



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Magíster en Ciencias Forestales

CARACTERIZACIÓN E INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA EN *Araucaria araucana* (MOLINA) K. KOCH.:
ESPECIE EN PELIGRO (EN)

POR

DANIELA CONSTANZA RIFFO AGURTO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Forestales para optar al Grado Académico de
Magister en Ciencias Forestales (MSc)

Profesor Guía: Manuel Sánchez Olate
Depto. de Silvicultura
Facultad de Ciencias Forestales

Noviembre 2024
CONCEPCIÓN – CHILE

© 2024

DANIELA CONSTANZA RIFFO AGURTO

Ninguna parte de esta memoria puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

CARACTERIZACIÓN E INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN
Araucaria araucana (MOLINA) K. KOCH.: ESPECIE EN PELIGRO (EN)

Comisión evaluadora:

Manuel Sánchez Olate (Profesor guía)
Ingeniero Forestal, Dr.

Neusa Steiner (Profesora co-guía)
Licenciada en Agronomía, Dra.

Darcy Ríos Leal (Comisión evaluación)
Prof. Biología y Química, Dra.

Marta Hernández de la Torre (Comisión evaluación)
Ingeniero Químico, Dra.

Roberto Ipinza Carmona (Comisión evaluación externa)
Ingeniero de Montes, Dr.

Director de Postgrado

Regis Teixeira Mendonça
Ingeniero Químico, Dr.

Director de Programa Magister

Vicente Hernández Castillo
Ingeniero en Maderas, Dr.

Decano Facultad de Ciencias Forestales

Eugenio Sanfuentes VS.
Ingeniero Forestal, Dr.

AGRADECIMIENTOS

A mi hija Amanda por apoyarme en este camino quién, con tan solo diez años, aceptó con la madurez de una mujer adulta las veces que mamá postergó algunas salidas familiares para dedicarse a esta investigación, admirarme y comprender que todos mis esfuerzos son dedicados a ti.

A mis padres por creer siempre en mis capacidades personales y profesionales, quienes siempre me motivaron a seguir adelante sin rendirme, quienes sin lugar a duda han permitido que hoy sea la profesional que soy.

A mis amigos Pilar, Karina, Yenny, Nico, Camila D., Luciano C., Luciano S., alumnos de ayudantías y mucha gente valiosa que conocí en la Universidad y el CB...que hoy forman parte de mi círculo cercano, por su confianza y palabras motivadoras.

A mis profesores Manuel Sánchez y Darcy Ríos por su apoyo, motivación y confianza en mí, desde el pregrado hasta el día de hoy.

A la Dra. Steiner, por su recibimiento, preocupación y apoyo durante todo mi magíster, quién hoy es una de las profesionales mujeres a quienes más admiro. Además, agradecer a todo su equipo de trabajo del Laboratorio de Fisiología Vegetal, del departamento de Botánica de la Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis; Principalmente a sus investigadoras Tassiane, Evelyn y Louisiana por sua ajuda com meus ensaios e lindas lembranças criadas durante minha estadia. Muito obrigada!

A Priscila Cartes, Pamela Quiroga, Jaime Espejo y Ester San Martín por confiar en mis capacidades para llevar adelante este proyecto, así como a todas las personas de Forestal Mininco Spa, quienes indirectamente influyeron en permitir desarrollar de manera exitosa este reto y gran aporte científico en nuestro país.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS	9
ABREVIACIONES	10
INTRODUCCION.....	11
1.1 Descripción y Ecología de <i>Araucaria araucana</i>	11
1.2 Pérdida del ecosistema de <i>A. araucana</i> en Chile.....	12
1.3 Conservación de <i>A. araucana</i>	15
1.4 Rol del cultivo de tejidos en la conservación <i>ex situ</i> de la especie	16
OBJETIVOS	19
4.1 General.....	19
4.2 Específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 Material vegetal.....	20
2.2 Inducción de cultivo embriogénico	20
2.3 Proliferación de cultivos embriogénicos	21
2.4 Desarrollo embrionario somático en pre-maduración y maduración	21
2.5 Extracción y cuantificación de Poliaminas endógenas	22
2.6 Análisis Morfocitoquímico	22
2.7 Análisis Estadístico	23
RESULTADOS	24
3.1 Descripción de la fenología de <i>A. araucana</i>	24
3.2 La etapa de desarrollo del embrión se ve afectada por la procedencia y afecta la inducción del cultivo embriogénico.....	26
3.3. Proliferación de cultivos embriogénicos y caracterización de masas proembriogénicas	28
3.4 Cuantificación de PEMs y determinación de PAs endógenas.....	31
3.5 Pre-maduración y maduración del cultivo embriogénico	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS.....	44
APENDICE.....	52

RESUMEN

Araucaria araucana, especie endémica de gran importancia ecológica y cultural en Chile, enfrenta amenazas atribuibles al cambio climático y la acción antrópica, principalmente la recolección indiscriminada de su semilla, provocando pérdida de su biodiversidad. A través de la embriogénesis somática buscamos masificar genotipos de interés y propagarlos con fines de conservación. Identificamos por primera vez las condiciones de cultivo que permiten desencadenar la inducción de proembriones somáticos a partir de semillas inmaduras de tres orígenes, costero (Villa Las Araucarias), Cordillera de Nahuelbuta (Trongol Alto) y Cordillera de los Andes (Malalcahuello). Los resultados muestran que existen líneas celulares embriogénicas con potencial embriogénico de las tres procedencias. La inducción de estructuras embriogénicas se obtiene a los 45 días cuando se utilizó el medio BM suplementado con NAA (11 μM), 6-BA (2,8 μM) y Kin (2,8 μM). Se evaluaron por 105 días siete líneas celulares donde, las mejores tasas de proliferación se obtuvieron en el medio MP1 suplementado con (5 μM 2,4-D + 2,8 μM 6-BA y Kin). Además de cuantificar PEM en estas líneas, se relacionó con los niveles de poliaminas libres y razón Put:Spd cuantificadas a partir de muestras de los tratamientos de proliferación, donde apreciamos una marcada diferencia en la bioquímica de las ECLs entre las tres líneas celulares evaluadas y el crecimiento gradual de los cultivos, lo que sugiere que la determinación de PAs es un eficiente marcador bioquímico para testear ECLs en *A. araucana*.

La transición de PEM a estadios embrionarios posteriores sigue bajo investigación; sin embargo, se observaron estadios tempranos de embriones somáticos en el tratamiento con maltosa (3% p/v), PEG 3350 (7% p/v) y ABA (34 y 68 μM). La maduración completa de los embriones somáticos aún está en proceso, lo que demuestra que la técnica puede ser una alternativa viable en la conservación de esta especie.

ABSTRACT

Araucaria araucana, an endemic species of great ecological and cultural importance in Chile, faces threats attributable to climate change and anthropic action, mainly the indiscriminate collection of its seed, causing loss of its biodiversity. Through somatic embryogenesis we seek to massify genotypes of interest and propagate them for conservation purposes. We identified for the first time the culture conditions that allow triggering the induction of somatic proembryos from immature seeds from three origins, coastal (Villa Las Araucarias), Cordillera de Nahuelbuta (Trongol Alto) and Cordillera de Los Andes (Malalcahuello). The results show that there are embryogenic cell lines with embryogenic potential from the three origins. The induction of embryogenic structures was obtained at 45 days when the BM medium supplemented with NAA (11 μM), 6-BA (2.8 μM) and Kin (2.8 μM) was used. Seven cell lines were evaluated for 105 days where the best proliferation rates were obtained in MP1 medium supplemented with (5 μM 2,4-D + 2.8 μM 6-BA and Kin). In addition to quantifying PEM in these lines, it was related to the levels of free polyamines and Put:Spd ratio quantified from samples of the proliferation treatments, where we appreciated a marked difference in the biochemistry of the ECLs between the three cell lines evaluated and the gradual growth of the cultures, which suggests that the determination of PAs is an efficient biochemical marker to test ECLs in *A. araucana*.

The transition from PEM to later embryonic stages remain under investigation; However, early stages of somatic embryos were observed in treatment with maltose (3% w/v), PEG 3350 (7% w/v) and ABA (34 and 68 μM). The complete maturation of the somatic embryos is still in process, which demonstrates that the technique can be a viable alternative in the conservation of this species.

INDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Desarrollo de estróbilos e individuo muestreado de *A. araucana*. (a) altura de la copa alcanzada para colecta y observación de estróbilos, (b) presencia de polen en estróbilo masculino plenamente desarrollado, (c) morfología inicial del estróbilo femenino inmaduro. 25
- **Figura 2.** Inducción de embriogénesis somática (a, b, c) y análisis citoquímico (d, e, f de masas proembrionarias en *A. araucana*. (a) embrión cigótico temprano (ZE), (b) Extrusión de cultivo embriogénico (ECS) del embrión cigótico (ZE), (c) proliferación de ECS, (d) masa proembriogénica II (PEM II) compuesta por grupos de ec rodeados por sc, (e) PEM I con un pequeño grupo de ec unido a uno o dos sc, (f) PEM II con grupos de ec conectados a sc. Célula embriogénica (ec) teñida con acetocarmín y célula tipo suspensor (sc) teñida con azul de Evans. 29
- **Figura 3.** Número (a) y peso fresco (b, c) de líneas celulares embriogénicas (ECLs) de *A. araucana* durante la etapa de proliferación. Las ECLs se subcultivaron en medio MP1 suplementado con (5 μ M 2,4-D + 2,8 μ M 6-BA y Kin) y MP2 suplementado con (23 μ M 2,4-D + 2,8 μ M 6-BA y Kin). L1-7: diferentes ECLs; procedencias MA: Malalcahuello, TR: Trongol y VA: Villa Las Araucarias..... 30
- **Figura 4.** Número de PEMs (a, c) y poliaminas libres (b, d) de líneas celulares embriogénicas (ECLs) de *A. araucana* al final de la proliferación cultivadas en medio MP1 (a,b) y MP2 (c,d) durante 105 días. L1-7: diferentes ECLs; procedencias MA: Malalcahuello, TR: Trongol y VA: Villa Las Araucarias; poliaminas libres (free PAs): Put: Putrescina, Spd: Espermidina, Spm: Espermina y Cad: Cadaverina. 32
- **Figura 5.** Cultivo embriogénico (ECS) de *A. Araucana* con embriones somáticos tempranos después de 63 días en tratamientos con PEG 3350 (7 % p/v), Maltosa (3 % p/v) y ABA 68 μ M. (a) ECS de Villa Araucarias (VA) con embriones tempranos en la superficie (marcados con asteriscos amarillos) (b) detalles de embriones somáticos tempranos, (c) tinción con safranina del embrión somático temprano obtenido. 35
- **Figura 6.** Representación esquemática del avance en la embriogénesis somática de *Araucaria araucana* y los principales factores evaluados. Etapas establecidas (inducción y proliferación). Parcialmente desarrollado (premaduración y maduración) y no evaluados (maduración completa y conversión). 52

INDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Calendario resumen de las fenofases presentes en estróbilos de *Araucaria araucana* durante el año 2020-2022 26
- **Tabla 2.** Etapas de desarrollo del embrión cigótico de semillas de *Araucaria araucana* recolectadas entre noviembre y enero en plantas de tres ubicaciones geográficas diferentes. 27
- **Tabla 3.** Efecto del estadio de embrión cigótico y los medios de cultivo sobre la inducción de la embriogénesis somática en *Araucaria araucana* de tres poblaciones diferentes... 28
- **Tabla 4.** Niveles endógenos de totales de poliaminas libres y relación Put:Spd total de ECLs de *A. araucana* L1, L2 y L6 en medios de cultivo MP1 y MP2. 33
- **Tabla 5.** Cultivos embriogénicos y análisis citoquímicos de PEMs de *A. araucana* en tratamientos de pre-maduración. Paso de pre-maduración 1 medio libre de PGRs, paso de pre-maduración 2 con maltosa (3 % p/v), PEG 3350 (7 % p/v) y ABA (34, 68 y 95 μ M). Los PEMs se tiñeron mediante doble coloración con acetocarmín y azul de Evans. 34

ABREVIACIONES

AAVC	= áreas de alto valor de conservación
ABA	= ácido abscísico
ANA	= ácido 1-naftalenacético (NAA)
BM	= Basal Medium (Gupta y Pullman, 1991)
DW	= contenido de peso fresco
Early	= estadio embrionario temprano
ec	= célula embriogénica
ECS	= Cultivos Embriogénicos
ECLs	= Líneas celulares embriogénicas
IC	= Medio de inducción (BM sin PGRs)
Kin	= Kinetina
Late	= estadio embrionario tardío
MA	= Malalcahuello
MIP	= Medio de Inducción (BM con 11 uM ANA y otros)
MIN	= Medio de Inducción (BM con 23 uM ANA y otros)
MP1	= Medio de Proliferación 1 (BM con 5 uM 2,4-D y otros)
MP2	= Medio de Proliferación 2 (BM con 23 uM 2,4-D y otros)
NaClO	= Hipoclorito de sodio
PEG	= Polietilenglicol 3350
PEMs	= Masas proembriogénicas (PEM)
PAs	= Poliaminas
Put	= Putrescina
PGRs	= Reguladores del crecimiento vegetal
Pro-embryo	= estadio embrionario de proembrión
p/v	= relación peso/volumen (w/v)
sc	= células suspensoras
SE	= Embriogénesis Somática
Spd	= Espermidina
Spm	= Espermina
TR	= Trongol
VA	= Villa Araucarias
v/v	= relación volumen/volumen
ZE	= Embrión cigótico
2,4-D	= ácido 2,4-diclorofenoxiacético
6-BA	= 6-bencil aminopurina

INTRODUCCION

1.1 Descripción y Ecología de *Araucaria araucana*

Conocida popularmente como árbol Mapuche, Pehuén, araucaria o piñonero, *Araucaria araucana* es una especie arbórea muy longeva de crecimiento lento con edades calculadas de hasta 1.300 años y alcanzando a medir más de 50 metros de altura. Posee un tronco recto con diámetros que llegan a 2,5 metros (Aguilera-Betti et al., 2017; Donoso, 1993; González et al., 2006), con corteza gruesa, resquebrajada y ramas con hojas escamosas, que, cuando el árbol es adulto, se ubican sólo en una copa ancha y piramidal. Sus flores se ubican al extremo de las ramas, siendo las masculinas, amentos cilíndricos que forman conos de color café que generan una gran cantidad de polen que es dispersado por el viento; mientras que las flores femeninas, están estructuradas en conos lignificados que permanecen dos años en la rama, en cuya base se desarrollan entre 120 a 200 semillas por cono, pero su producción es variable de un año a otro. Desde la formación de los conos femeninos hasta la diseminación de las semillas, el ciclo reproductivo de *A. araucana* dura dos años aproximadamente, pudiendo aumentar el tiempo de acuerdo con las condiciones ambientales del sitio donde se desarrolla, por lo que es posible encontrar en un mismo individuo, conos maduros de mayor tamaño de color castaño e inmaduros de color verde (Lizana & Antonio, 2009). Sus semillas denominadas “piñones”, son sensibles a la desecación y recalcitrantes al almacenamiento a largo plazo, por lo que su conservación ha sido todo un desafío. Además, dado que presentan un alto contenido de almidón y minerales como calcio y hierro, son usadas localmente como un producto nutricional (Min. Medio Ambiente, 2002).

Araucaria araucana es una especie endémica presente sólo en los bosques subantárticos lluvioso-templados del extremo sur de Sudamérica. La mayor parte de su población mundial se encuentra en Chile con una superficie estimada de aproximadamente 254.000 hectáreas (Echeverría et al., 2004); distribuidas en la Cordillera de los Andes y en la cordillera de Nahuelbuta, ubicándose desde la Región del Biobío hasta la vertiente sur del Volcán Villarrica en la Región de los Lagos (Min. Medio Ambiente, 2002; Zapata & Schafer, 2019).

Desde los inicios de la colonización en Chile (alrededor de 1550), los bosques de *A. araucana* han sido objeto de aprovechamientos madereros, incendios forestales, desmontes para habilitación de terrenos agrícolas, sustitución por plantaciones de especies exóticas y extracción inadecuada de sus frutos, existiendo en la actualidad sólo 52% de los bosques que hubo antes de la colonización europea (Cortés, 2003; Lara et al., 1999).

Los piñones son un componente importante de la dieta familiar de las comunidades que viven en torno a los bosques de araucaria, debido a su alto contenido de carbohidratos, sirviendo además como fuente de ingresos monetarios (Cortés et al., 2019; Tacón et al., 2006). Además, la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2001) prohíbe el comercio internacional de la araucaria, incluida su semilla, por lo que el mercado de este producto es de ámbito estrictamente nacional.

Debido a que utilizan sus recursos, la comunidad mapuche-pehuenche ha acumulado la mayor parte del conocimiento ecológico sobre el bosque de *A. araucana* y lo transmite de generación en generación (Donoso et al., 2014; Herrmann, 2005).

1.2 Pérdida del ecosistema de *A. araucana* en Chile

A pesar de que la araucaria tiene alta prioridad de conservación a nivel nacional e internacional por su valor ecológico, ornamental, paisajístico y cultural (Veblen et al., 1995), la especie enfrenta diversas amenazas de origen antrópico, como la ganadería, la recolección excesiva de semillas y de leña; la invasión de pinos exóticos naturalizados en zonas cercanas, mamíferos invasores o sucesos de incendios severos (Rechene et al., 2003; Sanguinetti, 2008; Sanguinetti & Kitzberger, 2010; Shepherd & Ditgen, 2005; Zamorano-Elgueta et al., 2012). Todo lo anterior, genera pérdidas en la biodiversidad original de los bosques de *A. araucana* como, por ejemplo, una drástica disminución de la abundancia y diversidad de especies de roedores nativos que se alimentan de piñones en los bosques más impactados y que son vectores naturales que ayudan en la dispersión (Min. Medio Ambiente, 2002).

Actualmente, se encuentra prohibida su corta; sin embargo, esto no ha frenado su degradación (Donoso et al., 2010). Las presiones actuales del mercado y futuras demandas de sus semillas desde los centros urbanos pueden generar escenarios negativos en tema de

conservación con incrementos significativos en los niveles de recolección en comparación con la productividad de los bosques de *A. araucana* (Sanguinetti, 2014). El gran peligro que corren los bosques de araucaria en la actualidad es la excesiva cosecha de piñones y la sobrecarga animal, que han ido incrementando junto al aumento de la población y la valoración económica del piñón; originando una fuerte presión por la recolección y el consumo de sus semillas. Dicho esto, la regeneración de *A. araucana* está relacionada con los niveles de recolección y consumo; y actualmente, no hay mecanismos que permitan regular la cosecha y depredación de piñones, en función de la producción (Donoso et al., 2010). Del mismo modo, comunidades pehuenche y colonos han reconocido que podría estar ocurriendo una sobre demanda del piñón en distintas localidades, aunque no ha sido evaluada empíricamente, es posible ver a personas cosechando piñones sin regulación alguna (Cortés et al., 2019).

Por otro lado, durante la temporada estival 2001-2002 ocurrió uno de los mayores incendios de los últimos 50 años en la Región de la Araucanía, donde en la cordillera andina de las provincias de Malleco y Cautín, fueron consumidas por el fuego cerca de 20.000 hectáreas de bosques, de las cuales un 30% correspondió a bosques mixtos de *Araucaria-Nothofagus*, incluyendo tanto áreas silvestres protegidas como privadas (CONAF, 2002). Estos grandes incendios provocaron una gran conmoción pública y política considerando la importancia ecológica y cultural de *A. araucana* (Echeverría, 2002). Estos siniestros han sido asociados a eventos naturales, como El Niño Oscilación del Sur, y a la influencia humana (González & Veblen, 2007). En los últimos 10 años, Chile ha experimentado cambios drásticos a nivel del clima, reduciendo las precipitaciones anuales y aumentando las estaciones cálidas generando mayor recurrencia de incendios forestales, disminución importante de agua en ríos, lagos y embalses. Entre los años 2010 y 2015 ocurrió la mayor sequía registrada hasta ahora en Chile, la cual ha afectado gravemente diferentes especies nativas del centro-sur de Chile (CONAF, 2017; Valderrama et al., 2018).

Además, el año 2016 se detectó una enfermedad fúngica antes desconocida en araucaria con síntomas como secado de hojas y coloración rojo intenso hacia la copa que provocan un deterioro gradual del árbol que conduce a la muerte (Balocchi et al., 2021). A partir de esto se han realizado diversos estudios desarrollando diferentes hipótesis que van desde el cambio

climático, régimen de hambre provocado por sequía prolongada o problemas en el genoma de *Araucaria*, entre otros (Besoain et al., 2017; CONAF, 2017; Riess et al., 2016; Saavedra & Willhite, 2017; Vélez et al., 2018). el estado de conservación de la especie es preocupante y se encuentra en una alta prioridad de conservación en los comités nacionales e internacionales de especies raras e icónicas. plantas del mundo (IUCN, 2023; Veblen et al., 1995).

Actualmente, *A. araucana* se encuentra declarada Monumento Natural de Chile desde 1990, y en 2017, en el proceso de reclasificación de especies silvestres, el Ministerio del Medio Ambiente señaló que las poblaciones de este milenar árbol en la Cordillera de la Costa cambian de “Vulnerable” a “En peligro de extinción” (Premoli et al., 2013) debido a la tala extensiva y los incendios provocados por el ser humano, pero no así para aquellas poblaciones que se ubican en la Cordillera de los Andes (Aguilera-Betti et al., 2017). A partir de entonces, se prohíbe su corta con fines comerciales y la exportación de sus productos derivados y, además, la especie se encuentra protegida oficialmente bajo la Convención sobre Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (Min. Agricultura, 2010). Éste constituye un significativo paso para avanzar en la protección de una especie milenaria y emblemática para Chile y en contribuir a su proceso de restauración ecológica y resguardo a través de la educación ambiental.

Aun así, según indica el Min. Medio Ambiente (2002), del área total, (254 mil hectáreas de araucarias), sólo un 48% está en áreas protegidas, y como especie primitiva le cuesta más competir con la flora moderna a la hora de repoblar, y aún más en terrenos estériles por efecto del fuego que ha afectado a la región de La Araucanía.

En conclusión, estos ecosistemas continúan siendo amenazados por explotación forestal, colecta de semillas sin marco regulatorio, incendios forestales, daños sanitarios, el uso extensivo del ganado y por las amenazas potenciales planteadas por el cambio climático como las temporadas de frío, nieve y sequía. Estos factores constituyen los principales desafíos para la conservación de *A. araucana* (Aguilera-Betti et al., 2017).

1.3 Conservación de *A. araucana*

La implementación de áreas de protección para el manejo de la conservación y el conocimiento de los ecosistemas afectados ha sido la principal medida tomada en Chile para contrarrestar el problema de la degradación de los ecosistemas de *A. araucana*, sin embargo, no se han desarrollado tecnologías con el fin de proteger y encontrar otros medios de conservación. En este contexto, es de relevancia la multiplicación de germoplasma con alta variabilidad genética para aumentar las áreas cubiertas con esta especie, pero siempre manteniendo la representatividad de las procedencias. Así, existen iniciativas de colecta de semillas de diferentes poblaciones o zonas genéticas y la subsecuente producción de plantas para repoblar áreas importantes del ecosistema araucaria. Una experiencia valiosa es el acuerdo entre empresas CMPC y el Instituto Forestal (INFOR), donde se incluye la producción de alrededor de 35.000 plantas que representarán la mayor parte de la diversidad genética de *A. araucana* a través de lo que se conoce como “Migración Asistida” o Conservación *ex situ* (INFOR 2018). Acciones similares se llevan a cabo en varios viveros interesados en los aspectos ecológicos ambientales y de conservación de esta valiosa especie, acciones que por lo general se enfocan en la aplicación de producción de plantas vía semillas, produciéndose en el corto plazo una alta demanda por plantas, debido a la escasa producción anual de las mismas.

En la distribución más austral de esta especie ubicada en el sector de Villa Las Araucarias, se ha creado el “Bien Nacional Protegido Las Araucarias” con la función de conservación y sustentabilidad de los recursos naturales existentes en el lugar, como una forma de resguardar el patrimonio de los distintos agentes y presiones responsables de la fragmentación de los bosques que ha obligado a las araucarias a desplazarse, adaptarse y soportar grandes oscilaciones térmicas, suelos delgados y restricciones hídricas y nutricionales (Donoso et al., 2008). Dicha área de protección está bajo el resguardo de la Universidad de La Frontera desde fines del año 2013.

La excepcional importancia ya descrita para *A. araucana*, así como su condición de especie protegida, no son un impedimento para su continua exposición a presiones intensas y diversas. Sin lugar a duda es necesario desarrollar estrategias para su conservación que

incorporen prácticas *in situ* y *ex situ*, incluyendo la restauración de poblaciones degradadas (Bekessy et al., 2004).

Los programas de conservación de plantas en el mundo se basan principalmente en estrategias *in situ* y *ex situ* (Convention on Biological Diversity, 1992). Ya se sabe que la conservación *in situ* es apropiada para especies con semillas recalcitrantes. Sin embargo, muchas plantas en el mundo son cada vez más raras y vulnerables, en peligro de extinción o extintas. Estrategias de conservación *ex situ* se han vuelto urgentes y ampliamente utilizadas para la preservación de la diversidad genética de plantas raras, como es el caso de *A. araucana*, centrando su foco en multiplicar y conservar germoplasma de este tipo de plantas (Ruiz et al., 2007).

1.4 Rol del cultivo de tejidos en la conservación *ex situ* de la especie

Teniendo en cuenta que la mayoría de las especies de árboles forestales o gimnospermas, con semillas recalcitrantes no pueden almacenarse a largo plazo en bancos de semillas convencionales, en particular, resultan ser mucho más difíciles de reproducir mediante cultivo de tejidos. En lo que respecta para *A. araucana* existen escasos estudios que incorporen técnicas de micropropagación. Jerez (2000), partió desde la inducción de embriones cigóticos maduros en cultivo *in vitro* para masificación de germoplasma, a través de germinación directa en medio de cultivo, aquí se demostró que es posible propagar esta especie a pequeña escala, pero los explantes utilizados se oxidan o contaminan muy fácilmente.

Por su otra parte, la embriogénesis somática (SE) en coníferas es un proceso de múltiples pasos que comienza con la inducción de masas proembriogénicas y sigue por el desarrollo temprano y tardío del embrión somático, la maduración, la desecación y la planta (Steiner et al., 2016). El primer paso de inducción es uno de los principales desafíos para el establecimiento de protocolos de SE en especies leñosas y generalmente se utilizan explantes juveniles como embriones cigóticos inmaduros. En plantas silvestres raras y poco estudiadas, identificar el momento adecuado para recolectar muestras y el explante adecuado suele ser difícil y requiere un seguimiento constante por parte de expertos en esta materia.

Durante las últimas décadas se ha intentado determinar los factores que controlan la SE, aceptando que la selección del explante inicial apropiado y la elección de los reguladores del crecimiento vegetal (PGRs) incorporados en el medio de inducción, como factores importantes para la inducción exitosa de masas proembriogénicas (PEM) (Corredoira et al., 2019; Fehér, 2015; Gaj, 2004). En general, se acepta que hay dos estímulos que inducen la reprogramación de células vegetales diferenciadas en células competentes: (i) estrés fuerte y (ii) cambios en los niveles celulares internos y/o externos de los reguladores del crecimiento (Feher, 2008; Su et al., 2021). Se reconoce que altas dosis de auxina, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 1-naftalenacético (NAA), ácido indol-3-acético (IAA) y 4-amino-3,5,6- El ácido tricloro-2-piridincarboxílico (picloram) (George et al., 2008) con o sin citoquininas como 6-bencilaminopurina (6-BA) y kinetina (Kin) en concentraciones bajas son cruciales como desencadenante inicial en la adquisición de competencia celular. Primero promueven la desdiferenciación seguida de la diferenciación embriogénica (Wójcik et al., 2020). Además de las auxinas, el genotipo y la fuente del explante, su etapa de desarrollo bien definida, parecen ser los factores más importantes que determinan la embriogénesis (Ballester et al., 2016; Corredoira et al., 2019; Merkle, 1995).

La morfología de los PEM durante los pasos de inducción y multiplicación del protocolo ha sido crucial para el desarrollo y maduración normal y progresivo de los embriones somáticos (Goeten et al., 2020; Steiner et al., 2016). También se ha informado que la inducción de SE depende del genotipo y esto podría requerir diferentes enfoques en términos de composición del medio de cultivo para poder tener un alto número de plantas con capacidad de respuesta que permita capturar la diversidad genética (Stefenon et al., 2009). Hasta donde sabemos, no hay informes previos sobre la SE de *A. araucana*, pero sí de otras coníferas raras como *A. angustifolia* (Guerra et al., 2000; Silveira et al., 2002), *Torreya taxifolia* (Ma et al., 2012) y *Cedrus libani* (Khuri et al., 2000). Y en especies comerciales como *P. abies* (Von Arnold et al., 1995), *P. menziesii* (Gupta & Pullman, 1991), *P. taeda* (Gupta et al., 1993; Pullman & Webb, 1994).

Por otro lado, se sabe que ciertas moléculas como las poliaminas (PAs), han sido consideradas candidatas como marcadores asociados con etapas de desarrollo junto con los

aminoácidos, al ser fuente importante de nitrógeno en las plantas, puesto que participan en su desarrollo y sus niveles están asociados con etapas específicas de embriogénesis cigótica y somática (de Oliveira et al., 2019). De acuerdo con lo anterior determinaciones bioquímicas de este tipo de moléculas pueden ser útiles en los procesos de diferenciación celular, pudiendo probarse un gran número de árboles madre como fuentes de explante y realizar la selección de aquellos con mayor potencial embriogénico, además de promover el proceso de inducción de embriogénesis somática en medios de cultivo enriquecidos con estos compuestos, mejorando los protocolos existentes. (dos Santos *et al.*, 2002; dos Santos *et al.*, 2016; de Oliveira *et al.*, 2019).

Con base en estudios previos de SE de coníferas, nuestra hipótesis es que la inducción de SE en *A. araucana* es posible utilizando explantes juveniles en un medio de cultivo con PGRs. Para probarlo evaluamos por primera vez el estadio óptimo del embrión cigótico como fuente de explante inicial para inducir cultivos embriogénicos a partir de árboles de tres poblaciones de plantas silvestres Trongol Alto, Villa Las Araucarias y Malalcahuello. Investigamos los efectos del medio de cultivo utilizando (i) dos auxinas (NAA, 2,4-D) y (ii) la duración de la exposición a auxinas/citoquininas en la inducción y proliferación de cultivos embriogénicos (ECS) y en la morfología de embriones. Se evaluó el progreso del desarrollo embrionario somático en un tratamiento de pre-maduración utilizando maltosa, PEG 3350 y ABA.

OBJETIVOS

4.1 General

Inducir embriogénesis somática en distintas concentraciones auxínicas a partir de embriones cigóticos de semillas en desarrollo de *Araucaria araucana* obtenidas de tres procedencias.

4.2 Específicos

- Relacionar el estadio de desarrollo del embrión cigótico de las distintas procedencias con la inducción de cultivos potencialmente embriogénicos en *A. araucana*.
- Evaluar medio de cultivo, concentración auxínica y el efecto de los subcultivos que inducen exitosamente la embriogénesis somática en *A. araucana*.
- Determinar un marcador bioquímico en la proliferación de cultivos embriogénicos que permita definir líneas competentes que avancen a etapas de maduración temprana de embriones somáticos en *A. araucana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para la caracterización fenológica de la especie, se recolectaron estróbilos masculinos y femeninos mensualmente desde septiembre de 2020 durante 15 meses hasta en una población de árboles silvestres de polinización libre de tres áreas geográficas (procedencias) diferentes del territorio chileno. El primero fue en Trongol Alto (TR) (Cordillera de Nahuelbuta, Región del Bio-Bío, 1000 m de altitud, 37°37' de latitud sur y 73° 07' de longitud oeste). El segundo fue en Villa Las Araucarias (VA) (Carahue, Región de la Araucanía, 651 m de altitud, 38°29' de latitud sur y 73°14' de longitud oeste). La tercera población se localizó en Malalcahuello (MA) (Cordillera de los Andes, Región de la Araucanía, 1300 m de altitud, 38°26' de latitud sur y 71°31' de longitud oeste). Para la inducción de embriogénesis somática se recolectaron estróbilos femeninos con semillas cada 15 días en las tres ubicaciones desde octubre de 2021 hasta enero de 2022.

2.2 Inducción de cultivo embriogénico

Se individualizaron semillas de conos de tres genotipos diferentes, uno de cada procedencia, y se remojaron en solución de fungicida (Captan y Benomilo 0,1% p/v) durante 10 min. Después las semillas se transfirieron a NaClO (10% v/v) y se mantuvieron en agitación durante 5 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril. En el flujo laminar, utilizando un estereoscópico Leica modelo EZ4 W, se escindieron los megagametofitos de las semillas y se colocaron seis embriones cigóticos en placas Petri individuales (90 x 15 mm), con cada medio de inducción. Se utilizó el medio basal BM descrito por Pullman y Gupta (Pullman & Gupta, 1991) y modificado por Pullman (Pullman, 2018), suplementado con caseína hidrolizada (0,05% p/v), mioinositol (2% p/v) y maltosa (1,5% p/v), 6-BA (2,8 μ M) y Kin (2,8 μ M). Se evaluaron dos auxinas diferentes y los medios de inducción se denominaron MIP cuando se agregó NAA (11 μ M), MIN para la adición de 2,4-D (23 μ M) y medio IC sin RCV. A todos los medios se les ajustó el pH a 5,8 antes de introducirlos en la autoclave (1 atm) durante 15 min. Se utilizó Gelrite® (0,2% p/v). Se incubaron placas de Petri con embriones cigóticos inmaduros en la oscuridad a 25 ± 2 °C durante 45 días. Un total de 1296 embriones cigóticos fueron aislados e inducidos durante las ocho

colectas de semillas realizadas. Se evaluó el porcentaje de embriones cigóticos capaces de presentar inducción de cultivo embriogénico friable.

2.3 Proliferación de cultivos embriogénicos

Los cultivos embriogénicos que alcanzaron un tamaño de aproximadamente 10 mm de diámetro en la etapa de inducción se transfirieron al medio de proliferación y se mantuvieron en oscuridad a 25 ± 2 °C, con un subcultivo cada veintiún días. El medio de cultivo de proliferación (MP) fue el mismo medio basal de BM utilizado en el paso de inducción, pero solo se modificaron los RCV. El medio MP1 se complementó con 2,4-D (5 μ M), 6-BA y Kin (2 μ M) y MP2 con 2,4-D (23 μ M), 6-BA y Kin (2 μ M). En ambos casos se utilizó sacarosa (3 % p/v) y Gelrite® (0,25 % p/v). Los cultivos embriogénicos de embriones cigóticos individuales se subcultivaron por separado y se consideraron como una línea celular individual. En la etapa de proliferación no existió medio libre de PGRs, ya que, no todas las líneas celulares inducidas y mantenidas sin éstos pudieron proliferar. Las líneas celulares procedentes del medio libre de PGRs se subcultivaron en medio MP1 y MP2, donde finalmente algunas de ellas mostraron proliferación.

Para evaluar la tasa de crecimiento de la línea celular, se midió el aumento del peso fresco relativo cada veintiún días, durante cinco subcultivos sucesivos. La tasa de crecimiento se realizó utilizando las siete mejores líneas celulares, que incluyen las tres procedencias diferentes. La calidad de las líneas celulares se validó mediante tinciones citoquímicas permanentes utilizando la metodología descrita en el punto 2.6, además se realizó la cuantificación y caracterización de PEMs de todas estas líneas de acuerdo con lo descrito por (Filonova et al., 2000).

2.4 Desarrollo embrionario somático en pre-maduración y maduración

Se probó la LCE L1 proveniente de semillas VA con alta proliferación y presencia de PEM en tratamientos de pre-maduración y maduración. En la pre-maduración, la LCE L1 se subcultivó en medio BM libre de PGRs durante 42 días. Después, para la maduración, se subcultivó en medio de cultivo BM suplementado con maltosa (3 % p/v), mioinositol (2 % p/v), polietilenglicol (PEG 3350) (7 % p/v) y ABA 34, 68 y 95 μ M. En cada tratamiento con ABA se utilizaron un total de doce cultivos embriogénicos de aproximadamente 0,2 g cada uno. La LCE se subcultivó cada veintiún días en medio fresco y se mantuvo durante 63 días en la oscuridad a 25 ± 2 °C.

2.5 Extracción y cuantificación de Poliaminas endógenas

El contenido de PAs se determinó para siete líneas celulares previamente seleccionadas en la etapa de proliferación cultivadas en los medios MP1 y MP2. Las extracciones y cuantificación de los PAs libres se realizó como describen Steiner et al. (2007), con modificaciones. Tres muestras (300 mg de peso seco) de ECS de cada ECLs se maceraron con 1,6 mL de ácido perclórico al 5% (v/v). Después de la extracción, se dansilaron 40 μ L de muestra con 100 μ L de cloruro de dansilo (5 mg mL⁻¹) en acetona 1,8 mM, 50 μ L de solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y 20 μ L de 1,7-diaminoheptano (DAH) 0,05 mM. La identificación y cuantificación de PAs se realizó en HPLC con una columna C18 de fase reversa de 5 μ m (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Como disolvente se utilizó: acetonitrilo al 10% en agua, pH 3,5 ajustado con HCl 1N (disolvente A) y acetonitrilo absoluto (disolvente B). Las áreas de los picos y los tiempos de retención de cada PAs se evaluaron en comparación con los estándares (Putrescina (Put), espermidina (Spd) y espermina (Spm)) en concentraciones conocidas.

2.6 Análisis Morfocitoquímico

Las masas proembriónicas (PEM) y morfología embrionaria de los diferentes ECS en cada procedencia se evaluó mediante tinción doble, donde una muestra de células pequeñas, con acetocarmín, seguido de azul de Evans, como lo describieron Gupta and Durzan (1985) y Steiner et al. (2016). Se tomaron imágenes de los PEM utilizando un microscopio Olympus BX 51 asociado a una cámara de captura de imágenes (software del sistema Image focus4). Este análisis se realizó en todos los ECS desde la inducción y también cada dos meses en las ECLs en la etapa de proliferación. Cada vez se evaluaron al menos tres muestras de células de cada ECLs. La morfología y el estadio de desarrollo de los embriones cigóticos se evaluaron mediante observación y registro fotográfico respectivo con un estereoscópico Leica modelo EZ4 W.

2.7 Análisis Estadístico

Todos los tratamientos se realizaron por triplicado, los datos fueron evaluados mediante ANOVA ($p \leq 0,05$) y los gráficos se procesaron en el programa Sigma Plot. Para la frecuencia de activación celular (Inducción), se transformaron los datos por medio de Dist. Poisson incorporando efectos aleatorios en un GLM mediante software estadístico R studio; La significación estadística para la comparación de los tratamientos de PGRs (proliferación) en los subcultivos de biomasa fresca se determinó mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) y la comparación de PAs libres totales de las diferentes procedencias de acuerdo con la Prueba T Student.

RESULTADOS

3.1 Descripción de la fenología de *A. araucana*

A partir de observaciones en terreno y en laboratorio, se desarrolló una descripción desde identificación de los estróbilos a nivel de copa (figura 1a) y todos los cambios anatómicos visibles en cada etapa. En primer lugar, respecto del estróbilo masculino, éste es observable a finales de diciembre-enero, están ubicados en extremos de las ramas agrupados de a tres o cuatro. Son de tipo ovoide y se van tornando cónicos a medida que van madurando, pasando de un verde claro a más oscuro. A partir de septiembre su tamaño es aproximadamente el doble y su coloración comienza a mudar a un color café, en esta etapa además se encuentran más separados y su posición al eje de la rama experimenta un giro de 45° a 90°, notoriamente observable a mediados de octubre, justo cuando se puede apreciar dehiscencia del polen por acción del viento (Figura 1b). Post emisión del polen, el estróbilo cambia a un color café rojizo y experimenta una curvatura en su forma, probablemente por pérdida de humedad, además este puede permanecer adherido por un periodo prolongado en la rama (incluso hasta la primavera siguiente). Por otra parte, el estróbilo femenino, es observable desde principios de octubre a noviembre, se cree que para entonces los granos de polen ya se han depositado en las brácteas del estróbilo donde quedan adheridos. La fecundación propiamente tal está dada por la emisión del tubo polínico, fenofase que tiene lugar en la primavera siguiente. De acuerdo con su anatomía se pueden verificar cambios en su aspecto desde formas geométricas pentagonales (figura 1c) a curvilíneas. Estos abren sus carpelos facilitando el acceso de los granos de polen, los que se cierran cuando ocurre la fecundación (alrededor de un año post polinización).



Figura 1. Desarrollo de estróbilos e individuo muestreado de *A. araucana*. (a) altura de la copa alcanzada para colecta y observación de estróbilos, (b) presencia de polen en estróbilo masculino plenamente desarrollado, (c) morfología inicial del estróbilo femenino inmaduro.

La tabla 1 entrega el resumen de las fenofases presentes en *A. araucana* entre los años de estudio 2020 a 2022, entregándonos información relevante para la extracción de material vegetal antes de ser introducido en laboratorio, este calendario no es tan estricto, sobre todo en localidades más extremas como la Cordillera de Los Andes, la cual presenta un desfase de una o dos semanas, donde es muy probable que factores de temperatura como horas de frío, gatillen los mecanismos de dispersión y maduración en esta especie. Además, el periodo o “ventana” óptima para la fecundación, aparece como primavera tardía durante finales de octubre en adelante, lo que permite en este periodo registrar con mayor frecuencia el nivel de avance para el desarrollo del embrión cigótico, el cual se utilizó como explante inicial para iniciar los cultivos embriogénicos en esta investigación.

Tabla 1. Calendario resumen de las fenofases presentes en estróbilos de *Araucaria araucana* durante el año 2020-2022

Ciclo Reproductivo <i>A. araucana</i> 2021	Estróbilos inmaduros 2021												Estróbilos maduros 2021												
	2020			2021									2022												
	Sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun	jul	Ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may				
Estr. Masculinos visibles				[Barra amarilla]																					
Estr. Femeninos visibles	[Barra verde]			[Barra verde]																					
Liberación Polen	[Barra azul]												[Barra azul]												
Fecundación													[Barra naranja]												
Maduración semilla													[Barra gris]												
Nº Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20					

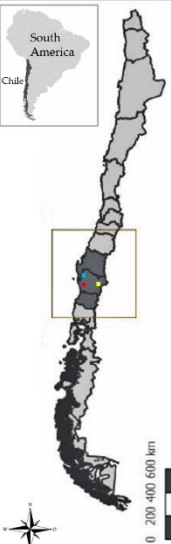
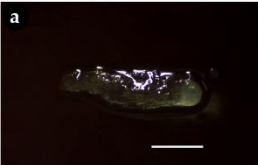
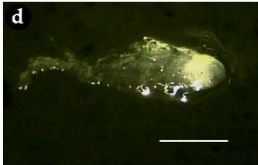
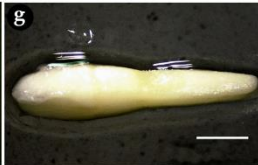
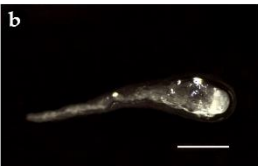

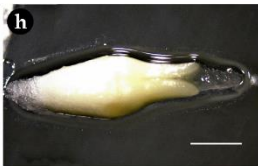
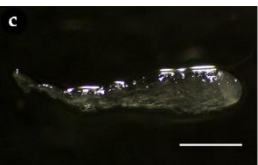
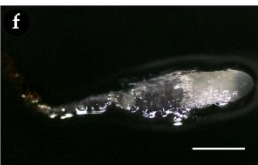
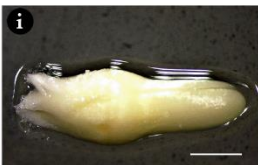
3.2 La etapa de desarrollo del embrión se ve afectada por la procedencia y afecta la inducción del cultivo embriogénico

Se aislaron megagametofitos de semillas recolectadas a partir de octubre de 2021, donde no se identificó la etapa de embrión cigótico, por lo cual se indujeron directamente en los medios de cultivo, sin embargo, no mostraron ninguna inducción de cultivo embriogénico (datos no mostrados). A noviembre de 2021, todas las semillas de las procedencias (MA, VA y TR) presentan la mayor parte de embriones cigóticos en etapa proembrionaria. Esta etapa se caracteriza por la presencia de un largo sistema de células suspensoras unidas a la célula embrionaria en la región apical (Tabla 2 a, b, c). En diciembre de 2021, se observó la progresión en el desarrollo del embrión cigótico y todas las semillas de las procedencias muestran una etapa embrionaria cigótica temprana (Tabla 2 d, e, f). Las primeras etapas de los embriones se caracterizan por el aumento del ápice embrionario y el inicio de la regresión de las células suspensoras. Finalmente, se observó una etapa de embrión cigótico tardío en las semillas de todas las procedencias a enero de 2022, pero con una ligera diferencia en la etapa de desarrollo embrionario. Los embriones de semillas MA muestran cotiledones de mayor tamaño en comparación con los embriones de semillas VA y TR (Tabla 2 g, h, i). En la etapa tardía, las células suspensoras ya no existen y el embrión cigótico muestra eje, meristemas y cotiledones. En todas las procedencias estudiadas y momentos de recolección, se observó, que dentro de un mismo estróbilo siempre había una ligera diferencia de grado entre el estadio de desarrollo

embrionario, lo que hizo que el proceso inicial de selección de explante fuera una búsqueda minuciosa.

La etapa de embrión cigótico afecta la inducción de la embriogénesis somática en *A. araucana* para las tres procedencias. Los embriones cigóticos tempranos muestran el porcentaje de inducción más alto y significativo en comparación con el proembrión y la etapa tardía que tenían casi cero. La combinación de etapa de embrión temprano cigótico y cultivo en medio MIP promueve la mejor tasa de inducción de cultivo embriogénico para las tres procedencias de *A. Araucana* (Tabla 3). A pesar de esto, fue posible la inducción de cultivo embriogénico en medios MIN e IC a baja frecuencia para las tres poblaciones cuando se utilizó el estadio embrionario correcto.

Tabla 2. Etapas de desarrollo del embrión cigótico de semillas de *Araucaria araucana* recolectadas entre noviembre y enero en plantas de tres ubicaciones geográficas diferentes.

S. America and Chile geographical location	Plant population provenance	Zygotic embryo development stage (months)		
		Pro-embryo (November)	Early (December)	Late (January)
	Malalcahuello ■ 38°26' S – 71°31' W			
	Trongol ■ 37°37' S – 73°07' W			
	Villa Las Araucarias ■ 38°29' S – 73°14' W			

*Scale: 1,0 mm

Tabla 3. Efecto del estadio de embrión cigótico y los medios de cultivo sobre la inducción de la embriogénesis somática en *Araucaria araucana* de tres poblaciones diferentes.

Plant population provenance	Pro-embryo	Early	Late	Pro-embryo	Early	Late	Pro-embryo	Early	Late
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
	IC			MIP			MIN		
Malalca-huello	6 Bb*	3 Cb	0 Cc	0 Cc	39 Aa	0 Cc	0 Cc	3 Cb	0 Cc
Trongol	0 Cc	17 Bb	0 Cc	0 Cc	22 Ba	0 Cc	0 Cc	19 Ba	0 Cc
Villa Las Araucarias	0 Cc	11 Bb	0 Cc	0 Cc	75 Aa	0 Cc	0 Cc	17 Bb	0 Cc

*Comparison capital letter (A: columns) and lower case (a: row).
Poisson distribution in GLM model incorporating random effects

3.3. Proliferación de cultivos embriogénicos y caracterización de masas proembriogénicas

La inducción de cultivos embriogénicos se observó después de 45 días y se caracterizó por la extrusión de un grupo de células friables y translúcidas de la región apical del embrión cigótico (ZE) (Figura 2 a, b). La proliferación se observó por el aumento del tamaño de los cultivos embriogénicos (Figura 2c). Mediante análisis citoquímico se observó que los cultivos embriogénicos (ECS) estaban compuestos por masas proembriogénicas (PEMs) lo que muestra dos tipos de células: células embriogénicas (ec) y células suspensoras (sc). Las células embriogénicas teñidas de rojo son redondas y muestran un citoplasma denso. Las células suspensoras están alargadas y vacuoladas con permeabilidad al azul de Evans (Figura 2e). Se observó cierto grado de organización de los PEM y el PEM I muestra pequeños grupos de ec vinculados a uno o dos sc. PEM II muestra agregados similares a PEM I pero con más de una célula vacuolizada. En PEM III se observó un aumento en el grupo de ec y sc, los cuales proliferan sin polaridad (Figura 2d-f).

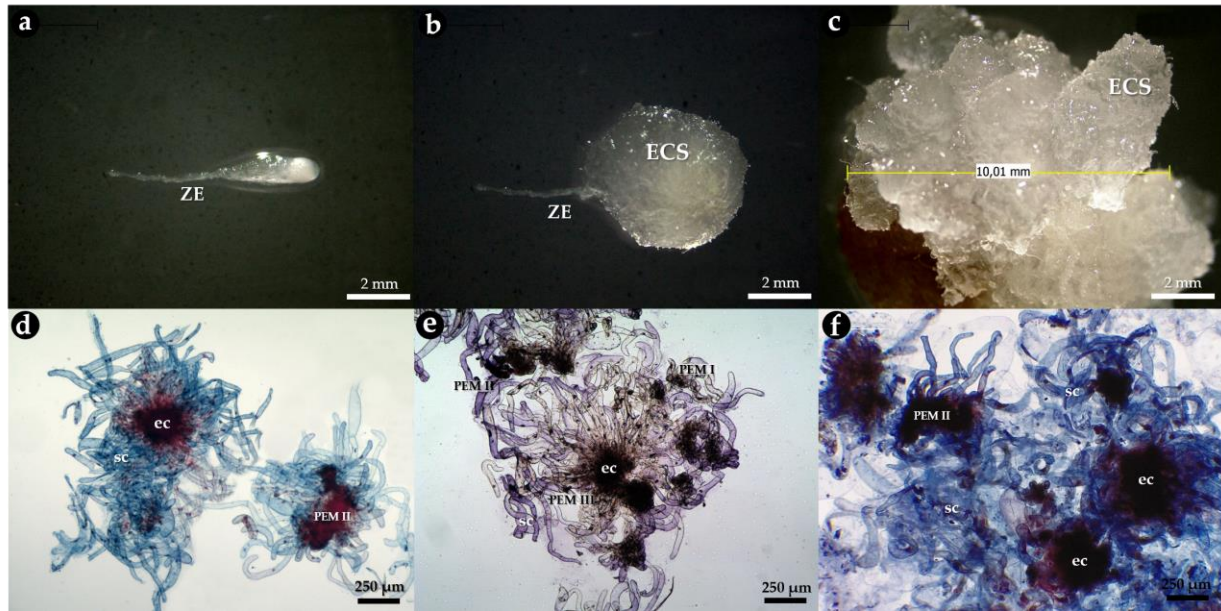


Figura 2. Inducción de embriogénesis somática (a, b, c) y análisis citoquímico (d, e, f de masas proembrionarias en *A. araucana*. (a) embrión cigótico temprano (ZE), (b) Extrusión de cultivo embriogénico (ECS) del embrión cigótico (ZE), (c) proliferación de ECS, (d) masa proembrionaria II (PEM II) compuesta por grupos de ec rodeados por sc, (e) PEM I con un pequeño grupo de ec unido a uno o dos sc, (f) PEM II con grupos de ec conectados a sc. Célula embriogénica (ec) teñida con acetocarmín y célula tipo suspensor (sc) teñida con azul de Evans.

Se obtuvieron un total de 121 ECLs, pero sólo 37 lograron proliferar y fueron seleccionadas por la presencia de diferentes grados de organización de los PEM. Todas estas ECLs proliferaron en los medios de cultivo MP1 y MP2 respectivamente, aunque el medio MP1 mostró la tasa de crecimiento más alta. Por su parte las cinco ECLs inducidas en medio IC libre de PGRs tuvieron que subcultivarse en medio MP1 para poder proliferar. Respecto del número total de líneas inducidas en el medio MIP que se proliferaron en MP1, Siete de estas ECLs fueron de semillas de Malalcahuello, cuatro de Trongol y trece ECLs de Villa Araucarias. Por su parte las líneas inducidas en el medio MIN proliferadas en MP2 correspondieron a una de Malalcahuello, cuatro de Trongol y tres ECLs de Villa Araucarias (Figura 3a). De todas estas, se seleccionaron las siete que tuvieron mejores tasas de proliferación, donde después de cinco subcultivos sucesivos se evaluó el incremento de biomasa fresca. En el medio MP1, las ECLs de Villa Araucaria (líneas 1, 4, 5) muestran el mayor aumento en peso fresco donde la línea 1 (L1) pasa de 0,2 g a 109,2 g de biomasa fresca. Las ECLs de TR (líneas 3, 6, 7) muestran una tasa de proliferación intermedia y la línea de MA (L2) fue la ECL con menor aumento de masa fresca (Figura 3b). Ahora bien,

las líneas dispuestas en el medio de proliferación MP2 de Villa Araucaria (líneas 1, 4, 5) muestran el mismo comportamiento anterior, pero en este caso la mejor correspondió a la línea 5 (L5), la cual pasa de 0,2 g a 16,3 g de biomasa fresca. La línea 2 de MA muestra una tasa de proliferación intermedia y las ECLs de TR (líneas 3, 6, 7) fueron la ECLs con menor aumento de masa fresca luego de 105 días en cultivo (Figura 3c). Estas diferencias nos dan luces que la concentración hormonal del 2,4-D está influenciando el mantenimiento de las líneas celulares a lo largo de los subcultivos.

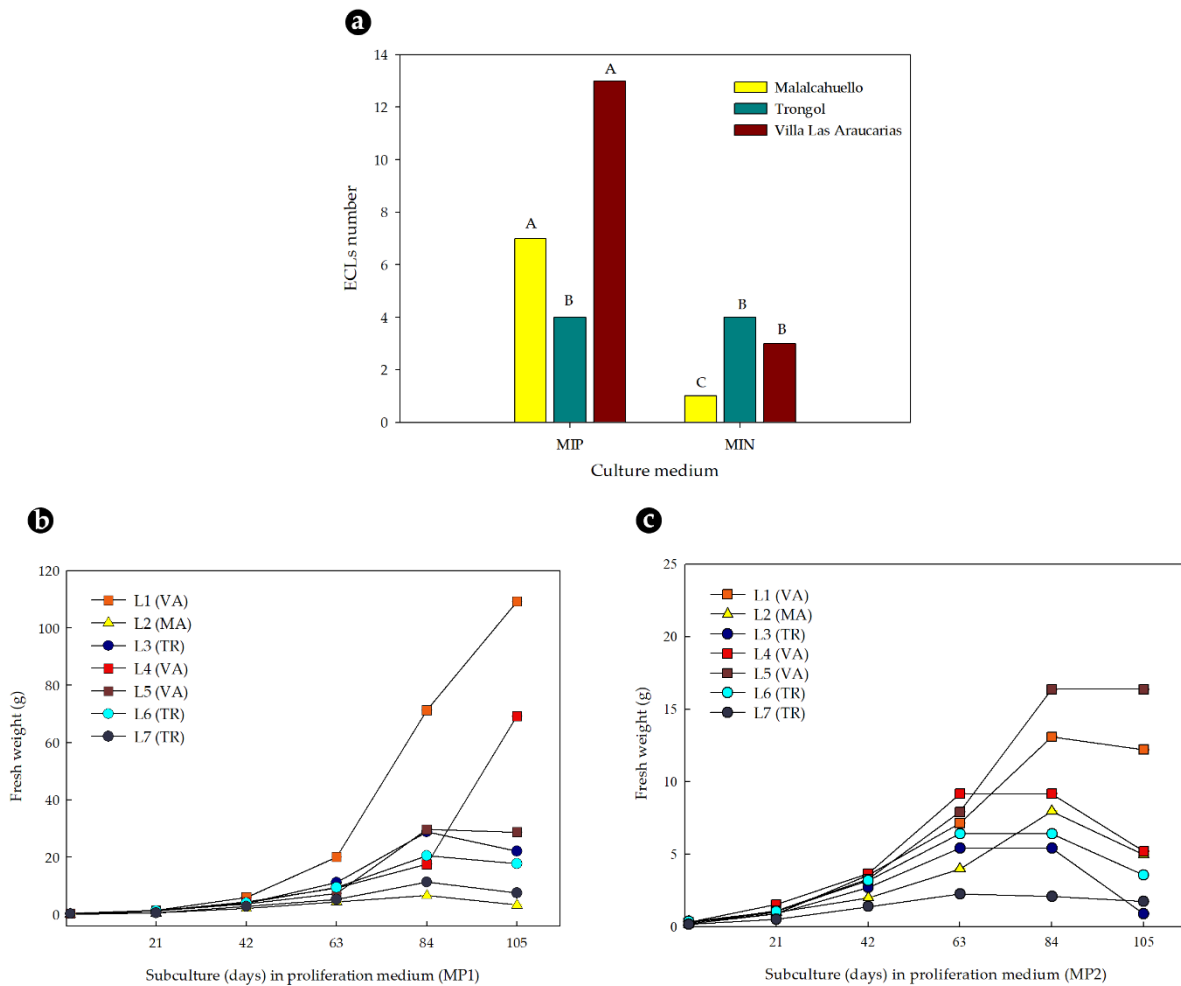


Figura 3. Número (a) y peso fresco (b, c) de líneas celulares embriogénicas (ECLs) de *A. araucana* durante la etapa de proliferación. Las ECLs se subcultivaron en medio MP1 suplementado con (5 μ M 2,4-D + 2,8 μ M 6-BA y Kin) y MP2 suplementado con (23 μ M 2,4-D + 2,8 μ M 6-BA y Kin). L1-7: diferentes ECLs; procedencias MA: Malalcahuello, TR: Trongol y VA: Villa Las Araucarias.

3.4 Cuantificación de PEMs y determinación de PAs endógenas

En los cultivos embriogénicos de *A. araucana* analizados la poliamina endógena más abundante fue la Put, seguida de Spd y Spm, solamente una línea (L6) evidenció contenido de Cad internamente. Por un lado, la ECL L1 fue la más productiva en términos de biomasa fresca cultivada en MP1 y también presentó los más altos índices de PEMs III (Figura 4a), aunque el aumento de la concentración de auxina en MP2, provocó una disminución del crecimiento y del contenido de Put endógena y en este caso los índices de PEMs II fueron más altos (Figura 4c).

En el caso de la ECL L2, por el contrario, se observó un mayor contenido de Put con el aumento de la concentración de auxina en el medio MP2 (Figura 4d), sin embargo, esta línea no tuvo un buen desempeño en términos de crecimiento cuando se cultivó en MP1, probablemente debido a la escasa cantidad de PEM I, ya que no hubo recambio permanente del tejido nuevo a proliferar y la mayor cantidad de PEMs se concentró en los de tipo II, no obstante, el desempeño de esta línea fue moderadamente mejor cuando se cultivó en MP2, quizás por la mejor relación en el nivel de PEM I presente en esta ECL.

Finalmente la ECL L6 que en términos de crecimiento se situó en la posición intermedia, mantuvo esta tendencia cuando se cuantificaron las PAs, ya que la concentración de auxina afectó moderadamente el crecimiento, pero no influyó en el contenido endógeno de PAs por la presencia de las tres principales Put, Spd, Spm y en ambas condiciones además se presentó Cad en niveles menores que la Put, que en este caso podría deberse más a un efecto del genotipo y no de las condiciones culturales, aunque con el transcurso del tiempo los cultivos de esta línea que pasaron a madurar en ABA comenzaron a disminuir, esto tiene una directa relación con el nivel de PEMs I y II presente en estas muestras, ya que como no hubo transición a PEMs III los tejidos comenzaron a morir. Este antecedente es muy importante a la hora de seleccionar material vegetal a partir de esta procedencia.

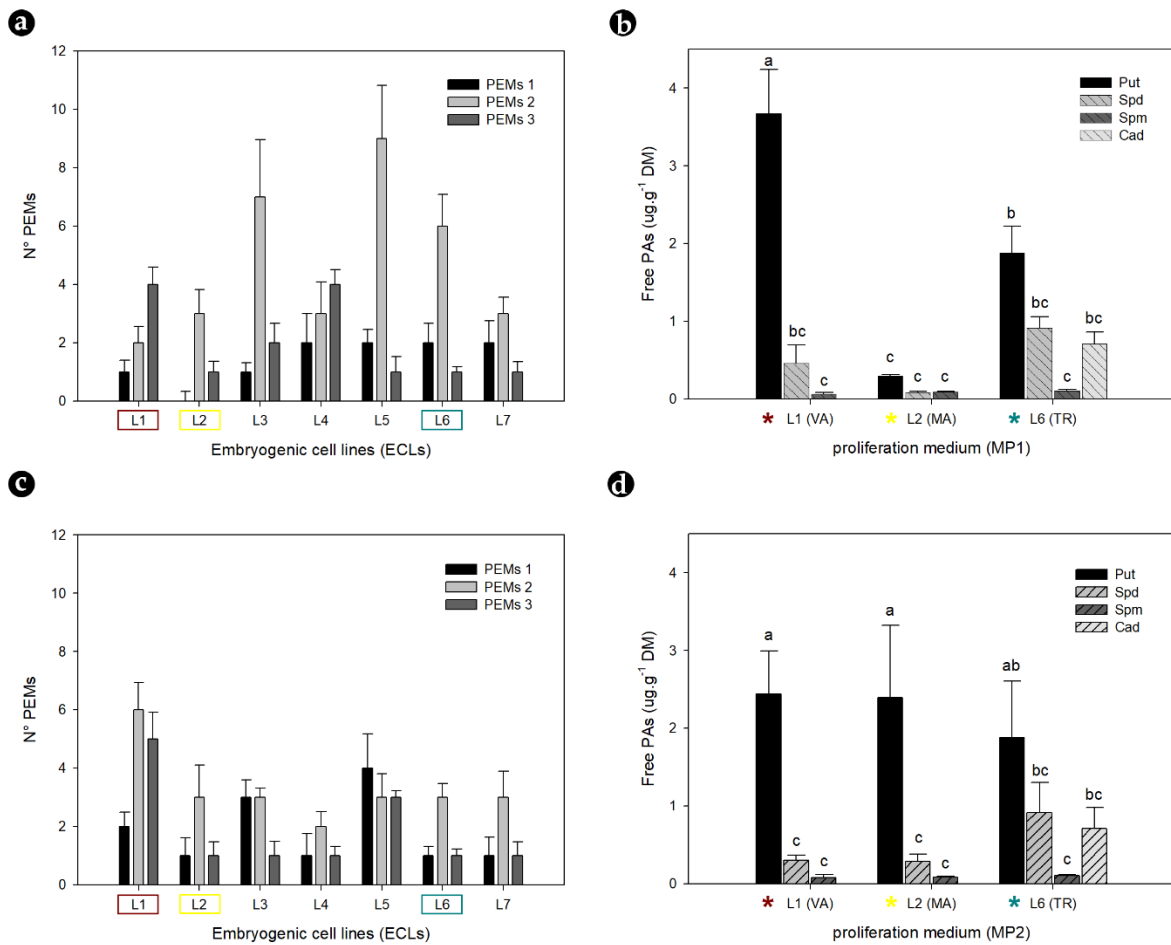


Figura 4. Número de PEMs (a, c) y poliaminas libres (b, d) de líneas celulares embriogénicas (ECLs) de *A. araucana* al final de la proliferación cultivadas en medio MP1 (a,b) y MP2 (c,d) durante 105 días. L1-7: diferentes ECLs; procedencias MA: Malalcahuello, TR: Trongol y VA: Villa Las Araucarias; poliaminas libres (free PAs): Put: Putrescina, Spd: Espermidina, Spm: Espermina y Cad: Cadaverina.

En definitiva, el mantenimiento de las ECLs está relacionado con el contenido endógeno de PAs, el desarrollo de PEMs y el crecimiento. De acuerdo con la tabla 4, evidenciamos que el contenido total de PAs junto con la dinámica de PEMs mostró mejores resultados en la L1, lo mismo para la razón Put:Spd, ya que, la concentración de Put se mantuvo más alta que las demás en ésta ECL; En segundo lugar se situó la L6 y finalmente la L2.

Tabla 4. Niveles endógenos de totales de poliaminas libres y relación Put:Spd total de ECLs de *A. araucana* L1, L2 y L6 en medios de cultivo MP1 y MP2.



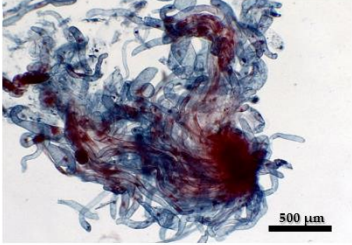

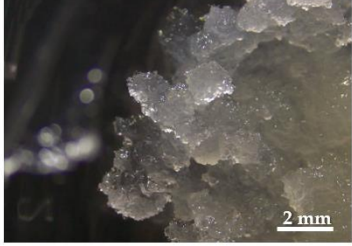
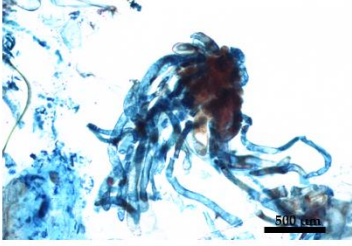

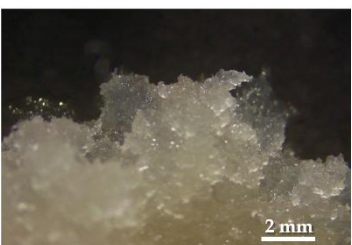
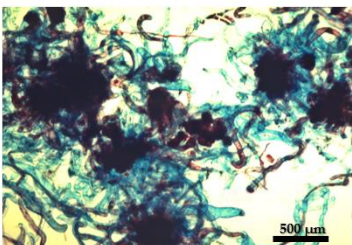
Embryogenic Cell Lines (ECLs)	MP1		MP2	
	Total free PAs	Put:Spd	Total free PAs	Put:Spd
L1 (VA)	4,19 ± 0,50 ^a	8,29 ± 4,36 ^a	2,82 ± 0,59 ^b	6,43 ± 0,81 ^a
L2 (MA)	0,47 ± 0,02 ^c	1,69 ± 0,19 ^b	2,76 ± 1,04 ^b	6,44 ± 0,52 ^a
L6 (TR)	2,27 ± 0,66 ^b	1,43 ± 0,13 ^b	3,61 ± 1,40 ^b	1,85 ± 0,02 ^b

*For each column, means followed by different lowercase letters are significantly different according to Student's t-test ($P < 0,05$) (mean ± SD; n=3)

3.5 Pre-maduración y maduración del cultivo embriogénico

En el primer paso del tratamiento de pre-maduración, 42 días libres de PGRs, se observaron ECLs con embriones tempranos en la superficie del ECS. En el segundo paso, después de veintiún días, se observó el inicio de la polarización embrionaria en el medio de cultivo con PEG 3350 (7 % p/v), maltosa (3 % p/v) y ABA (34 y 68 μ M). En estos dos tratamientos con ABA se observó que la región apical del proembrión somático se desarrollaba de manera opuesta al sistema suspensor largo. Sin embargo, las ECLs en ABA 95 μ M no mostraron ninguna polarización de PEM, las que parecen multiplicar células embriogénicas y suspensoras en todas las direcciones (Tabla 5).

Tabla 5. Cultivos embriogénicos y análisis citoquímicos de PEMs de *A. araucana* en tratamientos de pre-maduración. Paso de pre-maduración 1 medio libre de PGRs, paso de pre-maduración 2 con maltosa (3 % p/v), PEG 3350 (7 % p/v) y ABA (34, 68 y 95 μ M). Los PEMs se tiñeron mediante doble coloración con acetocarmín y azul de Evans.

Morpho-cytological response of PEMs in pre-maturation		
Step 1 (Free PGRs - 42 days)	Step 2 (ABA- 21 days)	PEMs cytology (ABA- 21 days)
34 μM ABA		
		
68 μM ABA		
		
95 μM ABA		
		

Después de 63 días en el medio de maduración, se observaron embriones somáticos tempranos en la superficie del ECS (Figura 5a, b) en el medio de cultivo suplementado con ABA 68 μ M. El análisis de citoquímica nos permitió identificar el desarrollo embrionario somático temprano en *A. araucana*, el cual se caracterizó por la presencia de polaridad con una región apical lisa unida al grupo de células suspensoras (Figura 5c).

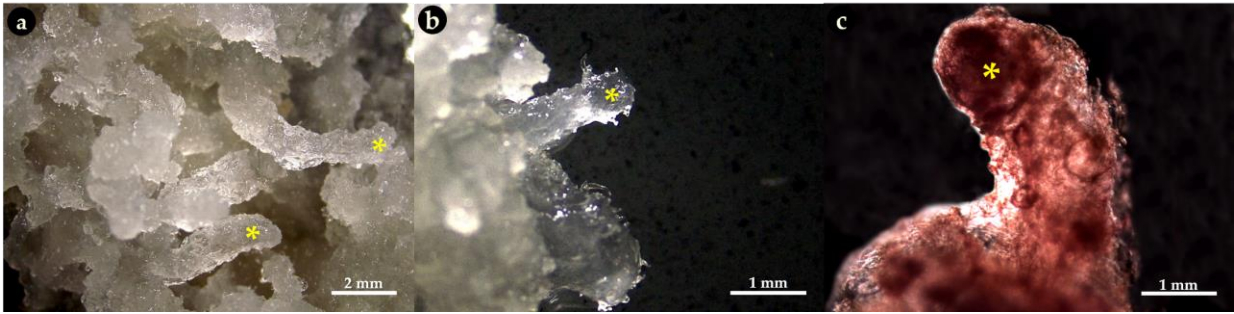


Figura 5. Cultivo embriogénico (ECS) de *A. Araucana* con embriones somáticos tempranos después de 63 días en tratamientos con PEG 3350 (7 % p/v), Maltosa (3 % p/v) y ABA 68 μ M. (a) ECS de Villa Araucarias (VA) con embriones tempranos en la superficie (marcados con asteriscos amarillos) (b) detalles de embriones somáticos tempranos, (c) tinción con safranina del embrión somático temprano obtenido.

DISCUSIÓN

Actualmente, la embriogénesis somática representa una forma de desarrollo vegetal asexual que puede ser inducida en callos o tejidos somáticos. Desde que Haberlandt (1902) propuso el concepto de totipotencia, se entiende que las células vegetales pueden cambiar de un tipo a otro y que a partir de células somáticas se podrían generar plantas enteras. Sin embargo, la respuesta *in vitro* a la inducción de SE está determinada por factores como el genotipo, el tipo de tejido o el estadio de desarrollo que dan lugar a diferentes respuestas y determinan el éxito o fracaso de esta técnica.

A través de esta investigación caracterizamos morfológicamente el ZE de *A. araucana* en tres procedencias, esto permitió relacionar su nivel de desarrollo con la inducción de ECS a través de embriogénesis somática.

Los embriones pre-cotiledonarios se han utilizado como fuente de explante en muchas otras especies de coníferas como *Pinus taeda* (Becwar et al., 1991), *Pinus pinaster* (Lelu et al., 1999) y *Pinus strobus* (Klimaszewska & Smith, 1997). Sin embargo, el embrión cigótico temprano es pequeño y está rodeado de megagametofito en las gimnospermas e incluso dentro de la misma planta, diferentes óvulos se desarrollan de forma asincrónica (Owens et al., 1995), lo que dificulta la recolección de embriones en una etapa de desarrollo común en la que se genera una estructura morfológica. La caracterización fenológica para cada procedencia nos proporcionó información valiosa para futuras selecciones de material vegetal y nuevas inducciones de SE.

Nuestros resultados confirman lo descrito por Silveira et al. (2002) donde los ECS se obtuvieron de embriones cigóticos inmaduros de *A. angustifolia*, mientras que los embriones maduros formaron un tejido blanquecino sin desarrollo embriogénico. Asimismo, Astarita and Guerra (1998) demostraron que la etapa de desarrollo de los embriones cigóticos utilizados como explante inicial influyó en la inducción de masas celulares de *A. angustifolia*, donde los explantes más jóvenes (pre-cotiledonarios) respondieron a la inducción, pero los embriones cotiledonarios (maduros) perdieron esta capacidad. A través de nuestra investigación pudimos observar que no sólo el nivel de desarrollo del ZE de *A. araucana* generó diferencias, sino que también las condiciones de cultivo (PGRs) y el genotipo influyeron en nuestros análisis.

Además, es bien sabido que mientras más orígenes se evalúen, más precisa será la optimización del protocolo, ya que, si la SE proporciona sólo unos pocos genotipos, habría una pérdida grave de diversidad genética en los programas operativos de "clonación" (Park et al., 1993) lo que no es esperado para esta especie.

Además, la proliferación continua de cultivos embriogénicos requiere auxinas y citoquininas (Dong & Dunstan, 1994), mientras que, un mayor desarrollo y maduración de embriones somáticos individuales requieren ABA (Dong & Dunstan, 1999). La primera fase está representada por PEM en proliferación, agregados celulares que pueden pasar por una serie de etapas características que se distinguen por la organización celular y el número de células (PEM etapas I, II y III) (Farias-Soares et al., 2014; Filonova et al., 2000; Steiner et al., 2016), pero que nunca pueden desarrollarse directamente en un embrión real. La segunda fase cubre el desarrollo de embriones somáticos. Estos últimos surgen de novo de PEM III y luego proceden a través de la misma secuencia de etapas descritas para la embriogénesis cigótica de Pinaceae (Singh, 1978).

Para establecer un protocolo reproducible en el tiempo considerando que *A. araucana* no contaba con estudios previos, fue necesario probar el medio de cultivo óptimo para la inducción de la embriogénesis somática de los tres orígenes seleccionados en esta especie. Previamente reportado en otras gimnospermas *P. taeda* (Gupta & Pullman, 1991) y *A. angustifolia* (Silveira et al., 2002) sales nutricionales de BM como composición base del medio de cultivo y auxinas NAA (11 μ M) y 2,4-D (23 μ M) respectivamente, a partir de estas investigaciones se determinó utilizar ambos tratamientos incorporando un control libre de PGRs para inducir ECS. En *A. angustifolia*, se requirieron diferentes niveles de 2,4-D, NAA, 6-BA y Kin para establecer ECS (Guerra et al., 2000). Estos PGRs y sus diferentes niveles influyen directamente en la inducción de SE. Como lo demostraron Astarita and Guerra (1998) quienes obtuvieron frecuencias de inducción de hasta 68,7 % cuando se inocularon embriones cigóticos inmaduros en presencia de PGRs, sin embargo, una parte importante de las ECLs generadas no sobrevivieron a la reducción gradual de los niveles de PGRs en la fase de mantenimiento.

Silveira et al. (2002) también mostraron el mismo efecto, donde los rangos de inducción embriogénica esta vez fluctuaron entre 33,3 % (libres de PGRs) y 43,8 % (con PGRs), mientras

que, en nuestro caso para *A. araucana* obtuvimos valores máximos de 17% (libres de PGRs) y 75% (con PGRs). Por su parte, aquellas líneas celulares que se iniciaron sin PGRs, inicialmente presentaron estructuras PEM típicas de coníferas, pero rápidamente comenzaron a mostrar un pardeamiento de los cultivos y una pérdida de capacidad embriogénica, y sólo sobrevivieron cuando se incorporaron PGRs a los medios de cultivo. en la etapa de mantenimiento. Por otro lado, dos Santos et al. (2002) informaron que la inducción SE ocurrió en explantes en medio sin PGRs en tasas similares (14-15%). Sin embargo, la ausencia hormonal en la fase de multiplicación provocó oxidación tisular y disminución de la capacidad embriogénica. Allí, los ECS mantenidos con PGRs 2,4-D, 6-BA y Kin fueron de color blanco translúcido, mientras que las mantenidas en medio de cultivo libre de PGRs mostraron un proceso de oscurecimiento progresivo. Incluso Guerra et al. (2000) ya habían demostrado el efecto hormonal, cuando indujeron masas embrionarias en *A. angustifolia* utilizando medio LP suplementado con NAA o 2,4-D, Kin (9,3 μ M) y 6-BA (12 μ M), donde las tasas de inducción más altas (60%) se obtuvieron con 45 μ M de 2,4-D suplementados al medio de cultivo.

Lo anterior sugiere un proceso intensivo de selección celular impuesto por el ambiente dentro del medio de cultivo y sus componentes, donde además no podemos perder de vista la pérdida de viabilidad de los tejidos embriogénicos inducida por una sobresaturación hormonal entre cada subcultivo. Ya se ha demostrado que, el 2,4-D utilizado en la etapa de mantenimiento puede actuar aumentando la actividad de las auxinas, pero simultáneamente impulsa respuestas de estrés y bloquea etapas posteriores de la maduración del embrión (Attree & Fowke, 1993). Según nuestros resultados, este efecto se va evidenciando a medida que pasan los días, el aumento de biomasa en algunas LCE es evidente, pero llega a un punto máximo, donde dejan de crecer, e incluso algunas comienzan a morir (Bais & Ravishankar, 2002; Silveira et al., 2004; Steiner, 2009).

Por otro lado, la maduración de embriones somáticos de coníferas generalmente ocurre en presencia de ABA y un agente osmótico (Bozhkov & Von Arnold, 1998). La presencia de un agente osmótico permite que el potencial osmótico sea similar durante las primeras etapas del desarrollo del embrión cigótico, donde las concentraciones de ABA aumentan a medida que el embrión establece la latencia y adquiere reservas de almacenamiento. Se han realizado numerosos

estudios evaluando la transición de embriones somáticos tempranos a embriones maduros, así como la mejora de su calidad, demostrando así, que el medio de maduración de bajo potencial osmótico promueve el desarrollo embrionario, así como su aplicación combinada con ABA; Éste se ha convertido en un método rutinario para estimular la maduración somática embrionaria en algunas especies de coníferas (Attree & Fowke, 1993; Bozhkov & Von Arnold, 1998; Gupta & Pullman, 1991). El efecto imita el estrés hídrico impuesto naturalmente a las semillas en las últimas etapas de maduración, lo que permite a los embriones sobrevivir a una deshidratación severa.

Diferentes agentes osmóticos de bajo peso molecular, incluidas sales inorgánicas, aminoácidos y azúcares, así como compuestos de alto peso molecular, incluido PEG, pueden proporcionar un medio con bajo potencial osmótico inducido por estrés hídrico porque su gran tamaño le impide atravesar la pared celular (presión de turgencia reducida), lo que lleva a una presión intracelular más negativa (Bozhkov & Von Arnold, 1998). También se ha demostrado que el uso de maltosa como agente osmótico o fuente de carbohidratos durante la fase de maduración es beneficioso en la embriogénesis somática de las coníferas. La maltosa combinada con ABA promovió y/o mejoró el desarrollo de embriones somáticos maduros en *Abies alba* (Hristoforoglu et al., 1995), *Pinus taeda* (Li & Huang, 1998) y *Pinus nigra* (Salajova et al., 1999).

El uso de ABA asociado a agentes osmóticos no fue eficaz en el desarrollo y progresión de embriones somáticos, según dos Santos et al. (2002), de acuerdo con este autor el ABA a nivel morfológico dentro del embrión cigótico en estadios tempranos estaría inhibiendo algunas fases de la poliembrionía de escisión, por lo que, al hacer la comparación con nuestros ECS, los proembriones somáticos obtenidos no estarían respondiendo a los tratamientos de maduración aplicados.

Según Guerra et al. (2000) el medio de cultivo suplementado con ABA (50 μ M) y PEG 4000 (1 % p/v) resultó en el desarrollo y transición de embriones somáticos globulares a torpedos, durante 90 días de cultivo, pero no hubo transición a la etapa cotiledonaria más tarde. A su vez, dos Santos et al. (2002) demostraron que durante la fase de maduración sólo los tratamientos con maltosa (6 y 9 % p/v) y PEG 3350 (6 y 9 % p/v) más 6-BA y Kin (1 μ M) permitieron la progresión de la fase globular a embriones torpedo en *A. angustifolia*. Sin embargo, el PEG ya ha sido reconocido

como un buen agente osmótico para mejorar la maduración de embriones somáticos y ya ha sido probado en *P. abies* (Von Arnold et al., 1995), *P. menziesii* (Gupta & Pullman, 1991), *P. taeda* (Gupta et al., 1993; Pullman & Webb, 1994), entre otros. Pero, en este último, no lograron producir embriones en estadio 3 cuando utilizaron un medio BM4 (Gupta & Pullman, 1991) con diferentes concentraciones de ABA y sin PEG, por lo que consideraron que este agente osmótico es crítico en el medio de maduración (Li & Huang, 1997). Además, la maduración embrionaria en *P. taeda* a una concentración de ABA (38 μM) produjo una sobreproliferación de tejido embriogénico y menos embriones en estadio 2 y en nuestro caso, mientras tanto, se observó lo mismo cuando utilizamos ABA (95 μM). (tabla 3), ya que, el ECS aparentemente mejor desarrollado (paso 1), al validarse citológicamente, retrocedió a estadios anteriores (PEM II-III).

Por otro lado, cuando Li and Huang (1997) utilizaron niveles más altos de ABA para producir embriones cotiledonarios en *P. taeda*, la concentración de (152 μM) produjo el mayor número de embriones en etapa 2 y 3. En nuestros experimentos, cuando intentamos usar ABA a esta concentración (datos no mostrados), los tejidos se oxidaron fácilmente y, aunque no se descartaron inmediatamente, después de doce semanas ninguna de las réplicas respondió al tratamiento, por lo que fue decidido no continuar con este nivel hormonal, probablemente se cree que los ECS utilizados en este experimento no estaban en la etapa óptima, cuando se disponían a madurar, por lo que la transición de PEMs III a embriones tempranos no se produjo, suponiendo que ABA a esta concentración provocaba la muerte celular programada de las células que formaban dichos tejidos. Razón por la cual la caracterización celular es esencial para la comprobación de la relación interna de PEMs en todas sus formas (I, II, III) al final de la etapa de proliferación, ya que, de acuerdo con lo reportado por Filonova et al. (2000) aquellas líneas dispuestas en ABA para la maduración que contienen mayores niveles de PEM I y II mueren poco tiempo después de su aplicación, mientras que las líneas con mayores niveles de PEM III desarrollan una correcta transición hacia embriones somáticos. En este estudio, pudimos relacionar directamente el incremento de biomasa de la ECLs, la conformación celular y el contenido endógeno de las PAs, determinando así un método eficaz en la selección de líneas embriogénicas capaces de proseguir a etapas más avanzadas.

La transición del proembrión al embrión somático temprano juega sin duda un papel fundamental en la embriogénesis somática de las coníferas, donde la incapacidad de muchos cultivos embriogénicos para formar embriones bien desarrollados está, en gran parte, asociada a alteraciones morfológicas y aspectos bioquímicos como consecuencia de una condición de cultivo inadecuada (von Arnold et al., 2005), por lo tanto, aclarar y optimizar esta etapa es crucial para avanzar a etapas posteriores de maduración de embriones somáticos, su germinación y su posterior conversión en plantas.

CONCLUSIONES

Por primera vez se reporta un estudio de inducción de embriogénesis somática en *A. araucana* utilizando embriones cigóticos inmaduros; La etapa embrionaria "temprana" se estableció como el explante inicial para la inducción de cultivos embriogénicos, donde las frecuencias de iniciación oscilaron entre el 3 y el 75%. Por su parte, el medio de cultivo BM modificado que contenía NAA (11 μM), 6-BA (2,8 μM) y Kin (2,8 μM) "MIP", presentó una inducción significativamente más alta que cuando se complementó con 2,4- D (23 μM), 6-BA (2,8 μM) y Kin (2,8 μM) "MIN".

Los resultados muestran que las líneas celulares con potencial embriogénico presentan características distintivas en los medios de cultivo probados, lo que comprueba que el éxito en esta etapa no solo depende del genotipo del árbol madre, sino que también del estadio embrionario y de las condiciones de cultivo; Se sugiere continuar evaluando nuevos orígenes y descifrar el efecto significativo del genotipo, teniendo en cuenta la estandarización de diferentes metodologías según su origen. En total se obtuvieron 121 líneas celulares, de las cuales sólo 37 se multiplicaron activamente y presentaron PEM que avanzaron a etapas de proliferación.

Además, demostramos que el uso excesivo de PGRs en la etapa de mantenimiento puede inducir un bloqueo o retroceso en el crecimiento de líneas celulares, impidiendo su transición a embriones somáticos maduros, para lo cual se debe especificar su tiempo de aplicación.

En relación con lo anterior, es que el perfil bioquímico de las PAs analizadas en las ECLs en proliferación puede ayudar en un futuro a seleccionar semillas con alta capacidad embriogénica, considerando la participación de estas moléculas en los procesos de determinación celular.

También, se necesitó tanto PEG como ABA para la pre-maduración de cultivos embriogénicos, estimamos que la concentración de PEG correspondería al menos al 7% (p/v) y entre 34 - 68 μM de ABA. Los primeros estadios de embriones somáticos se observaron después de 63 días en medio de cultivo BM con ABA 68 μM y maltosa (3 % p/v). En este experimento no se observaron etapas de desarrollo posteriores. En el futuro se utilizarán nuevos genotipos y diferentes ECLs para probar la capacidad de desarrollo de los embriones somáticos, donde será necesario optimizar la transición de embriones tempranos a tardíos en *A. araucana*, su germinación y posterior conversión a plántulas.

Aunque, en este estudio no se logró ninguna línea celular con desarrollo embrionario somático completo, la estrategia de la SE representa una alternativa para obtener cultivos embriogénicos genéticamente distintos, permitiendo obtener ECS y embriones somáticos tempranos de *A. Araucana*, una conífera amenazada e icónica de Chile y Sudamérica. Finalmente, dejando a disposición un esquema resumen con los principales avances obtenidos hasta la fecha, con todas sus generalidades en el Apéndice (Figura 6).

REFERENCIAS

- Aguilera-Betti, I., Muñoz, A. A., Stahle, D., Figueroa, G., Duarte, F., González-Reyes, Á., Christie, D., Lara, A., González, M. E., Sheppard, P. R., Sauchyn, D., Moreira-Muñoz, A., Toledo-Guerrero, I., Olea, M., Apaz, P., & Fernandez, A. (2017). The First Millennium-Age *Araucaria Araucanain* Patagonia. *Tree-Ring Research*, *73*(1), 53-56. <https://doi.org/10.3959/1536-1098-73.1.53>
- Astarita, L., & Guerra, M. (1998). Early somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia*—induction and maintenance of embryonal-suspensor mass cultures. *Braz J Plant Physiol*, *10* (2), 113-118.
- Attree, S., & Fowke, L. (1993). Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *35*, 1-35.
- Bais, H., & Ravishankar, G. (2002). Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69*, 1-34.
- Ballester, A., Corredoira, E., & Viéitez Martín, A. M. (2016). Limitations of somatic embryogenesis in hardwoods trees.
- Balocchi, F., Wingfield, M., Ahumada, R., & Barnes, I. (2021). *Pewenomyces kutranfy* gen. nov. et sp. nov. causal agent of an important canker disease on *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Pathology*, *70*(5), 1243-1259.
- Becwar, M., Blush, T., Brown, D., & Chesick, E. (1991). Multiple paternal genotypes in embryogenic tissue derived from individual immature loblolly pine seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *26*, 37-44.
- Bekessy, S., Lara, A., González, M., Cortez, M., Gallo, L., Premoli, A., & Newton, A. (2004). Variación en *Araucaria araucana*. In *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina* (pp. 215-231). Editorial Universitaria.
- Besoain, X., Guajardo, J., & Camps, R. (2017). First report of *Diplodia mutila* causing gummy canker in *Araucaria araucana* in Chile. *Plant Disease*, *101*(7), 1328-1328.
- Bozhkov, P. V., & Von Arnold, S. (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, *104*(2), 211-224.

- CITES. (2001). *Convención Sobre El Comercio Internacional De Especies Amenazadas De Fauna Y Flora Silvestres*. (14).
- CONAF. (2002). Antecedentes sobre impacto de incendios forestales en la IX Región. Documento de visita a la zona afectada por Incendios. In (pp. 16). Temuco, Chile. .
- CONAF. (2017). Determinación del daño sanitario de *Araucaria araucana* y medidas de acción. . In *Comisión de Agricultura del Senado*. .
- Convention on Biological Diversity. (1992). In a. i. N. 2023 (Ed.).
- Corredoira, E., Merkle, S., Martínez, M., Toribio, M., Canhoto, J., Correia, S., Ballester, A., & Vieitez, A. (2019). Non-zygotic embryogenesis in hardwood species. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 38(1), 29-97.
- Cortés, J., Ugalde, I., Caviedes, J., & Ibarra, J. T. (2019). Semillas de montaña: recolección, usos y comercialización del piñón de la araucaria (Araucaria araucana) por comunidades Mapuche-Pewenche del sur de los Andes. *Pirineos*, 174. <https://doi.org/10.3989/pirineos.2019.174008>
- Cortés, M. (2003). *Dinámica y conservación de Araucaria araucana (Mol.) Koch en la Cordillera de la Costa de Chile* Tesis de Magister. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales ...].
- de Oliveira, L. F., dos Santos, A., & Floh, E. (2019). Polyamine and amino acid profiles in immature *Araucaria angustifolia* seeds and their association with embryogenic culture establishment. *Trees*, 34(3), 845-854. <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01938-y>
- Dong, J.-Z., & Dunstan, D. I. (1994). Growth parameters, protein and DNA synthesis of an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). *Journal of plant physiology*, 144(2), 201-208.
- Dong, J.-Z., & Dunstan, D. I. (1999). Cloning and characterization of six embryogenesis-associated cDNAs from somatic embryos of *Picea glauca* and their comparative expression during zygotic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 39, 859-864.
- Donoso, C. (1993). *Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica*.
- Donoso, C., González, M., Cortés, M., González, C., Donoso, P., & Hernández, M. (2008). Poblaciones de araucaria enana (*Araucaria araucana*) en la Cordillera de Nahuelbuta, Chile. *Bosque (Valdivia)*, 29(2), 170-175.

- Donoso, S., Peña-Rojas, K., Pacheco, C., Perry, F., & Espinoza, C. (2010). Evaluación de la sustentabilidad de los bosques de araucaria araucana: producción, colecta y consumo de pinones. *Spanish Journal of Rural Development*, 1(2), 99-113.
- Donoso, S. R., Peña-Rojas, K., Espinoza, C., Galdames, E., & Pacheco, C. (2014). Producción, permanencia y germinación de semillas de Araucaria araucana (Mol.) K. Koch en bosques naturales, aprovechados por comunidades indígenas del sur de Chile.
- dos Santos, A., Silveira, V., Steiner, N., Vidor, M., & Guerra, M. (2002). Somatic Embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Brazilian archives of Biology and Technology*, 45 (1), 97-106.
- Echeverría, C. (2002). Ecological disaster in southern Chile. *New York Botanical Garden Plant Talk*, 28, 14.
- Echeverría, C., Zamorano, C., & Cortés, M. (2004). Conservation and restoration of monkey puzzle (*Araucaria araucana*) forest in Chile. Final Report. May 2004, 17 pp. In.
- Farias-Soares, F. L., Steiner, N., Schmidt, É. C., Pereira, M. L. T., Rogge-Renner, G. D., Bouzon, Z. L., Floh, E. S. I., & Guerra, M. P. (2014). The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(7), 1853-1865. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1560-6>
- Feher, A. (2008). The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, 52(1), 53-56.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis—stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385-402.
- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V., & von Arnold, S. (2000). Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot*, 51(343), 249-264. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.343.249>
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27-47.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G.-J. D. (2008). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background* (pp. 175-204). Springer.

- Goeten, D., Rogge-Renner, G. D., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Farias-Soares, F. L., Guerra, M. P., & Steiner, N. (2020). Updating embryonic ontogenesis in *Araucaria angustifolia*: from Burlingame (1915) to the present. *Protoplasma*, 257(3), 931-948. <https://doi.org/10.1007/s00709-020-01481-5>
- González, M., Cortés, M., Izquierdo, F., Gallo, L., Echeverría, C., Bekkesy, S., Montaldo, P., & Donoso, C. (2006). *Araucaria araucana*. *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones*, 36-53.
- González, M., & Veblen, T. (2007). Incendios en bosques de *Araucaria araucana* y consideraciones ecológicas al madereo de aprovechamiento en áreas recientemente quemadas. *Revista chilena de historia natural*, 80(2), 243-253.
- Guerra, M. P., Silveira, V., dos Santos, A. L., Astarita, L. V., & Nodari, R. O. (2000). Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (BERT) O. KTZE. *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 6*, 457-478.
- Gupta, P., & Durzan, D. (1985). Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4, 177-179.
- Gupta, P., & Pullman, G. (1991). *METHOD FOR REPRODUCING CONIFEROUS PLANTS BY SOMATIC EMBRYOGENESIS USING ABSCISIC ACID AND OSMOTIC POTENTIAL VARIATION*.
- Gupta, P. K., Pullman, G., Timmis, R., Kreitinger, M., Carlson, W. C., Grob, J., & Welty, E. (1993). Forestry in the 21st Century. *Bio/technology*, 11(4), 454-459.
- Haberlandt, G. (1902). Culturversuche mit isolierten pflanzenzellen, sitz-ungsber. *Akad. D. wissensch. Mathematisch-naturwissenschaftlicher c169*.
- Herrmann, T. M. (2005). Knowledge, values, uses and management of the *Araucaria araucana* forest by the indigenous Mapuche Pewenche people: A basis for collaborative natural resource management in southern Chile. *Natural Resources Forum*,
- Hristoforoglu, K., Schmidt, J., & Bolhar-Nordenkamp, H. (1995). Development and germination of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 277-284.
- IUCN. (2023). The IUCN Red list of threatened species. In: *Red list of threatened species*. . In (Vol. 3).

- Jerez, J. (2000). *Propagación de Araucaria araucana (Mol.) C. Koch mediante cultivo in vitro por medio de embriones maduros aislados* Universidad de Concepción]. Concepción, Chile.
- Khuri, S., Shmoury, M., Baalbaki, R., Maunder, M., & Talhouk, S. (2000). Conservation of the *Cedrus libani* populations in Lebanon: history, current status and experimental application of somatic embryogenesis. *Biodiversity & Conservation*, 9, 1261-1273.
- Klimaszewska, K., & Smith, D. R. (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiologia Plantarum*, 100(4), 949-957.
- Lara, A., Solari, M., Rutherford, P., Thiers, O., Trecaman, R., Molina, R., Prieto, R., & Montory, C. (1999). Cobertura de la vegetación original de la Ecoregión de los bosques valdivianos en Chile hacia 1550. *Informe Técnico, Proyecto FB*, 49.
- Lelu, M. A., Bastien, C., Drugeault, A., Gouez, M. L., & Klimaszewska, K. (1999). Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum*, 105(4), 719-728.
- Li, X. Y., & Huang, E. H. (1997). Polyethylene glycol-promoted development of somatic embryos in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 33, 184-189.
- Li, X. Y., & Huang, E. H. (1998). Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 34, 22-26.
- Lizana, M., & Antonio, L. (2009). *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch: un recurso promisorio.
- Ma, X., Bucalo, K., Determann, R. O., Cruse-Sanders, J. M., & Pullman, G. S. (2012). Somatic embryogenesis, plant regeneration, and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 48(3), 324-334. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9433-4>
- Merkle, S. (1995). Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *IN VITRO CELLULAR AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY A*, 31, P-6.
- Min. Agricultura. (2010). Resultados y Lecciones en Producción, técnicas de poscosecha y desarrollo de productos a partir del piñón. Proyecto de Innovación en la VIII Región del Biobío y IX Región de La Araucanía., 34-35.
- Min. Medio Ambiente. (2002). *Araucaria araucana* (Mol.) Koch, M. K. *Clasificación de especies: Hoja de Antecedentes de especie*. Retrieved from

https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2019/10/Araucaria_araucana_FINAL.pdf

- Owens, J. N., Catalano, G. L., Morris, S. J., & Aitken-Christie, J. (1995). The reproductive biology of Kauri (*Agathis australis*). III. Proembryogeny and early embryogeny. *International Journal of Plant Sciences*, 156(6), 793-806.
- Park, Y., Pond, S., & Bonga, J. (1993). Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theoretical and applied genetics*, 86, 427-436.
- Premoli, A., Quiroga, P., & Gardner, M. (2013). *Araucaria araucana*. The IUCN Red List of Threatened Species *e.T31355A2805113*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20131.RLTS.T31355A2805113.en>
- Pullman, G., & Webb, D. (1994). An embryo staging system for comparison of zygotic and somatic embryo development. TAPPI R&D Division biological sciences symposium,
- Pullman, G. S. (2018). Embryogenic tissue initiation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants: Volume I*, 13-31.
- Pullman, G. S., & Gupta, P. K. (1991). Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using adsorbent materials in the development stage media. In: Google Patents.
- Rechene, C., Bava, J., & Ateaga, R. M. (2003). *Los bosques de Araucaria araucana en Chile y Argentina*. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit.
- Riess, K., Schön, M. E., Lutz, M., Butin, H., Oberwinkler, F., & Garnica, S. (2016). On the evolutionary history of *Uleiella chilensis*, a smut fungus parasite of *Araucaria araucana* in South America: Uleiellales ord. nov. in Ustilaginomycetes. *PloS one*, 11(1), e0147107.
- Ruiz, E., González, F., Torres-Díaz, C., Fuentes, G., Mardones, M., Stuessy, T., Samuel, R., Becerra, J., & Silva, M. (2007). Genetic diversity and differentiation within and among Chilean populations of *Araucaria araucana* (Araucariaceae) based on allozyme variability. *Taxon*, 56(4), 1221-1228.
- Saavedra, A., & Willhite, E. (2017). *Observations and recommendations regarding Araucaria araucana branch and foliage mortality (Daño Foliar de la Araucaria) in the National Parks of South-Central Chile*. USDA Forest Service.

- Salajova, T., Salaj, J., & Kormutak, A. (1999). Initiation of embryogenic tissues and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. *Plant Science*, *145*(1), 33-40.
- Sanguinetti, J. (2008). Producción y predación de semillas, efectos de corto y largo plazo sobre el reclutamiento de plántulas: Caso de estudio: *araucaria araucana*.
- Sanguinetti, J. (2014). Producción de semillas de *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch durante 15 años en diferentes poblaciones del Parque Nacional Lanín (Neuquén-Argentina). *Ecología austral*, *24*(3), 265-275.
- Sanguinetti, J., & Kitzberger, T. (2010). Factors controlling seed predation by rodents and non-native *Sus scrofa* in *Araucaria araucana* forests: potential effects on seedling establishment. *Biological Invasions*, *12*, 689-706.
- Shepherd, J. D., & Ditgen, R. S. (2005). Human use and small mammal communities of *Araucaria* forests in Neuquén, Argentina. *Mastozoología neotropical*, *12*(2), 217-226.
- Silveira, V., Balbuena, T., Santa-Catarina, C., Floh, E., Guerra, M., & Handro, W. (2004). Biochemical changes during seed development in *Pinus taeda* L., *44*, 147–156.
- Silveira, V., Steiner, N., Santos, A. L. W., Nodari, R. O., & Guerra, M. P. (2002). Biotechnology tools in *Araucaria angustifolia* conservation and improvement: inductive factors affecting somatic embryogenesis. *Cropp Breeding and Applied Biotechnology*, *2*(3), 463-470. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v02n03a18>
- Singh, H. (1978). *Embryology of gymnosperms*.
- Stefenon, V. M., Steiner, N., Guerra, M. P., & Nodari, R. O. (2009). Integrating approaches towards the conservation of forest genetic resources: a case study of *Araucaria angustifolia*. *Biodiversity and Conservation*, *18*, 2433-2448.
- Steiner, N. (2009). *Embriogênese somática em Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze, Pinus sylvestris (Linneaus) e Picea abies (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK* Universidade Federal de Santa Catarina]. Florianópolis.
- Steiner, N., Farias-Soares, F. L., Schmidt, É. C., Pereira, M. L., Scheid, B., Rogge-Renner, G. D., Bouzon, Z. L., Schmidt, D., Maldonado, S., & Guerra, M. P. (2016). Toward establishing a morphological and ultrastructural characterization of proembryogenic masses and early somatic embryos of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Protoplasma*, *253*, 487-501.
- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Silveira, V., Floh, E. I. S., & Guerra, M. P. (2007). Polyamine effects on growth and endogenous hormones levels in *Araucaria angustifolia* embryogenic

- cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1), 55-62.
<https://doi.org/10.1007/s11240-007-9216-5>
- Su, Y. H., Tang, L. P., Zhao, X. Y., & Zhang, X. S. (2021). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 228-243.
- Tacón, A., Palma, J., Fernández, U., & Ortega, B. (2006). El mercado de los productos forestales no madereros y la conservación de los bosques del sur de Chile y Argentina.
- Valderrama, L., Contreras-Reyes, J. E., & Carrasco, R. (2018). Ecological impact of forest fires and subsequent restoration in Chile. *Resources*, 7(2), 26.
- Veblen, T., Armesto, J., Burns, B., Kitzberger, T., Lara, A., León, B., & Young, K. (1995). The ecology of the conifers of southern South America. In.
- Vélez, M., Salgado Salomón, M., Marfetan, A., Tirante, S., Mattes Fernández, H., Avila, M., & Viviani, D. (2018). *Caracterización desecación del dosel y sanidad de Araucaria araucana en Argentina*.
- von Arnold, S., Bozhkov, P., Clapham, D., Dyachok, J., Filonova, L., Högberg, K., Ingouff, M., & Wiweger, M. (2005). Propagation of Norway spruce via somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81, 323-329.
- Von Arnold, S., Egertsdotter, U., Ekberg, I., Gupta, P., Mo, H., & Nörsgaard, J. (1995). Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). In *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 3—Gymnosperms* (pp. 17-36). Springer.
- Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., & Gaj, M. D. (2020). Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1333.
- Zamorano-Elgueta, C., Cayuela, L., González-Espinosa, M., Lara, A., & Parra-Vázquez, M. (2012). Impacts of cattle on the South American temperate forests: Challenges for the conservation of the endangered monkey puzzle tree (*Araucaria araucana*) in Chile. *Biological Conservation*, 152, 110-118.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.037>
- Zapata, M., & Schafer, M. (2019). *Diplodia africana* causing twig death on *Araucaria araucana*, a new host and first record for Chile. *New Disease Reports*, 40, 2-2.

APENDICE

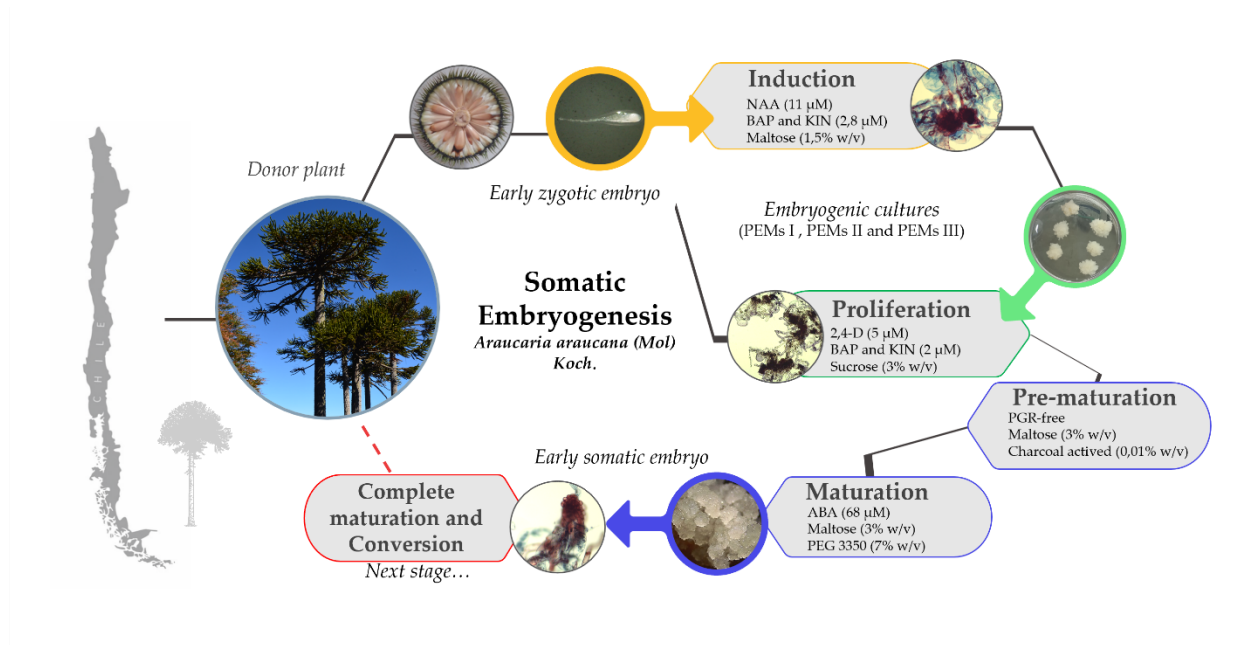


Figura 6. Representación esquemática del avance en la embriogénesis somática de *Araucaria araucana* y los principales factores evaluados. Etapas establecidas (inducción y proliferación). Parcialmente desarrollado (premaduración y maduración) y no evaluados (maduración completa y conversión).