

En la etapa de incremento de peso se utilizó el medio MS adicionado con 60 gL⁻¹ de sacarosa. Esto, basado en uno de los primeros informes relacionados con la microbulbificación sincronizada *in vitro* en ajos de sanidad controlada, el que fue realizado por Racca (1989) citado por Izquierdo y Quiones (2003). Este autor utiliza como medio basal MS a la mitad suplementado con 0.3 ppm de ANA y 3 ppm de 2-ip, pero las pérdidas fueron superiores al 70% cuando se transfirieron las plántulas propagadas *in vitro* directamente a macetas. Este inconveniente se solucionó transfiriendo las vitroplantas después de la fase de multiplicación a un medio MS diluido a la mitad sin suplemento de auxinas ni citoquininas y suplementado con sacarosa. A los 90 días se obtuvo un 62% de bulbificación con 60 gL⁻¹ de sacarosa. Estos microbulbillos alcanzaron una sobrevivencia superior al 85% en campo, siempre y cuando su tamaño fuera superior a 3 mm de diámetro.

Los bulbos obtenidos correspondieron a calibres de bulbos de tamaño floral y sin presencia de raíces; lo que en concordancia con lo señalado por Bouterin y Bron (1994), quienes indican que las raíces nacidas *in vitro* son extremadamente frágiles y colocadas en contacto con un sustrato, mueren y sería necesario esperar la formación y el crecimiento de nuevas raíces

para que la planta se nutra; dejaría material de fácil manipulación para su posterior aclimatación.

Respecto del rendimiento obtenido (número de bulbillos por explante) la tasa fue mayor en explantes provenientes de bulbo. Así también, explantes provenientes de la zona basal de la hoja, tendrían un mayor potencial para generar bulbillos, en relación con explantes provenientes de otras porciones de hoja.

BIBLIOGRAFÍA

- BOUTHERIN, D.; BRON, G. 1994. Multiplicación de plantas hortícolas. Zaragoza, Acribia. 225p.
- IZQUIERDO O.; QUIONES O. 2003. Obtención de semilla de ajo. (on line), www.utm.mx/temas/temas-docs/nfnotas15R2.pdf. Marzo 2003.
- MANSUR, L.; ZOELLNER, O.; RIEDEMANN, P.; VERDUGO, G.; HARRISON, C. 2002. *Leucocoryne*, un género nativo chileno y su uso como planta de jardín. Valparaíso, Oficina de Transferencia Tecnológica Universidad Católica de Valparaíso. 49p.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- SCHIAPPACASSE, F.; YAÑES, P.; PEÑAILILLO, P. 1999. Propagación de geófitos nativos. FIA. Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura. Talca. 12 noviembre 1999. pp. 11-26.

Agro Sur 34 (1-2):23-25 2006

INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE AUTOPOLIPLOIDÍA EN *Rhodophiala Presl.**

INDUCTION AND DETECTION OF POLYPLOIDY IN *Rhodophiala Presl.*

Muñoz, M¹., Riegel, R¹., Seemann, P¹., Jara, G¹., Schiappacasse, F., Peñailillo, P²., Basoalto, A²
¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: mamunoz@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La duplicación cromosómica ha sido ampliamente utilizada en horticultura para obtener nuevas y/o mejorar características agronómicas. En especies de uso ornamental esta técnica

ha permitido lograr flores de mayor tamaño y de texturas más intensas, así como un período de floración más prolongado. Para realizar un aumento de ploidía en vegetales, es frecuente el tratamiento de plántulas jóvenes en crecimiento activo con colchicina, un alcaloide natural con

acción antimitótica. Desde los tratamientos de colchicina aplicados *in vitro*, es posible obtener una población numerosa de plantas, sin embargo, sólo una pequeña fracción de los individuos sobrevivientes a los tratamientos con el alcaloide son efectivamente autoploiploides. El presente trabajo tiene como objetivo dar a conocer los resultados obtenidos en los experimentos de inducción de poliploidía mediante la aplicación de antimitóticos a plántulas jóvenes *in vivo* e *in vitro* y en el desarrollo de nuevas técnicas de detección de estos autoploiploides desde una población de plantas tratadas de *Rhodophiala*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En una primera etapa se realizaron experimentos *in vivo* a partir de tratamientos a semillas en germinación de *R. splendens*, sometiendo material vegetal de 2 a 10 días luego de la germinación a soluciones de colchicina 0,05% y 0,2% por 4 y 12 horas. Luego las plantas fueron cultivadas en macetas con sustrato turba: vermiculita: perlita. Se realizaron recuentos cromosómicos en aplastados de los meristemas radicales tratados con la reacción de Feulgen modificada para evaluar el éxito de la inducción. En una segunda etapa se realizaron experimentos *in vitro* con *R. montana*, *R. splendens*, *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*, tratándose plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* con soluciones de colchicina al 0,1% durante 8 horas y 0,2% durante 4 horas. También se trataron bulbillos *in vitro* en medio de cultivo líquido Murashigue Skoog adicionado con 0,05% de colchicina (p/v) en agitación. El éxito de la inducción se evaluó mediante recuentos cromosómicos en plántulas provenientes de subcultivos de las plantas tratadas. Debido a que la realización de recuentos cromosómicos es un proceso laborioso altamente demandante en tiempo, en una tercera etapa se realizaron investigaciones conducentes a desarrollar nuevas técnicas para la detección de autoploiploides inducidos. Para esto se estudió un grupo de 14 plántulas de *R. montana*, 7 de ellas diploides y otras 7 tetraploides (determinadas mediante recuentos cromosómicos) investigándose la asociación entre el tamaño

de estomas y el nivel de ploidía y la aplicación de la técnica de citometría de imágenes para la estimación de la cantidad de ADN nuclear. La estimación de la cantidad de ADN en los núcleos celulares se realizó con las mismas preparaciones citológicas antes descritas. De ellas se obtuvieron 3 a 4 nuevas microfotografías en escala de grises, desde las cuales se midieron un total de 15 núcleos en estado de interfase por planta. Utilizando el programa computacional UTHSCSA Image Tool (disponible en <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) se obtuvo el valor Integral de Densidad Óptica (IOD). Este valor IOD, considera el tamaño e intensidad de pigmentación de cada núcleo teñido con la reacción Feulgen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la inducción de poliploidía en *R. splendens* y *R. montana*. Los resultados de la inducción de poliploidía *in vivo* en *R. splendens* se muestran en los Cuadros 1, 2 y 3.

En cuanto al estudio del tamaño de estomas y citometría de imágenes en 14 plantas de *R. montana* los resultados muestran que si bien las plantas poliploides en promedio tienen estomas de mayor tamaño, no es posible discriminar el nivel de ploidía en forma individual del 100% de las plantas, debido a que los valores obtenidos no reflejan una clara separación entre los dos grupos. El análisis citométrico de las imágenes obtenidas de los núcleos de los individuos diploides arroja como promedio un contenido relativo de ADN de $12,83 \pm 1,34$ millones (valor IOD sin unidad) y de $24,10 \pm 1,62$ millones para los individuos poliploides. Concordante con la teoría de la duplicación del contenido de ADN en el caso de individuos autotetraploides estos presentan un valor cercano al doble (1,88) del contenido de ADN que las plantas diploides. El promedio IOD de las plantas diploides más 2 veces su desviación estándar (15,51 millones) y el promedio de los poliploides menos 2 veces su desviación estándar (20,86 millones) pueden ser utilizados como parámetros de selección con un 100% de eficiencia.*

Cuadro 1. Inducción de poliploidía *in vivo* en *R. splendens*.**Table 1. Induction of *in vivo* polyploidy in *R. splendens***

Tratamiento	Sobrevivencia %	N° Analizadas	Poliploides* %	Mixoploides %	Diploides %
0.05% col. x 4 h	69%	18	11 %	33%	67%
0.05% col. x 12 h	40%	5	20 %	0	80%
0.2% col. x 4 h	21%	5	60 %	40%	0
0.2% col. x 12 h	0.05%	1	0	0	100%
Testigo	100 %				
10 uM trif x 24 h	66%	17	0	12.5%	58.3%
100 uM trif x 24 h	41%	19	5.2 %	15.7%	78.9%

Cuadro 2. Inducción de poliploidía aplicando colchicina *in vitro* a *R. splendens***Table 2. Polyploidy induction applying colchicine to *R. splendens in vitro***

Tratamiento	N° Tratadas	Sobrevivencia %	N° Analizadas	Poliploide %	Mixoploides %	Diploides %
0.1 % x 8 h	68	83	12	0	25	75
0.2 % x 4 h	69	64	14	20	33	46

Cuadro 3. Inducción de poliploidía aplicando colchicina *in vitro* a *R. montana***Table 3. Polyploidy induction applying colchicine to *R. montana in vitro***

Tratamiento	No Tratados	Sobrevivencia %	N° Analizado	Poliploide %	Mixoploides %	Diploides %
0.1 x 8 h	312	33	10	20	0	80
0.2 x 4 h	312	44	10	20	0	80
0.05 x 5d	60	60	31	38	19	41

BIBLIOGRAFÍA

COHEN, D.; YAO, J. 1991. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 43 - 49.

HARDIE, D., GREGORY, R.; HERBERT, D. 2002:

From pixels to picograms: A beginners' guide to genome quantification by Feulgen Image analysis densitometry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50: 735 - 749.

*Trabajo Financiado por Proyecto FIA-BIOT-01-071