

ESTUDIOS REALIZADOS EN TORNO AL CULTIVO DE TEJIDOS EN ESPECIES CHILENAS DE *Rhodophiala*.

TISSUE CULTURE STUDIES ON CHILEAN *Rhodophiala* SPECIES.

Jara, G.¹, Seemann, P.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.² y Basoalto, A.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

E-mail: gjara@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

El potencial de regeneración *in vitro* de la familia Amaryllidaceae, mediante la utilización de escamas gemelas o triples en presencia de la placa basal, es considerado por ser especie y genotipo dependiente y la tasa de multiplicación puede variar entre 2 y 15 yemas por explante (Ziv y Kipnis, 2000) o entre 2- 25 yemas por explante (Fennel y van Staden, 2004), de tal forma que pueden presentarse diferentes tipos de respuesta. En este sentido hay algunas especies en que se ha logrado desarrollar un eficiente sistema de multiplicación, como en el caso de *Narcissus*, *Hemerocallis*, *Hippeastrum*, entre otras (Vishnevetsky *et al.*, 2003), pero también se han reportado otras especies que no han respondido tan eficientemente, como es el caso de algunas especies de *Nerine*, *Eucrosia*, *Hippeastrum*, o en cuatro especies de *Rhodophiala*. La respuesta de este género ha sido estudiada extensamente mediante el desarrollo del Proyecto FIA "Aplicaciones Biotecnológicas para el mejoramiento genético de *Rhodophiala* chilenas", analizando factores que influyen en la multiplicación y crecimiento de los microbulbillos, prevención de la fenolización en los explantes y aclimatización, principalmente mediante el cultivo de órganos en medios semisólidos. Sin embargo, debido a que la respuesta de las diferentes especies ha sido poco eficiente, se ha tenido que recurrir a otros sistemas de multiplicación, como es el caso del cultivo en medio líquido estacionario o mediante la inmersión temporal e incluso incursionar en técnicas como la embriogénesis somática, las que se ha postulado

que aumentan los coeficientes de multiplicación en una gran variedad de especies, incluso en las consideradas las más recalcitrantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Establecimiento de los cultivos: se ha realizado a partir de bulbos y semillas de la especie *R. bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*. En el caso de bulbos estos fueron desinfectados y seccionados hasta obtener escamas dobles o triples, las que fueron sembradas individualmente en frascos de 80 x 25 mm con 10 ml de medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas de Murashigue y Skoog (1962). Se han estudiado diferentes factores para inducir la brotación y formación de microbulbillos como, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, carbohidratos, concentración de macrosales, tipo de escamas, entre otros. Para la incorporación de semillas se ha utilizado el medio MS reducido a la mitad.

Multiplicación de microbulbillos: una vez inducido los microbulbillos, estos han servido de material para realizar ensayos de multiplicación, en el cual se ha estudiado el efecto de diferentes concentraciones de citoquininas en combinación con auxinas, la reducción de las macrosales, el efecto de un corte en cruz en la placa basal de los microbulbillos, el aumento de la concentración de sacarosa. Más recientemente se han establecido ensayos para determinar el uso de medios líquidos en forma estacionaria, analizando factores como la incorporación de citoquininas aromáticas, el uso del paclobutrazol o diferentes volúmenes de medio de cultivo,

utilizando para ellos frascos de mayor tamaño. Las condiciones de incubación han sido de un FFF de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de 24°C , evaluándose al cabo de 30 o 60 días de incubación, el porcentaje de fenolización, sobrevivencia en base a la sanidad del material vegetal y necrosis por fenolización, escamas hinchadas, brotación, número y tamaño de los microbulbillos, brotes y raíces.

Embriogénesis somática: esta técnica se ha desarrollado mediante la inducción de callos a partir de láminas foliares y microbulbillos de plántulas *in vitro*, sembrados en medio MS adicionados con diferentes tipos y concentraciones de auxinas, principalmente 2,4-D y ANA e incubados en oscuridad durante 90 días. Una vez formados los callos estos son trasladados a medio de multiplicación MS con $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ANA y $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ BAP.

Aclimatización: se ha realizado principalmente con material que presenta algún síntoma de contaminación, utilizando para ello sustrato de turba y arena. Estos microbulbillos se han dividido en tres calibres, 0.2-0.4, 0.5-0.6, y 0.7-1.2, utilizando nueve repeticiones con seis microbulbillos cada una, manteniéndolas durante 15 días en cámaras de luz artificial con un FFF de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura que oscila entre los $12\text{-}23^\circ\text{C}$, cubiertas para mantener la humedad relativa, para posteriormente ser evaluadas y trasladado a invernadero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha descrito en otros trabajos el establecimiento de *Rhodophiala in vitro* a partir de escamas ha entregado porcentajes de brotación muy bajos, para lo cual se ha tenido que recurrir al ingreso de semillas aumentando de esta forma el Banco de Germoplasma de *Rhodophiala in vitro* y *ex vitro*. Sin embargo, del mismo modo como se ha reportado para otras Amaryllidaceas la multiplicación *in vitro* ha sido lenta, y muy dependiente del genotipo, con coefi-

cientes de multiplicación en promedio de 1.0 en medios semisólidos y en algunos casos de 2.0 al realizar un corte en cruz en la zona basal del microbulbillo. La utilización de medios líquidos estacionario ha permitido aumentar a 2.1 la tasa de multiplicación en *R. splendens*, aunque todavía no puede considerarse como un método de multiplicación eficaz, con lo cual se espera que mediante la utilización del cultivo de inmersión temporal estos coeficientes sean mayores.

En el caso de inducción de callos a partir de material de desecho como son las hojas de las plántulas *in vitro* se ha logrado una respuesta favorable en casi todos los tratamientos utilizados, estableciéndose un protocolo para la inducción de callo *in vitro*. Sin embargo, es necesario establecer la secuencia en el desarrollo de las diferentes etapas de la embriogénesis somática, de tal forma de definir los medios de cultivo para la germinación y maduración de los embriones. A pesar de esto se han regenerado plántulas a partir de callos, especialmente del genotipo 363 de *R. splendens*, a partir de callos de hojas en un medio compuesto por $2,0 \text{ mgL}^{-1}$ 2,4-D y 10 mgL^{-1} de ANA.

En el caso de la aclimatización, los microbulbillos con raíces formadas *in vitro* han respondido exitosamente, presentándose una relación directa entre el tamaño de los microbulbillos y la emergencia foliar, la cual fluctuó entre un 80 % (calibre de 0.2-0.4), 90% (calibre de 0.5-0.6) y un 100% (calibre de 0.7-1.2).

BIBLIOGRAFÍA.

- FENNELL, C.W.; van STADEN, J. 2004. Biotechnology of southern African bulbs. South African Journal of Botany 70 : 37-46.
- VISHNEVETSKY, J.; ZAMSKI, E.; ZIV, M. 2003. Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine sarniensis* cultured in vitro. Plant Cell Reports 10.1007/s00299-003-0580-2.
- ZIV, M.; LILIEN-KIPNIS, H. 2000. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes in vitro. Plant Cell Reports 19:845-850.