

Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*

In vitro induction of callogenesis and indirect organogenesis from explants of cotyledon, hypocotyl and leaf in *Ugni molinae*

Mario M Rodríguez Beraud ^{a*}, Mirtha I Latsague Vidal ^b, Manuel A Chacón Fuentes ^a,
Pamela K Astorga Brevis ^a

^a Autor de correspondencia: ^a Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Agronomía, Temuco, Chile, tel.: 56 45 2205536, marodrig@uct.cl

^b Universidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Ciencias Ambientales, Temuco, Chile.

SUMMARY

The objective of this study was to stimulate the production of calluses, to observe its typologies and organogenic response under different induction and differentiation mediums in explants from cotyledons, hypocotyls and leaves of *Ugni molinae*. Higher callus production was obtained with cotyledons in a Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.5 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid (NAA), similar also in explants of hypocotyls with 1.0 and 5.0 mg L⁻¹ of NAA, and in the control (62, 62, 74 and 64 %, respectively). Larger sizes of calluses were observed in cotyledons and smaller in leaves. Later, calluses were transferred to subcultures without growth regulators, where they were observed green, friable, compact and phenolic, obtaining the higher survival rates in calluses induced with 0.5 mg L⁻¹ of NAA for cotyledon and hypocotyl, and 1.0 mg L⁻¹ of NAA in leaf. Finally, the calluses derived from these treatments were cultivated in a differentiation medium with different concentrations of NAA plus 6-benzylaminopurine (BAP). The best organogenic responses were achieved with cotyledons in a medium without growth regulators and the rhizogenic in leaves with 0.1 mg L⁻¹ of NAA + 1.0 mg L⁻¹ of BAP. These results indicate that it is possible to stimulate different types of calluses and to obtain roots or shoots in *U. molinae*, which makes it possible to potentially use this technique for the conservation, micro-propagation and plants breeding of an endemic plant species.

Key words: callogenesis, organogenesis, auxins, cytokinins, Myrtaceae.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue estimular la producción de callos, observar su tipología y respuesta organogénica bajo diferentes medios de inducción y de diferenciación en explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja de *Ugni molinae*. Los mayores porcentajes de callos se lograron con cotiledones en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA), como también en explantes de hipocótilo con 1,0 y 5,0 mg L⁻¹ de ANA, además del testigo (62, 62, 74 y 64 %, respectivamente). El mayor tamaño de callos se observó en cotiledones y el menor en hojas. Posteriormente, los callos fueron transferidos a un subcultivo sin reguladores de crecimiento, donde se observaron callos verdes, friables, compactos y fenólicos, obteniendo la mayor sobrevivencia en callos inducidos con 0,5 mg L⁻¹ de ANA para cotiledón e hipocótilo y 1,0 mg L⁻¹ de ANA en hoja. Finalmente, los callos derivados de estos tratamientos fueron cultivados en un medio de diferenciación con distintas concentraciones de ANA más 6-bencilaminopurina (BAP). La mayor respuesta caulogénica se logró en callos de cotiledones en un medio sin reguladores de crecimiento y la rizogénica en callos de hojas con 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP. Estos resultados indican que es posible estimular distintos tipos de callos y obtener raíces o brotes en *U. molinae*, lo que posibilita su uso potencial para la conservación, micropropagación y mejoramiento vegetal de una especie endémica.

Palabras clave: callogénesis, organogénesis, auxinas, citoquininas, Myrtaceae.

INTRODUCCIÓN

Murta, mutilla o murtilla (*Ugni molinae* Turcz) es un arbusto endémico de Chile, perteneciente a la familia de las mirtáceas, muy polimorfo, que se desarrolla en forma silvestre en el sur de Chile, entre la región del Maule hasta el río Palena de la región de Aysén. Se lo encuentra tanto en la Cordillera de la Costa como en la Cordillera de Los Andes

y en tipos forestales roble-raulí-coihue, coihue-raulí-tepa, roble-hualo y ciprés de Las Guaitecas (Hoffmann 2005). Pese a la gran variabilidad observada en *U. molinae*, existen algunos problemas que están presentes en todos los ecotipos y que impiden la producción comercial de sus frutos, especialmente, su exportación como fruto fresco, como la presencia de sépalos prominentes, semillas duras y cicatriz peduncular (Rodríguez 2000, 2011). El cultivo de callos

puede ser utilizado para diferentes propósitos, tales como la micropropagación y el mejoramiento vegetal. La producción de callo requiere de un explante inicial, el que puede tener una alta diferenciación de sus tejidos, como un trozo de raíz, tallo u hoja, o bien la utilización de tejidos menos diferenciados como hipocótilos y cotiledones de plántulas recién germinadas e incluso embriones zigóticos maduros e inmaduros (Correia y Canhoto 2010). También, aunque con menor frecuencia, se han utilizado tejidos florales como estambres, pétalos y ovarios (Stefanello *et al.* 2005). En cualquier caso, la inducción de callo representa un proceso de dediferenciación y división celular intensiva, el cual depende principalmente del explante, genotipo, medio de cultivo, tipo de regulador de crecimiento como también su concentración y combinación (Larson *et al.* 2006, Feeney *et al.* 2007, Rashmi y Trivedi 2014).

La organogénesis indirecta a menudo induce la variación somaclonal y permite exponer características diferentes que no están expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable (Sala y Labra 2003). Por otra parte, la rizogénesis *in vitro* y el cultivo de células a partir de callos podría ser utilizada para la producción de metabolitos secundarios en bioreactores, lo cual resulta interesante para una planta a la cual se le atribuyen numerosas características medicinales, como efectos analgésicos, anti-inflamatorios, astringentes, actividad antimicrobiana y antioxidante de sus hojas (Delporte *et al.* 2007). Por otra parte, los callos pueden ser utilizados para hacer suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Normalmente, esta vía requiere de una elevada concentración de auxinas en la etapa de inducción de callo (Trabelsi *et al.* 2010).

En mirtáceas la producción de callos a partir de tejidos juveniles como embriones zigóticos o parte de plántulas se ha utilizado para la embriogénesis somática indirecta, induciendo callos con diferentes concentraciones y combinaciones de auxinas y citoquininas (Correia y Canhoto 2010, Prakash y Gurumurthi 2010). La caulogénesis indirecta para fines de micropropagación se ha logrado con el uso de citoquininas, principalmente BAP durante la etapa de inducción de callos de *Eucalyptus globulus* Labill. (Larson *et al.* 2006) y de *Eucalyptus erythronema* Turcz. (Glocke *et al.* 2006). Otra aplicación para el cultivo de callos es la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, o bombardeo con partículas de tungsteno (Al Abdallat *et al.* 2011).

La callogénesis de *U. molinae* no ha sido reportada, lo cual es la base para la aplicación de otras técnicas mencionadas anteriormente. Las hipótesis de esta investigación son que *Ugni molinae* es capaz de formar callos a partir de explantes de cotiledón, hipocótilos y hojas y que es posible obtener una respuesta organogénica a partir de estos callos. Los objetivos son inducir la formación de callo en explantes de cotiledones, hipocótilos y hojas, describir su tipología y posterior diferenciación organogénica bajo diferentes tratamientos de reguladores de crecimiento como 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP).

MÉTODOS

El ensayo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Agronomía de la Universidad Católica de Temuco, región de La Araucanía, Chile. Todos los medios de cultivo utilizados en la presente investigación fueron gelificados con 7 g L⁻¹ de agar y se esterilizaron en autoclave a 120 °C a 1 atmósfera de presión (0,1 MPa) por 20 minutos. Las placas Petri desechables de 60 x 15 mm contenían 10 mL de medio cada una, el pH fue ajustado a 5,8 con 1,0 N hidróxido de potasio (KOH) y 1,0 N de ácido clorhídrico (HCl). Las condiciones de incubación fueron 25 °C ± 1, fotoperiodo de 16 h luz con 3.000 lux de intensidad (tubos Philips TLD 36W/54).

Material vegetal. Para la obtención de explantes de cotiledón, hipocótilos y hojas se germinaron *in vitro* semillas de *U. molinae* cosecha 2009, procedentes de la localidad de Curiñanco, sector costero de Valdivia, zona sur de Chile (latitud 39° 40' S, longitud 73° 21' O). Las semillas fueron desinfectadas en cámara de flujo laminar con una solución de fungicida (2 g L⁻¹ de Mancozeb + 0,6 g L⁻¹ de Benomil), más unas gotas de tensoactivo Tween 20 por 20 minutos. Luego, se adicionó hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % v/v (cloro activo) por 10 minutos y etanol 70° por 5 segundos, finalizando con tres enjuagues consecutivos de agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron secadas en cámara de flujo laminar a 20 °C durante 24 h y almacenadas a 4 °C por cinco meses. Se sembraron 25 semillas por placa Petri, la germinación *in vitro* se realizó en un medio (agua y agar) de pH 5,8 aplicando como buffer 3 mM L⁻¹ de ácido 2-(N-morfolino) etano sulfónico (MES). A los siete días de germinadas se escindieron los cotiledones e hipocótilos de las plántulas. Otro grupo de semillas continuó su desarrollo hasta cuatro semanas para la obtención de hojas con pecíolo, las que se colocaron en forma abaxial en contacto con el medio.

Callogénesis. Para la inducción de callos, los explantes se cultivaron en un medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementando con 30 g L⁻¹ de sacarosa más ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) o ácido naftalenacético (ANA), o la auxina en combinación con 6-bencilaminopurina (BAP), más un testigo por explante (cuadro 1). Este ensayo se mantuvo en oscuridad continua por 21 días. Al finalizar esta etapa, se evaluó la callogénesis y se clasificó por tamaño de callos. La callogénesis se expresa como el porcentaje de explantes que forman callos. Posterior a la inducción, los callos de los diferentes explantes fueron transferidos a un medio de cultivo MS, sin reguladores de crecimiento, suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y mantenidos durante 60 días en cámara de incubación, con un fotoperiodo de 16 h luz. Se realizaron dos subcultivos con intervalos de 30 días. Finalizada esta etapa se evaluó la sobrevivencia de callos y se clasificaron en verde, friable, compacto y fenólico.

Organogénesis. Los callos procedentes del subcultivo, fueron repicados a un tamaño aproximado de 0,3 cm cada uno, excepto los más pequeños, y transferidos a placas Petri con un medio basal MS suplementado con diferentes combinaciones hormonales, para su diferenciación (cuadro 2). Los medios de cultivos fueron suplementados con 30 g L⁻¹ de sacarosa y mantenidos durante 21 días en cámara de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz. Al finalizar este período se midió longitud y porcentaje de brotes y raíces.

Estudio morfológico. Se efectuaron análisis morfológicos con una lupa Japan Optical CO. Modelo XTL-2310 (10 x 4,5), para diferenciar estructuras callogénicas y organogénicas, bajo condiciones asépticas. Se realizaron caracterizaciones que incluyeron aspectos tales como, tamaño, co-

lor, y superficie del callo. Para la cuantificación de tamaño de callos, longitud de brotes y raíces se utilizó un pie de metro digital Mitutoyo CD-6. Como criterio de clasificación de tamaño de callos se utilizó la siguiente escala, callos pequeños < 0,5 cm, callos mediano entre 0,5 - 1,0 cm y callos grandes > 1,0 cm.

Diseño experimental y análisis de los datos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el software SPSS (versión 15,0 para Windows). Cada tratamiento constó de 10 placas con cinco explantes cada una, utilizando la placa como unidad experimental, tanto para la etapa de inducción como de diferenciación. Para el ensayo de callogénesis se utilizó un experimento completamente aleatorio con un factorial de 3 x 9, producto de tres tipos de explantes y nueve combinaciones hormonales (cuadro 1) y para el ensayo de organogénesis un factorial de 3 x 3 producto de tres tipos de explantes y tres combinaciones hormonales (cuadro 2). Se aplicó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y se analizó la homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene). Para observar las diferencias significativas en los porcentajes de callogénesis en el medio de inducción y la organogénesis en el medio de diferenciación, se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un $P \leq 0,05$ y la prueba de comparación múltiple de Tamhane para la formación de grupos. Los datos de porcentajes fueron normalizados usando una transformación mediante el cálculo de arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje.

Cuadro 1. Tratamientos de inducción de callos en medio MS.
Treatments for callus induction in MS medium.

Tratamiento	Explante	Medio de inducción (mg L ⁻¹)
1	Cotiledón	2,4-D 0,5
2	Cotiledón	2,4-D 1,0
3	Cotiledón	2,4-D 5,0
4	Cotiledón	ANA 0,5
5	Cotiledón	ANA 1,0
6	Cotiledón	ANA 5,0
7	Cotiledón	2,4-D 1,0 + BAP 1,0
8	Cotiledón	ANA 1,0 + BAP 1,0
9 (Control 1)	Cotiledón	0
10	Hipocótilo	2,4-D 0,5
11	Hipocótilo	2,4-D 1,0
12	Hipocótilo	2,4-D 5,0
13	Hipocótilo	ANA 0,5
14	Hipocótilo	ANA 1,0
15	Hipocótilo	ANA 5,0
16	Hipocótilo	2,4-D 1,0 + BAP 1,0
17	Hipocótilo	ANA 1,0 + BAP 1,0
18 (Control 2)	Hipocótilo	0
19	Hoja	2,4-D 0,5
20	Hoja	2,4-D 1,0
21	Hoja	2,4-D 5,0
22	Hoja	ANA 0,5
23	Hoja	ANA 1,0
24	Hoja	ANA 5,0
25	Hoja	2,4-D 1,0 + BAP 1,0
26	Hoja	ANA 1,0 + BAP 1,0
27 (Control 3)	Hoja	0

RESULTADOS

Callogénesis. El análisis de los factores tipo de explante y combinaciones hormonales indicaron, para ambos, diferencia significativas ($P \leq 0,05$). Los hipocótilos alcanzaron el promedio más alto de formación de callo respecto a los otros explantes (49 % vs 41 % y 18 % de cotiledones y hojas respectivamente), en tanto que ANA fue el regulador de crecimiento que más estimuló la callogénesis.

Cuadro 2. Tratamientos para organogénesis de callos en medio MS.
Treatments for callus organogenesis in MS medium.

Tratamiento	Explante	Medio de diferenciación (mg L ⁻¹)
1	Cotiledón	ANA 0,1 + BAP 0,5
2	Cotiledón	ANA 0,1 + BAP 1,0
3 (Control 1)	Cotiledón	0
4	Hipocótilo	ANA 0,1 + BAP 0,5
5	Hipocótilo	ANA 0,1 + BAP 1,0
6 (Control 2)	Hipocótilo	0
7	Hoja	ANA 0,1 + BAP 0,5
8	Hoja	ANA 0,1 + BAP 1,0
9 (Control 3)	Hoja	0

En cotiledones, el aumento de la concentración de ANA produjo una disminución en el porcentaje de callogénesis observándose la mayor respuesta (62 %) con 0,5 mg L⁻¹ de ANA. En general, la combinación de BAP con auxinas disminuyó la formación de callo respecto a la auxina utilizada por sí sola (figura 1). En hipocótilos, los promedios máximos de 74 %, 62 %, y 64 % de callogénesis se registraron en los tratamientos 5,0 y 1,0 mg L⁻¹ de ANA y control respectivamente. En tanto, que el promedio más bajo se observó en el tratamiento 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP (14 %). Los hipocótilos tratados con 2,4-D o con ANA, presentaron un aumento en el porcentaje de callogénesis, en relación a la concentración hormonal. Respecto a los explantes de hojas, la formación de callo fue baja en comparación con los cotiledones e hipocótilos, el tratamiento que obtuvo el porcentaje más alto de callogénesis fue 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg L⁻¹ de BAP con un 60 %, este explante, a diferencia de los demás, presentó mejores respuestas en los tratamientos combinados de auxinas con BAP. Los menores porcentajes se observaron en los tratamientos con 2,4-D y testigo.

Tamaño de los callos. El mayor crecimiento de callos se observó en cotiledones, especialmente los tratados con 0,5 mg L⁻¹ de ANA, luego en orden decreciente, hipocótilos y hojas (cuadro 3). En los explantes de cotiledón prevalecieron los tamaños medianos, a excepción de aquellos que incluyeron BAP, los cuales fueron pequeños. Para hipocótilos, los tratamientos testigo y 2,4-D a concentraciones de 0,5 y 1,0 mg L⁻¹ lograron tamaños de callos medianos, en tanto que el aumento de la concentración de ANA y 2,4-D produjo callos pequeños. Los tratamientos de auxinas en combinación con BAP solo produjeron callos pequeños en todos los explantes.

Tipos de callos. Luego de una etapa de inducción y de subcultivo sin reguladores de crecimiento, algunos callos no sobrevivieron, especialmente los provenientes de hojas (cuadro 4). Los callos presentaron contrastes morfológicos evidentes respecto a su color, textura y superficie clasificándose en cuatro tipos (figura 2). Los porcentajes más altos de callos verdes se alcanzaron en hipocótilos y cotiledones procedentes del testigo con un 40 % en ambos (figura 2A y 2E), como también en callos de hojas (46 %)

Cuadro 3. Tamaño de los callos (cm) en explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja de *Ugni molinae* a los 21 días de cultivo en medio MS bajo tratamiento de inducción.

Size of the callus of *Ugni molinae* after 21 days in MS induction medium in explants of cotyledon, hypocotyl and leaf.

Hormona (mg L ⁻¹)		Tamaño de callo		
Auxina	Citoquinina	Cotiledón	Hipocótilo	Hoja
-	-	++	++	+
2,4-D 0,5	-	++	++	+
2,4-D 1,0	-	++	++	+
2,4-D 5,0	-	++	+	+
ANA 0,5	-	+++	++	+
ANA 1,0	-	++	+	+
ANA 5,0	-	++	+	+
2,4-D 1,0	BAP 1,0	+	+	+
ANA 1,0	BAP 1,0	+	+	+

Tamaño de callos: + pequeños < 0,5 cm, ++ medianos 0,5 - 1,0 cm, +++ grandes > 1,0 cm; n = 10.

Sobre el 70 % de los datos, se encuentran en los rangos asignados.

Cuadro 4. Supervivencia y tipos de callo obtenidos de diferentes explantes de *Ugni molinae*, a los 60 días en subcultivo en medio MS sin reguladores de crecimiento.

Survival rates and types of calluses of different explants from *Ugni molinae*, after 60 days in subculture in the MS medium without growth regulators.

Procedencia del tratamiento (mg L ⁻¹)	Supervivencia de callos (%)			Callo verde (%)			Callo friable (%)			Callo compacto (%)			Callo fenólico (%)		
	C*	Hi*	H*	C	Hi	H	C	Hi	H	C	Hi	H	C	Hi	H
Testigo	56	74	0	40	40	0	10	6	0	0	0	0	6	28	0
2,4-D 0,5	34	58	0	0	0	0	6	0	0	28	52	0	0	6	0
2,4-D 1,0	48	78	0	0	0	0	18	12	0	30	38	0	0	28	0
2,4-D 5,0	56	70	0	2	0	0	28	28	0	0	0	0	26	42	0
ANA 0,5	72	94	0	0	0	0	38	20	0	34	0	0	0	74	0
ANA 1,0	48	64	80	0	0	46	34	26	34	0	0	0	14	38	0
ANA 5,0	50	74	16	0	0	4	24	28	6	0	0	2	26	46	4
2,4-D 1,0+BAP 1,0	26	6	0	0	0	0	24	2	0	0	0	0	2	4	0
ANA 1,0+BAP 1,0	74	30	0	0	0	0	72	22	0	0	0	0	2	8	0

* C = cotiledón, Hi = hipocótilo, H = hoja.

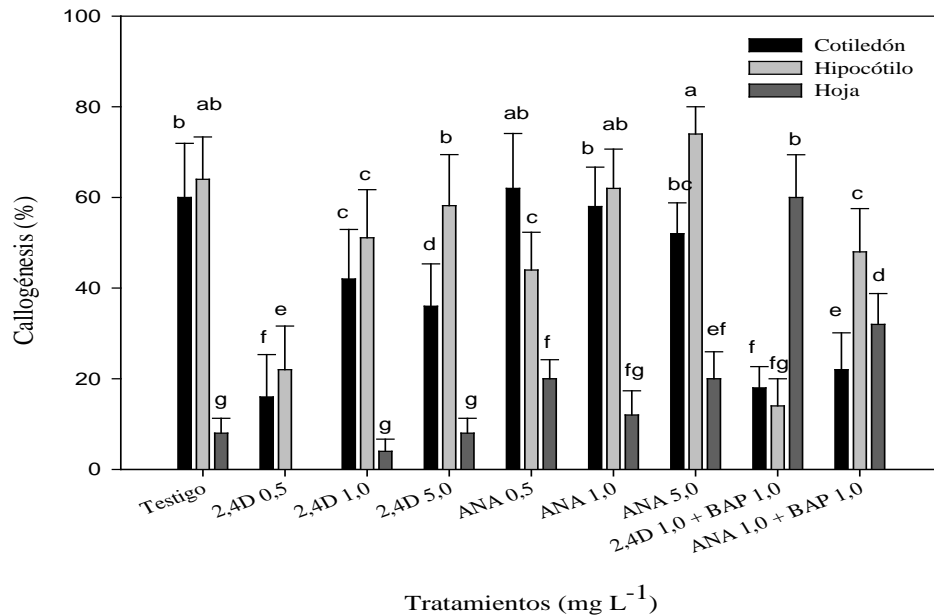


Figura 1. Respuestas callogénicas (%) para los diferentes medios de inducción en explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja a los 21 días. Barras y líneas verticales representan el promedio \pm el error estándar de la media. Barras con letras distintas indican diferencias significativas (Tamhane, $*P \leq 0,05$, $n = 10$).

Callogenic responses (%) for different induction media in explants of cotyledons, hypocotyls and leaves after 21 days. Bars and vertical lines represent average and the standard error. Bars with different letters indicate significant differences among means (Tamhane, $*P \leq 0.05$, $n = 10$).

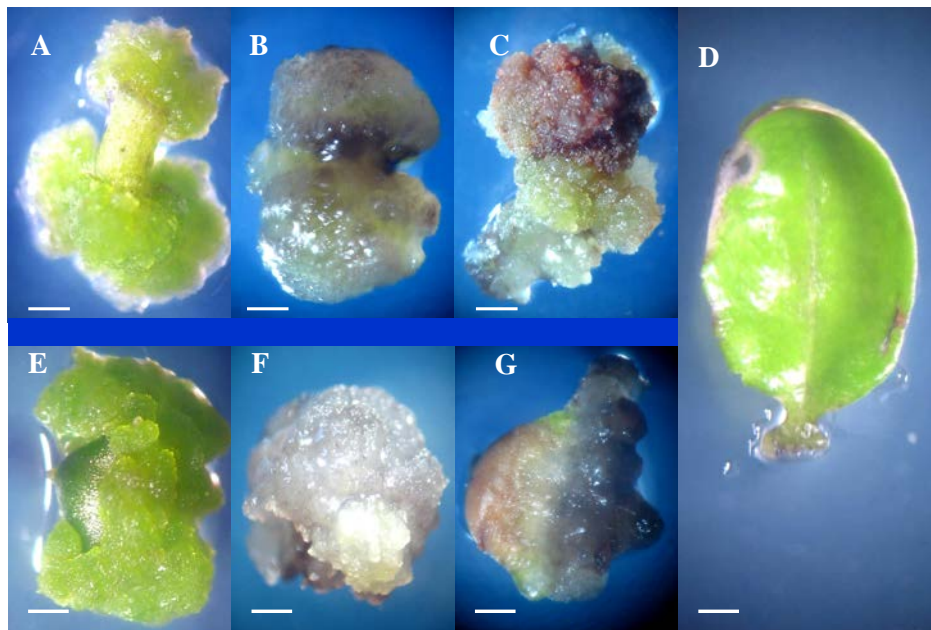


Figura 2. Tipos de callos en *Ugni molinae*, a partir de distintos explantes procedentes de 21 días en medios de inducción y 60 días de subcultivo en medio MS sin reguladores de crecimiento. Hipocótilos (A) Callo verde testigo. (B) Callo compacto 0,5 mg L⁻¹ de 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D). (C) Callo fenólico 0,5 mg L⁻¹ ácido naftalenacético (ANA). Hoja (D) Callo verde 1,0 mg L⁻¹ ANA. Cotiledones (E) Callo verde testigo. (F) Callos friable 1,0 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). (G) Callo fenólico 5,0 mg L⁻¹ de ANA. Barras corresponden a 0,1 cm.

Types of calluses in *Ugni molinae*, from different explants after 21 days in induction medium and 60 days of subculturing in the MS medium without growth regulators. Hypocotyls (A) Green callus, control. (B) Compact callus, 0.5 mg L⁻¹ of 2.4 diclorofenoxiacetic (2.4-D). (C) Phenolic callus, 0.5 mg L⁻¹ naftalenacetic acid (NAA). Leaves (D) Green callus, 1.0 mg L⁻¹ NAA. Cotyledons (E) Green callus, control. (F) Friable callus, NAA + 1.0 mg L⁻¹ of 6-bencilaminopurine (BAP). (G) Phenolic callus, NAA 5.0 mg L⁻¹. Bars correspond to 0.1 cm.

derivados del medio de inducción con 1,0 mg L⁻¹ ANA (figura 2D). En tanto, el máximo para callos friables (72 %) se logró sobre cotiledones procedentes del tratamiento con 1,0 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP (figura 2F). Los callos compactos alcanzaron su máxima respuesta (52 %) en hipocótilos tratados con 0,5 mg L⁻¹ de 2,4-D (figura 2B). Respecto a los callos fenólicos, el mayor porcentaje (74 %) se presentó en hipocótilos, particularmente en los tratados con 0,5 mg L⁻¹ de ANA (figura 2C) y en cotiledones con 0,5 mg L⁻¹ de 2,4 D y 5,0 mg L⁻¹ de ANA (figura 2G).

Caulogénesis. La formación de brotes en callos fue baja, siendo nula para el caso de los explantes de hojas (cuadro 5). Los porcentajes más altos de caulogénesis se obtuvieron en los tratamientos testigo y 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP con un 6 % y 4 %, respectivamente, ambos en cotiledones (figura 3A). En relación al largo del brote, se obtuvieron las mayores longitudes en los tratamientos 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP con 1,35 cm en cotiledones y 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 0,5 mg L⁻¹ de BAP con 1,45 cm en hipocótilos.

Rizogénesis. Se observó formación de raíces en todos los tratamientos excepto en los cotiledones sin reguladores de crecimiento. Las hojas presentaron la mayor respuesta (32 %) en la combinación hormonal con mayor concentración de BAP (figura 3D), a diferencia de los otros explantes que obtuvieron una mayor rizogénesis con una baja concentración de BAP (figura 3B y 3C).

Con respecto al largo de las raíces, en cotiledones la mayor longitud se alcanzó con el tratamiento 0,1 mg L⁻¹ de

ANA + 1,0 mg L⁻¹ de BAP con 5,85 cm, para hojas en el testigo con 8,9 cm y en hipocótilos con 0,1 mg L⁻¹ de ANA + 0,5 mg L⁻¹ de BAP observándose en este tratamiento el promedio de 13,20 cm, siendo este último valor significativamente ($P \leq 0,05$) el más alto para esta variable.

DISCUSIÓN

Al menos el 60 % de los cotiledones e hipocótilos de *U. molinae* son capaces de formar callos en un medio MS prescindiendo de auxinas o de combinaciones de éstas con BAP (figura 1). Esta respuesta es poco frecuente, ya que generalmente la formación de callo es estimulada por el corte de los tejidos y la concentración exógena del regulador de crecimiento utilizado. Los callos se generan a partir de la zona de corte en todos los explantes (figura 2), los hipocótilos lo hacen en ambos extremos y las hojas en la base del pecíolo lo que sugiere una acumulación de auxinas en las zonas de corte y en consecuencia una estimulación de la mitosis permitiendo la formación de tejido calloso (Smith 2012).

La callogénesis es altamente dependiente del tipo de explante y hormona utilizada. En hipocótilos, a diferencia de los otros explantes, se ve un claro incremento de la callogénesis cuando se aumenta la concentración de 2,4-D y ANA (figura 1). Entre los tratamientos que utilizaron las auxinas con BAP la mejor combinación es ANA + BAP tanto en cotiledón como en hipocótilo, al igual que lo observado por Gómez *et al.* (2006) en *E. globulus*. En hojas, en contraste a hipocótilos y cotiledones, la callogénesis responde a la presencia de BAP en los medios de inducción, especialmente, cuando se combina con 2,4-D superando el porcentaje del testigo. Al respecto, Pinto *et al.* (2002) lograron incrementar el porcentaje de callos aumentando la concentración hormonal de 2,4-D y de BAP en este tipo de explantes en *E. globulus*.

El tamaño de callos en cotiledones de *U. molinae* es en general superior al de hipocótilo y hoja (cuadro 3), como lo observado por Pinto *et al.* (2002) al utilizar 2,4-D y ANA en *E. globulus*, sin embargo, resulta inferior al reporte de Gómez *et al.* (2006) quienes observaron tamaños promedios de 1,5 cm en combinaciones de 2,4-D y BAP.

Tanto los callos verdes como los fenólicos presentaron una superficie nodular. Muchos investigadores han relacionado el tipo de callo con la respuesta organogénica y embriogénica que se pueda presentar, siendo altamente dependiente de la especie. Por lo tanto, el tipo de callo puede ser un indicador importante de la ruta morfogénica a seguir (Smith 2012). No obstante, independiente del color del callo existe una alta evidencia que los callos organogénicos proceden, generalmente, de callos nodulares ya sean de color verde o de apariencia oxidada como los fenólicos (Bandyopadhyay *et al.* 1999, Ainsley *et al.* 2000). El pardeamiento de los callos fenólicos fue en aumento en relación a los días de cultivo, en algunos casos especialmente los que detuvieron su crecimiento quedaron finalmente ne-

Cuadro 5. Respuesta organogénica, longitud de brotes y raíces de *Ugni molinae* a los 21 días en medio de diferenciación (MS).

Organogenic responses of *Ugni molinae*, length of shoots and roots after 21 days in the differentiation medium (MS).

Tratamientos (mg L ⁻¹)	Organogenesis (%)		Longitud (cm)	
	Brote	Raíz	Brote	Raíz
Explante cotiledón				
Testigo	6 ^a	0	0,85 ^{bc}	0,00
ANA 0,1+BAP 0,5	0	20 ^b	0,00	3,60 ^d
ANA 0,1+BAP 1,0	4 ^{ab}	6 ^{cd}	1,35 ^{ab}	5,85 ^c
Explante hipocótilo				
Testigo	0	8 ^c	0,00	6,08 ^{bc}
ANA 0,1+BAP 0,5	2 ^b	16 ^b	1,45 ^a	13,20 ^a
ANA 0,1+BAP 1,0	2 ^b	10 ^c	0,55 ^c	3,14 ^d
Explante hoja				
Testigo	0	2 ^d	0,00	8,90 ^b
ANA 0,1+BAP 0,5	0	4 ^d	0,00	2,65 ^d
ANA 0,1+ BAP 1,0	0	32 ^a	0,00	4,87 ^{cd}

Medias dentro de cada columna con letras distintas indican diferencias significativas (Tamhane, * = $P \leq 0,05$, n = 10).

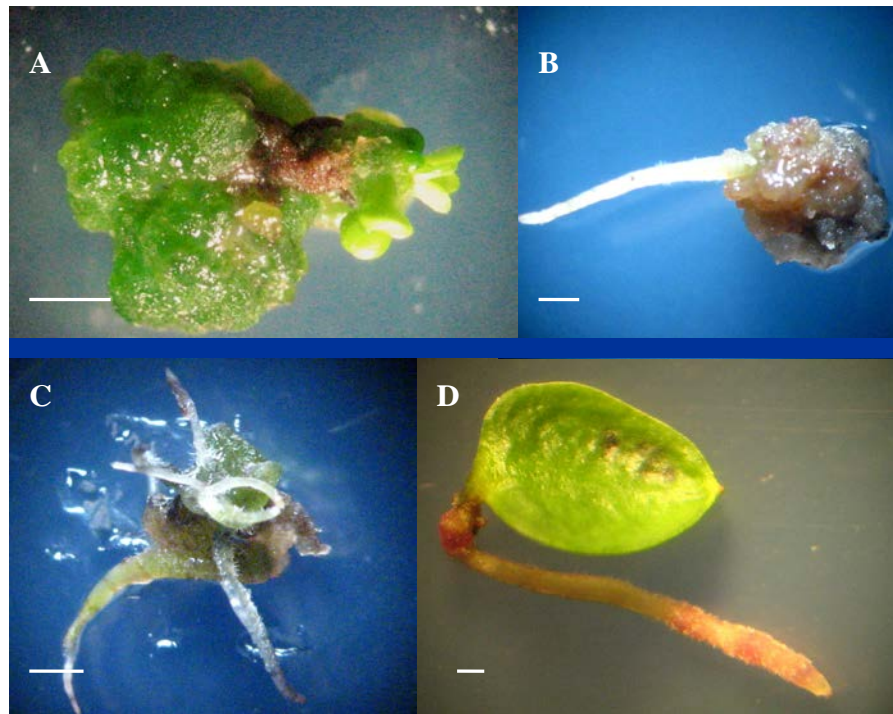


Figura 3. Respuesta organogénica del cultivo de callos de *Ugni molinae* en medios de diferenciación. A) Caulogénesis a partir de callo de cotiledón obtenido de un medio MS sin reguladores de crecimiento. B) Rizogénesis sobre callos de cotiledón cultivados en MS + 0,1 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) + 0,5 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). C) Rizogénesis sobre callos de hipocótilo en medio MS + 0,1 mg L⁻¹ ANA + 0,5 mg L⁻¹ BAP. D) Rizogénesis a partir de callo sobre el peciolo de la hoja en un medio MS + 0,1 mg L⁻¹ ANA + 1,0 mg L⁻¹ BAP. Barras corresponden a 0,1 cm.

Organogenic responses from calluses culture of *Ugni molinae* in differentiation medium. A) Caulogenesis from callus of cotyledons obtained of MS medium without growth regulators. B) Rizogenesis from cotyledons calluses cultivated in MS + 0.1 mg L⁻¹ of naftalenacetic acid (NAA) + 0.5 mg L⁻¹ of 6-bencilaminopurine (BAP). C) Rizogenesis from hypocotyls calluses in medium MS + 0.1 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ BAP. D) Rizogenesis from calluses on petiole leaf calluses in medium MS + 0.1 mg L⁻¹ NAA + 1.0 mg L⁻¹ BAP. Bars correspond to 0.1 cm.

cróticos y otros continuaron hacia la formación de órganos (figura 3). El cambio de aspecto de los callos conforme se cultivan en el tiempo ha sido reportado por Larson *et al.* (2006). La apariencia translúcida, cristalina y superficie lisa de los callos compactos de *U. molinae* se relaciona a los explantes de cotiledón e hipocótilos inducidos con 2,4-D. Al respecto Shiram *et al.* (2008) señalan que altas concentraciones de auxina o citoquininas estimulan la producción de callo y que su aspecto está relacionado al tipo de hormona utilizada durante su inducción.

Después de 21 días en medios de inducción en base a auxinas, 60 días previos de subcultivo de callos en un medio MS sin hormonas y 21 días en medios de diferenciación con mayor relación citoquinina/auxina se observó una rizogénesis predominante para todos los tratamientos ensayados, excepto, en los cotiledones no tratados con hormonas. Lo anterior puede ser atribuido a la mayor presencia de auxinas en los medios de inducción de callo en este estudio. La presencia de brotes en cotiledones e hipocótilos en *U. molinae*, aunque es baja, sugiere que si el objetivo es la regeneración indirecta de plantas se debe inducir callos a partir de estos explantes sin hormonas o a base del uso de

citoquininas como BAP, zeatina (ZEA), kinetina (KIN) o tiadizuron (TDZ) (Larson *et al.* 2006, Meiners *et al.* 2007). Se observó además que, durante el transcurso de formación de brotes, los callos que dieron origen a brotes fueron aumentando su grado de oxidación, situación también descrita por Gómez *et al.* (2006) y Feeney *et al.* (2007), la cual se atribuye a la producción de fenoles. La caulogénesis dependería de una relación óptima entre las concentraciones totales de citoquininas y de auxinas exógenas y endógenas. La formación de raíces generalmente se opone a la formación de vástagos y viceversa, si ambos procesos se intentan de forma simultánea *in vitro* frecuentemente se producen problemas (Smith 2012). No obstante, en otras investigaciones la inducción de callos con una alta relación auxina/citoquinina o sólo auxinas favorece la presencia de callos caulogénicos, como lo dejan en evidencia los reportes de Tang y Newton (2005) en *Pinus strobus* L. y de Hajari *et al.* (2006) en híbridos de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*. En otros casos, como en *Eucalyptus nitens*, *E. globulus* y *E. camaldulensis*, la inducción basada en auxinas ha promovido callos embriogénicos (Bandyopadhyay *et al.* 1999, Prakash y Gurumurthi 2010). Este estudio, pio-

nero para la especie, abre expectativas para el uso potencial de callos de *U. molinae* en otras aplicaciones tales como, la producción de protoplastos, híbridos somáticos, embriones somáticos y su utilización en la poliploidización.

CONCLUSIONES

Los cotiledones e hipocótilos son los explantes más apropiados para el desarrollo de callos en *U. molinae*, estos incluso pueden prescindir de la adición de hormonas exógenas en la fase de inducción. El tipo de callo depende tanto del tipo de explante y del tratamiento hormonal. La ausencia de reguladores de crecimiento en los medios de inducción estimula la presencia de callos verdes, mientras que los tratados con reguladores de crecimiento son en su mayoría friables y fenólicos. Los tratamientos ensayados en *U. molinae* potencian preferentemente el proceso de rizogénesis comparado con el de caulogénesis.

REFERENCIAS

- Al Abdallat A, J Sawwan, B Al Zoubi. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of callus cells of *Craetagus aronia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 31-39. DOI: 10.1007/s11240-010-9798-1.
- Ainsley P, G Collins, M Sedgley. 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 36: 470-474.
- Bandyopadhyay S, C Karen, R Gillian, D John. 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Plant Science* 140: 189-198.
- Correia S, J Canhoto. 2010. Characterization of somatic embryo attached structures in *Feijoa sellowiana* Berg. (Myrtaceae). *Protoplasma* 242: 95-107. DOI: 10.1007/s00709-010-0130-z.
- Delporte C, N Backhouse, V Inostroza, M Aguirre, N Peredo, X Silva. 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology* 112(1): 162-165.
- Feeney M, B Bhagwat, J Mitchell, W Lane. 2007. Shoot regeneration from organogenic callus of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90: 201-214.
- Glocke P, G Collins, M Sedgley. 2006. Effects of auxins on organogenesis and somatic embryogenesis from juvenile explants of *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii*, and two inter-specific hybrids. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 81(6): 1009-1014.
- Gómez C, M Uribe, D Ríos, M Sanchez. 2006. Inducción de callo embriogénico en *Eucalyptus globulus* Labill. *Interciencia* 31(10): 734-738.
- Hajari E, M Watt, D Mycock, B McAlister. 2006. Plant regeneration from induced callus of improved *Eucalyptus* clones. *South African Journal of Botany* 72: 195-201.
- Hoffmann A. 2005. Flora silvestre de Chile. Zona Araucana. Quinta edición. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 258 p.
- Larson C, C Gómez, M Sánchez, D Ríos. 2006. Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus globulus*. *Bosque* 27(3): 250-257.
- Meiners, J, M Schwab, I Szankowski. 2007. Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 89:169-176.
- Murashige T, F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Pinto G, C Santos, L Neves, C Araújo. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. *Plant Cell Reports* 21: 208-213. DOI: 10.1007/s00299-002-0505-5.
- Prakash M, K Gurumurthi. 2010. Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 100: 13-20. DOI: 10.1007/s11240-009-9611-1.
- Rashmi R, M Trivedi. 2014. Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of *Nerium odorum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI 10.1007/s12010-013-0693-1.
- Rodríguez M. 2000. Análisis de la diversidad fenotípica de murta (*Ugni molinae* Turcz.) a través de métodos multivariados. Tesis Magister en Ciencias. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. 177 p.
- Rodríguez M. 2011. La propagation d'écotypes sélectionnés de murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), une baie endémique du Chili: étude de la germination et stratégies de multiplication *in vitro*. Tesis doctoral. Paris, Francia. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, AgroParis-Tech. Ecole Doctorale ABIES. 232 p.
- Sala F, M Labra. 2003. Somaclonal variation. In Thomas B, DJ Murphy, B Murray eds. *Encyclopedia Appl. Plant Sci.* Oxford, UK. Academic Press Elsevier. p. 1417-1422.
- Shiram V, V Kumar, M Shitole. 2008. Indirect organogénesis and plant regeneration in *Helicteres isora* L., an important medicinal plant. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 44:186 DOI: 10.1007/s11627-008-9108-3.
- Smith R. 2012. Plant tissue culture: Techniques and experiments. Londres, UK. Academic Press Elsevier. 208 p.
- Stefanello S, L Dal Vesco, J Ducroquet, R Nodari, M Guerra. 2005. Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg). *Scientia Horticulturae* 105: 117-126.
- Tang W, R Newton. 2005. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobes* L.). *Plant Cell Reports* 24: 1-9. DOI: 10.1007/s00299-005-0914-3.
- Trabelsi E, S Najja, N Elloumi, Z Belfeleh, M Msellem, R Ghezal, S Bouzid. 2010. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(2): 319-324. DOI: 10.1007/s11738-010-0550-6.