

Efectos del ácido giberélico, N⁶-bencilaminopurina y fluridona sobre la germinación *in vitro* de *Aristotelia chilensis*

Effects of gibberellic acid, N⁶-benzylaminopurine and fluridone on the *in vitro* germination of *Aristotelia chilensis*

Mario Rodríguez Beraud ^{**}, Jocelyne Tampe Pérez ^b

*Autor de correspondencia: ^aUniversidad Católica de Temuco, Facultad de Recursos Naturales, Escuela de Agronomía, Rudecindo Ortega 02950, Temuco, Chile, tel.: 56 45 2205536, marodrig@uct.cl

^bUniversidad de La Frontera, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Laboratorio de Química Ecológica, Avenida Francisco Salazar, 01145 Temuco, Chile.

SUMMARY

Aristotelia chilensis is a native tree species from Chile whose berry fruits are credited as holding a high antioxidant and cardio-protective ability. Its seeds possess high dormancy. In order to accelerate the germination process, N⁶-benzylaminopurine (BAP), gibberellic acid (GA₃) and Fluridone (FLU) in two concentrations (10 and 100 μM) were studied *in vitro* conditions. The BAP treatments were the most effective dominance breakers mostly in a 100 μM concentration: reaching 74 % germination at 30 days, much higher than the 27 % from the witness control group. Germination curves indicate that treatments with GA₃ and FLU accelerated germination, which started after a lag phase of 40 days. However, maximum germination never achieved the one obtained by the BAP 100 μM treatment with 85 % after 60 days.

Key words: *Aristotelia chilensis*, dormancy, germination, N⁶-bencilaminopurine, tissue culture.

RESUMEN

Aristotelia chilensis, es una especie nativa de Chile, a cuyos frutos se le atribuye una alta capacidad antioxidante y cardio-protectora. Esta especie posee elevada dormancia en sus semillas. Con el propósito de acelerar el proceso de germinación, se estudiaron los efectos de N⁶-bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (GA₃) y fluridona (FLU) en concentraciones de 10 y 100 μM, respectivamente, bajo condiciones *in vitro*. Los tratamientos con BAP, fueron los más efectivos en romper la dormancia, especialmente en concentración de 100 μM, elevando la germinación respecto al testigo de 27 a 74 % a los 30 días. Las curvas de germinación indican que los tratamientos con GA₃ y FLU iniciaron una fase de mayor aceleración posterior a los 40 días, no obstante, nunca lograron alcanzar la germinación máxima obtenida por el tratamiento BAP 100 μM (G_{máx}, 85 %, a los 60 días).

Palabras clave: *Aristotelia chilensis*, dormancia, germinación, N⁶-bencilaminopurina, cultivo de tejidos.

INTRODUCCIÓN

La dormancia y germinación de las semillas son procesos adaptativos de las plantas superiores que son influenciados por un gran número de genes y factores ambientales. En muchas especies de importancia agrícola, la dormancia o latencia prolongada es una característica indeseable, donde la rápida germinación y el crecimiento vegetativo son necesarios a la hora de establecer un cultivo (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). La fuerte dormancia que presentan la mayoría de las especies nativas, corresponde a un rasgo adaptativo a fin de evitar condiciones desfavorables y facilitar el proceso reproductivo. Por otra parte, la baja dormancia, propia de las especies cultivadas es el resultado de la selección genética y mejoramiento de estas (Bewley *et al.* 2013). En el control

de la dormancia participan sustancias promotoras tales como citoquininas, giberelinas (GAs), e inhibidoras como el ácido abscísico (ABA) (Koornneef *et al.* 2002, Nikolić *et al.* 2006). Para muchas especies, el ABA, se considera el principal inhibidor de la germinación, induciendo la síntesis de proteínas de almacenamiento en las semillas e inhibiendo la síntesis de proteínas relacionadas con la movilización de reservas (Kermode 2005). El balance entre ABA y las GAs tiene un rol importante en la regulación de la dormancia, como consecuencia de un balance dinámico entre la síntesis y degradación de estas hormonas. El quiebre de la dormición se asocia principalmente a un incremento en la concentración de GAs (Sawada *et al.* 2008) y a una reducción del contenido de ABA (Millar *et al.* 2006). Por otra parte, el uso de fluridona (FLU), un importante inhibidor del ABA cuya acción impide la biosíntesis de

carotenoides, precursores del ABA, ha sido ampliamente utilizado para mejorar la germinación (Kondhare *et al.* 2014, Chen *et al.* 2016). Para el quiebre de la dormancia se han utilizado frecuentemente como tratamiento pregerminativo BAP, GA₃ y FLU en concentraciones que varían entre 1 y 100 µM (Hartinie y Azlan Jualang 2007, Otroshy *et al.* 2009, Uribe *et al.* 2012, Emamipoor y Maziah 2014, Rodríguez *et al.* 2016). Las citoquininas, están presentes en el desarrollo de la semilla y se acumulan preferentemente en el endospermo, interviniendo en sus actividades fisiológicas y metabólicas. Dentro de las citoquininas, N⁶-bencilaminopurina (BAP) activa la división celular en el embrión contribuyendo a su desarrollo y promoviendo la germinación en algunas especies (Kucera *et al.* 2005, Moradi y Otroshy 2012) o el vigor de plántulas (Dissanayaka *et al.* 2015).

Aristotelia chilensis (Mol) Stuntz, comúnmente conocida como maqui, es una especie dioica perteneciente a la familia Elaeocarpaceae. En Chile, su importancia está asociada a la conservación de suelos en áreas que han sido rozadas, explotadas o desnudadas, donde la abundancia de árboles adultos es similar en bosques continuos como fragmentados (Bustamante *et al.* 2005). El fruto del maqui presenta altos niveles de antioxidantes (polifenoles, taninos y antocianinas) y fibra dietética respecto a otros berries nativos (Céspedes *et al.* 2008), tales como la murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) y frutilla silvestre (*Fragaria chiloensis* (L.) Mill.) y berries comerciales, como arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y frambuesa (*Rubus idaeus* L.) siendo considerado uno de los frutos más saludables de la naturaleza (Cruzat y Barrios 2009, Romanucci *et al.* 2016). Actualmente, el maqui ha sido incorporado a distintos tipos de productos como: deshidratados, jugos, yogures, concentrados, colorantes y polvos (Cruzat y Barrios 2009).

La reproducción sexual permite obtener una gran variabilidad, la cual puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético. Para el caso de semillas con dormancia, se requiere optimizar el tiempo de germinación. En el caso del maqui, los resultados de germinación muestran discrepancias. Por una parte, Valdebenito y Aguilera (2013) y Molina (2001) reportan un bajo porcentaje de germinación, en tanto Rodríguez *et al.* (1983) señalan lo contrario. La germinación *in vitro* y la aplicación de tratamientos químicos, han demostrado acelerar este proceso en otras especies como: *U. molinae* (Rodríguez *et al.* 2016, Rodríguez *et al.* 2014, Rodríguez 2011) y *Vestia foetida* (Ruiz *et al.* Hoffmanns (Uribe *et al.* 2012), permitiendo obtener una mayor uniformidad e incremento de la germinación. La aplicación de fluridona y reguladores de crecimiento exógenos tales como las citoquininas y giberelinas, tienen efectos sobre la germinación ya sea inhibiendo o activando enzimas (Campbell *et al.* 2001). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es estudiar el efecto sobre la germinación de *Aristotelia chilensis* mediante la adición de diferentes concentraciones de N⁶-bencilaminopurina, ácido giberélico

(GA₃) y fluridona en condiciones *in vitro*, basándose en la hipótesis que la semilla de *A. chilensis* posee dormancia y es posible romperla al menos con uno de los tratamientos químicos propuestos.

MÉTODOS

Se realizaron seis tratamientos correspondientes a la combinación de fluridona (FLU) y reguladores de crecimiento bencilaminopurina (BAP) y ácido giberélico (GA₃) en dos concentraciones (10 y 100 µM).

Obtención de las semillas. Las semillas proceden de frutos maduros cosechados el 2010 en la región del Libertador Bernardo O'Higgins, latitud 34° 10' Sur y longitud 70° 45' Oeste. Para separar las semillas del fruto, estos fueron remojados en agua destilada fría durante seis días, con un cambio de agua diario. Posteriormente, las semillas fueron secadas en una cámara de flujo laminar (25 ± 2 °C) durante 24 h y almacenadas por tres meses a 4 °C.

Desinfección de semillas. Se aplicaron tres soluciones desinfectantes de forma secuencial (fungicida-alcohol-cloro) en cámara de flujo laminar. La solución fungicida (2 g L⁻¹ de Mancozeb + 0,6 g L⁻¹ de Benomil, más unas gotas de Tween 20) se aplicó por 20 min bajo agitación constante. Luego se adicionó alcohol al 75 % por 5 s e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2 % (v/v) de cloro activo por 10 minutos, concluyendo con tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril.

Preparación del medio de cultivo. Los medios de cultivo consistieron en agua destilada gelificada con 7 g L⁻¹ de agar microbiológico (Merck ®), ajustando el pH a 5,8 con 1,0 N de hidróxido de potasio (KOH) y 1,0 N de ácido clorhídrico (HCl), utilizando como buffer 3 mM L⁻¹ de ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico (MES). Los medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 121 °C a 1 atm de presión y posteriormente distribuidos en placas Petri desechables estériles (60 x 15 mm) en razón de 10 mL por placa en una cámara de flujo laminar.

Siembra y condiciones de cultivo. Las placas sembradas se sellaron con parafilm y fueron incubadas en una cámara de cultivo a 25 ± 2 °C con tubos fluorescentes de luz fría blanca con una intensidad lumínica de 50 µmol m⁻² s⁻¹ (tubos Philips TLD 36 W/54) y un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Análisis estadístico. Un diseño completamente al azar fue utilizado para todos los tratamientos. Los datos obtenidos fueron procesados con el software SPSS (versión 15.0 para Windows). Los porcentajes fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje dividido por 100. Se realizó un análisis descriptivo a través de la media y el error estándar. El gráfico se obtuvo con el programa

Sigma Plot (versión 10.0). La unidad experimental estuvo constituida por una placa Petri con 25 semillas y cada tratamiento constó de cuatro repeticiones. Se evaluó el porcentaje de germinación diariamente hasta los 60 días desde la siembra.

RESULTADOS

Las semillas de maqui iniciaron su germinación al sexto día con el tratamiento de BAP 100 μM (figura 1), posteriormente al décimo día lo hicieron los tratamientos con GA_3 (10 y 100 μM), BAP 10 μM y testigo, siendo más tardía para el caso de los tratamientos con FLU (entre el décimo primero y décimo segundo día). En términos generales, las semillas tratadas con BAP, GA_3 y FLU presentaron mayores valores de germinación máxima respecto al testigo, haciéndose más evidente estas diferencias entre los veinte y cuarenta días. Las mejores respuestas se obtuvieron al adicionar BAP a 100 y 10 μM con un TM (TM, momento en que se alcanza el 50 % del valor de la germinación máxima, $G_{\text{máx}}$) de 18 y 20 días. Además, se observó que BAP produjo la mayor velocidad de germinación, que ocurrió entre los 10 y 21 días, con un $G_{\text{máx}}$ de 79 % y 85 % (10 y 100 μM). Las respuestas obtenidas con GA_3 fueron análogas para ambas concentraciones (10 y 100 μM) con un $G_{\text{máx}}$ de 77 y 72 %. Similar apreciación fue observada con FLU (10 y 100 μM) y el testigo con un $G_{\text{máx}}$ de 74 %, 75 % y 66 %, respectivamente.

DISCUSIÓN

La germinación de *A. chilensis* fue acelerada e incrementada con la aplicación de hormonas exógenas. La presencia de BAP en el medio de cultivo aumentó significativamente la germinación de las semillas, siendo el más efectivo en romper la dormancia de los productos químicos evaluados. Los resultados son consistentes con lo reportado por Otrshy *et al.* (2009), quienes obtuvieron un incremento en la germinación de *Ferula assafoetida* L. desde un 53,3 % en un medio libre de hormonas a 74,4 % en un medio suplementado con 1,11 μM de BAP. Del mismo modo, Hartinie y Azlan Jualang (2007) reportaron un aumento en la germinación de *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill por sobre un 90 % al suplementar el medio con 2 μM de BAP y Moradi y Otrshy (2012) señalaron que aplicaciones de la hormona BAP son eficientes promotores de la germinación para semillas de *Dracocephala lumkotschyi* Boiss. Si bien, las citoquininas no han sido descritas por estar directamente involucradas en el rompimiento de la dormancia (Rodríguez *et al.* 2016) su presencia permite disminuir el nivel de inhibidores de la germinación, especialmente de ABA, haciendo que las semillas sean más sensible a las GAs (Bewley *et al.* 2013, Guan *et al.* 2014), aseveración que podría explicar los resultados obtenidos. En algunas especies, la combinación de la aplicación exógena de BAP con estratificación en frío han incrementado la germinación, como es el caso de *Bunium persicum* (Emamipoor y Ma-

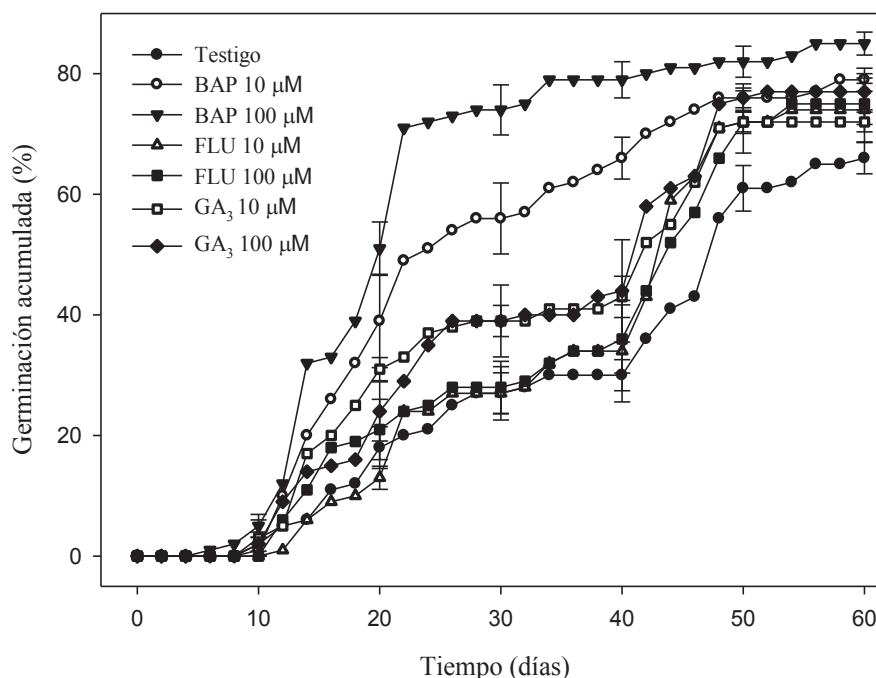


Figura 1. Efecto de la concentración de BAP, GA_3 y FLU sobre la germinación *in vitro* de semillas de *A. chilensis*. Barras verticales representan el error estándar del promedio.

Effect of BAP, GA_3 and FLU concentration on the *in vitro* germination of *A. chilensis*. Vertical bars represent the average standard error.

ziah 2014) y *F. assafoetida* (Otroshy *et al.* 2009). Por otra parte, GA₃ es una de las más importantes hormonas que han sido utilizadas para romper la dormancia (Nadjafi *et al.* 2006). La relación de los niveles de ABA/GA₃ indica que a mayores niveles de ABA y bajos niveles de GA₃ el embrión permanece latente y al invertirse estos niveles la intensidad latente del embrión se reduce. Es por ello, que la aplicación exógena de GA₃ podría incrementar o acelerar la germinación (Finch-Savage y Leubner-Metzger 2006). Al respecto, Rodríguez *et al.* (1983) reportaron una germinación del 90 % en semillas de maqui en base a un pretratamiento con agua y posterior aplicación de ácido giberélico. Contrariamente, otros autores indican una baja germinación (18%) con tratamientos de giberelina en dosis de 2.500 y 5.000 mg L⁻¹ (Molina 2001) y de 29 % con tratamientos de escarificación mecánica, remojo en agua y 1.000 mg L⁻¹ de ácido giberélico (Valdebenito y Aguilera 2013). No obstante en la presente investigación, la aplicación de esta hormona, si bien, incrementó el porcentaje de germinación entre los 20 y 40 días, no logró superar los porcentajes de germinación alcanzados por los tratamientos con BAP.

CONCLUSIONES

Las semillas de *Aristotelia chilensis* de la presente investigación, presentan una dormancia primaria tipo endógena. Los tratamientos con BAP son los más efectivos para elevar la germinación *in vitro*, especialmente en concentración de 100 µM, donde son suficientes solo 40 días para obtener la germinación de gran parte de las semillas. Por lo anterior, se recomienda la adición de BAP a los medios de cultivo. Se sugiere investigar los efectos combinados de BAP con otras técnicas como la estratificación.

REFERENCIAS

Bewley JD, K Bradford, H Hilhorst, H Nonogaki. 2013. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. New York, USA. Springer. 392 p.

Bustamante R, J Simonetti, A Grez, J San Martín. 2005. Fragmentación y su dinámica de regeneración del bosque Maulino: diagnóstico actual y perspectivas futuras. In Smith-Ramírez C, J Armesto, C Valdovinos eds. Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile. Santiago, Chile. Editorial Universitaria. p. 555-564.

Campbell N, M Lawrence, R Jane. 2001. Conceptos y relaciones. México. Pearson Educación. 896 p.

Céspedes CL, M El-Hafidi, N Pavon, J Alarcon. 2008. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chemistry* 107: 820-829.

Chen QL, Y Guo, Y Jiang, P Tu. 2016. Mechanism of fluridone-induced seed germination of *Cistanche tubulosa*. *Pakistan Journal of Botany* 48(3): 971-976.

Cruzat G, A Barrios. 2009. Resultados y Lecciones en Productos a Base de Berries Nativos. Santiago, Chile. Fundación para la Innovación Agraria. Ministerio de Agricultura. Ograma Ltda. 34 p.

Dissanayaka NP, KAS Kodikara, DS Vithanage, SA Krishnarajah, MK Rubasinghe, TG Dayananda. 2015. Effects of 6-Benzylaminopurine (BAP) Treatment on Seed Germination and Seedling Vigour of Endemic Herb *Exacum trinervium* L. in Sri Lanka: Conservation strategy. *Journal of the University of Ruhuna* 3(1):14-20.

Emamipoor Y, M Maziah. 2014. An efficient method in breaking of dormancy from *Bunium persicum* (Boiss) Fedtsch seeds: a valuable herb of Middle East and Central Asia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(8): 642-649.

Finch-Savage WE, G Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501-523.

Guan CH, X Wang, J Feng, S Hong, Y Liang, B Ren, J Zuo. 2014. Cytokinin antagonizes abscisic acid mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of abscisic acid insensitive protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 164: 1515-1526.

Hartnie M, G Azlan Jualang. 2007. In vitro germination and plantlet establishment of *Labisia pumila* (Bl.) F. Vill. *Scientia Horticulturae* 115: 91-97.

Kermode, AR. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation* 24: 319-344.

Kondhare KR, P Hedden, PS Kettlewell, C Farrell, JM Monaghan. 2014. Use of the hormone-biosynthesis inhibitors fluridone and paclobutrazol to determine the effects of altered abscisic acid and gibberellin in levels on pre-maturity α -amylase formation in wheat grains. *Journal of Cereal Science* 60: 210-216.

Koornneef M, L Bentsink, H Hilhorst. 2002. Seed dormancy and germination. *Plant Biology* 5:33-36.

Kucera B, MA Cohn, G Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307.

Millar A, J Jacobsen, J Ross, C Helliwell, A Poole, G Scofield, J Reid, F Gubler. 2006. Seed dormancy and ABA metabolism in *Arabidopsis* and barley: the role of ABA 8-hydroxylase. *The Plant Journal* 45: 942-954.

Molina J. 2001. Preacondicionamiento de la semilla de maqui (*Aristotelia chilensis*) y descripción de sus cambios micro-morfológicos en el proceso de germinación. Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Concepción, Chile. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción. 30 p.

Moradi K, M Otroshy. 2012. A combination of chemical scarification and 6-Benzylaminopurine (BAP) treatment promote seed germination in *Dracocephalum kotschy* seeds. *Trakia Journal of Sciences* 10(3): 26-29.

Nadjafi F, M Bannayan, L Tabrizi, M Rastgoo. 2006. Seed germination and dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments* 64: 542-547.

Nikolić R, N Mitić, R Miletić, M Nešković. 2006. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 25:187-194.

Otroshy M, A Zamani, M Khodambashi, M Ebrahimi, P Stryik. 2009. Effect of exogenous hormones and chilling on dormancy breaking of seeds of Asafoetida (*Ferula assafoetide* L.) *Research Journal of Seed Science* 2: 9-15.

Rodríguez M, N Hormazábal, X Araneda, J Tampe, V Lobos, C Castillo. 2016. Efectos del ácido giberélico, bencilaminopurina y fluridona en la germinación *in vitro* de *Ugni mo-*

- linae* Turcz. (Myrtaceae). *Gayana Botánica* 73(1): 77-84.
- Rodríguez M, M Chacón, R Carrillo. 2014. Efecto de la concentración y de los componentes del medio de cultivo MS sobre la germinación *in vitro* de *Ugni molinae*. *Bosque* 35(1):123-126.
- Rodríguez M. 2011. La propagation d'écotypes sélectionnés de murtila (*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, Agro Paris Tech, Ecole Doctorale ABIES. 232 p.
- Rodríguez R, O Matthei, M Quezada. 1983. Flora arborea de Chile. Concepción, Chile. Editorial Universidad de Concepción. 408 p.
- Romanucci V, D D'Alonzo, A Guaragna, C Di Marino, S Davinelli, G Scapagnini, G Di Fabio, A Zarrelli. 2016. Bioactive Compounds of *Aristotelia chilensis* Stuntz and their Pharmacological Effects. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 17: 513-523.
- Sawada Y, T Katsumata, J Kitamura, H Kawaide, M Akajima, T Sami, K Nakaminami, T Kurahashi, W Mitsuhashi, Y Inoue, T Toyomasu. 2008. Germination of photoblastic lettuce seeds is regulated via the control of endogenous physiologically active gibberellin content, rather than of gibberellin responsiveness. *Journal of Experimental Botany* 59: 3383-3393.
- Uribe M, C Delaveau, K Paredes, P Carrasco, C Flores. 2012. Preliminary studies *in vitro* propagation of an endemic species to Chile, *Vestia foetida* (Solanaceae). *Gayana Botánica* 69(1): 204-207.
- Valdebenito G, M Aguilera. 2013. Información tecnológica de productos forestales no madereros del bosque nativo en Chile. Antecedentes Silvícolas *Aristotelia chilensis* (Mol.) Stuntz. Santiago, Chile. Instituto Forestal. 31 p.

Recibido: 20.01.17
Aceptado: 10.10.17

