



C.D.O.: 232.3

GERMINACION "IN VITRO" DE *GEVUINA AVELLANA* MOL. (PROTEACEAE)*Janis GRINBERGS¹, Eduardo VALENZUELA¹ y Carlos RAMIREZ²¹ Instituto de Microbiología, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia.² Instituto de Botánica, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia.

SUMMARY

Gevuina avellana (avellano), a native Chilean tree, has fruits of great economic importance and well developed proteoid roots of considerable scientific value. Its reproduction with seeds is slow, irregular and little efficient. This paper describes a method of improving germination of the species and thus having large number of seedlings of a similar age and size.

Fruits (nuts) from three different localities were used for the study: Lago Chapo in the province of Llanquihue, Puerto Klocker in the province of Osorno and Tres Chiflones in Valdivia. All the fruits as well as the seeds without pericarp were disinfected, successively, in mercuric chloride and sodium hypochloride; half an hour in each. They were then washed and sown on an agar substrate under sterile conditions. The most favourable substrate concentration was 0.7% since, below this the seeds sink and die due to the lack of oxygen while over this percentage, they lack the humidity needed for germination.

Microorganisms contaminated all the normal fruits sown to germinate. This contamination can be reduced to 25% if the exocarp is sterilized; contamination is eliminated when the seeds are sterilized. The seeds presented a high power of germination without any significant differ-

ences among their places of origin. Germination, 92% of the seeds, begun 7 days after sowing and ended on day 32.

RESUMEN

Gevuina avellana (avellano) es un árbol chileno de interés económico, por sus frutos, y científico, por sus raíces proteiformes muy desarrolladas. Su reproducción por semillas es lenta, irregular y poco eficiente. El presente trabajo entrega un método que mejora su germinación, permitiendo obtener grandes cantidades de plántulas similares en edad y tamaño.

Se trabajó con frutos (nueces) de 3 localidades geográficas: Lago Chapo en la provincia de Llanquihue, Puerto Klocker en la de Osorno y Tres Chiflones en la de Valdivia. Frutos completos y semillas sin pericarp se desinfectaron sucesivamente con cloruro de mercurio e hipoclorito de sodio, 1/2 hora en cada uno, y después de lavados, se sembraron sobre un sustrato de agar-agar, en condiciones estériles. La concentración más favorable del sustrato fue de 0,7%; bajo ella, las semillas se hundían y mueren por falta de oxígeno, y, sobre ella, no germinan por falta de humedad.

Todos los frutos puestos a germinar sufrieron contaminación con microorganismos. Esta contaminación se redujo en un 25% al esterilizar el exocarpio y, comple-

* Proyectos S-85-27 y 1038/85 financiados por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile y el Fondo Nacional de Ciencias (FONDECYT, Chile).

tamente, al esterilizar también las semillas. Estas últimas presentaron un alto poder germinativo sin diferencias significativas entre las procedencias. La germinación se inició 7 días después de la siembra y se completó a los 32 días, con un 92% de semillas germinadas.

INTRODUCCION

Gevuina avellana Mol. (avellano) es un árbol endémico de Chile, perteneciente a la familia *Proteaceae* (RODRIGUEZ *et al.*, 1983). Como miembro de esta familia, presenta raíces proteiformes muy desarrolladas que constituyen un excelente material de experimentación para dilucidar el origen y la función de dichos conglomerados radicales (LAMONT, 1982; GRINBERGS *et al.*, 1987). Sin embargo, la lenta germinación de sus semillas hace imposible obtener grandes cantidades de plántulas que formen una población homogénea en cuanto a edad y tamaño (DONOSO y CABELLO, 1978). Este hecho limita las posibilidades de experimentación al no permitir disponer de varias repeticiones. Tratando de solucionar este problema, se ensayaron varias posibilidades para acelerar y uniformar la germinación de esta especie.

Con el presente trabajo, se describe un método de germinación "in vitro" y en condiciones estériles, que efectivamente acelera y uniforma la germinación de las semillas del avellano chileno. Este método se ensayó con los frutos de tres procedencias, correspondientes a las provincias de Llanquihue, Osorno y Valdivia en el Centro-Sur de Chile.

MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con frutos de avellano colectados en el mes de abril de 1985 en Tres Chiflones, Cordillera de la costa al sur de la ciudad de Valdivia; Puerto Klocker en la ribera norte del lago Llanquihue, provincia de Osorno, y en las cercanías del

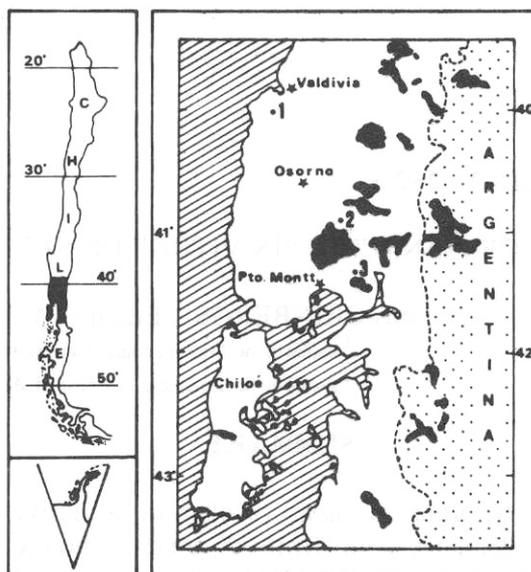


Fig. 1: Décima región de Chile. Lugares de colecta de frutos de *Gevuina avellana*: 1 = Tres Chiflones, 2 = Puerto Klocker, 3 = Lago Chapo.

Tenth region of Chile. Collecting sites of Gevuina avellana fruits: 1 = Tres Chiflones, 2 = Puerto Klocker, 3 = Lago Chapo.

lago Chapo, al oriente de la ciudad de Puerto Montt, en la provincia de Llanquihue (Fig. 1). Todos los lugares están incluidos en la Décima Región, de Los Lagos, Chile.

Los frutos (nueces) y las semillas fueron sometidos primeramente a un proceso de desinfección, realizando los siguientes pasos:

- 1) Lavado de frutos y semillas por separado con agua potable;
- 2) Escobillado y enjabonado de los frutos;
- 3) Lavado con agua potable para eliminar el jabón,
- 4) Lavado con agua destilada estéril;
- 5) Desinfección con bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) al 1%, durante 1/2 hora, agitando enérgicamente cada 5 minutos;
- 6) Lavado repetido con agua destilada estéril;
- 7) Desinfección con hipoclorito de sodio comercial ($NaClO$), durante 1/2 hora,

agitando enérgicamente cada 5 minutos, y
 8) Lavados repetidos con agua destilada estéril, hasta eliminar el olor a cloro.

Los primeros pasos se realizaron colocando frutos y semillas en bandejas bajas de 6.000 ml y. los siguientes en matraces de boca ancha de 500 ml. La desinfección de las semillas no contempló el paso número 2, para no destruir el embrión. Esta desinfección se realizó porque en experimentos previos, al hacer germinar las semillas desprovistas del pericarpio, un gran número de ellas era infectado por microorganismos.

Para extraer las semillas del fruto, se calentó un punzón al rojo vivo y con él se hizo un orificio en el pericarpio, cuidando de no dañar el embrión. Por el orificio formado, se introdujo la punta de una tijera esterilizada y se procedió a cortar el pericarpio. Se abrió el fruto y con una pinza se extrajo la semilla.

Para la germinación se usaron frascos de 250 ml, adicionados con 50 ml de agar-agar al 0,7% en agua destilada y esterilizados en autoclave por 30 minutos a 121°C. En cada frasco se colocó sólo 4 semillas para evitar posibles riesgos de contaminación en toda la población. Estos frascos se mantuvieron tapados a temperatura ambiente (entre 16 y 21°C). La germinación se controló diariamente, y como semillas germinadas se consideró aquellas que tenían una radícula superior a 1 cm de largo (RAMIREZ, 1973). Las plántulas obtenidas fueron repicadas en macetas con

suelo para seguir su posterior desarrollo. Como control se hizo germinar frutos no esterilizados en placas petri, regadas con agua bidestilada estéril. Cada procedencia contó con una serie de 25 frascos y un total de 100 semillas.

Previamente y para ubicar la concentración de agar-agar más adecuada para la germinación, se realizaron experimentos con 60 semillas de Puerto Klocker, sembrándolas en sustratos de distinta concentración.

RESULTADOS Y DISCUSION

Con el proceso de esterilización usado se logró eliminar el peligro de contaminación de las semillas con hongos y bacterias, que impiden su germinación (Cuadro 1). Al esterilizar el fruto completo y luego también la semilla extraída de él, se alcanzó un 100% de efectividad, obteniéndose sólo plántulas sanas. Al esterilizar el pericarpio y no la semilla, sólo se logra un 75% de efectividad; el resto de las semillas (25%) son destruidas por contaminación con microorganismos antes que germinen. Por último, al sembrar semillas sin tratamiento de desinfección, todas son atacadas por hongos y bacterias, que les impiden germinar. De esto se deduce que los frutos del avellano, e incluso la misma semilla, vienen contaminados desde el terreno, lo cual se explica porque fueron recolectados en el suelo. Sin embargo, estos microorganismos contaminantes fueron eliminados completamente con el proceso

Cuadro 1. Efecto del proceso de desinfección sobre la contaminación de semillas y frutos de *Gevuina avellana*.

Effect of desinfection process on the contamination of Gevuina avellana fruits and seeds.

Esterilización	No contaminadas	Contaminadas	Porcentaje
Pericarpio y semilla	12	0	0
Pericarpio	3	7	75
No hubo	0	12	100

de desinfección a que fueron sometidos frutos y semillas.

La Fig. 2 muestra el porcentaje absoluto de germinación de semillas de las tres procedencias de *Gevuina avellana*. La germinación se inicia a los 7 días y no es pareja, ya que los valores más altos se alcanzan entre los 12 y 13 días, después de la siembra. Con posterioridad, hay un marcado descenso hasta los 27 días y, luego, nuevos aumentos. Las curvas presentan recorridos parecidos, aunque desfasados en el tiempo. Sin embargo, coinciden bastante bien en los períodos con muy baja o nula germinación, que para los tres lugares corresponden a los días 11, 27 y 29. El inicio de la germinación fue desigual para las tres procedencias, pero al final tienden a presentarse valores similares. Esta germinación irregular, a saltos, se presenta a menudo en plantas silvestres, no cultivadas, y muchas veces asegura la sobrevivencia de la especie (BARTON. 1953).

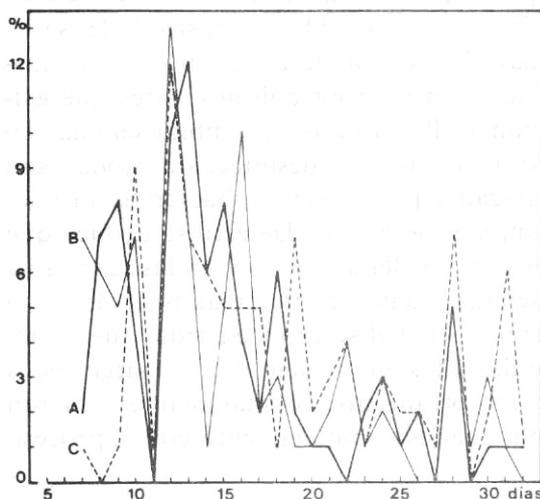


Fig.2: Porcentaje diario absoluto de germinación "in vitro" de semillas de tres procedencias de *Gevuina avellana* en condiciones estériles. A = Puerto Klocker. B = Tres Chiflones. C = Lago Chapo.

Absolute daily percentage of germination "in vitro" of Gevuina avellana seeds from three different sites, under sterile conditions. A = Puerto Klocker, B = Tres Chiflones, C = Lago Chapo.

La Fig. 3 muestra las curvas de germinación acumulada de las tres procedencias, comparadas con el control de frutos puestos a germinar sin previa desinfección, en placas petri regadas con agua destilada estéril. Se aprecia que las semillas sin pericarpo y desinfectadas germinan más rápidamente que el control y alcanzan también un mayor porcentaje final de germinación. Además, el inicio del proceso se adelantó en 9 días al del control.

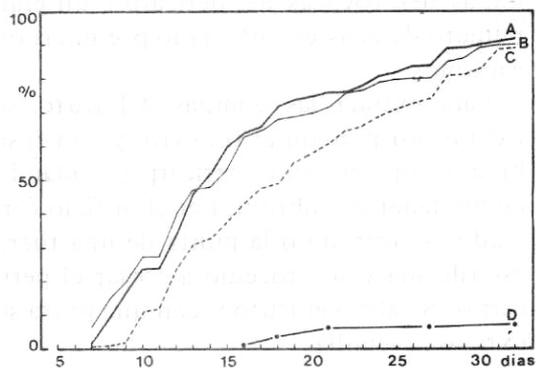


Fig. 3: Porcentaje acumulado de germinación "in vitro" de semillas de tres procedencias de *Gevuina avellana*, en condiciones estériles, comparadas con un control en condiciones naturales. A = Puerto Klocker. B = Tres Chiflones. C = Lago Chapo. D = Control.

Accumulated percentage of germination "in vitro" of Gevuina avellana seeds from three different sites under sterile conditions compared with a control group under natural conditions. A = Puerto Klocker, B = Tres Chiflones, C = Lago Chapo, D = Control.

Las curvas de germinación de las semillas de las procedencias de Puerto Klocker y Tres Chiflones tienen un recorrido muy parecido, sin diferencias significativas entre ellas. La curva de la procedencia Lago Chapo se mantiene siempre más baja y alcanza a las otras dos, sólo al final del experimento. Todas las curvas muestran un ascenso constante más o menos hasta los 29 días después de la siembra, indicando con esto la existencia de una prolonga-

da fase de imbibición, con detenciones a los 10, 13, 16, 20 y 29 días. Estas irregularidades de las curvas son coincidentes, lo que indica que la germinación de *Gevuina avellana* presenta un ritmo endógeno específico, que no se ve afectado por el origen de los frutos. No obstante, estas irregularidades podrían tener su origen en oscilaciones térmicas que afectaron a todas las siembras por igual, mientras duró el experimento. De hecho la temperatura tiene una fuerte influencia sobre la germinación (RAMIREZ, 1971). Sobre la existencia de un ritmo endógeno en la germinación del avellano chileno no hay antecedentes en la literatura y constituye un interesante fenómeno que podría ser investigado a futuro. La fase metabólica o de crecimiento se inicia al final del experimento, época en que las plántulas obtenidas se repicaron en macetas con suelo.

De los resultados anteriores, podría suponerse que la desinfección de las semillas eliminó el efecto de procedencia, pero al parecer dicho efecto no se presenta en las semillas de la especie estudiada (RIVEROS y RAMIREZ, 1976). Esta propiedad de las semillas de *Gevuina avellana* es algo muy especial ya que la mayoría de las especies de vegetales superiores, presentan comportamientos germinativos distintos en diferentes procedencias (RAMIREZ, 1971).

La Fig. 4 presenta la curva completa de germinación del control y puede verse que ella se prolonga hasta los 150 días, fecha en que sólo ha germinado el 64% de las semillas sembradas. Esta curva muestra dos zonas de mayor velocidad de germinación que se inician a los 20 y 44 días, respectivamente. En general, el ascenso de la curva es lento, demostrando con ello una escasa velocidad de germinación. Esto hace que las plántulas obtenidas por germinación natural, sean de muchas edades diferentes, lo que no permite montar experimentos adecuados con muestras equivalentes en edad y tamaño. En cambio,

con la germinación "in vitro" en condiciones estériles expuestas en este trabajo, es posible obtener gran cantidad de plántulas, sin gran diferencia de edad entre ellas. La lenta germinación demostrada por los frutos puede deberse a la presencia del pericarpo, que al prolongar la viabilidad de la semilla también prolonga su latencia (BARTON, 1953; RAMIREZ *et al.*, 1980). Estos resultados concuerdan con los valores entregados por DONOSO y CABELLO (1978), que en condiciones parecidas lograron un 92% de germinación, a los 270 días después de la siembra. Estos autores trabajaron con sustrato de tierra, el que favorece la germinación en muchas especies (KNAPP, 1954).

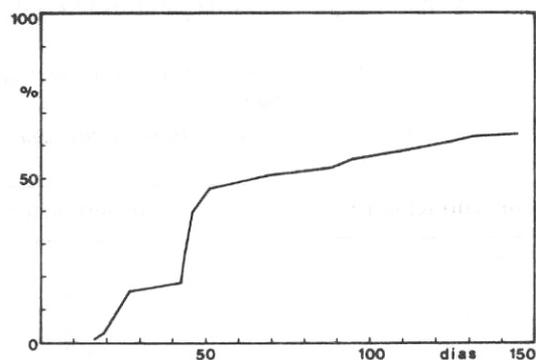


Fig. 4: Porcentaje acumulado de germinación de semillas (con pericarpo) de *Gevuina avellana*, en condiciones naturales, sin desinfección.

Accumulated percentage of germination of Gevuina avellana seeds (with pericarp) under natural conditions, without disinfection.

El Cuadro 2 resume los resultados obtenidos por el método "in vitro" con las semillas de avellano. El inicio de la germinación es muy parejo: a los 7 días para las tres procedencias. El mayor porcentaje de germinación se alcanzó a los 32 días, aproximadamente, con un valor promedio de 92% y con escasa variación entre las localidades trabajadas. Del resto de las semillas, el 6.5% presentó señales de lesiones mecánicas recibidas por el embrión en el

proceso de extracción del pericarpo y el 1,2% restante no germinó, sin que se pueda precisar la causa.

Cuadro 2 Germinación de semillas de tres procedencias de *Gevuina avellana*
Germination of Gevuina avellana seeds from three different sites.

Procedencia	Pto. Klocker	Tres Chiflones	Lago Chapo	Promedio
Inicio (días)	7	7	7	7
Término (días)	32	33	31	32
Germinación (%)	92	93	91	92

La concentración de agar-agar en la que se pusieron a germinar las semillas fue crítica. En efecto, sólo con una concentración de 0,7% se consiguió el valor máximo de germinación. Bajo ella, el sustrato es muy blando y la semilla se hunde en el

agar-agar, muriendo el embrión por falta de oxígeno. Sobre dicha concentración, el sustrato se hace muy duro y no deja penetrar la semilla, que entonces no obtiene la suficiente humedad para germinar (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la concentración de agar-agar del sustrato sobre la germinación de semillas de *Gevuina avellana*,
Effect of concentration of the agar substrate on the germination of Gevuina avellana seeds.

Concentración (%)	No germinadas	Germinada	Porcentaje
0.5	58	12	20
0.7	0	60	100
1.0	60	0	0
1.5	60	0	0

Con el proceso de desinfección y germinación "in vitro" de las semillas de avellano, se consigue acelerar la cinética germinativa de esta especie, para tener grandes cantidades de plántulas y una población más o menos homogénea en edad y tamaño. El posterior cultivo de las plántulas permitió confirmar que este tipo de tratamiento asegura, además, la sobrevivencia de ellas. El método de esterilización usado presentó una alta efectividad y no alteró la viabilidad de las semillas, ni menos el posterior desarrollo de las plantas.

El aumentar y uniformar la germinación de *Gevuina avellana* no sólo es útil para el estudio de las raíces proteiformes, sino que también sirve para fomentar su cultivo, sobre todo en la actualidad, cuan-

do este árbol se presenta como una especie con grandes proyecciones económicas, por la calidad nutritiva de sus semillas y por el aceite que se extrae de las mismas (MUÑOZ *et al.*, 1981).

CONCLUSIONES

Con los resultados presentados, analizados y discutidos en el capítulo anterior, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Con el proceso de esterilización usado se logró reducir totalmente el riesgo de contaminación de las semillas de avellano durante el proceso germinativo.
2. La concentración del sustrato de agar-agar más favorable a la germinación del avellano fue de 0,7%.

3. En condiciones estériles, las semillas germinan más rápidamente y alcanzan un mayor porcentaje de germinación en menos tiempo.
4. Con el método descrito, se consigue uniformar y acelerar la germinación, de manera que es posible obtener grandes poblaciones de plántulas de avellano, similares en edad y tamaño.
5. No se encontró diferencias significativas entre la germinación de las semillas de las tres procedencias de avellano ensayadas.

REFERENCIAS

- BARTON. L. V. 1953. Seed storage and viability. *Contr. Boyce Thompson Inst.* 17: 87-103.
- DONOSO, C.; CABELLO, A. 1978. Antecedentes fenológicos y de germinación de especies leñosas chilenas. *Ciencias Forestales* 1 (2): 31-42.
- GRINBERGS, J.; VALENZUELA, E.; RAMIREZ, C. 1986. Formación y desarrollo de raíces proteiformes en plántulas de *Gevuina avellana* Mol. *Agro Sur* (En prensa).
- KNAPP, R. 1954. *Experimentelle Soziologie der höheren Pflanzen*, Stuttgart, Ulmer, 202 p.
- KUMMEROW. J. 1963. Endogenous fluctuations of germination capacity in *Dactylis glomerata*. *American Journal of Botany* 50 (9): 915-920.
- LAMONT, B. 1982. Mechanisms for enhancing nutrient uptake in plants with particular reference to Mediterranean South Africa and Western Australia. *Bot. Review* 48 (3): 597-689.
- MUÑOZ, M.; BARRERA, E.; MEZA, I. 1981. El uso medicinal y alimenticio de plantas nativas y naturalizadas en Chile. *Pub. Ocas. Museo Nacional Historia Natural* 33: 3-89.
- RAMIREZ, C. 1971. *Experimentelle Untersuchungen über gegenseitige Beeinflussungen. Keimung und Provenienzen von Pflanzarten südchilenischer Rasen und Gebüsche*. Disertación, Univ. Justus Liebig, Giessen. 249 p.
- RAMIREZ. C. 1973. Germinación, crecimiento juvenil y relaciones de competencia de *Rubus constrictus* Lef. et Mey. y *Ulex europaeus* L. *Agricultura Técnica* 33 (2): 90-93.
- RAMIREZ. C.; ROMERO, M.; HENRIQUEZ, O. 1980. Estudios de germinación en semillas de Mirtáceas chilenas. *Bosque* 3 (2): 106-114.
- RIVEROS, M.; RAMIREZ, C. 1976. Germinación en *Gevuina avellana* Mol. II Reunión Agrup. Regional Sociedad de Biología de Chile. Concepción 2: 59.

Recibido: 30-10-1986.