

Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (*Magnoliopsidae*, *Gomortegaceae*)

In Vitro propagation of a Chilean endangered plant species: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (*Magnoliopsidae*, *Gomortegaceae*).

C.D.O.: 161.4; 164.4

XIMENA CALDERON-BALTIERRA, FERNANDO PEREZ y ALESSANDRO ROTELLA

Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Talca,
Casilla 747, Talca, Chile.

SUMMARY

An adequate method of *in vitro* plant propagation of *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, from mature cigotic embryos is presented. *G. keule* is an endangered endemic chilean species, with a high growth rate. Shoots initiation was obtained after 4 months in culture over the cotyledonar zone in an MS medium supplemented by BAP (0.1, 1 and 2 mg/l) and AIA (1 and 2 mg/l). Three months later, multiple shoots were obtained on MIII6 medium supplemented with 1 mg/l BAP, 0.01 ANA and 0.1 mg/l GA3.

RESUMEN

Se reporta un método efectivo para micropropagar plántulas de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon, una especie forestal endémica chilena en peligro de extinción, con una alta tasa de crecimiento, a partir de embriones cigóticos maduros. La iniciación de brotes adventicios se logró en la base de los cotiledones después de 4 meses, en cultivo sobre un medio MS* suplementado con BAP (0.1, 1 y 2 mg/l) y AIA (1 y 2 mg/l) y su producción masiva a los 3 meses, en medio MIII6 con 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA y 0.1 mg/l GA3.

INTRODUCCION

Gomortega keule (Mol.) Baillon (n.v. "queule") es el único representante de la familia *Gomortegaceae* y una especie endémica chilena en peligro de extinción. Su distribución está restringida a lugares húmedos y sombríos en la Cordillera de la Costa, entre el Río Maule (VII Región) (35° 50' Lat S) y la Cordillera de Nahuelbuta, provincia de Arauco (VIII Región) (38° 40' Long W), desde el nivel del mar hasta 300 m s.n.m. Esta especie tiene un

potencial valor ornamental, sus frutos comestibles se utilizan para hacer mermeladas y su perfumada madera para confeccionar muebles. "Los indios mapuches han manifestado que antiguamente tenía valor como droga psicoactiva y que el efecto de intoxicación podría ser un alucinógeno. Se sabe que los frutos, especialmente cuando están frescos, causan embriaguez" (Schultes, 1983).

La distribución natural de esta especie siempre-verde se ha visto afectada por la intensiva plantación de *Pinus radiata* D. Don en el área, confinándola a quebradas. El queule es una especie dañada, calificada en la categoría "en peligro" de extinción por el Primer Simposio de Flora y Bosque Nativo de Chile y constituye uno de los casos más representativos de flora dañada en el país.

Assumiendo que el cultivo de *Pinus radiata* continuará incrementándose en esta región, no es

* MS, Murashige and Skoog Medium; BAP, 6-Benzilaminopurine; NAA, Ac. naftalenoacético; GA3, Ac. Giberélico; MIII6, Medio de Mosella.

Esta investigación ha sido financiada por FONDECYT Proyecto 090-283.

seguro que el establecimiento de Leyes de Protección de la Flora Nativa (Benoit, 1989) garanticen la sobrevivencia de esta especie.

En este trabajo se propone un método para rescatar esta especie dañada, cuyas poblaciones son extremadamente reducidas. Al mismo tiempo que se desea destacar que el cultivo de tejidos es una vía excelente para incrementar rápidamente el número de individuos y puede constituir una etapa en el establecimiento de un banco de germoplasma de queule, lo cual indudablemente tiene un gran valor no sólo para la investigación, sino también para preservar una especie en peligro de extinción.

Aunque existen algunas publicaciones sobre rescate de especies, tales como *Senecio hermosae* Pitard (Ortega y González, 1985), *Saussurea lappa* C.B. Clarke (Arora, 1989), *Coronopus navasii* (Iriando, 1990), *Betula uber* [Ashe] Fern., (Vijayakumar *et al.* 1990), no hay antecedentes de micropropagación de queule, a pesar del interés de investigadores nacionales sobre el cultivo *in vitro* con objetivos conservacionistas.

MATERIAL Y METODOS

En el otoño de 1990 se colectaron semillas de queule en la localidad de Canelillos (VIII Región) (35° 47' Lat S y 72° 39' 40" Lat W).

Los frutos se asemejan a las almendras; se trata de una drupa ovoide de endocarpio pétreo (Fig. 1). Estos se estratificaron y escarificaron naturalmente en invierno, en un invernadero (Fig. 1). Para facilitar la germinación *in vitro* se rompió mecánicamente el endocarpio.

Los embriones cigóticos fueron esterilizados superficialmente durante 5 min en cloro comercial 10% (v/v), luego en jabón medicinal 10% (v/v) y posteriormente lavados dos a tres veces con agua destilada estéril.

Los embriones fueron transferidos, asépticamente, a frascos de vidrio de 10 x 10 cm conteniendo medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido, suplementado con diferentes concentraciones de sacarosa (50, 75 y 100 g/l) sin hormonas (Fig. 1). Ellos fueron cultivados en una cámara de crecimiento diurno controlado, Forma Scientific, a 25° C, algunos bajo un régimen de fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad y otros en oscuridad permanente.

A los treinta días los cotiledones lucen hinchados. En estas condiciones se extirparon los

cotiledones y fueron transferidos a medios MS suplementados con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas (cuadro 1, Fig. 2). Los tejidos se mantuvieron en un fotoperíodo 16/8 h.

A los 30 días aparecieron los brotes adventicios sobre la región cotiledonar, en la combinación 1 mg/l BAP y 0.1 mg/l ANA.

Después de ocho meses de cultivo en estas condiciones los brotes adventicios obtenidos se transfirieron a medio de multiplicación MIII6 (6), con 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA y 0.1 mg/l GA3, con 30 g/l sacarosa.

El alargamiento de entrenudos de los brotes adventicios se logró disminuyendo el régimen de intensidad de luz de 5.400 lux a 1.000-1.500 lux (Fig. 2).

El medio MIII6, con la combinación hormonal antes indicada, se mostró adecuado para la multiplicación de brotes adventicios, por lo que se utilizó extensivamente para los subcultivos y evaluación del crecimiento.

El crecimiento se evaluó durante 240 días, utilizando como parámetros el número de brotes/frasco, el número de hojas/frasco y la altura de los brotes sobre 10 repeticiones con 7-10 brotes/frasco.

El pH de todos los medios se ajustó a 5.8 y todos ellos se suplementaron con 7 g/l de Difco-bacto-agar y se esterilizaron a 120° C por 20 min a 15 lb.

Dado el reducido número de semillas disponible, un factor limitante en la realización de este trabajo radicó en la imposibilidad de disponer de un número adecuado de explantes y, por consiguiente, de réplicas. Se comenzó el trabajo con siete explantes por tratamiento.

En todas estas etapas, una dificultad importante fue la contaminación endógena por bacterias que aparecían periódicamente en el tejido. El cultivo axénico se logró aplicando altas concentraciones de estreptomycin (4 mg/ml) por 20 min.

RESULTADOS

Los embriones que crecían en luz en medio MS con altas concentraciones de sacarosa y sin hormonas incrementaron el tamaño de sus cotiledones y desarrollaron clorofila en ellos, pero no diferenciaron vástagos, sólo se acumuló agua en los tejidos (Fig. 1). En oscuridad no hay respuesta.

Los embriones con cotiledones hinchados, cuando se hicieron crecer en medios MS con dife-

rentes concentraciones de AIA e IBA, bajo condiciones de fotoperíodo 16/8, diferenciaron brotes adventicios sobre la región cotiledonar (Fig. 2) a los 30 días.

Después de ocho meses en cultivo sobre estos medios, la producción de brotes adventicios se incrementó muy lentamente. Interpretamos esto como una indicación de que los medios ensayados no eran adecuados.

Como consecuencia de lo anterior, se cambió arbitrariamente de medio de cultivo, reemplazando el medio basal MS por el medio MIII6 (Mosella y col., 1979) con 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA y 0.1mg/l GA3. En estas condiciones se logró un evidente crecimiento en corto tiempo y fue posible entonces evaluarlo (cuadro 1 y Fig. 2).

Después de la esterilización con estreptomycin, sobre los cotiledones se regeneraron brotes, los cuales en una primera etapa resultaron vitrificados (Fig. 2); pero posteriormente se formaron brotes normales, sin vitrificación (Fig. 2).

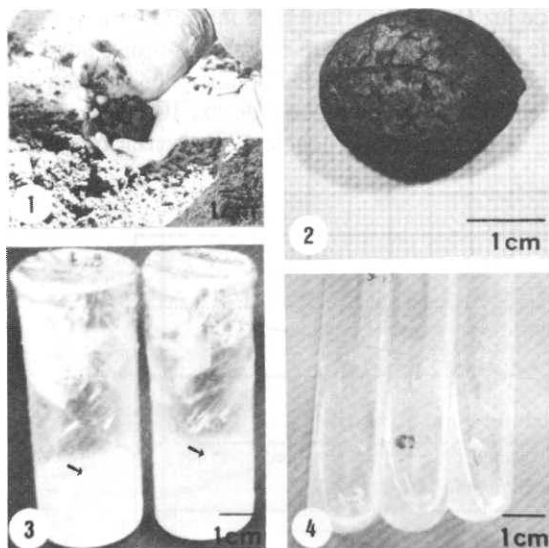


Figura 1. Semillas y embriones de queule
Seeds and embryos of queule

- 1-1 Semillas de queule estratificadas en vivero.
- 1-2 Detalle del endocarpio pétreo.
- 1-3 Embriones cigóticos de queule
- 1-4 Embriones cigóticos en medio de inducción.
- 1-1 Queule seeds stratified in nursery.
- 1-2 Details of endocarp.
- 1-3 Cigotic embryos in queule
- 1-4 Cigotic embryos in induction medium.

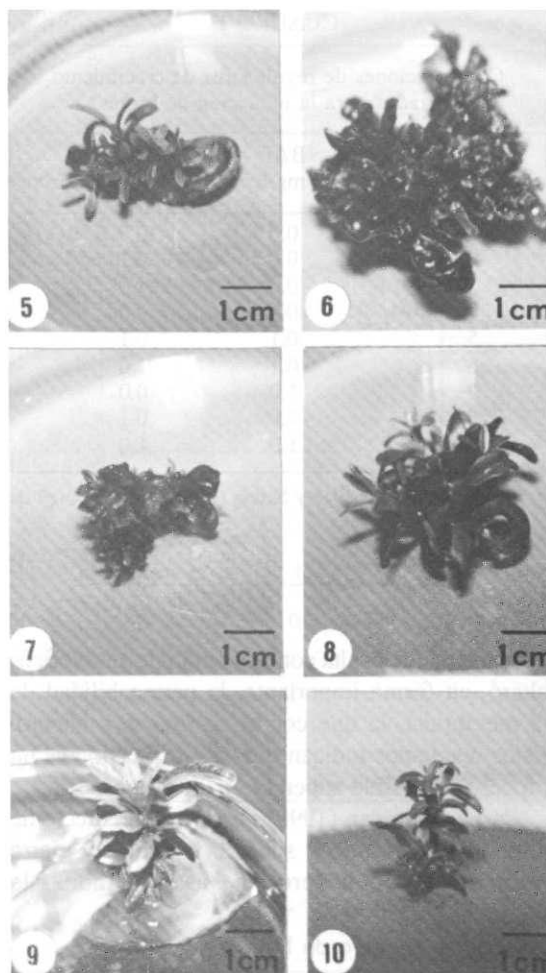


Figura 2. Micropropagación del queule
Micropropagation of queule

- 2-5 Inicio de brotes adventicios en la base del cotiledón.
- 2-6 Severa vitrificación después del tratamiento con estreptomycin.
- 2-7 Formación de brotes no vitrificados.
- 2-8 Brotes múltiples normales, sin vitrificación.
- 2-9 Brotes en medio MIII6 con 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA y 0.1 mg/l GA3.
- 2-10 Brotes adventicios con entrenudos alargados después de la transferencia a un régimen de baja intensidad de luz.
- 2-5 First shoots adventitious at the base of the cotyledon zone.
- 2-6 Severe vitrification after streptomycin treatment.
- 2-7 Formation of non vitrified shoots.
- 2-8 Multiple normal shoots without vitrification.
- 2-9 Shoots in MIII6 medium with 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA and 0.1 mg/l GA3.
- 2-10 Adventitious shoots with long internodes after trasplant to a low light intensity regime.

CUADRO 1

Combinaciones de reguladores de crecimiento utilizados para la inducción de brotes*

N°	BAP mg/l	ANA mg/l
1	0.0	0.0
2	0.0	0.1
3	0.0	1.0
4	0.1	0.0
5	0.1	0.1
6	0.1	1.0
7	1.0	0.0
8	1.0	0.1
9	1.0	1.0

* Medio basal Murashige y Skoog (1962), con 0.01 mg/l de gas y 30 g/l de azúcar.

DISCUSION

Probablemente la alta concentración de antibióticos alteró, en forma importante, la permeabilidad de la membrana, la que con el tiempo se recuperó. Estos resultados indican que la vitrificación es un proceso reversible superable para esta especie.

Park y Thimann (1990) observaron el efecto de diferentes antibióticos sobre la apertura y cierre estomático. De acuerdo a sus resultados, la

Kanamicina preserva la clorofila y las proteínas, favoreciendo la apertura estomática, al mismo tiempo que inhibe la senescencia en hojas de avena en la oscuridad y disminuye la resistencia estomática a concentraciones tan altas como 2.000 uM de la misma.

De acuerdo con lo anterior, la estreptomycin podría haber producido el mismo efecto sobre el tejido de queule cultivado *in vitro*. Si estimuló la apertura estomática y alteró la permeabilidad de la membrana, entonces el ingreso de agua fue desequilibrado y originó la vitrificación. Esta probable alteración de las propiedades de las membranas obviamente fue temporal, pues luego surgieron brotes normales sobre los vitrificados.

El medio evaluado, MIII6 más 1 mg/l BAP, 0.01 mg/l ANA y 0.1 mg/l GA3, ha demostrado ser un exitoso método para clonar queule (Fig. 2). Se obtuvo una alta producción de hojas y brotes/frasco en el tiempo (Figs. 3 y 4).

Al mismo tiempo, la elongación de los brotes (Fig. 2) se logró en este mismo medio tan sólo transfiriéndolos a un régimen de menor intensidad de luz (1.500 lux). La Fig. 5 muestra un importante incremento en altura cuando los brotes adventicios se someten a estas condiciones de baja intensidad lumínica a partir de los 100 días.

Estos resultados nos permiten pensar que se ha

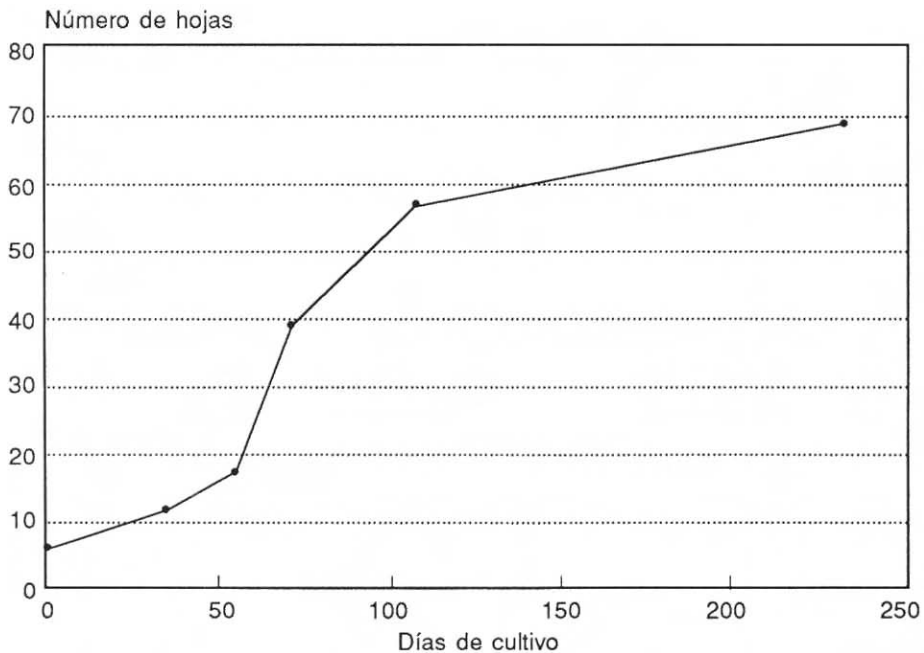


Figura 3. Aparición temporal de hojas
Appearance of leaves in time

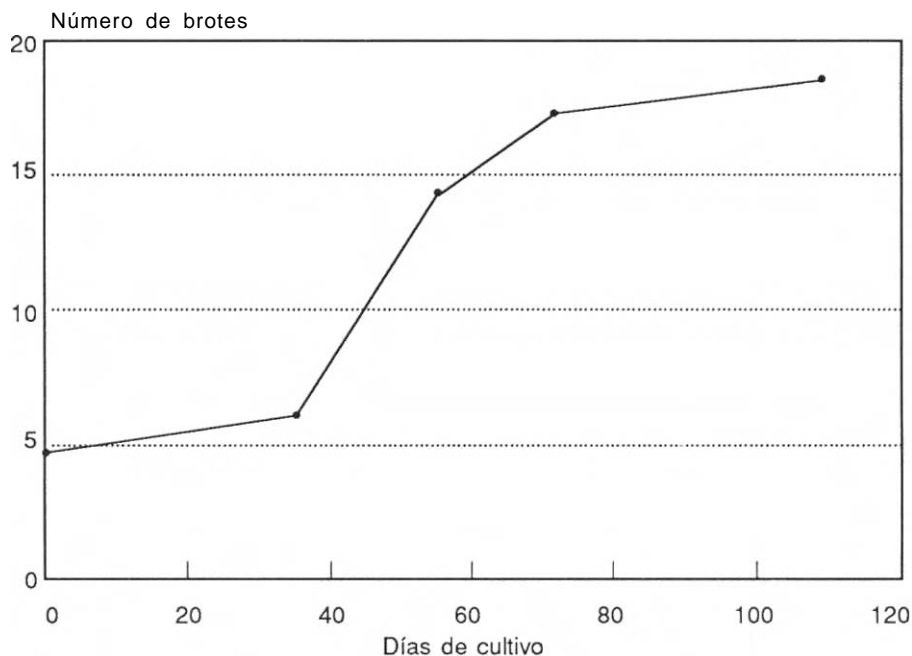


Figura 4. Aparición temporal de brotes

Appearance of shoots in time

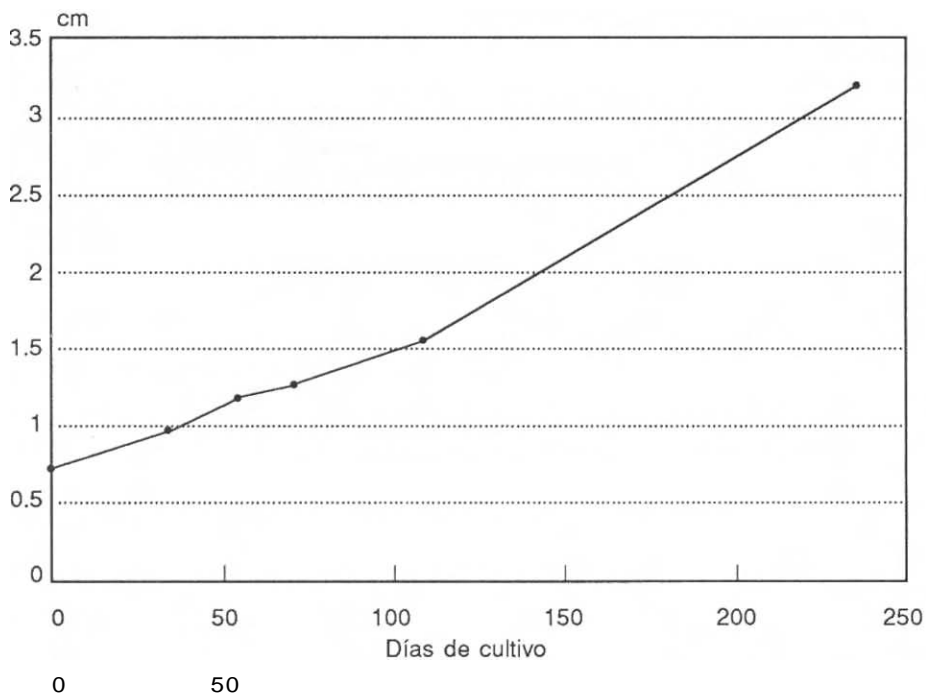


Figura 5. Crecimiento en altura

Growth in height

logrado así un efectivo método para micropropagar y elongar plántulas de queule.

Por otra parte, es bien conocido que la germinación de queule por métodos tradicionales es un

proceso lento, que tarda 60 días y que la capacidad germinativa es de alrededor del 24% (Hartman y Kester, 1985; Donoso y Escobar, 1986). En este sentido, el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos,

aunque tarda cuatro meses para dar una respuesta organogénica, tiene una ventaja evidente sobre el método tradicional, ya que permite clonar masivamente a esta especie en vías de extinción.

Hemos podido obtener más de 180 plántulas/explante en ocho meses de cultivo y contamos, actualmente, con un banco de germoplasma de aproximadamente 1.000 plántulas.

El cultivo de tejidos de queule *in vitro* supera notablemente la dificultad de producir masivamente plantas a partir de semilla, ofreciendo una vía adecuada para clonar y preservar esta especie mediante la metodología sugerida en esta investigación. El siguiente paso es su establecimiento en condiciones *ex vitro*. Esto se logra desarrollando un buen método de arraigamiento. Con tal objetivo, en esta investigación, que aún no ha terminado, se realizan, actualmente, ensayos de enraizamiento *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al profesor Carlos Padilla, quien nos ayudó con los problemas de contaminación, y al doctor Alejandro Troncoso por sus comentarios críticos.

REFERENCIAS

- ARORA, R. y S. BHOJWANI. 1989. "In vitro propagation and low temperature storage of *Saussurea lappa* C.B. Clarke - An Endangered, medicinal plant", *Plant Cell Reports* 8:44-47.
- BENOIT, I. 1989. *Libro rojo de la Flora Terrestre de Chile* (Primera Parte). Reedición actualizada de las Actas del Simposio "Flora Nativa Arbórea y Arbustiva de Chile Amenazada de Extinción", 1985, organizado por la Corporación Nacional Forestal.
- DONOSO, C. y B. ESCOBAR. 1986. "Germinación de *Gomortega keule* (Mol.) Baillon", *Bosque* 6 (2): 120-122.
- HARTMAN, H.T. y D.E. KESTER. 1985. *Plant Propagation. Principles and Practice*. Prentice Hall. Inc., Englewood.
- IRIONDO, J.M. y C. PEREZ. 1990. "Micropropagation of an endangered plant species: *Coronopus navasii*", *Plant Cell Reports* 8: 745-748.1090.
- MOSELLA, L., C. M. RIEDEL, R. JONARD y P. SIGNORET. 1979. "Développement *in vitro* d'apex de pecher (*Prunus persica* Batsch): possibilités d'application", *C.R. Acad. Sc. Paris*. 289: 1335-1338.
- MURASHIGE, T. y F. SKOOG. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- MUÑOZ, R. 1989. "El queule, una especie en peligro de extinción". *Chile Forestal* 124: 16-17.
- ORTEGA, C. y C. GONZALEZ. 1985. "In vitro propagation of *Senecio hermosae* Pitard", *Botanica macaronésica* 14: 59-72.
- PARK, J. y K. THIMANN. 1990. "Senescence and stomatal aperture as affected by antibiotics in darkness and light", *Plant Physiol.* 92: 696-702.
- SCHULTES, R. 1983. "Peruvian and Chilean Psychoactive Plants mentioned in Ruiz's Relation (1777 - 1788)", *Journal of Psychoactive Drugs* 15 (4): 303-304.
- VIJAYAKUMAR, N.K. P.P. FERET y T.L. SHARIK. 1990. "In vitro propagation of the endangered Virginia Roundleaf birch (*Betula uber* [Ashe] Fern). Using Dormant Buds", *Forest Science* 36 (3): 842-846.