



Universidad Austral de Chile

---

Facultad de Ciencias Agrarias

Escuela de Agronomía

**Protocolo de enraizamiento de plantas  
micropropagadas de  
*Sophora toromiro* (Phil.) Skottsberg, especie  
extinta en su lugar de origen.**

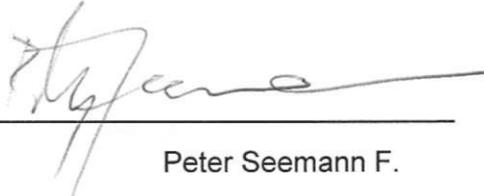
Memoria presentada como parte de  
los requisitos para optar al título de  
Ingeniero Agrónomo

**Raúl Cristóbal Polidoro Alarcón González**

Valdivia – Chile

2013

PROFESOR PATROCINANTE:



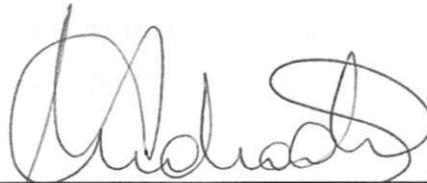
---

Peter Seemann F.

Ingeniero Agrónomo, Dr. Rer. Hort.

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

PROFESORES INFORMANTES:



---

Nancy Andrade S.

Ingeniero Agrónomo, M. Sc.

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal



---

Judith Carrasco P.

Lic. Cs. Biológicas, M. Sc.

Instituto de Producción y Sanidad Vegetal

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres Víctor y Mirtha que fueron mi pilar fundamental en este largo periodo universitario, por su apoyo incondicional, incluso sacrificando objetivos personales para poder darme sin titubear todo lo que necesité. A mi hermano Ignacio que me llenó de alegría y de risas muchas veces cuando me sentí derrotado.

También quiero agradecer de manera especial a mi querido primo y padrino espiritual, Leonardo García, que gracias a su apoyo moral y económico nunca me vi complicado en la vida de estudiante lejos de casa, como una vez me dijo “Pasado es historia, el futuro es un misterio pero el hoy es un regalo, por eso se llama presente”, muchas gracias por haberme ayudado a disfrutar de mi presente.

A mis compañeros de la escuela de la vida Rodrigo B., Nicolás F., Rodrigo L., Silvia R. y Laura S. que fueron parte de mi aprendizaje mas allá de los libros, siempre fuimos, somos y seremos parte de algo mágico, algo que pareciera cercano y lejano, algo utópico que no nos parece imposible.

Gracias al profesor Peter Seemann porque cada vez que me enseñó, a la vez me enseñó a dudar y buscar mas allá de lo enseñado. Por la infinita paciencia que me tuvo, su comprensión, consejos y apoyo.

A la profesora Judith C. que me enseñó a trabajar en el laboratorio, me aconsejó y me escuchó cada vez que lo necesité, gracias por su paciencia.

A Susana por su apoyo, el trabajo y la amistad que fueron de gran ayuda en la realización de mi trabajo.

A los trabajadores del laboratorio de fitopatología, Herman que fue mi salvador en el análisis estadístico. A Don Ramón y Don José por el apoyo, buena onda y por facilitarme una salita para trabajar en el escrito de la memoria.

Gracias a la vida por haberme dado esta oportunidad....

**INDICE DE MATERIAS**

<b>Capítulo</b>		<b>Página</b>
	RESUMEN	1
	SUMMARY	3
1	INTRODUCCION	5
2	MATERIAL Y METODOS	13
2.1	Diseño experimental	13
3	PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS	15
3.1	Efecto de diferentes concentraciones de ANA y KIN en medio MS (Ensayo A)	15
3.1.1	Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento	16
3.1.2	Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos	17
3.2	Efecto de diferentes concentraciones de AIB y KIN en medio MS. (Ensayo B)	17
3.2.1	Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento	18
3.2.2	Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos	18
3.3	Efecto de diferentes concentraciones de AIB en medio MS (ensayo C)	19

3.3.1	Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento	19
3.3.2	Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos	20
3.4	Efecto de diferentes concentraciones de ANA en medio WPM (Ensayo D)	20
3.4.1	Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento	20
3.4.2	Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos	21
3.5	Presencia de oxidación, hiperplasia, formación de callos y callos aéreos	22
3.5.1	Porcentajes de oxidación para cada uno de los ensayos	22
3.5.2	Porcentajes de hiperplasia para cada uno de los ensayos	23
3.5.3	Porcentajes de callos para cada uno de los ensayos	23
3.6	Evolución en el tiempo	25
3.6.1	Número de brotes desde el día 15 al 75	25
3.6.2	Longitud de brotes (cm), desde el día 15 al 75	26
3.6.3	Número de raíces y longitud de raíces en cada evaluación	27
4	CONCLUSIONES	28
5	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
6	ANEXOS	34

**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces y longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo A).	15
2	Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces y longitud de raíces (cm) (Ensayo B).	17
3	Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo C).	19
4	Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo D).	20
5	Promedios y rangos de oxidación (%), hiperplasia (%), formación de callos (%) y callos aéreos (%) distribuidos en los ensayos A, B, C y D.	22
6	Evolución en el tiempo del número de raíces totales por ensayo, número de raíces por plántula y longitud de raíces por plántula (mm) por cada uno de los ensayos.	27

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Promedio del número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos (Ensayo A).	16
2	Promedios del número de brotes y longitud de brotes (cm) (Ensayo D).	21
3	Número de brotes a través de cada evaluación, desde el día 15 al 75.	25
4	Longitud de brotes (cm) a través de cada evaluación desde el día 15 al 75.	26

**INDICE DE ANEXOS**

<b>ANEXO</b>		<b>Página</b>
1	Se muestra la trazabilidad de las generaciones de <i>Sophora toromiro</i> (Phil.) Skotts. cultivadas en el Jardín Botánico Nacional, hasta el año 2009	34
2	Comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio ( <i>in vitro</i> ) respecto a una planta en condiciones naturales ( <i>in vivo</i> ).	35
3	Plántulas de <i>S. toromiro</i> propagadas <i>in vitro</i> .	36
4	Presencia de oxidación en el medio de cultivo.	37
5	Presencia de hiperplasia en las plántulas.	38
6	Presencia de formación de callos en la zona radicular de las plántulas.	39
7	Presencia de callos aéreos en las plántulas.	40

## RESUMEN

*Sophora toromiro* es un árbol pequeño endémico de la Isla de Pascua, que se encuentra extinto en su distribución natural. Actualmente la especie ha sobrevivido bajo cultivo en diversos jardines botánicos y jardines privados de Chile y Europa. Los estudios genéticos realizados sobre el material introducido demostraron que la diversidad genética es mínima debido a que la propagación se había basado en individuos genéticamente idénticos por lo que es posible que la especie no pueda volver a formar poblaciones estables en estado silvestre. La conservación de la biodiversidad es hoy una materia de preocupación global por lo cual la propagación de especies amenazadas es de vital importancia. Entre las distintas alternativas de propagación se encuentra la micropropagación o propagación *in vitro*, la que permite incrementar rápidamente el número de individuos e incluso el establecimiento de las especies en un banco de germoplasma, ayudando a la preservación de especies amenazadas. Este trabajo propone un método de enraizamiento a partir de plántulas de *Sophora toromiro*, propagadas *in vitro*, en diversos ensayos, en donde sus tratamientos presentan diferentes concentraciones hormonales. El primer ensayo corresponde a la combinación de la auxina ácido naftalén acético (ANA) y la citoquinina kinetina (KIN), en concentraciones de 0; 0,1 y 0,5 mg/L, respectivamente. El segundo ensayo es la combinación de ácido indol butírico (AIB) y KIN, también en las concentraciones de 0; 0,1 y 0,5 mg/L. El tercer ensayo corresponde a diferentes concentraciones de la auxina AIB en 0; 1 y 2 mg/L. Estos tres ensayos fueron hechos en medio Murashige y Skoog (MS). Finalmente el último ensayo corresponde a tres concentraciones de ANA, 0; 1 y 2 mg/L, en el medio Woody Plant Medium (WPM) de Lloyd y McCown (1981). Estos cuatro ensayos fueron dejados en una cámara de incubación por 75 días, realizando evaluaciones cada 15 días. Las variables evaluadas fueron número y longitud de raíces y brotes y otras variables que aparecieron como porcentajes de enraizamiento, oxidación, hiperplasia, formación de callos subterráneos y aéreos. Los explantes formaron raíces, así como también, brotes, callos, hiperplasia y oxidación, sin embargo la respuesta fisiológica no presentó diferencias significativas para ninguno de los

tratamientos debido a que el valor de las desviaciones estándar fue alto en todos los casos. Bajo las condiciones evaluadas, *Sophora toromiro* no responde adecuadamente al proceso de rizogénesis *in vitro* debido a que las raíces no aparecieron en un número significativo de plántulas y la longitud de estas raíces alcanzaron promedios insignificantes.

## SUMMARY

*Sophora tomorimo* is a small endemic tree from Easter Island, which is extinct in its natural range. Currently the species has survived in cultivation in several botanical gardens and private gardens of Chile and Europe. Genetic studies made on the material introduced showed that the genetic diversity is minimal because propagation was based on genetically identical individuals, so it is possible that the species cannot form stable populations in the wild state again. Currently the conservation of biodiversity is a matter of global concern whereby propagation of endangered species is vital. Among the various options for propagation, micropropagation or *in vitro* propagation allows to rapidly increase the number of individuals and the establishment of species in a germplasm bank, helping to preserve endangered species *ex situ*. This work proposes a method of rooting *Sophora toromiro* plantlets, propagated *in vitro*, in various experiments, where treatments have different hormone levels. The first experiment corresponds to the combination of the auxin naphthaleneacetic acid (NAA) and the cytokinin kinetin (KIN), each in concentrations of 0; 0.1 and 0.5 mg/L. The second experiment is the combination of indole butyric acid (IBA) and KIN, also in 0; 0.1 and 0.5 mg/L concentrations. The third experiment combines different concentrations of auxin IBA in 0; 1 and 2 mg/L. These three tests were made on Murashige and Skoog (MS) culture medium. Finally, the last experiment was carried out with three concentrations of NAA, 0; 1 and 2 mg/L. on Lloyd and McCown's (1980) Woody Plant Medium (WPM). These four experiments were left in an incubation chamber for 75 days, making assessments every 15 days. The variables evaluated were number of roots, root length, shoots length and other variables such as rooting percentages, oxidation, hyperplasia, and formation of underground and aerial calluses. Explants formed roots, as well as shoots and callus, but also showed tissue hyperplasia and oxidation. However, the physiological responses were not significantly different for either treatment because values of the standard deviation were high in all cases. Under conditions tested, *Sophora toromiro* did not respond adequately to the process of *in vitro* rhizogenesis,

because roots did not appear in a significant number of plantlets and the length of these roots were insignificant.

## 1 INTRODUCCION

El ser humano desde el comienzo de su existencia, ha dependido de la naturaleza, obteniendo de ésta múltiples bienes y servicios, ya sean alimentos, combustibles, medicinas y materias primas entre otras. Este es un componente fundamental para el desarrollo de la vida ya que protege cauces de agua, permite la formación del suelo, aire puro, sirve de hábitat de la fauna silvestre e incluso permite el esparcimiento y disfrute de su belleza (BENOIT, 1985). HECHENLEITNER *et al* (2005) indican que actualmente existen diversos problemas a nivel nacional e internacional, debido al uso incontrolado de los recursos, disminuyendo la cubierta vegetal nativa, por diversos factores, tales como la explotación e incendios, los que sumados a otros elementos, como cambio climático, urbanización, construcción de plantas hidroeléctricas, caminos y minería aumentan el riesgo de extinción para muchas especies provocando la desaparición de ellas, erosión incontrolada, desertificación, estancamiento de cauces de agua, inundaciones y aumento de la contaminación.

Identificar las especies de plantas amenazadas es importante, ya que tiene múltiples implicancias en la gestión ambiental como el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (SEIA) y la aplicación de la Ley de Recuperación del Bosque Nativo y Fomento Forestal, ya que en ellas se señala la prohibición de captura y corta de especies calificadas como amenazadas. Del mismo modo, la identificación de las especies, según el estado de conservación, permite definir prioridades de acción destinando recursos a la conservación de las mismas (COMISIÓN NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE, 2009).

Una de las especies afectadas y designada en la categoría de “extinta en su entorno natural” (CONAMA, 2007) es *Sophora toromiro* (Phil.) Skottsberg, principalmente por problemas relacionados con la actividad humana insustentable ambientalmente como la sobreexplotación.

Ya SKOTTSBERG (1920), en una expedición a la Isla de Pascua entre los años 1916 y 1917 encuentra y describe a *S. toromiro* como una especie que “probablemente pronto se extinguirá”, confirmando lo señalado por Fuentes (s.f), citado por SKOTTSBERG (1922), que considera al árbol como “muy escaso”, señalando también que el toromiro

se encontraba al borde de la extinción, recalcando su importancia desde el punto de vista geográfico así como etnológico.

*Sophora toromiro* es un árbol pequeño endémico de la Isla de Pascua, actualmente extinto en su distribución natural, muriendo el último ejemplar a los pies del volcán Rano-Kao a inicios de la década de 1960 (CONAMA, 2009). Actualmente se encuentra en el Jardín Botánico Nacional de Viña del Mar, el Vivero las Brujas de Talagante y en jardines botánicos europeos como el Jardín Botánico de Gotemburgo, Suecia y el Jardín Botánico de Bonn, Alemania, entre otros (SEEMANN, 2011, comunicación personal).

En el anexo 1 se muestra la trazabilidad de las generaciones de *Sophora toromiro* (Phil.) Skotts. cultivadas en el Jardín Botánico Nacional, hasta el año 2009.

CONAMA (2009) indica que es un árbol que no sobrepasa los 2 a 3 metros de altura. Sus hojas son compuestas de entre 4,5 a 10 centímetros de largo, dispuestas de forma alterna en las ramas. Estas están formadas por 8 a 12 pares de folíolos verdes, pequeños y elípticos u ovalados, de entre 0,6 a 1,5 centímetros de largo y 0,7 centímetros de ancho. Su envés es pubescente al igual que el raquis en hojas menos jóvenes. Posee una inflorescencia formada por racimos laxos compuestos por unas pocas flores las cuales poseen 5 pétalos amarillos de 2 centímetros de largo y una forma ligeramente tubular. En cuanto a su fruto, este es una vaina la cual puede medir hasta 8 centímetros de largo y 1 de ancho, y en su interior se pueden encontrar desde 1 a 6 semillas de forma ovalada con aproximadamente 5 milímetros de diámetro cada una.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE (WCMC) (1998) establece la siguiente clasificación botánica:

Reino: *Plantae*; Phylum: *Tracheophyta*; Clase: *Magnoliopsida*; Orden: *Fabales*; Familia: *Leguminosae*; Género: *Sophora*; Especie: *S.toromiro*. (Phil.) Skotts.

La conservación de la flora nativa chilena se ha convertido en un tema de cada vez mayor importancia en los últimos años, ya que ha aumentado el conocimiento sobre las amenazas que la afectan (HECHENLEITNER *et al*, 2005). En el caso de *Sophora toromiro* debido a sus bajas densidades poblacionales y al intenso uso de su madera, fue rápidamente agotada (CONAMA, 2009). CONAMA (2009) también menciona que

las principales razones de su extinción fueron la utilización indiscriminada de la madera de este árbol para construcción de artículos domésticos y para rituales, sin embargo la mayor reducción poblacional de esta especie fue en los siglos XVIII y XIX debido al alto consumo de sus hojas y tallos por parte del ganado doméstico llevado a la isla (se estima que llegaron a haber 20.000 ovejas en la isla).

Actualmente existe una organización llamada Toromiro Management Group (TMG) compuesta por miembros de jardines botánicos e instituciones de investigación provenientes de Chile, Suecia, Reino Unido, Francia, Alemania y Australia (TOROMIRO MANAGEMENT GROUP, s.f). El objetivo de esta es la conservación y recuperación del toromiro primeramente evitando su extinción y luego a través de una reintroducción de una población genéticamente y demográficamente viable a la Isla de Pascua (MAUNDER, 1997).

No existen normativas específicas para esta especie y las acciones actuales de conservación se encuentran limitadas principalmente a los viveros y jardines botánicos nombrados anteriormente. Desde el año 1966 se han hecho intentos de reincorporar esta especie a la Isla de Pascua sin tener éxito ya que todos los individuos trasplantados han muerto (CONAMA, 2009).

BACCHETTA *et al* (2008), indican que, realizando un inventario, en 1988 se encontró un ejemplar cultivado en el Jardín Botánico de Bonn y se pudo saber que también se cultivaba en otros jardines botánicos europeos como el de Gotemburgo, lo que dio origen a un programa de propagación de la especie con la finalidad de reintroducirlo de nuevo en la naturaleza, siendo el año 1996 cuando se plantaron en la Isla de Pascua 180 ejemplares provenientes de estos jardines. Sin embargo, la introducción fracasó y más del 80% de los individuos desaparecieron en poco tiempo y el resto algo más tarde. Los análisis genéticos realizados sobre el material introducido demostraron que la diversidad genética era mínima y que el programa de propagación se había basado en individuos genéticamente idénticos (Barthlott *et al*, 2000 citado por BACCHETTA *et al*, 2008). Debido a ello, es posible que la especie no pueda volver a formar poblaciones estables en estado silvestre, aunque queda el consuelo de tener aún ejemplares vivos de la planta. Si en lugar de individuos aislados, la conservación *ex situ* se hubiese desarrollado según los cánones actuales, el éxito de la reintroducción hubiese sido

mayor. Cabe destacar que estas plantas presentan una baja diversidad genética debido a que provienen de semillas de un solo ejemplar recolectadas por Thor Heyerdahl en el año 1955-1956 (CONAF, s.f). Un grupo de científicos del núcleo milenio en genómica funcional de plantas, de la Universidad Católica de Chile, diseñó un proyecto para reinsertar el árbol en la Isla de Pascua y levantar su categoría de extinto en su medio natural. Para ello rescataron semillas del Jardín Botánico Nacional de Viña del Mar y de Múnchen, Alemania, asegurándose a través de estudios genéticos que coincidían con la huella genética registrada en el Museo Nacional de Historia Natural y clonándolos *in vitro* para su posterior reintroducción a la isla (RODRIGUEZ, 2010).

La conservación de la biodiversidad es hoy una materia de preocupación global (CONAMA, 2009) por lo cual la propagación de las especies es de vital importancia. Existen distintas alternativas de propagación y entre estas se encuentra el cultivo de tejidos, también llamado micropropagación o propagación *in vitro*, siendo esta una excelente vía para incrementar rápidamente el número de individuos e incluso el establecimiento de las especies en un banco de germoplasma, lo cual no solo le da un gran valor a la investigación de las especies, sino que también es una forma de preservación de estas especies amenazadas (CALDERON *et al*, 1993).

SEEMANN (1993), señala que la micropropagación es una técnica de propagación agámica de plántulas en la cual se multiplica un genotipo específico sin segregación de las características genéticas utilizando células, tejidos u órganos de distintas procedencias de la planta. Esta técnica posee una amplia gama de aplicaciones, dependientes del objetivo al cual se quiere llegar, utilizando células, tejidos u órganos de distintas procedencias de la planta. CASTILLO (2004) añade que a partir de un explante de la planta madre, se obtiene una descendencia genéticamente idéntica, denominadas clones.

Según lo señalado por Montoya (1991); Seemann (1993) y Hartmann y Kester (1997), citados por TORRES (2002), con esta técnica se puede lograr un incremento acelerado de plántulas derivadas de la planta madre (genotipo determinado). Como existe un control de los factores ambientales y químicos, en el laboratorio, influyentes en la propagación vegetativa se consigue una tasa de propagación mayor que la convencional, teniendo múltiples ventajas como acelerar la producción de nuevas

variedades, conservación de germoplasma y obtener plantas libres de patógenos, utilizando un espacio reducido (en comparación a condiciones de campo e invernadero), posibilitando el cultivo de las especies sin limitaciones climáticas.

Esta técnica ha ayudado a conservar especies amenazadas como es el caso de la cactácea *Pelecyphora strobiliformis*, propia del sur de Nuevo León, Mexico, de la que Arias, citado por CARRILLO (2002), estableció un banco de germoplasma como reserva.

Se han realizado ensayos con ejes embrionarios de cotiledones y almacenados en nitrógeno líquido, como es el caso de *Quercus faginea* y *Corylus avellana*, de las que mediante técnicas de cultivo *in vitro* se han obtenido tasas de recuperación del 60 y 80% respectivamente (González-Benito y Pérez 1992a, 1994b citados por IRIONDO, 2001). En *Gomortega keule* también se han realizado trabajos de micropropagación a partir de embriones cigóticos utilizando distintas variables como concentraciones hormonales, luz y oscuridad, llegando a la conclusión de que el cultivo de tejidos *in vitro* supera notablemente la dificultad de producir plantas a partir de semillas (CALDERON, 1993).

OLMOS *et al* (s.f) señala que existen 3 etapas para la propagación *in vitro*:

- a) Establecimiento del cultivo: El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables libres de microorganismos. La planta madre es determinante, ya que se ha establecido que los tejidos meristemático jóvenes, embriones o semillas tienen una mayor capacidad regenerativa. La obtención de cultivos axénicos puede lograrse determinando la incidencia de contaminantes a través de métodos preventivos como análisis DAS-ELISA o PCR. También a través de la observación de tejidos maduros se puede identificar la presencia de patógenos a través de síntomas. Además existen métodos curativos como la termoterapia y quimioterapia, a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas.
- b) Multiplicación: el objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes a través de ciclos sucesivos de multiplicación. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como las auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones ambientales cumplen un rol fundamental sobre esta etapa. Esta

puede ser a través de organogénesis o embriogénesis, las que pueden darse de forma directa e indirecta.

- c) Enraizamiento y aclimatación: Esta es la etapa donde se producen las raíces adventicias, siendo más fácil el enraizamiento de herbáceas que en leñosas debido a su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto *in vitro* como *ex vitro* en donde en el primer caso se utilizan distintos tipos de sustratos (medios de cultivo WPM y Murashige y Skoog 1962) con reguladores de crecimiento para promover la rizogénesis. El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y la aclimatación ocurran simultáneamente. Sin embargo, el estrés asociado a la evapotranspiración acelerada de las plantas puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por lo anterior es necesario contar con las instalaciones adecuadas, ya sean invernaderos o cámaras de crecimiento adecuadas que le brinden las condiciones ambientales propicias para la supervivencia.

En el anexo 2 se observa una comparación entre las características de una planta en condiciones *in vitro* respecto a una planta en condiciones *in vivo*.

La práctica de enraizamiento de los brotes propagados *in vitro* reviste gran importancia ya que tiene como objetivo producir plantas con buenas características fisiológicas y morfológicas que puedan sobrevivir en condiciones de trasplante al suelo (Ruscitti *et al* (2000), citado por QUINTERO *et al.*, 2003) La formación del sistema radical y el crecimiento de las raíces son fundamentales para lograr la transferencia de las plántulas a condiciones de invernadero. Sin embargo, algunos autores han experimentado inconvenientes al realizar esta práctica, lo cual sería lógico al considerar que existen respuestas diferenciales entre especies (Grout y Aston, 1977, citados por QUINTERO *et al.*, 2003).

RICCI y EATON (1997) examinaron el origen y variabilidad genética de algunos individuos adultos de toromiro provenientes de distintos jardines botánicos y privados en el mundo ya que existen muchos toromiro creciendo cerca de *Sophora microphylla* y *Sophora fernandeziana* y esto ha generado dudas sobre hibridismo en la descendencia llegando a la conclusión de que los ejemplares estudiados son, de hecho, *S.toromiro* y no híbridos con otras especies. Sin embargo, los autores comentan que se deben hacer

esfuerzos en las cruces entre toromiro enfocadas a una mayor recombinación genética que ayude a la reintroducción de la especie a la isla.

KUN-HUA *et al.*, (2010) multiplicaron *in vitro* *Sophora flavescens*, una importante planta medicinal china, con el objetivo de obtener una rápida propagación y generar una característica poliploide obteniendo resultados positivos.

Plántulas de *Sophora toromiro* entre 3 a 4 meses provenientes de semillas también han sido propagadas *in vitro* ya que la propagación natural por semillas es muy pobre y lenta, siendo una buena alternativa la micropropagación (ITURRIAGA *et al.*, 1994).

JORDÁN *et al.* (2001) también trabajaron con toromiro *in vitro* utilizando ejes embrionarios con cotiledones, cotiledones, yemas axilares y hojas de árboles de 20 años de edad, que fueron evaluados por su capacidad para activar la organogénesis y para regenerar plántulas bajo condiciones *in vitro*.

ITURRIAGA *et al.* (1994), JORDAN *et al.* (2001) y VÁSQUEZ (2012) explican que explantes de *Sophora toromiro* han sido establecidos *in vitro*, sin embargo, la tasa de regeneración completa aún es deficiente en un sistema de micropropagación.

Una especie cercana a *S. toromiro*, *Sophora flavescens*, induce satisfactoriamente brotación múltiple y rizogénesis, al utilizar medio MS (MURASHIGE and SKOOG. 1962), suplementado con 8,88  $\mu\text{M}$  de ABA y 2,69  $\mu\text{M}$  de ANA, obteniendo una tasa de brotación de 93,4%, y 82,4% de enraizamiento (Zhao *et al.*, 2002; citado por VÁSQUEZ, 2012). También, se han hecho estudios de respuesta a rizogénesis en otras especies de leguminosas arbóreas como *Acacia chundra* utilizando explantes de yemas embrionarias, obteniendo un 75% de rizogénesis al cultivar los explantes en medio MS a la mitad de la concentración, suplementado con 0,25 mg/L de IBA o IAA, mientras que de 3 a 6 brotes por explante fueron obtenidos en medio MS suplementado con 1,5 mg/L BAP (Bencilaminopurina), 0,01 a 0,05 mg/L AIA (Ácido indolacético) y 50 mg/L de (Sulfato de Adenina). VÁSQUEZ (2012), indica que entre las auxinas ANA, AIA y AIB probadas en sus ensayos, AIB 0,5 mg/L en medio WPM fue la que produjo mayor enraizamiento (16,7 %), a los 60 días del cultivo, sin embargo ANA 0,5 mg/L en medio WPM también produjo enraizamiento (8,3 %), también señala que AIB 0,1 mg/L en medio MS produjo una mayor elongación de raíz.

De acuerdo a este contexto, se plantea la siguiente hipótesis: Plántulas de *Sophora toromiro* responden adecuadamente al proceso de enraizamiento *in vitro*.

El objetivo general de este trabajo es:

- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de dos auxinas con o sin presencia de citoquininas, en dos medios de cultivo (MS y WPM) sobre enraizamiento *in vitro* de *Sophora toromiro*.

Los objetivos específicos son:

- Establecer un protocolo de enraizamiento para *Sophora toromiro*.
- Evaluar diferentes concentraciones de ANA y KIN y respuesta de la especie.
- Evaluar diferentes concentraciones de AIB y KIN y respuesta de la especie.

## 2 MATERIAL Y METODO

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, perteneciente al Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile. El material vegetal utilizado son plántulas de *S. toromiro*, cultivadas *in vitro*, (Anexo 3), provenientes del banco de germoplasma del laboratorio y obtenidas a partir de embriones cigóticos y mantenidos *in vitro* en la Universidad Austral de Chile. Previamente al establecimiento de los ensayos, las plántulas fueron separadas y repicadas para aumentar su población y obtener las plántulas necesarias para la realización del trabajo.

Los materiales utilizados son el equipamiento habitual de un laboratorio, siendo los más relevantes la cámara de flujo laminar, autoclave, frascos de vidrio, medios de cultivo MS y WPM, además de cámaras de incubación con temperatura y fotoperiodo controlados.

La primera etapa del desarrollo de la investigación consistió en la micropropagación, en donde el material fue replicado para alcanzar la cantidad de plántulas necesarias para el establecimiento de los ensayos. Estas debieron tener una altura mínima de 1 cm para estandarizar el diseño. Se utilizaron dos medios de cultivo, el MS de MURASHIGE and SKOOG (1962) y el medio WPM de LLOYD and MCCOWN (1980), en ambos se utilizó agar, en vez de Gelrite como gelificante para evitar la vitrificación de las plántulas. El pH se estabilizó a 5,8, se dosificaron en el dispensador de medios, proporcionando a cada frasco 10 mL de medio para luego esterilizarlos en autoclave a 1,2 atm. y 120° C por 20 minutos. La siembra *in vitro* se realizó en la cámara de flujo laminar, cuidando la asepsia dentro de ésta, utilizando etanol al 95% y un mechero para esterilizar los instrumentos.

### 2.1 Diseño experimental

Para la siguiente etapa se utilizaron 360 plántulas de toromiro, diseñadas como experimentos completamente al azar y distribuidas en cuatro ensayos (A, B, C y D). Cada ensayo contenía distintos tratamientos en donde cada uno era una concentración hormonal distinta. En los ensayos A y B se establecieron 9 tratamientos con 3 repeticiones de 5 plántulas cada uno, de los ensayos C y D se establecieron 3

tratamientos con 3 repeticiones cada uno en la siguiente disposición. Los ensayos A, B y C en medio MS y el ensayo D en medio WPM.

El ensayo A, basado en diferentes concentraciones hormonales de ANA/KIN (Testigo sin hormonas; KIN 0,1 mg/L; KIN 0,5 mg/L; ANA 0,1 mg/L; ANA 0,5 mg/L; ANA 01/KIN 0,1 mg/L; ANA 0,1/KIN 0,5 mg/L; ANA 0,5/KIN 0,1 mg/L; ANA 0,5/KIN 0,5 mg/L).

El ensayo B, basado en diferentes concentraciones hormonales de AIB/KIN (Testigo sin hormonas; KIN 0,1 mg/L; KIN 0,5 mg/L; AIB 0,1 mg/L; AIB 0,5 mg/L; AIB 01/KIN 0,1 mg/L; AIB 0,1/KIN 0,5 mg/L; AIB 0,5/KIN 0,1 mg/L; AIB 0,5/KIN 0,5 mg/L).

El ensayo C, basado en diferentes concentraciones hormonales de AIB (Testigo sin hormonas, AIB 1 mg/L; AIB 2 mg/L).

El ensayo D, basado en diferentes concentraciones hormonales de ANA (Testigo sin hormonas, ANA 1 mg/L; ANA 2 mg/L).

Las evaluaciones se hicieron cada 15 días hasta llegar a una quinta evaluación, evaluando el número de brotes, la longitud de brotes (cm), el número de raíces, la longitud de raíces (cm), el enraizamiento (%), la oxidación (%), la hiperplasia (%), la presencia de callos subterráneos (%) y la formación de callos (%).

Para el análisis estadístico se utilizaron datos de la última evaluación (día 75). Primero se realizó un análisis de Shapiro Wilk's ( $W$  test) a cada variable dependiente en relación a la concentración hormonal para saber si los datos presentaron normalidad. Los datos de longitud y número fueron evaluados como unidad experimental plántula y los datos de porcentajes de enraizamiento, fueron evaluados como unidad experimental repetición (5 plántulas). Al no encontrarse normalidad, los datos de longitud y número, así como los de porcentaje, fueron transformados con cada una de las formulas respectivas ( $\ln x$ ;  $\sqrt{x} + 1$ ;  $\sqrt{x} + 0,5$ ) y  $\arcsin \sqrt{x/\%}$ ). Si nuevamente no presentaron normalidad, después de ser transformados, se decidió realizar un análisis no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó el programa estadístico Statistica versión 7.0. Los datos de porcentajes de oxidación, hiperplasia y formación de callos no se analizaron estadísticamente.

### 3 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

#### 3.1 Efecto de diferentes concentraciones de ANA y KIN en medio MS (Ensayo A).

Con el propósito de evaluar las diferentes respuestas hormonales *in vitro* de *S. toromiro*, el Cuadro 1 y la Figura 1 muestran distintas variables de porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, así como también promedio y longitud de brotes. Estas variables fueron analizadas en relación a distintas concentraciones hormonal de ANA y KIN.

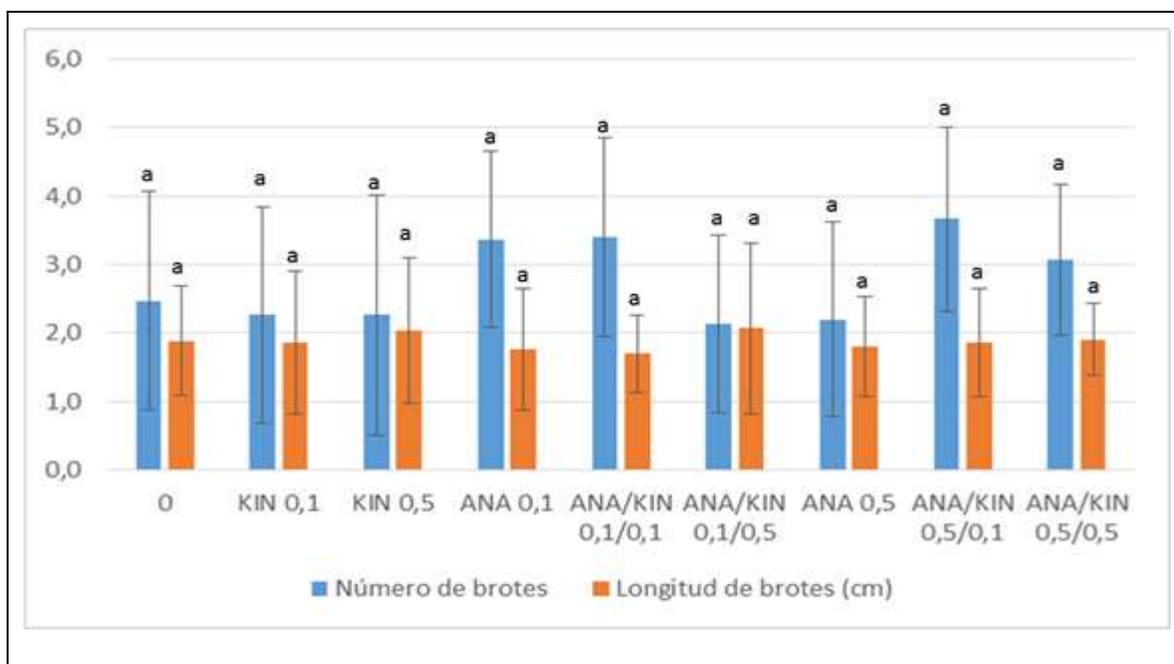
**Cuadro 1. Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo A).**

Hormonas (mg/L)	Número de brotes por explante $\bar{X}$	Longitud de Brotos (cm) $\bar{X}$	Número de raíces por explante $\bar{X}$	Longitud de raíces (cm) $\bar{X}$	Enraizamiento %
<b>ANA 0/KIN 0</b>	2,5a	1,9a	0,0a	0,00a	0,0a
<b>KIN 0,1</b>	2,3a	1,9a	0,1a	0,03a	6,7a
<b>KIN 0,5</b>	2,3a	2,0a	0,1a	0,03a	6,7a
<b>ANA 0,1</b>	3,4a	1,8a	0,2a	0,08a	26,7a
<b>ANA 0,5</b>	2,2a	1,8a	0,1a	0,05a	13,3a
<b>ANA 0,1/KIN 0,1</b>	3,4a	1,7a	0,0a	0,00a	0,0a
<b>ANA 0,1/KIN 0,5</b>	2,1a	2,1a	0,2a	0,10a	13,3a
<b>ANA 0,5/KIN 0,1</b>	3,7a	1,9a	0,1a	0,02a	6,7a
<b>ANA 0,5/KIN 0,5</b>	3,1a	1,9a	0,1a	0,07a	13,3a

**3.1.1 Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento.** No se obtuvieron raíces en los tratamientos sin hormonas y ANA 0,1/KIN 0,1 mg/L, sin embargo, en el tratamiento ANA 0,1 mg/L fue el que obtuvo un mayor enraizamiento, obteniendo un 26% lo que corresponde a 4 plántulas enraizadas con alrededor de 0,2 raíces por planta. El tratamiento ANA 0,1/KIN 0,5 mg/L obtuvo la mayor longitud de raíces con el valor 0,1 cm por raíz. Al observar los valores todos se encontraban dentro de los rangos de los valores de la desviación estándar y por consecuencia no se encontraron diferencias significativas.

El hecho de que no haya enraizado el tratamiento testigo no es de extrañar ya que según la Universidad de Valladolid (s.f), es necesaria la presencia de auxinas para la inducción de rizogénesis, siendo la más utilizada AIB en concentraciones de 1-10  $\mu\text{M}$ .

Los bajos porcentajes de enraizamiento obtenidos pueden deberse a que se utilizó ANA sin embargo, KUN-HUA *et al.*, (2010) recomienda en *Sophora flavescens*, utilizar la auxina AIB, 1,5 mg/L, en medio MS, *S. Toromiro* al pertenecer al mismo género podría tener una respuesta similar.



**Figura 1. Promedios del número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos (Ensayo A).**

**3.1.2 Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos.** En la Figura 1 se observa que los tratamientos con las concentraciones hormonales ANA 0,1 mg/L; ANA/KIN 0,1/0,1 mg/L; ANA/KIN 0,5/0,1 mg/L y ANA/KIN 0,5/0,5 mg/L presentaron mayores promedios en el número de brotes. Debido a que las citoquininas están relacionadas a diferentes respuestas fisiológicas, como la promoción de la división celular y en este caso kinetina (KIN) al estar combinada con la auxina ácido naftalenacético (ANA) provocó que la combinación de ambas hormonas ANA/KIN 0,1/0,5 mg/L obtuviera el mayor promedio de longitud de brotes con 2,1 cm por brote, siendo una respuesta a la concentración hormonal (SEEMANN, 2011).

### 3.2 Efecto de diferentes concentraciones de AIB y KIN en medio MS. (Ensayo B)

Con el propósito de evaluar las diferentes respuestas hormonales *in vitro* de *S. toromiro*, el Cuadro 2 muestra distintas variables de porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, también promedio y longitud de brotes. Estas fueron analizadas en relación a variable/concentración hormonal de AIB y KIN.

**Cuadro 2. Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces y longitud de raíces (cm) (Ensayo B).**

Hormonas (mg/L)	Número de brotes $\bar{X}$	Longitud de brotes (cm) $\bar{X}$	Número de raíces por explante $\bar{X}$	Longitud de raíces (cm) $\bar{X}$	Enraizamiento %
AIB 0/KIN 0	1,9a	1,8a	0,2a	0,09a	20,0a
KIN 0,1	3,0a	1,8a	0,1a	0,04a	13,3a
KIN 0,5	3,3a	1,8a	0,1a	0,03a	13,3a
AIB 0,1	2,3a	1,8a	0,3a	0,17a	33,3a
AIB 0,5	3,4a	1,5a	0,2a	0,05a	13,3a
AIB 0,1/KIN 0,1	2,9a	1,7a	0,1a	0,03a	6,7a
AIB 0,1/KIN 0,5	2,8a	1,7a	0,3a	0,03a	20,0a
AIB 0,5/KIN 0,1	3,0a	1,8a	0,3a	0,09a	26,7a
AIB 0,5/KIN 0,5	2,9a	1,9a	0,2a	0,07a	20,0a

**3.2.1 Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento.** Ácido indol butírico (AIB) 0,1 mg/L fue el tratamiento que obtuvo mayor número de raíces con un promedio de 0,3 raíces por plántula, del mismo modo también obtuvo la mayor longitud de raíces con un promedio de 0,03 cm de raíz por plántula. Un estudio realizado por OBERSCHELP y MARCÓ (2010) indica que el AIB tiene un efecto positivo sobre el enraizamiento adventicio de *Prosopis alba* Grisebach perteneciente a la familia *Fabaceae*, lo que puede estar relacionado con la respuesta de enraizamiento en *S.toromiro*. En otro estudio realizado por Cav., PONCE *et al* (2011) en micropropagación de *Mutisia subspinosa* señalan que existe un efecto del AIB en relación al enraizamiento de las plántulas, sin embargo, este puede ser positivo así como negativo dependiendo de las concentraciones.

**3.2.2 Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos.** Los valores del número de brotes y la longitud de estos, presentaron valores similares en todos los tratamientos no existiendo diferencias significativas, siendo el tratamiento testigo el que obtuvo el promedio más bajo en número de brotes.

Los bajos valores de número y longitud de brotes, se debe principalmente a las hormonas utilizadas ya que para inducir brotación en otras sóforas como *Sophora flavescens* se recomienda la utilización de BAP, 1.5 mg/L y AIA 0.3 mg/L por 30 días (KUN-HUA *et al.*, 2010).

### 3.3 Efecto de diferentes concentraciones de AIB en medio MS (Ensayo C).

Con el propósito de evaluar las diferentes respuestas hormonales *in vitro* de *S. toromiro*, el Cuadro 3 muestra distintas variables de porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, así como también promedio y longitud de brotes. Estas fueron analizadas en relación a variable/concentración hormonal de AIB.

**Cuadro 3. Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo C).**

Hormonas (mg/L)	Número de brotes	Longitud Brotes (cm)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Enraizamiento %
	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%
<b>AIB 0</b>	3,3a	1,6a	0,1a	0,06a	13,3a
<b>AIB 1</b>	3,0a	1,8a	0,1a	0,05a	13,3a
<b>AIB 2</b>	2,5a	1,9a	0,1a	0,03a	6,7a

**3.3.1 Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento.** Respecto al número de raíces, no presentaron diferencias significativas, estas presentaron un promedio de 0,1 raíces por planta. Dentro de las 15 plántulas correspondientes a cada tratamiento se encontraron 2 raíces, a diferencia del tratamiento AIB, 2 mg/L, en donde se encontró una sola raíz. El tratamiento testigo y el tratamiento con AIB, 1 mg/L, obtuvieron el mismo porcentaje de enraizamiento de un 13% a diferencia del tratamiento AIB, 2 mg/L, que obtuvo un 6,7% de enraizamiento. La longitud de estas tampoco presentó diferencias significativas.

VÁSQUEZ (2012), señala que en *Sophora toromiro* la auxina AIB, 0,5 mg/L, en medio WPM es la que produjo un mayor enraizamiento en su investigación (16,7%), a los 60 días de cultivo. La única diferencia con este ensayo es el medio de cultivo utilizado, pudiendo ser el medio de cultivo el que marque una diferencia en el enraizamiento.

**3.3.2 Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos.** El número de brotes, así como la longitud no presentaron diferencias significativas, manteniéndose en valores cercanos entre los tratamientos.

VÁSQUEZ (2012), indica que los explantes de *Sophora toromiro* cultivados en medio WPM + AIB, 0,1 mg/L, producen gran cantidad de brotes con alrededor de 3,6 brotes por plántula y siendo MS + AIB, 0,5 mg/L, el que produjo mayor longitud de brotes con alrededor de 3,6 cm, obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. La diferencia en concentración hormonal de AIB y la utilización de medio MS pudieron haber disminuido el número de brotes y en el caso de la longitud solo es la diferencia en concentración hormonal.

#### **3.4 Efecto de diferentes concentraciones de ANA en medio WPM (Ensayo D).**

Con el propósito de evaluar las diferentes respuestas hormonales *in vitro* de *S. toromiro*, el Cuadro 4 y la Figura 2 muestran distintas variables de porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, así como también promedio y longitud de brotes. Estas fueron analizadas en relación a variable/concentración hormonal de ANA.

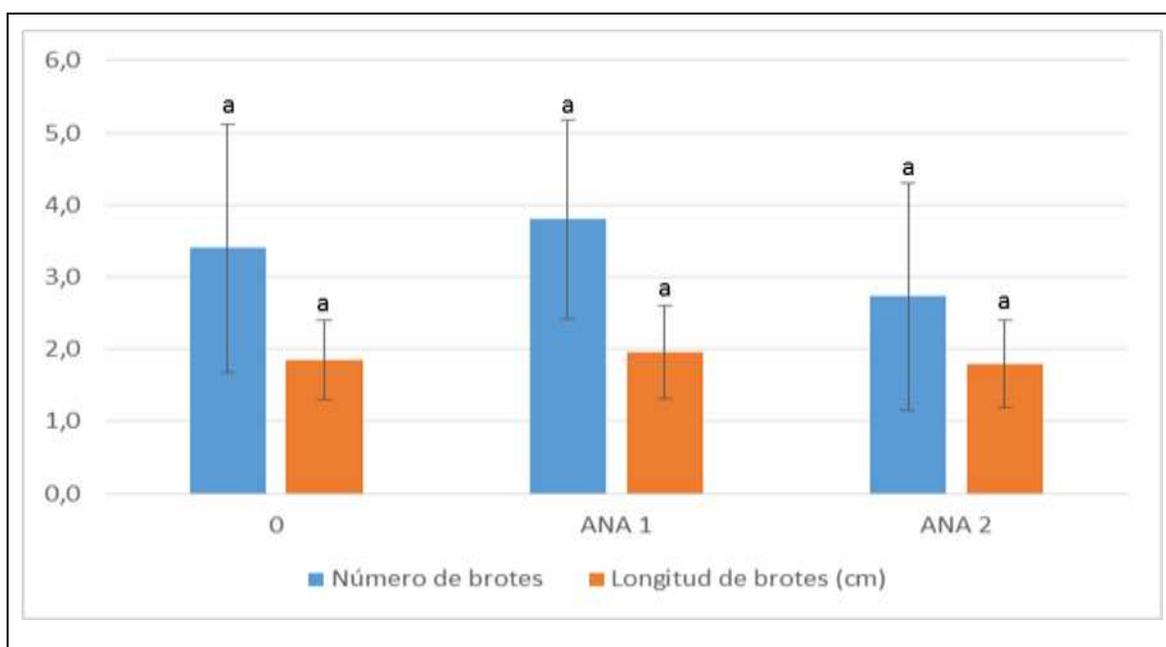
**Cuadro 4. Promedios de número de brotes, longitud de brotes (cm), número de raíces, longitud de raíces (cm) y enraizamiento (%) (Ensayo D).**

	Número de brotes	Longitud Brotes (cm)	Número de raíces por explante	Longitud de raíces (cm)	Enraizamiento
Hormonas (mg/L)	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	%
<b>ANA 0</b>	3,4a	1,9a	0,1a	0,02a	6,7a
<b>ANA 1</b>	3,8a	2,0a	0,2a	0,07a	13,3a
<b>ANA 2</b>	2,7a	1,8a	0,0a	0,00a	0,0a

**3.4.1 Número de raíces por explante y porcentaje de enraizamiento.** Como se observa en el Cuadro 4, solo presentaron raíces los tratamientos sin hormonas y ANA, 1 mg/L, con promedios de 0,1 y 0,2 raíces por planta, respectivamente, lo que quiere decir que el tratamiento sin hormonas presentó dos raíces con una longitud promedio de 0,02

cm por raíz dentro de las 15 plántulas evaluadas y el tratamiento ANA, 1 mg/L, presentó 3 raíces con una longitud promedio de 0,07 cm por raíz dentro de las 15 evaluadas. El enraizamiento en este ensayo fue bajo, siendo el valor máximo un 13% en el tratamiento con ANA, 1 mg/L. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En *Sophora falavescens*, una especie cercana a *S. toromiro*, Zhao *et al.* (2002), citados por VÁSQUEZ (2012), reportaron que se induce satisfactoriamente brotación múltiple y rizogénesis, al combinar las auxinas AIB con ANA, lo que indicaría que la falta de AIB podría ser la respuesta al bajo enraizamiento.



**Figura 2. Promedios de número de brotes y longitud de brotes (cm) (Ensayo D).**

**3.4.2 Número de brotes y longitud de brotes (cm) por cada uno de los tratamientos.** La Figura 2 muestra que los tratamientos sin hormonas, ANA 1 mg/L y ANA 2 mg/L, respectivamente, presentaron promedios de 3,4; 3,8 y 2,7 brotes por plántula y longitudes de 1,9; 2,0 y 1,8 cm/brote respectivamente, manteniéndose valores similares entre los tratamientos, no habiendo diferencias significativas en ningún tratamiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos el tratamiento ANA 1 mg/L, fue el que obtuvo un mayor número de brotes, con un promedio de 3,8 brotes por plántula. ROJAS y ABDELNOUR (2012) indican que la auxina ácido naftalenacético (ANA) induce mayor número de brotes, como fue en el caso de *Salix tetrasperma*. Dentro de las funciones de las auxinas se encuentra el alargamiento y división celular y crecimiento de secciones de tallos, hojas, frutos y principalmente de raíces (SEEMANN, 2011), lo que podría explicar en cierta medida la mayor producción de brotes, en este caso bajo esta concentración hormonal.

### 3.5 Presencia de oxidación, hiperplasia, formación de callos y callos aéreos.

En el Cuadro 5 y Figura 3 se muestran otras respuestas presentadas en el estudio tales como oxidación, hiperplasia y formación de callos (subterráneos y aéreos).

**Cuadro 5 Promedios y rangos de oxidación (%), hiperplasia (%), formación de callos (%) y callos aéreos (%) distribuidos en los ensayos A, B, C y D.**

Ensayo	Oxidación %		Hiperplasia %		Callos %		Callos aéreos %	
	Rango	$\bar{X}$	Rango	$\bar{X}$	Rango	$\bar{X}$	Rango	$\bar{X}$
A	33,3 - 80,0	60	0,0 - 13,3	7	66,7 - 100	93	0,0 - 6,7	2
B	20,0 - 53,3	38	0,0 - 33,3	10	73,3 - 100	92	0	0
C	0,0 - 46,7	18	0,0 - 13,3	44	86,7 - 100	93	0	0
D	6,7 - 20,0	11	0,0 - 6,7	5	86,7 - 93,3	89	6,7 - 13,3	11

**3.5.1 Porcentajes de oxidación par cada uno de los ensayos:** Todos los ensayos presentaron oxidación. Siendo el ensayo A el que obtuvo los valores más altos, llegando en rango hasta un 80% con los tratamientos ANA 0,5/KIN 0,1 mg/L y ANA 0,5/KIN 0,5 mg/L, sin embargo el tratamiento con AIB 2 mg/L (Ensayo C) fue el único tratamiento que no presentó oxidación pero no se encontró ninguna relación hormonal para esta respuesta en este experimento.

Esta reacción de oxidación ocurre generalmente en los vegetales leñosos, como producto de su metabolismo secundario normal, ya que son capaces de sintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones biológicas y otros son de utilidad para defenderse de situaciones de

estrés. El fenómeno de ennegrecimiento ocurre por acción de enzimas tipo polifenoloxidasas y tirosinasas que se liberan y sintetizan cuando los tejidos sufren heridas, Estas actúan sobre los polifenoles y tirosinas, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas (HERNÁNDEZ y GONZÁLEZ, 2010). El desarrollo de este problema se encuentra estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones de pro-oxidación y los mecanismos antioxidantes para detoxificar, generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Novoa *et al*, 2001 citado por TURRENS, 2003) lo que nos indicaría que es una desventaja común al utilizar plántulas leñosas en cultivo de tejidos. HERNÁNDEZ y GONZÁLEZ (2009) también señalan que para disminuir el oscurecimiento de los explantes, es recomendable la inmersión en agua estéril y uso de antioxidantes, algunas horas antes de la siembra *in vitro* y la modificación de las condiciones ambientales al iniciar los cultivos, como oscuridad o bajas temperaturas (HERNÁNDEZ y GONZÁLEZ, 2010).

**3.5.2 Porcentajes de hiperplasia para cada uno de los ensayos:** Todos los ensayos presentaron hiperplasia, en donde AIB, 0,1 mg/L, presentó el mayor porcentaje, 33%, lo que corresponde a 5 plántulas. Sin embargo no todos los tratamientos. La presencia de virus puede inducir a una multiplicación incontrolado de células en plantas, dando origen a hiperplasia (KANT and PATNI, 2009). Pero este estudio no se debe a presencia de virus, ya que con la replicación intensiva debería haberse propagado el virus en una gran cantidad de plántulas, cosa que no sucedió. GONZÁLEZ (s.f), señala que el crecimiento desordenado, a veces isodiamétrico que se produce en la zona afectada debido a que sus células han aumentado en número , se explica por la alteración de niveles endógenos de auxinas, lo que provoca la división celular en las mismas, esto daría una posible explicación a la hiperplasia. Tampoco se observó, en este estudio, una relación entre las concentraciones hormonales e hiperplasia.

**3.5.3 Porcentajes de callos para cada uno de los ensayos:** Todos los ensayos presentaron promedios cercanos al 100%, de callos presentes en la zona basal de los explantes. BADILLO *et al* (2009) explican que los callos de las plantas son masas celulares indiferenciadas, no organizadas de rápido crecimiento que pueden ser producidas en todas las especies de plantas en respuesta a un suplemento de hormonas endógenas o externas. Según SEGRETÍN (s.f), la explicación hormonal a la

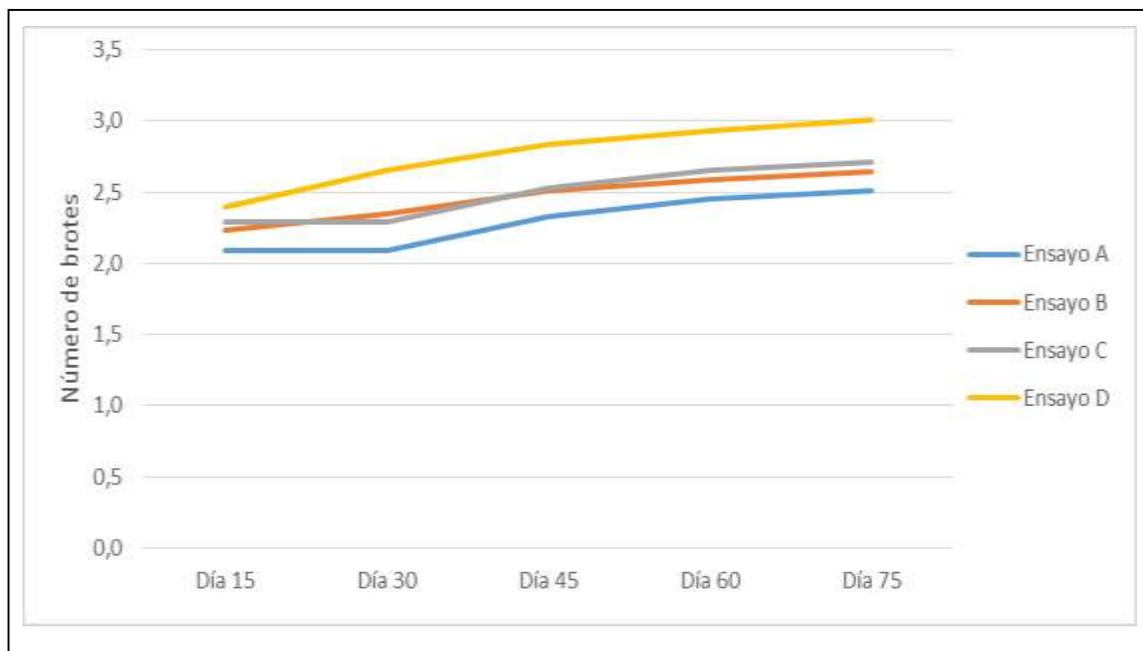
formación de callos tiene que ver con la relación citoquinina/auxina, que si es cercana a 1 se vería favorecida la producción de callos, lo que se ve contradicho con este estudio ya que no se observó ninguna relación entre las concentraciones hormonales y la formación de callos. RODRÍGUEZ (2001) añade que en condiciones naturales este tejido también puede aparecer como mecanismo de cicatrización cuando se presentan heridas lo cual también puede ser una respuesta de la plántula al corte basal realizado en el momento de replicación.

LALLANA y LALLANA (2003) señalan que esto corresponde a una masa amorfa surgida de la proliferación de células parenquimáticas, frecuentemente son el resultado de una herida, por lo anterior tienen patrones predecibles de organización, por lo que pueden estar presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales rudimentarias con zonas de diferenciación vascular. La presencia de la masa amorfa es surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, un callo se forma en el corte de un tallo o raíz (VELÁZQUEZ, 1997). Esto podría dar una explicación a la aparición o no aparición de callos aéreos.

OBERCHELT Y MARCÓ (2010) realizaron un estudio con *Prosopis alba* en el cual utilizaron distintas concentraciones de AIB en estacas de brotes herbáceos y semileñosos con el objetivo de inducir enraizamiento en donde las estacas semileñosas no presentaron respuestas significativas. La lignificación de los callos en las plántulas de *S. toromiro* pudo tener algún efecto en la respuesta de enraizamiento, lo que no se puede confirmar con este estudio.

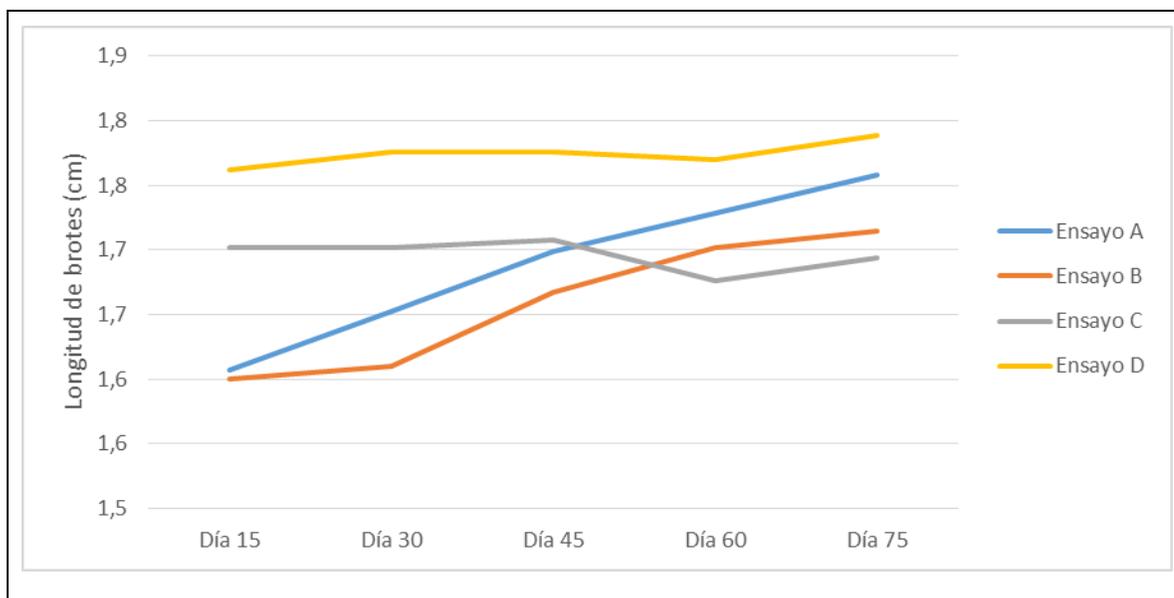
### 3.6 Evolución en el tiempo

En las Figura 3 y 4, y en el Cuadro 6 se muestra la evolución en el tiempo del número de brotes, longitud de brotes, número de raíces y longitud de raíces.



**Figura 3. Número de brotes a través de cada evaluación, desde el día 15 al 75.**

**3.6.1 Número de brotes desde el día 15 al 75.** En la Figura 3 se observa que a través del tiempo hubo un leve aumento en el número de brotes, pero fue menor a un brote por explante. Esto es debido a que las concentraciones utilizadas tuvieron el objetivo de enraizar y no de producir mayor número de brotes.



**Figura 4. Longitud de brotes (cm) a través de cada evaluación, desde el día 15 al 75.**

**3.6.2 Longitud de brotes (cm), desde el día 15 al 75.** Como se aprecia en la Figura 4, hubo un aumento en la longitud de brotes de aproximadamente 2 mm en el ensayo A y de 1 mm en el ensayo B a diferencia de los ensayos C y D que se mantuvieron relativamente constantes en el tiempo, lo que implica que no hubo crecimiento adicional observable. Esto indica que las hormonas en las concentraciones utilizadas no responden adecuadamente al ser utilizadas con el objetivo de aumentar la longitud de brotes en *S. toromiro*.

**Cuadro 6. Evolución en el tiempo del número de raíces totales por ensayo, número de raíces por plántula y longitud de raíces por plántula (mm) por cada uno de los ensayos.**

	N. raíces totales				
Ensayo	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
Ensayo A	0	0	10	10	14
Ensayo B	0	15	15	19	30
Ensayo C	0	0	1	1	5
Ensayo D	1	2	4	5	5
	N. Raíces por plántula				
Ensayo	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
Ensayo A	0,00	0,00	0,07	0,07	0,1
Ensayo B	0,00	0,11	0,11	0,14	0,22
Ensayo C	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04
Ensayo D	0,01	0,01	0,03	0,04	0,04
	Long. Raíces por plántula (mm)				
Ensayo	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60	Día 75
Ensayo A	0,0	0,0	0,1	0,2	0,3
Ensayo B	0,0	0,3	0,3	0,3	0,4
Ensayo C	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
Ensayo D	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2

**3.6.3 Número de raíces y longitud de raíces en cada evaluación.** En el Cuadro 6 se observan el número de raíces totales, número y longitud de raíces por plántula en cada uno de los ensayos y en cada evaluación desde el día 15 al día 75. Se observa que el aumento del número de raíces por plántula es casi nulo debido a las pocas plántulas enraizadas en relación al número de plántulas por ensayo, sin embargo, el ensayo B fue el que mayor número de raíces obtuvo en el tiempo, seguido por los ensayos D, A, C y D. El ensayo B fue el que presentó un mayor crecimiento de raíces a través del tiempo llegando hasta los 0,4 mm de raíces seguidos por el ensayo A que llegó a 0,3 mm de raíces por plántula. El ensayo D presentó raíces desde la primera evaluación (día 15) con 0,1 mm de raíces por plántula alcanzando 0,2 mm en la última evaluación. El ensayo C se mantuvo relativamente constante a través del tiempo, pero en la última evaluación alcanzó un promedio de 0,1 mm de raíces por plántula.

## 4 CONCLUSIONES

En base a estos resultados se puede concluir que se rechaza la hipótesis de que *Sophora toromiro* responde adecuadamente al proceso de rizogénesis *in vitro* bajo las concentraciones evaluadas, debido a que las raíces no aparecieron en un número significativo de plántulas y la longitud de estas raíces alcanzaron promedios insignificantes.

Ninguna de las concentraciones hormonales de los ensayos evaluados tiene una respuesta significativa frente a respuestas como número y longitud de brotes y raíces, oxidación, hiperplasia y presencia de callos. Sin embargo, existieron ciertas concentraciones que obtuvieron mejores resultados que otras. Esto no se puede explicar en este estudio, debido a que las diferencias no fueron significativas y algún otro factor que se escapa a esta investigación puede haber afectado, induciendo a esta respuesta fisiológica.

La formación de callos en la mayoría de los tratamientos fue cercana a 1 y posiblemente la lignificación de estos pudo haber afectado en el proceso de enraizamiento, lo que es necesario realizar otro estudio para poder determinarlo.

La formación de callos aéreos, se explica como una respuesta a posibles heridas producidas por manipulación.

Una alteración de niveles endógenos de auxinas podría ser la respuesta a la presencia de hiperplasia en las plántulas estudiadas, pero no se puede determinar en este estudio.

Todos los tratamientos presentaron oxidación lo que es propio en plantas leñosas.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BACCHETTA, G., BALLESTEROS, D., BELLETTI, P., BRULLO, S., BUENO, A., CAGELLI, L., CANO, M., CARASSO, V., CARRIÓ, E., CASAS, J., CAUJAPÉ, J., CERVELLI, C., DRAPER, D., ESCRIBÁ, M., FENU, G., GOMEZ, C., GORIAN, F., GRILLO, O., GÜEMES, J., JIMENEZ, B., MARQUES, I., MATTANA, E., MULE, P., NEPI, M., PACINI, E., PAVONE, P., PIOTTO, BETI., PONTECORVO, C., PRADA, A., SERRANO, F., VENORA, G., VIETTO, L., VIREVAIRE, M. 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias, España. 33 p.
- BADILLO, J., OLIVER, M., MORENO, K., PACHECO, V. y CORTES, H. 2009. Manual de laboratorio de cultivo de tejidos. Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal. México. 27 p.
- BENOIT, I., (Ed.) 1985. Chile. Libro rojo de la flora terrestre de Chile. CONAF. Santiago de Chile. 157 p.
- CALDERON, X.; PEREZ, F. y ROTELLA, A. 1993. Micropropagación de una especie chilena en peligro de extinción: *Gomortega keule* (Mol.) Baillon (*Magnoliopsidae*, *Gomortegaceae*). Bosque 14(1)23-28.
- CARRILLO, L. 2002. Perspectiva Ecología Cactácea mexicana en peligro de extinción. Gaceta Universitaria 278(1)9p.
- CASTILLO, A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología. INIA Las Brujas. Uruguay. 8p.
- COMISION NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE (CONAMA). 2007. Biodiversidad y especies con problemas. Flora con problemas de conservación. CONAMA, Santiago, Chile. 3p.
- COMISION NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE (CONAMA). 2009. Especies amenazadas de Chile protejámoslas y evitemos su extinción. (Chile) Pp 98-99.

CORPORACION NACIONAL FORESTAL (CONAF). S.F. Árboles, recursos naturales y comunidades indígenas en Chile. (Chile) Pp 39-41.

GONZALEZ, S. s.f. Biotecnología vegetal. Métodos de propagación "in vitro" en plantas. (On line). Universidad Nacional del Nordeste. <[http://www.google.cl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fexa.unne.edu.ar%2Fbiologia%2Ffisiologia.vegetal%2Fbiotecnologia%2520vegetal.pdf&ei=aXdpUs6QH4TA9gSIsIH4BA&usg=AFQjCNHx41zGQqh\\_8PxfYBwhwZq5Rqhr8g&bvm=bv.55123115,d.eW0](http://www.google.cl/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&cad=rja&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Fexa.unne.edu.ar%2Fbiologia%2Ffisiologia.vegetal%2Fbiotecnologia%2520vegetal.pdf&ei=aXdpUs6QH4TA9gSIsIH4BA&usg=AFQjCNHx41zGQqh_8PxfYBwhwZq5Rqhr8g&bvm=bv.55123115,d.eW0)>. (17 Octubre 2013).

HECHENLEITNER, P., GARDNER, M., THOMAS, P., ECHEVERRÍA, C., ESCOBAR, B., BROWNLESS, P. y MARTÍNEZ, C. 2005. Chile. Plantas amenazadas del centro sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edimburgo. Valdivia, Chile. 187 p.

HERNANDEZ, Y. y GONZÁLEZ. M. 2010. Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales 31 (4)58 – 69.

IRIONDO, J. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. Investigación Agraria. Producción y Protección Vegetal. (España) 16 (1)5-24.

ITURRIAGA, L., JORDAN, M., ROVERANO, C. and GOREUX, A. 1994. *In vitro* culture of *Sophora toromiro* (Papilionaceae), an endangered species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37 (2)201-204.

JORDAN, M., LARRAIN, M., TAPIA, A. and ROVERANO, C. 2001. *In vitro* regeneration of *Sophora toromiro* from seedling explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 66 (2)89-95.

KANT, U., and PATNI, V. 2009. *In vivo* and *in vitro* studies on plant tumors. Plant Tissue Culture and Molecular Markers. Their Role in Improving Crop Productivity. New Delhi, India. Pp 67-72.

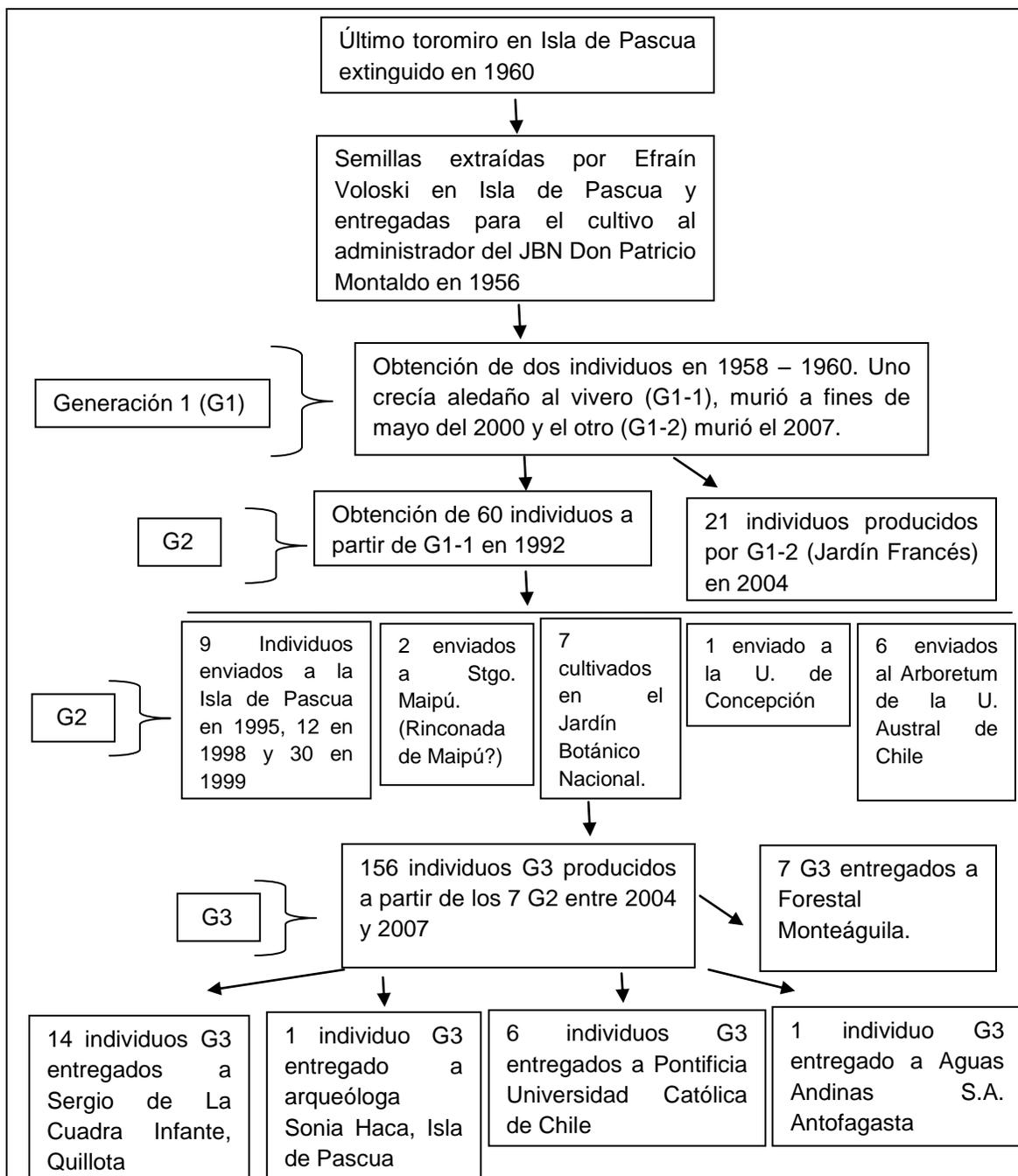
- KUN-HUA, W., LIN, S. and HE-PING, H. 2010. Tissue culture and generation of autotetraploid plants of *Sophora flavescens* Aiton. *Pharmacognosy Magazine* 6 (24)268-292.
- LALLANA, V. y LALLANA, M. 2003. Manual de prácticas de fisiología vegetal. Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER). Entre Ríos, (Argentina). 81 – 84.
- LLOYD, G. and MCCOWN, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, (30)421-427.
- MAUNDER, M. 1997. Conservation of the extinct toromiro tree. *Curtis's Botanical Magazine* (14)226-231.
- MURASHIGE, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3)473-497.
- MOHAMED, N. and MAT TAHA, R. (2011). Plant Regeneration of *Clitoria ternatea* from Leaf Explants Cultured *in vitro*. *Journal of Food. Agriculture & Environment* 9(3&4)268-270.
- OBERSCHELP, G., MARCÓ, M. A. 2010. Efecto del ácido 3-indolbutírico sobre el enraizamiento adventicio y altura de plantines clonales de *Prosopis alba* Grisebach. *Quebracho (Argentina)* 18 (1,2)112 – 119.
- OLMOS, S., LUCIANI, G. y GALDEANO, E. S.F. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. IV capítulo 1. Micropropagación. 2 ed. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). (Argentina). 353 – 361.
- PARQUE JARDÍN BOTÁNICO NACIONAL. 2012. Toromiro. Historia. (On line). <<http://fjbn.blogspot.com/2012/03/toromiro-historia.html>>. (1 de Junio de 2013).
- PONCE, M. T., GUIÑAZÚ, M., CIRRINCIONE, M., VIDELA, M. E. y ARANCIBIA, C. 2011. Micropropagación de la enredadera nativa *Mutisia subspinoso* Cav. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* 42 (2)235 – 243.

- QUINTERO, I., POLO, J., JARMA, A., y ESPITIA, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscoreas sp.* Revista Colombiana de Biotecnología (Colombia) 2 (2)51-56.
- RICCI, M., EATON, L. 1997. Do all existing *Sophora toromiro* descend from one individual ? Biodiversity and Conservation 12 (6)1697-1702.
- RODRIGUEZ, P. 2001. Cultivo de Tejidos. Lección 5.1.1 Calogénesis. UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA (UNAD) (On line). <[http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/Contenido\\_para\\_descarga\\_PDF\\_.pdf](http://datateca.unad.edu.co/contenidos/203024/Contenido_para_descarga_PDF_.pdf)>. (5 de Noviembre 2013).
- ROJAS, F. y ABDELNOUR, A. 2012. Brotación *in vitro* de yemas de teca (*Tectona grandis* L.f.). Tecnología en Marcha (Costa Rica) 25 (5)67 – 72.
- SEGRETIN, M. S.F. Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). ArgenBio Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. (On line). <<http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>>. (15 de Enero 2014).
- SEEMANN, P. 1993. Utilización de técnicas de micropropagación. In: Barriga, P. y Neira, M. (eds.). Avances en Producción y Sanidad Vegetal. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Valdivia, Chile. pp: 87-145
- SEEMANN, P. 2011. Apuntes de clases de micropropagación. PSVE 121 Propagación de plantas. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Presentación ppt. Universidad Austral de Chile. Valdivia. s.p.
- SKOTTSBERG, C. 1920. The Natural History of Juan Fernandez and Easter Island. Part 1. Vol. 2. Botany. Upsala, Sweden. 73 p.
- SKOTTSBERG, C. 1922. The Natural History of Juan Fernandez and Easter Island. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB. Uppsala, Sweden, Vol. 2. pp 95-240.

- TORRES, A. 2002. Cultivo *in vitro* de ruda (*Ruta graveolens* L.), toronjil (*Melissa officinalis* L.) y cedrón (*Aloysia tryphilla* (L'Hér.) Britton). Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 79 p.
- TOROMIRO MANAGEMENT GROUP (TMG). s.f. Toromiro management group. (On line). <[http://www.kew.org/conservation/cpdu/Toromiro/toro\\_t1.html](http://www.kew.org/conservation/cpdu/Toromiro/toro_t1.html)>. (5 de Diciembre 2012).
- TURRENS, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552 (2)335 – 344.
- UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, s.f. Micropropagación. (On line). <[https://www5.uva.es/guia\\_docente/uploads/2012/427/52016/1/Documento11.pdf](https://www5.uva.es/guia_docente/uploads/2012/427/52016/1/Documento11.pdf)> . (16 de Enero 2014).
- VASQUEZ, S. 2012. Optimización de organogénesis *in vitro* de *Sophora toromiro*. Scottsb. Informe. Universidad Austral de Chile (UACH). Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Valdivia. Chile. 7 p.
- VELAZQUEZ, J.A. 1997. La micropropagación y la mejora de especies frutales. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza. España. 35 pp.
- WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE (WCMC). 1998. *Sophora toromiro*. (On line). <<http://www.iucnredlist.org/details/30392/0>>. (9 de Junio del 2013).

## 6 ANEXOS

**ANEXO 1** Se muestra la trazabilidad de las generaciones de *Sophora toromiro* (Phil.) Skotts. cultivadas en el Jardín Botánico Nacional, hasta el año 2009.



**Fuente:** Jardín Botánico Nacional. (2012).

**ANEXO 2 Comparación de las características de una planta en condiciones de laboratorio (*in vitro*) respecto a una planta en condiciones naturales (*in vivo*).**

<b><i>In vitro</i></b>	<b><i>In vivo</i></b>
No realiza fotosíntesis	Realiza fotosíntesis
Crecimiento en condiciones controladas	Crecimiento en condiciones no controladas
Crecimiento en condiciones de asepsia	Exposición a los patógenos y gérmenes del ambiente
Alta humedad relativa	Humedad relativa variable
Estomas no funcionales	Estomas funcionales
Ausencia de pelos radiculares	Presencia de pelos radiculares
Ausencia de cera en la cutícula	Presencia de cera en la cutícula

**Fuente:** Adaptado de Castillo A. (S.F)

**ANEXO 3 Plántulas de *S. toromiro* propagadas *in vitro*.**



**ANEXO 4 Presencia de oxidación en el medio de cultivo.**

**ANEXO 5 Presencia de hiperplasia en las plántulas.**

**ANEXO 6 Presencia de formación de callos en la zona radicular de las plántulas.**



**ANEXO 7 Presencia de callos aéreos en las plántulas.**