

## Enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de *Ugni molinae* Turcz., una especie nativa de Chile

### *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Ugni molinae* Turcz. microshoots, a native species to Chile

MARIO RODRÍGUEZ BERAUD<sup>1\*</sup>, RUBÉN CARRILLO LÓPEZ<sup>2</sup>, MANUEL CHACÓN FUENTES<sup>1</sup>, NELSON HORMAZÁBAL VÁSQUEZ<sup>1</sup>, JOCELYNE TAMPE PÉREZ<sup>1</sup> & RICARDO TIGHE NEIRA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Agronomía, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco, Chile.

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Agronómicas y Recursos Naturales, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

\*marodrig@uct.cl

#### RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de microtallos de dos clones de *Ugni molinae*, se establecieron dos ensayos. En el experimento de enraizamiento *in vitro* se contrastaron nueve tratamientos producto de la combinación de tres concentraciones de medio Murashige y Skoog (MS) (1, ½ y ¼ de los macronutrientes diluidos) y tres de ácido 3-indolbutírico (AIB) (0, 1 y 2 µM). En tanto, para el ensayo de enraizamiento *ex vitro* se contrastaron cuatro tratamientos correspondientes a las concentraciones de 0; 4,9; 9,8 y 19,7 mM de AIB. Después de 30 días se evaluó la supervivencia, enraizamiento, longitud de raíz y número de raíces por explante. El tratamiento que logró el mayor enraizamiento difirió entre ambos clones. En condiciones *in vitro* el Clon 1 obtuvo un promedio de enraizamiento de 97% con ½ MS + 1 µM de AIB, mientras que el Clon 2 obtuvo un 93% con ¼ de MS + 2 µM de AIB. Nuestros resultados indican que la disminución de sales en el medio de cultivo MS y la adición de AIB favorece el enraizamiento. Con respecto a las condiciones *ex vitro*, el Clon 1 no respondió a las aplicaciones de AIB, en cambio en el Clon 2, el AIB promovió el enraizamiento a la concentración de 19,7 mM, alcanzando porcentajes de 90 y 85%, respectivamente. En virtud de los resultados obtenidos, se sugiere un enraizamiento *ex vitro* para los clones 1 y 2, para evitar los costos asociados al enraizamiento *in vitro*, ya que independiente del sistema utilizado, ambos clones obtuvieron enraizamientos iguales o superiores a un 85% en el mejor de sus tratamientos.

**PALABRAS CLAVE:** Ácido 3-indolbutírico, micropropagación, Myrtaceae, rizogénesis, auxina.

#### ABSTRACT

Two trials were established to evaluate the *in vitro* and *ex vitro* rooting of selected microshoots of two selected clones of *Ugni molinae*. In the *in vitro* experiment, nine treatments were compared, combination of three concentrations of Murashige and Skoog medium (MS) (1, ½ and ¼ strength macronutrients) and three concentration of indole 3-butyric acid (IBA, at 0, 1 and 2 µM). In the *ex vitro* assay we established for IBA four concentrations (0; 4.9; 9.8 and 19.7 mM). After 30 days total survival, rooting percentage, root length and number of roots per explants were evaluated. Both clones responded differently to the treatments used. Under *in vitro* conditions, Clone 1 had an average of 97% rooting at ½ MS + 1 µM IBA, whereas Clone 2 obtained a 93% of rooting with ¼ MS + 2 µM IBA. Our results indicate that the decrease in the strength of MS medium and the addition of IBA promotes rooting. With regard to *ex vitro* conditions, the Clone 1 did not respond to IBA applications, while in Clone 2, IBA promoted the rooting at the concentration of 19.7 mM, with percentages of 90 and 85%, respectively. Considering these results, it is generally recommended to use the *ex vitro* rooting system because both clones were able to obtain the same high percentage rooting (above 85%) in this system. *Ex vitro* propagation will also safe costs.

**KEYWORDS:** Indole 3-butyric acid, micropropagation, Myrtaceae, rhizogenesis, auxin.

## INTRODUCCIÓN

*Ugni molinae* Turcz. (Myrtaceae) es un arbusto de hoja persistente, conocido como murta o murtila, nativo de Chile, de ramas erectas comprimidas y vellosas cuando son nuevas. Esta especie se distribuye entre las regiones del Maule y

Aysén, particularmente en la Cordillera de la Costa y parte de la precordillera Andina en bordes de camino y claros del bosque (Andrade *et al.* 2009, Riedemann & Aldunate 2009). Su fruto corresponde a una baya globosa, aromática, de sabor agradable, que dependiendo de los ecotipos presentan distintas coloraciones entre el rojo oscuro y el blanco, incluyendo el

amarillo y púrpura (Rodríguez 2000, Riedemann & Aldunate 2009). A la murtila se le atribuyen numerosas características medicinales como efectos analgésicos, anti-inflamatorios, astringentes, actividad antimicrobiana y antioxidante (Avello & Pastene 2005, Rubilar *et al.* 2006, Suwalsky *et al.* 2006, Delporte *et al.* 2007, Suwalsky *et al.* 2007, Avello *et al.* 2009), propiedades que han impulsado la incorporación de la murtila a un sistema de cultivo comercial, a través de un proceso de selección y determinación de condiciones que optimicen la producción de su materia prima, tales como métodos de propagación y selección de ecotipos (Rodríguez 2000).

La formación de raíces adventicias se divide en cuatro etapas: inducción, iniciación, formación de primordios de raíces y elongación. Es un proceso inducido y regulado por factores externos como temperatura, luz y composición del medio de cultivo e internos como producción endógena de fitohormonas, carbohidratos y compuestos fenólicos (Pop *et al.* 2011).

En la micropropagación de plantas, la fase de aclimatación puede ser crítica, donde el enraizamiento de los microtallos juega un rol fundamental. El enraizamiento *in vitro* es seguido por la aclimatación de plantas en invernadero, y se realiza en plantas de difícil enraizamiento *ex vitro* (Sathyanarayana & Barghese 2007). Los microtallos también pueden ser enraizados *ex vitro* de forma simultánea con la aclimatación en condiciones no asépticas y en sustratos generalmente en base a turba con perlita o arena (Smith 2012). La etapa crítica ocurre entre el trasplante del microtallo y el inicio de emisión de raíces, ya que existe un desbalance hídrico entre la transpiración y absorción de agua. Para acelerar este proceso se recurre a la adición de auxinas, entre éstas el ácido indol 3-butírico (AIB) (Rai *et al.* 2009), ácido indol 3-acético (AIA) (Jain & Babbar 2000) y ácido naftalenacético (ANA) (Shah *et al.* 2008).

Otro aspecto importante son los reguladores de crecimiento utilizados en la etapa anterior (multiplicación de los microtallos); las citoquininas y giberelinas utilizadas ampliamente en el desarrollo de brotes axilares, se han descrito también como inhibidores del enraizamiento (Pop *et al.* 2011, Saini *et al.* 2013). Por otra parte, niveles altos de bencilaminopurina (BAP) se manifiestan a menudo en brotes hiperhídricos con problemas en la fase de aclimatación (Rodríguez 2011).

Para el enraizamiento *in vitro* de Mirtáceas se ha utilizado el medio MS con AIB en *Eucalyptus globulus* Labill. (Bennet *et al.* 1994), híbridos de *Leptospermum* (Seelye *et al.* 2001), *Syzygium francisci* (F.M. Bailey) L.A.S. Johnson (Shatnawi *et al.* 2004), *Metrosideros excelsa* Gaertn. (Iapichino & Airo 2008), y *Psidium guajava* L. (Rai *et al.* 2009), entre otras especies. Otra estrategia de enraizamiento es la disminución de la concentración de sales del medio diluyéndolas, por ejemplo a la mitad, tal es el caso del medio MS en la micropropagación de *S. alternifolium* (Sha Valli Khan *et al.* 1999), *E. tereticornis* (Sharma & Ramamurth 2000), *P. guajava* (Singh *et al.* 2002), o la utilización de medios de cultivos con menor concentración

de sales que el MS como el Woody Plant Medium (WPM) en *Feijoa sellowiana* Berg (Oltamari *et al.* 2000), *P. guajava* (Meghwal *et al.* 2010),  $\frac{1}{2}$  WPM en *P. salutare* (Sotolongo *et al.* 2003), medio de De Fossard (FS) en *E. globulus* (Trindade & Pais 1997), *E. nitens* (Gomes & Canhoto 2003), medio de Gamborg (B5) en *E. urophylla* y *E. grandis* (Martínez *et al.* 2005), o medio de Knop en *S. cuminii* (Jain & Babbar 2000). En otras ocasiones ha resultado una combinación de auxinas tales como AIB y ANA o AIB y AIA ha resultado beneficioso sobre el enraizamiento de microtallos de *P. guajava* (Fuenmayor & Montero 1997, Zamir *et al.* 2007). De acuerdo a lo anteriormente expuesto, la hipótesis de trabajo es que la adición de AIB aplicado para el enraizamiento *ex vitro* y una combinación de AIB con un medio MS diluido en el enraizamiento *in vitro* promueve la rizogénesis de microtallos de murtila. Para dar cumplimiento a esta hipótesis se plantea como objetivo determinar la mejor combinación entre las concentraciones del medio MS y AIB, que permitan los mayores enraizamientos *in vitro* como también evaluar la respuesta rizogénica *ex vitro* con diferentes concentraciones de AIB para cada uno de los clones seleccionados.

## MATERIALES Y METODOS

### MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron dos clones de murtila, Clon 1 y Clon 2 pertenecientes a una selección de ecotipos. El Clon 1 de bayas rojas procede de la zona costera en la Comuna de Teodoro Schmidt (latitud 38°45' S, longitud 73°00' O), Región de La Araucanía, y el Clon 2 de bayas amarillas proviene de la localidad costera de Niebla (latitud 39°51' S, longitud 73°24' O), comuna de Valdivia, Región de Los Ríos. Los microtallos fueron obtenidos a partir de cinco ciclos de subcultivos de segmentos uninodales en un medio de multiplicación Murashige & Skoog (1962) (MS) con un pH ajustado a 5,8, suplementado con 1  $\mu$ M BA, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 7 g L<sup>-1</sup> de agar microbiológico (Merck®). Para el enraizamiento se cortaron brotes apicales de aproximadamente 15 mm sin callo basal.

### CONDICIONES DE CULTIVO

Los microtallos de ambos ensayos permanecieron por 30 días en una cámara de incubación a 25 ± 2°C, con luz fluorescente blanca, 50  $\mu$ mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, y un fotoperiodo de 16 h luz. En el ensayo *ex vitro* se realizaron dos riegos con 65 mL de agua destilada estéril por caja, al comienzo y a los 15 días de la siembra.

### ENSAYO 1. ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

Se realizaron nueve tratamientos producto de la combinación de tres concentraciones de MS (1,  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{1}{4}$  de los macronutrientes diluidos) y tres concentraciones de AIB (0, 1 y 2  $\mu$ M), suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y gelificado con 7 g L<sup>-1</sup> de agar microbiológico. El pH fue ajustado a 5,8 con

hidróxido de potasio 1,0 N (KOH) y de ácido clorhídrico 1,0 N (HCl). Cada microtallo fue incubado en un frasco de 40 mL con 8 mL de medio de cultivo cada uno.

#### ENSAYO 2. ENRAIZAMIENTO *EX VITRO*

Se realizaron cuatro tratamientos correspondientes a las concentraciones de 0; 4,9; 9,8 y 19,7 mM de AIB. Los microtallos fueron tratados en su base con una solución hidro-alcohólica 50%, pH 4,7 de AIB por 10 segundos. Se utilizó un sustrato de turba+perlita 2:1 v/v contenido en cajas plásticas transparentes (18 x 5,5 cm), a razón de 430 mL por caja con 20 microtallos cada uno.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar para todos los tratamientos. La unidad experimental correspondió a 20 microtallos con tres repeticiones por tratamiento. Los porcentajes fueron transformados al arco seno de la raíz cuadrada del porcentaje dividido por 100. Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15. Se aplicó la prueba de normalidad (Shapiro-Wilk) y se analizó la homogeneidad de varianzas (estadístico de Levene). Se utilizó el análisis de varianza ANDEVA y para las diferencias significativas entre promedios la prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). Los resultados se expresan como promedios  $\pm$  error estándar de tres repeticiones por tratamiento.

## RESULTADOS

#### ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*

La interacción entre el medio MS y AIB fue significativa para todas las variables estudiadas en ambos clones (Tabla I). La supervivencia de los microtallos fue de 100% para todos los tratamientos en ambos clones. En general, los promedios de enraizamiento fueron más elevados en el Clon 1. Después de 30 días de enraizamiento, el Clon 1 alcanzó un promedio máximo de 97% de enraizamiento con  $\frac{1}{2}$  MS y 1  $\mu$ M de AIB, en cambio el Clon 2 un 93% con  $\frac{1}{4}$  MS y 2  $\mu$ M de AIB; estas combinaciones fueron significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a los tratamientos con MS completo en cualquier combinación con AIB para ambos clones. Los valores más bajos, 73 y 67%, se encontraron en los tratamientos de 1 MS sin AIB para el Clon 1 y 2, respectivamente. Por otra parte, mayores concentraciones de AIB aumentaron el número de raíces, encontrándose en los tratamientos de  $\frac{1}{2}$  MS con 1 y 2  $\mu$ M de AIB los valores significativamente más altos en ambos clones. El valor promedio de longitud de las raíces osciló entre 18,9 y 12,4 mm para el Clon 1 y 16,9 y 12,3 mm para el Clon 2, observándose los valores menores en los tratamientos con 1 MS en presencia de AIB.

#### ENRAIZAMIENTO *EX VITRO*

La supervivencia y enraizamiento de los microtallos fue mayor en el Clon 1 que en el Clon 2, 88 y 83% vs. 79 y 75%

respectivamente. No obstante, en el Clon 1 no se observaron respuestas significativas ( $p \leq 0,05$ ) por la presencia de AIB como lo hizo respecto a esta variable el Clon 2 (Tabla II). La concentración de 19,7 mM de AIB permitió el mayor porcentaje de enraizamiento y número de raíces para ambos clones, lo cual se relacionó con una alta supervivencia. Por otra parte, la menor supervivencia de los microtallos del Clon 2 (68%) es reflejo de su bajo nivel de enraizamiento. La mayor longitud de raíces en el Clon 1 se observó con el tratamiento sin AIB, los tallos enraizados de este tratamiento se caracterizaron por poseer pocas raíces y largas. En el Clon 2 no hubo una respuesta significativa respecto a esta variable.

Tanto en el enraizamiento *in vitro* como *ex vitro* se formó un callo basal a partir del cual se inició la emisión de raíces. En general, los microtallos enraizados *ex vitro* mostraron un menor número de raíces principales pero un mayor desarrollo de raíces laterales, los microtallos enraizados *in vitro* lucían raíces más traslúcidas, con pelos radicales, brotes más desarrollados y una mayor cantidad de hojas.

## DISCUSIÓN

El Clon 1 mostró un mayor enraizamiento ya sea en condiciones *in vitro* como *ex vitro*, no obstante e independiente de la técnica aplicada y del clon, los mejores tratamientos obtuvieron valores de enraizamiento superiores al 85%, lo cual es considerado muy bueno para una especie que se quiera propagar. En virtud de estos resultados se sugiere para esta especie hacer el enraizamiento *ex vitro* debido a que el enraizamiento *in vitro* requiere de mayores costos y tiempo de aclimatación (Sathyanarayana & Barghese 2007). En general, dependiendo de la especie, los costos del enraizamiento *in vitro* se estiman entre un 35 a 50% del total de los costos de la micropropagación (Leva 2011) e incluso más. Al respecto, Ranaweera *et al.* (2013), en *Camellia sinensis* calcularon un 71% de reducción del costo de la planta micropropagada al utilizar el enraizamiento *ex vitro* vs. el *in vitro*. Si bien la ventaja inicial de obtener plantas más desarrolladas al final del enraizamiento *in vitro* es evidente, posteriormente durante la aclimatación éstas presentan un mayor estrés, por lo que detienen temporalmente su crecimiento, anulando su ventaja inicial respecto a las enraizadas *ex vitro*. Además, las raíces formadas *in vitro* usualmente tienen poca conexión vascular con el brote y la captación de agua es baja, por lo tanto las raíces formadas *in vitro* no son comparables desde el punto de vista funcional a aquéllas generadas *ex vitro* (Trindade & País 1997, Nourissier & Monteuis 2008).

El tratamiento óptimo para el enraizamiento difiere entre ambos clones. En condiciones *in vitro* el Clon 1 obtiene el promedio máximo de enraizamiento con  $\frac{1}{2}$  MS + 1  $\mu$ M de AIB, el Clon 2 lo hace con  $\frac{1}{4}$  de MS + 2  $\mu$ M de AIB, por otra parte, bajo condiciones *ex vitro* el Clon 1 no responde a las

TABLA I. Efecto de diferentes concentraciones de ácido 3-indol butírico (AIB) y dilución de macrosales (MS) sobre la rizogénesis de microtallos de dos clones de *Ugni molinae* bajo condiciones *in vitro*.TABLE I. Effect of different concentrations of indole 3-butyric acid (IBA) and dilution of macro salts (MS) on rhizogenesis of microshoots of two *Ugni molinae* clones, under *in vitro* conditions.

MS	AIB ( $\mu$ M)	ENRAIZAMIENTO (%)		NÚMERO DE RAÍCES/BROTE		LARGO DE RAÍCES (mm)	
		CLON 1	CLON 2	CLON 1	CLON 2	CLON 1	CLON 2
1	0	73 $\pm$ 6,01 <sup>b</sup>	67 $\pm$ 3,33 <sup>d</sup>	2,8 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	2,6 $\pm$ 0,08 <sup>e</sup>	18,9 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	15,5 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
1	1	80 $\pm$ 2,89 <sup>b</sup>	73 $\pm$ 4,41 <sup>bcd</sup>	2,8 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	3,0 $\pm$ 0,10 <sup>de</sup>	12,4 $\pm$ 0,92 <sup>b</sup>	12,3 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
1	2	75 $\pm$ 2,89 <sup>b</sup>	75 $\pm$ 5,77 <sup>bcd</sup>	3,2 $\pm$ 0,15 <sup>bc</sup>	3,3 $\pm$ 0,07 <sup>cd</sup>	10,8 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	11,4 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>
1/2	0	72 $\pm$ 7,26 <sup>b</sup>	72 $\pm$ 4,41 <sup>cd</sup>	3,6 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	3,7 $\pm$ 0,22 <sup>abc</sup>	18,5 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	16,5 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>
1/2	1	97 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	88 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup>	4,4 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	4,3 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	17,2 $\pm$ 0,51 <sup>a</sup>	16,5 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
1/2	2	95 $\pm$ 5,00 <sup>a</sup>	87 $\pm$ 6,01 <sup>abc</sup>	4,5 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	4,2 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	17,9 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>
1/4	0	82 $\pm$ 1,67 <sup>b</sup>	83 $\pm$ 7,26 <sup>abc</sup>	2,6 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	3,1 $\pm$ 0,08 <sup>d</sup>	18,3 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	16,7 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
1/4	1	80 $\pm$ 7,64 <sup>b</sup>	85 $\pm$ 2,89 <sup>abc</sup>	3,6 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	3,7 $\pm$ 0,12 <sup>bc</sup>	17,6 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	16,9 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
1/4	2	85 $\pm$ 7,64 <sup>ab</sup>	93 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	3,3 $\pm$ 0,22 <sup>bc</sup>	3,9 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	17,9 $\pm$ 0,83 <sup>a</sup>	16,5 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>

Datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de tres repeticiones (20 explantes cada una). Los promedios con letras distintas dentro de cada columna son diferentes significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Duncan. / Values represent mean  $\pm$  standard error of three repetitions (20 explants each). Means values with different letters in the same column are significantly different ( $p \leq 0,05$ ), according to Duncan test.

TABLA II. Efecto de diferentes concentraciones de ácido 3-indol butírico (AIB) sobre la rizogénesis de microtallos de dos clones *Ugni molinae* bajo condiciones *ex vitro*.TABLE II. Effect of different concentrations of indole 3-butyric acid (IBA) on the rhizogenesis of microshoots of two *Ugni molinae* clones, under *ex vitro* conditions.

AIB (mM)	SUPERVIVENCIA (%)		ENRAIZAMIENTO (%)		NÚMERO DE RAÍCES/BROTE		LARGO DE RAÍCES (mm)	
	CLON 1	CLON 2	CLON 1	CLON 2	CLON 1	CLON 2	CLON 1	CLON 2
0	83 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 3,33 <sup>b</sup>	80 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 4,41 <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	2,0 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup>	23,1 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	17,1 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>
1000	90 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	75 $\pm$ 2,89 <sup>ab</sup>	2,4 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	2,4 $\pm$ 0,16 <sup>c</sup>	18,4 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	16,3 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup>
2000	88 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	82 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>	78 $\pm$ 4,41 <sup>a</sup>	2,3 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	2,8 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	16,3 $\pm$ 0,76 <sup>bc</sup>	18,9 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>
4000	90 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 2,89 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	15,2 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup>	18,6 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup>

Datos representan el promedio  $\pm$  error estándar de tres repeticiones (20 explantes cada una). Los promedios con letras distintas dentro de cada columna son diferentes significativamente ( $p \leq 0,05$ ), de acuerdo al test de Duncan. / Values represent mean  $\pm$  standard error of three repetitions (20 explants each). Means values with different letters in the same column are significantly different ( $p \leq 0,05$ ), according to Duncan test.



aplicaciones de AIB, en cambio en el Clon 2 el AIB promueve el enraizamiento. Por lo anterior, se puede atribuir una respuesta genética dependiente del clon. La diferencia en la respuesta rizogénica se puede encontrar a nivel de especies, variedades e incluso entre clones de una misma especie (Mankessi *et al.* 2009). Al respecto Doll *et al.* (2012) encontraron, después de tres meses, diferencias significativas en el enraizamiento de estacas de *U. molinae* (89 y 43%) entre murtillas procedentes de la Cordillera de los Andes vs. la Cordillera de la Costa. La adición de AIB a las estacas mejoró el enraizamiento pero mantuvo las diferencias entre ambas procedencias. *Eucalyptus globulus* es una de las especies que presenta dificultades de enraizamiento dentro de su género (Fett-Neto *et al.* 2001), incluso ésta puede diferir entre diversos clones (Trindade & País 1997). Al respecto, Borges *et al.* (2011) encontraron diferencias en el enraizamiento entre clones híbridos de *E. urophylla* x *E. globulus* y *E. grandis* x *E. globulus*, mostrando variaciones que en muchos casos superaban el 50%. El conocimiento de la habilidad rizogénica de un clon es de enorme interés para la producción comercial y muchas veces es el factor que determina su disponibilidad en el mercado. La facilidad de enraizamiento de la murtilla especialmente del Clon 1, el cual no tiene diferencias significativas entre los tratamientos *ex vitro* con o sin AIB, hace suponer que este clon posee los contenidos endógenos de auxinas suficientes para desencadenar una respuesta rizogénica adecuada (Simon & Petrásek 2011). No obstante, la aplicación de 19,7 mM de AIB aumentó el número de raíces por explante, lo cual debe ser considerado para la supervivencia y desarrollo del sistema radical de la planta en sus posteriores etapas de desarrollo en vivero.

En mirtáceas, el AIB ha sido la principal hormona utilizada para el enraizamiento de microtallos (Singh *et al.* 2002, Shatnawi *et al.* 2004, Rai *et al.* 2009). El AIB es más estable y efectivo que AIA para la inducción de raíces laterales, además puede ser convertido a AIA en los peroxisomas por  $\beta$ -oxidación (Zolman *et al.* 2000, Woodward & Bartel 2005). Según Pop *et al.* (2011), el AIB puede potenciarse con los contenidos de AIA endógeno, en este caso puede ser explicada por una mayor estabilidad, diferentes metabolismos, diferencia en el transporte y la conversión del AIB en AIA, esta interacción AIB-AIA difiere entre las especies, lo que también puede reflejarse entre clones distintos de una misma especie (Ludwig-Müller *et al.* 2005, Saini *et al.* 2013).

La dilución del medio MS provocó, en general, un mayor enraizamiento *in vitro* al compararlo con los tratamientos de MS completo, esta estrategia es de uso frecuente para estimular el enraizamiento *in vitro* (Nourissier & Monteuis 2008, Shah *et al.* 2008). La salinidad del medio de cultivo modifica la capacidad de adsorción del gel y con ello la disponibilidad de sus componentes, entre ellos las auxinas exógenas (Sathyanarayana & Barghese 2007).

La murtilla responde al enraizamiento *in vitro* con bajas concentraciones de AIB en comparación a otras mirtáceas como *Syzygium cumini* (Jain & Babbar 2000), *Feijoa sellowiana* (Oltamari *et al.* 2000), *Eucalyptus nitens* (Gomes & Canhoto 2003), *S. francisci* (Shatnawi *et al.* 2004) y *Psidium guajava* (Martínez *et al.* 2005) y su incremento de 1 a 2  $\mu$ M no produce cambios significativos. Probablemente mayores concentraciones de AIB disminuyan el porcentaje de enraizamiento como lo observado por Nourissier & Monteuis (2008), quienes encontraron que al aumentar la concentración de 5 a 12,5  $\mu$ M de AIB se redujo significativamente el porcentaje de enraizamiento en dos de los cuatro clones híbridos estudiados de *E. urophylla* x *E. grandis*.

Al final del ensayo, las plantas enraizadas *in vitro* exhibían un mayor desarrollo en longitud del tallo, un incipiente desarrollo de brotes laterales y un mayor número de raíces, las cuales eran de aspecto translúcido y frágil. Por otra parte, las plantas enraizadas *ex vitro* mostraban signos de estrés, especialmente por la caída de algunas hojas basales durante las primeras dos semanas de enraizamiento, probablemente por la falta de agua. El estrés osmótico induce un incremento de los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) y como consecuencia la caída de hojas (Fujita *et al.* 2011). Lo anterior sugiere que es probable mejorar la técnica empleada cortando un par de hojas basales previo al enraizamiento *ex vitro*. Independiente del tratamiento utilizado, todos los microtallos enraizados formaron un callo basal de donde emitían raíces adventicias. La formación de callo basal es muy frecuente en esquejes y es provocado por una mayor concentración de auxinas en la zona de la herida (Pop *et al.* 2011), sin embargo las raíces adventicias en otras especies pueden ser emitidas desde puntos del tallo distinto al callo basal, incluso el callo basal se puede desarrollar después de la emisión de las raíces. Al respecto, Štefančič *et al.* (2005) observaron en portainjertos de *Prunus* 'GiSelA5' que los sistemas radiculares desarrollados a partir de un callo basal eran de menor calidad. En el enraizamiento, un callo basal grande no es una condición deseable y su tamaño es menor cuando se utiliza AIB en comparación a otras auxinas como ANA o AIA (Metivier *et al.* 2007).

## CONCLUSIONES

Los microtallos de murtilla derivados del cultivo *in vitro* poseen una alta habilidad rizogénica, por lo que no es necesario su enraizamiento *in vitro*, debido a los costos involucrados. El uso de AIB para las condiciones *ex vitro* es aconsejable, ya que promueve el enraizamiento y cuando no lo hace al menos incrementa el número de raíces. La respuesta dependerá del genotipo del Clon.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDRADE, N., M. VILLAGRA & N. ARISMENDI. 2009. Evidencias microscópicas y moleculares de la presencia de fitoplasmas en plantas de murta (*Ugni molinae* Turcz.) afectadas por la enfermedad “escoba de bruja”. *Tropical Plant Pathology* 34(4): 245-249.
- AVELLO, M. & E. PASTENE. 2005. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz. (murtilla). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 4(2): 33-39.
- AVELLO, M., R. VALDIVIA, R. SANZANA, M. MONDACA, S. MENNICKENT, M. BITTNER & J. BECERRA. 2009. Extractos antioxidantes y antimicrobianos de *Aristolelia chilensis* y *Ugni molinae* y sus aplicaciones como preservantes en productos cosméticos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 8(6): 479-486.
- BENNETT, I., J. McCOMB, C. TONKIN & D. McDAVID. 1994. Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Annals of Botany* 74: 53-58.
- BORGES, S., A. XAVIER, L. OLIVEIRA, L. MELO & A. ROSADO. 2011. Enraizamiento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. *Revista Árvore* 35(3): 425-434.
- DELPORTE, C., N. BACKHOUSE, V. INOSTROZA, M. AGUIRRE, N. PEREDOET & X. SILVA. 2007. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *Journal of Ethnopharmacology* 112(1): 162-165.
- DOLL, U., I. RODRÍGUEZ, C. SOTO & I. RAZMILIC. 2012. Propagación de estacas y concentración de taninos y flavonoides en hojas de dos procedencias de *Ugni molinae* de la Región del Maule (Chile). *Bosque* 33(2): 203-209.
- FETT-NETO, A., J. FETT, W. LUÍZ, L. VIEIRA, G. PASQUALI, R. TERMIGNONI & A. FERREIRA. 2001. Distinct effects of auxin and light on adventitious root development in *Eucalyptus saligna* and *Eucalyptus globulus*. *Tree Physiology* 21: 457-464.
- FUENMAYOR, M.E. & N.J. MONTERO. 1997. *In vitro* clonal propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from stem shoots of Cv. Mara-7. *Acta Horticulturae* 452: 47-51.
- FUJITA, Y., M. FUJITA, K. SHINOZAKI, & K. YAMAGUCHI-SHINOZAKI. 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* 124: 509-525.
- GOMES, F. & J.M. CANHOTO. 2003. Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). *In vitro Cellular & Development Biology - Plant* 39: 316-321.
- IAPICHINO, G. & M. AIRO. 2008. Micropropagation of *Metrosideros excels*. *In vitro Cellular & Development Biology - Plant* 44: 330-337.
- JAIN, N. & S.B. BABBAR. 2000. Recurrent production of plants of black plum, *Syzygium cuminii* (L.) Skeels, a myrtaceous fruit tree, from *in vitro* cultured seedling explants. *Plant Cell Reports* 19: 519-524.
- LEVA, A. 2011. Innovative protocol for “*ex vitro* rooting” on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology* 6(3): 352-358.
- LUDWIG-MÜLLER, J., A. VERTOCNIK & CH. TOWN. 2005. Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany* 56(418): 2095-2105.
- MANKESSI, F., A. SAYA, C. BAPTISTE, S. NOURISSIER & O. MONTEUUIS. 2009. *In vitro* rooting of genetically related *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* clones in relation to the time spent in culture. *Trees* 23: 931-940.
- MARTÍNEZ, R., H. AZPIROZ, J. RODRÍGUEZ, V. CETINA, M.A. GUTIÉRREZ & J. SAHAGÚN. 2005. Micropropagación clonal *in vitro* en *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*. *Ra Ximha* 1(1): 111-130.
- MEGHWAL, P.R., H. SHARMA & S. SINGH. 2010. Micropropagation studies on guava. *Indian Journal of Horticulture* 67: 55-58.
- METIVIER, P., E. YEUNG, K. PATEL & T. THORPE. 2007. *In vitro* rooting of microshoots of *Cotinus coggygria* Mill, a woody ornamental plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 43: 119-123.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NOURISSIER, S. & O. MONTEUUIS. 2008. *In vitro* rooting of two *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* mature clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 44: 263-272.
- OLTRAMARI, A., L. DAL VESCO, E. PEDROTTI, J.P. DUCROQUET, R. NODARI & M. GUERRA. 2000. Feijoa (*Acca sellowiana* (Berg) Burret) micropropagation protocol. *Ciência Rural, Santa Maria* 30(1): 61-68.
- POP, T., P. DORU & C. BELLINI. 2011. Auxin control in the formation of adventitious roots. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 39(1): 307-316.
- RAI, M.K., V. JAISWAL & U. JAISWAL. 2009. Shoot multiplication and plant regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from nodal explants of *in vitro* raised plantlets. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 17(1): 29-38.
- RANAWEEERA, K., M. GUNASEKARA & J. EESWARA. 2013. *Ex vitro* rooting: A low cost micropropagation technique for Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz) hybrids. *Scientia Horticulturae* 155: 8-14.
- RIEDEMANN, P. & G. ALDUNATE. 2009. Flora nativa de valor ornamental. Identificación y propagación. Chile Zona Sur. Editorial Andrés Bello, Santiago, Chile. 516 pp.
- RODRÍGUEZ, M. 2000. Análisis de la diversidad fenotípica de murta (*Ugni molinae* Turcz.) a través de métodos multivariados. Tesis Magíster en Ciencias. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 177 pp.
- RODRÍGUEZ, M. 2011. La propagation d'écotypes sélectionnés de murtilla (*Ugni molinae* Turcz.), une baie endémique du Chili: étude de la germination et stratégies de multiplication *in vitro*. Tesis doctoral. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, AgroParisTech. Ecole Doctorale ABIES, Paris, Francia. 232 pp.
- RUBILAR, M., M. PINELO, M. IHL, E. SCHEUERMANN, J. SINEIRO & M. NUNEZ. 2006. Murtilla leaves (*Ugni molinae* Turcz.) as a source of antioxidant polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(1): 59-64.
- SAINI, S., I. SHARMA, N. KAUR & P.K. PATI. 2013. Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* 32: 741-757.
- SATHYANARAYANA, B. & D. BARGHESE. 2007. Plant tissue culture: practices and new experimental protocols. I.K. International Pvt Ltd., India. 316 pp.
- SEELYE, J.F., B. HOFMANN, G. BURGE & E. MORGAN. 2001. *In vitro* propagation of *Leptospermum* hybrids. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 29: 233-237.

- SHA VALLI KHAN, P.S., J.F. HAUSMAN & K.R. RAO. 1999. Clonal multiplication of *Syzygium alternifolium* (Wight.) Walp., through mature nodal segments. *Silvae Genetica* 48(1): 45-50.
- SHAH, S.T., R. ZAMIR, J. AHMAD, H. ALI & G. LUTFULLAH. 2008. *In vitro* regeneration of plantlets from seedlings explants of guava (*Psidium guajava* L.) cv. Safed A. Park. *Journal of Botany* 40(3): 1195-1200.
- SHARMA, S.K. & V. RAMAMURTHI. 2000. Micropropagation of 4-year-old elite *Eucalyptus tereticornis* trees. *Plant Cell Reports* 19: 511-518.
- SHATNAWI, M., K. JOHNSON & F. TORPY. 2004. *In vitro* propagation and cryostorage of *Syzygium francissi* (Myrtaceae) by the encapsulation-dehydration method. *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant* 40: 403-407.
- SIMON, S. & J. PETRÁSEK. 2011. Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180(3): 454-460.
- SINGH, S.K., P. MEGHWAL, H. SHARMA & S. SINGH. 2002. Direct shoot organogenesis on explants from germinated seedlings of *Psidium guajava* L. cv. Allahabad Safeda. *Scientia Horticulturae* 95: 213-221.
- SMITH, R. 2012. *Plant tissue culture: Techniques and experiments*. Academic Press Elsevier, Londres, UK. 208 pp.
- SOTOLONGO, R., M. GARCÍA, L. JUNCO, G. GEADA, & E. GARCÍA. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional, Universidad de la Habana* 24(1-2): 245-250.
- ŠTEFANČIĆ, M., F. ŠTAMPAR & G. OSTERC. 2005. Influence of IAA and IBA on root development and quality of *Prunus* 'GiSelA 5' leafy cuttings. *HortScience* 40(7): 2052-2055.
- SUWALSKY, M., P. ORELLANA, M. AVELLO & F. VILLENA. 2007. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology* 45: 130-135.
- SUWALSKY, M., P. ORELLANA, M. AVELLO, F. VILLENA & C. SOTOMAYOR. 2006. Human erythrocytes are affected *in vitro* by extracts of *Ugni molinae* leaves. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1393-1398.
- TRINDADE, H. & M.S. PAIS. 1997. *In vitro* studies on *Eucalyptus globulus* rooting ability. *In Vitro Cellular & Development Biology - Plant* 33: 1-5.
- WOODWARD, A. & B. BARTEL. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95(5): 707-735.
- ZAMIR, R., N. ALI, S.T. SHAH, T. MUHAMMAD & S.A. SHAH. 2007. *In vitro* regeneration of guava (*Psidium guajava* L.) from shoot tips of mature trees. *Pakistan Journal of Botany* 39: 2395-2398.
- ZOLMAN, B.K., A. YODER, & B. BARTEL. 2000. Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics* 156: 1323-1337.

Recibido: 14.05.14

Aceptado: 16.09.14