

MICROPROPAGACION DE *LAPAGERIA ROSEA* R. ET P. (MONOCOTYLEDONEAE, LILIACEAE)

Micropropagation of *Lapageria rosea* R. et P.
(Monocotyledoneae, Liliaceae)

BARRALES, P.H.L., MANCINELLI, S.P. y B. ORELLANA*

RESUMEN

Se informa sobre el cultivo "in vitro" de yemas axilares de rizoma y ovarios de *Lapageria rosea*, copihue, en varios medios de cultivo con distintos reguladores de crecimiento.

ABSTRACT

The behavior of aerial, underground bud and ovaries of *Lapageria rosea* cultivated "in vitro" are described.

KEYWORDS: *Lapageria Rosca*, Copihue vine. Buds. Ovaries. *In vitro* culture.

INTRODUCCION

El interés creciente que se observa por el cultivo del copihue, *Lapageria rosea*, junto a la creación de respeto ecológico hacia la flora autóctona, ha incentivado a grupos de investigadores para encontrar formas de multiplicación diferentes a la agámica o por semillas.

El cultivo de tejidos constituye actualmente una forma de reproducción masiva de plantas (Murashige, 1978; Zenk, 1878). *L. rosea* ha sido objeto de estudios previos de micropropagación "in vitro", obteniéndose reconstitución de plantas enteras a partir de segmentos nodales con su respectiva yema o de ésta (Jordan et al. 1983; Seemann, 1983).

Este trabajo informa sobre la con-

ducta de yemas axilares, yemas de rizoma y de ovarios enteros o en trozos.

MATERIALES Y METODOS

Yemas axilares, de rizomas y ovarios de copihue recolectados en la localidad de Manquimávida, Concepción, Octava Región, se desinfectaron superficialmente con NaClO al 5%, durante 10 minutos. Se lavaron varias veces con agua estéril y luego se agitaron en HgCl₂ al 0.33% durante 15 minutos, enjuagando repetidamente con agua estéril.

Todos los explantes permanecieron en incubación por un lapso de 30-35 días

*Departamento de Botánica
Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales
Universidad de Concepción

en los distintos tratamientos. Yemas axilares (30) y de rizomas (15) se incubaron en medio Koch (1974) o White (1977) con ácido naftalenacético (ANA), bencilaminopurina (BAP) y ácido Giberélico (GA₃) en concentraciones de 0.1 1.5 y 1.0 mgr L⁻¹, respectivamente. Después del lapso señalado todos los explantes se colocaron en medio Harada (1975) con igual tratamiento hormonal.

Las siguientes incubaciones se hicieron exclusivamente con medio Anderson (1978), cambiando sólo los tratamientos de los explantes. Las yemas se incubaron a continuación con ácido indolacético (AIA) y 6-gg-dimetilaminopurina (2iP) en concentraciones de 5 y 15 mgr l⁻¹ respectivamente, después se colocaron en medio sin hormonas con carbón activado al 1% y sacarosa a 15 mgr l⁻¹. Las yemas de rizoma se trataron con zeatina

en concentraciones de 1 y 5 mgr l⁻¹. A continuación se incubaron con AIA y 2iP a la concentración ya señalada, seguida con igual tratamiento de carbón activado y sacarosa. (Ver esquema).

Ovarios enteros (15) partidos transversal o longitudinalmente se incubaron en medio Harada o Murashige (1962) con AIA y 2iP a la concentración ya indicada. Después de ± 100 días se disectaron óvulos y se incubaron en White el 50%.

Todos los medios de cultivo se gelificaron con Bacto Agar (Difco) al 0.7%, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 104 KPa durante 20 minutos. Se usaron frascos de vidrio de 80 x 25 mm, con 7 ml de medio y las incubaciones se efectuaron en una cámara de luces bajo una intensidad de 11.6 W m⁻², con un régimen lumínico de 16:8 hr. y a una temperatura de ± 24°C.

ESQUEMA DE TRATAMIENTOS DE EXPLANTES DE *LAPAGERIA ROSEA*

| Yemas axilares | Yemas de rizoma | Ovarios | |
|---|---|---------------------------------------|--------------------------------------|
| Medio White *ANA, BAP, GA ₃ 30-35 días | Medio White *ANA, BAP, GA ₃ 30-35 días | M. Harada **AIA 2iP ± 60 días | M. Murashige AIA 2iP ± 60 días |
| Medio Harada ANA, BAP, GA ₃ 30 días | Medio Harada ANA, BAP, GA ₃ 50 días | Medios Whites Ovulos ± 100 días | |
| Medio Anderson AIA, 2iP 60 días | Medio Anderson zeatina 60 días | Plántulas | |
| Medio Anderson CA*, Sacarosa | Medio Anderson CA*, Sacarosa | | |
| Raíces | Callo | | |

*ANA = ácido naftalenacético; BAP = bencilaminopurina; GA₃ = ácido giberélico; AIA = ácido indolacético; 2iP = 6-gg-dimetilaminopurina; CA = carbón activado; § Medio White 50% de concentración.

RESULTADOS

Yemas axilares

Se detectó crecimiento en estos órganos incubados en medio White con ANA, BAP y GA3 a ± 6 días, comportamiento que se estimó por la apertura de las brácteas y aumento de volumen de los tejidos. Al cambiarlos a Harada con igual tratamiento hormonal y a igual concentración, se observó un crecimiento sostenido de las yemas. El tratamiento posterior en Anderson con AIA y 2iP, mantiene el crecimiento, diferenciación de epidermis, pigmentación y expansión foliar. Al incubar estas yemas en igual medio con carbón activado y sacarosa, diferenciaron yemas como se observa en la Fig. 1A. Los explantes incubados en medio Koch no respondieron a los tratamientos, comportamiento que también se observó en las yemas de rizoma, descartándose su utilización.

Yemas de rizoma

Las yemas tratadas con ANA, BAP y GA3 en medio White, respondieron al tratamiento a ± 15 días. Su cambio a Harada con igual tratamiento mantiene el crecimiento, resultados que se muestran en la Fig 1B. Al colocarlos en igual medio con zeatina (± 30 días) se induce la formación de callo en la parte inferior con diferencia de numerosas yemas, comportamiento que se observa en la Fig. 1C. Estas yemas al incubarlas separadamente en Harada con AIA y 2iP continuaron creciendo sin dificultad. El tratamiento con carbón activado y sacarosa para inducir la formación de raíces no dio resultados.

Ovarios

Los trozos de ovario y óvulos incubados en medio Harada o Murashige, aumentan de volumen a ± 60 días. Este comportamiento sólo se observa en trozos con la superficie del corte en contacto con el medio (Fig 1D.). Los ovarios enteros no aumentaron de volumen, descartándose como explantes en las experien-

cias posteriores. Su cambio a Anderson con AIA y 2iP, donde permanecieron por ± 100 días, muestra que siguen creciendo sostenidamente al igual que los óvulos. Muchos de éstos se deterioraron presentando una coloración oscura. La incubación en White al 50% de algunos de buen aspecto, produjo la germinación de algunos pocos (± 100 días), evolucionando a plántulas que no sobrevivieron al colocarlos en maceteros.

La desinfección de los explantes eliminó totalmente la contaminación y sólo se perdieron 1-2 después del tercer o cuarto cambio de medio y/o tratamiento (6-10%).

DISCUSION

El medio White es adecuado para iniciar el crecimiento de yemas axilares y de rizoma; aunque este medio no es el más utilizado, prefiriéndose entre otros el formulado por Murashige-Skoog o sus modificaciones (Hu & Wang, 1983). Sin embargo, la experiencia de este laboratorio lo señala como adecuado durante el establecimiento inicial de los explantes, debido que generalmente se ha logrado respuestas positivas. Su baja molaridad, que disminuye el impacto de la cirugía sobre los tejidos ya que carece de N-NH₄ (Damiano, 1980), apoyan su utilización. Estas consideraciones pueden explicar el comportamiento de los explantes en medio Koch, caracterizado por una alta molaridad y la presencia de dos sales de amonio; aquellos permanecieron latentes, descartándose su uso, a pesar que se ha utilizado con éxito (Seemann, 1983). Las yemas continuaron creciendo al incubarlos en medio Harada, de alta molaridad sin ser aparentemente afectados por esta característica, debido posiblemente al tamaño alcanzado (± 20 mm) lo que le permitiría adaptarse a las condiciones "in vitro".

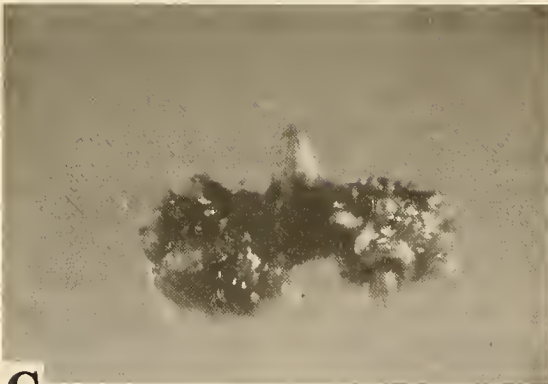
Las yemas axilares de copihue reiniciaron su crecimiento, respondiendo favorablemente al medio White y a las fitohormonas, ANA, BAP y GA3, en un



A



B



C



D

Fig. 1-A. Yema axilar del *L. rosea* en medio Anderson con AIA y 2iP a ± 60 días. Tamaño ± 40 mm. B. Yema de rizoma en medio Harada con ANA, BAP y GA3 de ± 20 días de incubación. Tamaño ± 5 mm. C. Callo organogénico en medio Harada con zeatina proveniente de yema de rizoma de ± 55 días de incubación y de ± 15 mm. D. Trozo de ovario en medio Anderson con AIA y 2iP de ± 100 días de incubación y de ± 15 mm de longitud.

tiempo relativamente corto (± 6 días). Este comportamiento no difiere fundamentalmente del informado por Jorda et al. (1983), así como también del encontrado por Seemann (1983), aun cuando estos autores utilizaron medios de cultivo de alta molaridad. Estas yemas diferenciaron raíces al incubarlas en medio Anderson con carbón activado y sacarosa (Harada, 1975), no obstante que para la diferenciación de estos órganos se necesita auxina y que la concentración de los componentes del medio disminuya a la mitad

(Anderson, 1980). Estos requerimientos se habrían cumplido al usar medio Anderson que es de baja molaridad y porque los tallos en crecimiento sintetizan auxina. Este comportamiento se ha encontrado en especies que forman raíces en ausencia de auxina (Hasewaga, 1980). Por otra parte, la diferenciación de raíces puede haberse facilitado por la presencia de carbón activado, que se agrega generalmente para eliminar por absorción, exceso de hormonas e inhibidores (Takayama & Missawa, 1980).

El comportamiento de las yemas subterráneas (rizoma), es distinto al de las axilares, tanto en el tiempo como en morfogénesis. La apertura de las yemas, criterio usado para estimar crecimiento, ocurrió más tarde que en las axilares (6 vrs 15 días). Estos explantes continúan su crecimiento, con expansión foliar y pigmentación al colocarlos en medio Harada con ANA, BAP y GA3, pero al incubarlos en Anderson con zeatina, se forma callo en la base. Esta conducta podría deberse a la presencia de kinetinas distintas en el medio, 2iP en las yemas aéreas y zeatina en las subterráneas (Hu & Wang, 1978). Se ha informado que la respuesta de un explante a las kinetinas, puede ser totalmente diferente aunque sean muy semejantes en su estructura (Everett et al. 1978). Debe recalarse que esta conducta no corresponde al efecto generalmente esperado para las kinetinas (Skoog & Miller, 1967).

Los ovarios enteros o en trozos

mostraron que pueden ser estimulados en su crecimiento por los tratamientos hormonales, AIA y 2iP, pero no evolucionan a material organogénico. Los óvulos pueden cultivarse sin dificultad aumentando de volumen, sin embargo, y por excepción se observó después de mucho tiempo (± 100 días), el crecimiento del embrión para formar una plántula, que no sobrevive mucho tiempo. Como los óvulos se obtuvieron desde flores cerradas y considerando que copihue es una planta autógena, podría esperarse una viabilidad mayor. Es posible, sin embargo, que los tratamientos hormonales puedan explicar estos resultados. Se ha informado que en frutilla la presencia de GA3, impide la formación de los embriones alterando el crecimiento y desarrollo del fruto (Tafazoli & Vince-Prue, 1979). Esta situación puede haberse presentado aunque no puede descartarse la posibilidad que los óvulos no estuvieran fecundados.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, W.C. 1978. Tissue Culture of Rhododendrons. In *Vitro* 14: 334 (Abstr.).
- Anderson, W.C. 1980. Mass Propagation by Tissue Culture; Principles and Techniques. In: Proc. Conf. Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture - Applications and Feasibility. pp 1-10. USAD. Science and Education Administration, Agricultural Research Results. ARR-NE-11, Beltsville. MD.
- Damiano, C. 1980. Strawberry Micropropagation. In: Proc. Conf. Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture-Application and Feasibility. pp 11-21. USAD. Sciences and Education Administration, Agricultural Research results. ARR-NE-11, Beltsville. MD.
- Everett, N.P., Wang, T.L. & H.E. Street, 1978. Hormone Regulation of Cell Growth and Development *in vitro*. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. T.A. Thorpe (ed.). Calgary, Univ. of Calgary Press. Canada, pp 307-316.
- Harada, H. 1975. In vitro Organ Culture of *Actinidia chinensis* Pl. A Technique for Vegetative Multiplication. *J. Hort Sci.* 50: 81-82.
- Hasegawa, P.M. 1980. Factors Affecting Shoot and Root Initiation from Culture Rose Shoot Tips. *J. Am. Hort. Sci.* 105: 216-220. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds.). New York, MacMillan Publishing Co. Vol. 1: 177-227.
- Hu, C.Y. & P.J. Wang, 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Culture. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds.). New York, MacMillan Publishing Co. Vol. 1: 177-227.
- Jordan, M., Cortes I. & G. Montenegro. 1983. Regeneration of *Lapageria rosea*. Plantlets by Tissue Culture (Family Philesiaceae) *Gartenbauwissenschaft*, 48(3): 97-100.
- Koch, L. 1974. Untersuchungen zur vegetativen Vermehrung bei *Phalaenopsis in vitro*. Diss. Techn. Univ. Hannover 160 p. en Seemann, P. 1983. Propagation *in vitro* del Copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pavon). *Agro Sur*, 11(2): 130-134.
- Murashige, T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*. T.A. Thorpe (ed.) pp 15-26. Calgary, Univ. of Calgary Press, Canada.
- Murashige, T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Seemann, P. 1983. Propagación *in vitro* del Copihue (*Lapageria rosea* Ruiz et Pavon) *Agro Sur*, 11(2): 130-134.
- Skoog, F. & C.O. Miller, 1957. Chemical regulation

- of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*. Soc. Exp. Biol. Sym., 11: 118-131.
- Takayama, S. & M. Misawa, 1980. Differentiation in *Lilium* bulb scales grow *in vitro*. Physiol. Plant. 48: 121-125.
- Tafazoli, E. & D. Vince-Prue, 1979. Fruits and growth in Strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch. Ann. Bot. 43: 125-134.
- White, P.R. 1977. Tissue (Callus) Culture-Techniques. M.M. Yeoman. In: Plant Tissue and Cell Culture. H.E. Street (ed.). Berkeley & Los Angeles, Univ. of California Press. Bot. Monograph. Vol. 11, 2nd Edition. pp 31-59.
- Zenk, M. 1978. The Impact of Plant Cell Culture on Industry and Agriculture. T.A. Thorpe (ed.). Calgary, Univ. of Calgary Press, Canada. pp. 1-14.