



Bosque

ISSN: 0304-8799

revistabosque@uach.cl

Universidad Austral de Chile

Chile

PREHN, DORIS; SERRANO, CAROLINA; BERRIOS, CARMEN GLORIA; ARCE-JOHNSON,  
PATRICIO

Micropropagación de Quillaja saponaria Mol. a partir de semillas

Bosque, vol. 24, núm. 2, agosto, 2003, pp. 3-12

Universidad Austral de Chile

Valdivia, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=173114405001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica





Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



## Bosque (Valdivia)

ISSN 0717-9200 *versión on-line*

-  Como citar este artículo
-  Agregar a favoritos
-  Enviar a e-mail
-  Imprimir HTML

Bosque (Valdivia) v.24 n.2 Valdivia ago. 2003

Bosque, Vol. 24 N° 2, 2003, pp. 3-12

### ARTICULOS

## Micropropagación de Quillaja saponaria Mol. a partir de semillas <sup>\*</sup>

### Micropropagation of Quillaja saponaria Mol. starting from seed

DORIS PREHN <sup>1</sup>, CAROLINA SERRANO <sup>2</sup>, CARMEN GLORIA BERRIOS <sup>1</sup>, PATRICIO ARCE-JOHNSON <sup>2</sup>

\* Trabajo financiado por el proyecto FONDEF D9712010, Manejo y Uso Industrial del Quillay, bajo la dirección del Dr. Ricardo San Martín y el Dr. Gustavo Cruz M.

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Ciencias de los Recursos Naturales, Unidad de Biotecnología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Teléfono: (56-2) 686 4956 Fax (56-2) 5526005; email: [dprehn@puc.cl](mailto:dprehn@puc.cl).

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Laboratorio de Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

### Summary

Quillay is an endemic tree that grows between the IV and IX regions of Chile. Because the bark of quillay has a high commercial demand, a propagation program for the large-scale economic production of this tree was developed. For this purpose, a protocol was designed for the *in vitro* culture of quillay

seeds. Seeds were disinfected with Dithane, sodium hypochlorine and hydrogen peroxide, and then stratified in MS culture medium. Explants were obtained from the germinated plants and transferred to establishment medium. Supplementation with casein hydrolysate, magnesium sulfate and glutamine were appropriate to establish quillay seedlings, and the addition of 1 mg/L BAP to the culture medium resulted in a high number of lateral shoots. The elimination of casein hydrolysate and the addition of 0.1 mg/l indolebutyric acid (IBA) induced roots in 59% of the shoots. Rooted plants were acclimated in a culture chamber and transferred to the greenhouse. This protocol generated 120 plants that after six months possess new leaves and a size between 20 and 70 cm.

*Key words:* quillay, micropropagation, seeds, casein hydrolysate.

## Resumen

El quillay es un árbol endémico chileno que crece entre las regiones IV y IX. Dada la alta demanda por la corteza de este árbol, se ha desarrollado un programa de propagación para su producción masiva y económica. Para este efecto se diseñó un protocolo para el cultivo *in vitro* de semillas de quillay. En primer lugar, las semillas se desinfectaron utilizando Dithane, hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno, para luego ser estratificadas en el medio de cultivo MS. De las plantas germinadas se obtuvieron explantes que se traspasaron a un medio de establecimiento. Además, se determinó que el suplemento de hidrolizado de caseína, sulfato de magnesio y Glutamina es adecuado para establecer plántulas de quillay. La adición al medio de cultivo de 1 mg/l de BAP permitió obtener una alta tasa de multiplicación de brotes laterales. La remoción del hidrolizado de caseína y la adición de 0,1 mg/l de IBA indujo raíces en un 59% de las plántulas. Posteriormente, las plantas enraizadas fueron aclimatadas en cámara de cultivo y se traspasaron a invernadero. Hasta la fecha se poseen 120 plantas en invernadero que presentan hojas nuevas y un tamaño que fluctúa entre 20 y 70 cm.

*Palabras claves:* quillay, micropropagación, semillas, hidrolizado de caseína.

*Abreviaciones:* BAP-6-bencilamino purina; IBA-ácido indol butírico; MS-medio Murashige & Skoog; HC-hidrolizado de caseína.

---

## INTRODUCCION

El quillay (*Quillaja saponaria* Molina) es un árbol endémico chileno que crece entre las regiones IV y IX ([Wiberg 1991](#) y [Lara 1997](#)). Esta especie se caracteriza por crecer en suelos pobres, tolerar altas fluctuaciones térmicas y condiciones extremas de sequía. De su madera y corteza se extraen las saponinas, las que son moléculas de gran importancia económica ([Hoffmann 1995](#)).

Las saponinas son alcaloides de tipo triterpenoide producidas durante el metabolismo secundario de árboles de quillay. Las saponinas poseen diversos usos farmacéuticos e industriales, entre los que se destacan sus propiedades de adyuvante inmunológico ([Dalsgaard 1995](#) y [Kensil 1996](#)). Se han purificado distintas fracciones de saponinas, siendo la fracción de saponinas QS21 la menos tóxica al ser utilizada como adyuvante en animales ([Kensil et al. 1991](#)). Esta saponina se ha utilizado en el control y prevención de enfermedades infecciosas, cáncer, desórdenes autoinmunes, tratamiento de SIDA, infección neumococal, control de la malaria y tratamiento de la tuberculosis ([Cainelli et al. 1995](#), [Newman 1992](#), [Wu 1992](#), [Chavali y Campbell 1987a](#) y [b, JP 7112939](#)). Las saponinas de *Quillaja saponaria* también poseen actividades de agente espumante y emulsificante, por lo que se han utilizado en la industria cosmética y elaboración de champúes ([Bombardelli et al. 1988](#)). Otro uso es el de pesticida biológico, especialmente en el control de hongos y nemátodos ([Osbourne 1996](#)). Esta propiedad se basa en la estructura química de la saponina, la que forma complejos con los esteroides presentes en las membranas celulares originando microporos que causan la lisis celular. Gracias a esta capacidad, las saponinas disminuyen el colesterol en animales ([Mitra y Dungan 1997](#)). También, las saponinas se han utilizado como neutralizadores de olores en criaderos de cerdos, aves y animales domésticos, y en la biodegradación de grasas en procesos aeróbicos y anaeróbicos en tratamiento de efluentes orgánicos ([Cheeke 1996](#), [Nagasaka 1995](#)).

Debido a la alta demanda por corteza de quillay, principal fuente de saponinas, y al cambio de uso de los suelos quillalleros, se disminuyó la existencia de árboles adultos. Esto motivó el desarrollo de un programa silvícola y de manejo forestal completo para esta especie, respaldado por un programa de propagación. El objetivo del programa es obtener la producción masiva, eficiente y económica de árboles de quillay con un alto contenido de saponinas de buena calidad y de baja toxicidad. Para este propósito, en este trabajo se implementaron técnicas de multiplicación por cultivo *in vitro* (micropropagación) a partir de semillas de árboles de quillay, seleccionados por su contenido y calidad de saponinas. Además, se diseñaron los medios de cultivo para cada etapa de propagación, es decir, germinación de semillas, elongación, multiplicación y enraizamiento de plántulas. La formulación de estos medios de cultivo permitió aportar los nutrientes y sales minerales, según los requerimientos de las plántulas, y las hormonas adecuadas para una exitosa micropropagación. Además, se estableció un procedimiento de aclimatación para el traspaso a invernadero de las plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro*.

## MATERIAL Y METODOS

*Material vegetal y condiciones de cultivo:* se utilizaron semillas de quillay cosechadas entre marzo y abril de cuatro árboles provenientes de Antuco, en la cordillera de la octava región, y de cuatro árboles de San Carlos de Apoquindo, en la región metropolitana. Posteriormente, las semillas se secaron y se mantuvieron en bolsas de papel a temperatura ambiente. Previo a los ensayos de desinfección, las semillas se lavaron con detergente (Quik). Luego, las semillas se establecieron en frascos de vidrio de 5x8 cm con 20 ml de medio de cultivo, los que se mantuvieron en cámara de crecimiento ( $T 20 \pm 6^\circ\text{C}$ ,  $25 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) para iniciar la germinación y posteriormente el cultivo.

El medio básico para el cultivo de semillas de quillay contiene los macro, micronutrientes y vitaminas descritas para el medio MS ([Murashige and Skoog 1962](#)). Estas fueron obtenidas de Sigma Chemical CO., St Louis, USA, al igual que las hormonas IBA (ácido indol butírico), BAP (6-bencil amino purina) y Zeatina. y los suplementos HC (hidrolizado de caseína) y Glutamina. Como fuente energética se usó azúcar Iansa® (30 g/l) y como gelificante agar nacional Midesa® (6 g/l). El pH para todos los medios de cultivo fue de 5,8. Como agentes antimicrobianos se usó etanol (98%), agua oxigenada (100 volúmenes) e hipoclorito de sodio (10%) de grado técnico y como fungicida se utilizaron Dithane y Ridomil, de Bayer®.

*Ensayos de desinfección y germinación:* las semillas utilizadas en estos ensayos corresponden a dos árboles de la precordillera de Santiago (RM). Previamente, para todos los ensayos las semillas fueron sumergidas durante 25 min en una solución de Dithane (5 g/l) bajo agitación constante. Posteriormente se efectuaron remojos en etanol (50% y 70%), hipoclorito de sodio (rango de 1 a 2%) y agua oxigenada (50, 60 y 75 vol.) a diferentes tiempos ([cuadro 1](#)). Después de cada aplicación de etanol e hipoclorito de sodio se realizaron 3 lavados con agua destilada por 3 minutos, y de 10 minutos después de usar agua oxigenada. Se desinfectaron semillas estratificadas por 48 h en agua (estratificación en humedad) y semillas secas, que se estratificaron a  $4^\circ\text{C}$  por 48 h después de la desinfección, en medio de cultivo MS sólido. El hipoclorito de sodio se aplicó por 3 min para la desinfección de semillas estratificadas en agua y por 10 min para las semillas secas.

CUADRO 1

Resultados de los ensayos de desinfección sobre la contaminación y germinación de semillas de quillay.  
Results of disinfection assays in the contamination and germination of quillay seed.

Ensayos	Agentes desinfectantes <sup>1</sup>	Nº plantas contaminadas/Total (%) <sup>6</sup>	Nº plantas germinadas/Total (%)
Etanol más	Etanol 0%, HS <sup>2</sup> 0%	48/60 (80)	42/60 (70)
Hipoclorito de sodio (HS)	Etanol 70%, 1 min.	30/60 (50)	25/60 (42)
(Semillas húmedas)	Etanol 70%; 1 min. HS 1,5%; 3 min.	12/60 (20)	0/60 (0)

	Etanol 50% 30 s; HS 1,5%; 3 min.	15/60 (25)	30/60 (40)
Hipoclorito de sodio <sup>3</sup> (Semillas húmedas)	0%	42/60 (70)	45/60 (75)
	1%	39/60 (65)	42/60 (70)
	1,1%	39/60 (65)	34/60 (56)
	1,2%	36/60 (60)	39/60 (65)
	1,3%	34/60 (57)	48/60 (80)
	1,4%	27/60 (45)	44/60 (73)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>4</sup> (Semillas secas)	Sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	140/200 (70)	150/200 (75)
	50 vol.; 10 min.	100/200 (50)	140/200 (70)
	50 vol.; 6 min.	120/200 (60)	184/200 (92)
	60 vol.; 10 min.	100/200 (50)	110/200 (55)
	60 vol.; 6 min.	104/200 (52)	180/200 (90)
	75 vol.; 10 min.	0/200 (0)	14/200 (7)
	75 vol.; 6 min.	0/200 (0)	40/200 (20)
Hipoclorito de sodio <sup>5</sup> (Semillas secas)	0%	144/200 (72)	150/200 (75)
	1,4%; 10 min.	124/200 (62)	114/200 (57)
	1,6%; 10 min.	60/200 (30)	134/200 (67)
	2%; 10 min.	16/200 (8)	158/200 (79)

1. El proceso de desinfección incluye al antifúngico Dithane 5 g/l por 25 minutos y a este tratamiento se le aplican los ensayos presentados.
2. Sólo Dithane 5 g/l por 25 minutos
3. La concentración de etanol de todos los tratamientos fue de 50% y el tiempo de aplicación fue de 30 segundos. El tiempo de aplicación de hipoclorito de sodio es de 3 min en todos los tratamientos.
4. La concentración de hipoclorito de sodio en todos los tratamientos fue de 1,4% y el tiempo de aplicación fue de 10 minutos. No se empleó etanol.
5. La concentración H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 60 volúmenes y el tiempo de aplicación fue de 6 minutos en todos los tratamientos. No se empleó etanol.
6. La contaminación se evaluó sobre el total de las semillas germinadas y no germinadas a los 10 días después de la siembra y se incluye la contaminación fúngica y bacteriana.

*Ensayos de suplemento nutricional:* se realizaron diversos ensayos con distintos componentes de cultivo para definir el medio de mantención adecuado de las plántulas generadas a partir de las semillas. Los parámetros evaluados en el medio de cultivo fueron: presencia de HC (0, 30, 100, 200 y 300 mg/l), Glutamina (0, 150 mg/l) y diferentes concentraciones de sulfato de magnesio (185, 370 y 555 mg/l).

*Ensayos de multiplicación y enraizamiento:* para la multiplicación de las plántulas se ensayaron las citoquininas BAP (1 mg/l) y Zeatina (1 mg/l). Se seccionaron en explantes con 2 y 3 entrenudos, se cortaron las raíces, los brotes laterales y se eliminaron las hojas cloróticas. Los reguladores de crecimiento se aplicaron durante un mes y luego las plántulas se traspasaron a un medio de mantención ([cuadro 2](#)). La tasa de multiplicación se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de multiplicación: } \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de plántulas} + \text{N}^{\circ} \text{ total de brotes}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de plántulas}}$$

Para el enraizamiento se utilizaron explantes y brotes provenientes del ensayo de multiplicación. En primer lugar se evaluó el efecto de la remoción del HC sobre el enraizamiento, y luego se ensayaron

distintas concentraciones de la auxina IBA (0-0,05-0,1-0,15-0,2 mg/l). El tratamiento hormonal se aplicó durante un mes, y después los explantes se traspasaron a un medio de formación de raíz ([cuadro 2](#)).

CUADRO 2

Composición de los medios de cultivos para micropropagación de quillay a partir de semillas.  
Composition of the culture medium used for the micropropagation of quillay at the seed stage.

	MS <sup>1</sup>	Medio establecimiento	Medio mantención	Medio multiplicación	Medio estimulación de raíz	Medio formación de raíz
Macronutrientes						
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	825	825	825	825	825
KNO <sub>3</sub>	1.900	950	950	950	950	950
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	370	185	370	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	85	85	85	85
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	440	22	22	22	22	22
Micronutrientes						
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3	22,3
KI	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
NaMoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
Quelato de fierro						
Na <sub>2</sub> EDTAx2H <sub>2</sub> O						
FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3	37,3
	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
Vitaminas						
Ac. ascórbico						
Ac. nicotínico	0	50	50	50	50	50
Piridoxina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tiamina-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Glicina	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	2	2	2	2	2	2
Comp. orgánicos						
Mioinositol						
HC	100	100	100	100	100	100
L-Glutamina	0	0	100	100	0	0
L-cisteína	0	0	150	150	150	150
Azúcar	0	0	0,01	0,01	0,01	0,01
Agar Midesa®	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000	30.000
	6.000	6.000	6.000	6.000	6.000	6.000
Reguladores crecimiento						
IBA	0	0	0	0	0,1	0
BAP	0	0	0	1	0	0
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8

*Ensayos de aclimatación de plantas de quillay enraizadas:* para los ensayos de aclimatación se utilizaron plantas enraizadas de un tamaño de aproximadamente 7 cm. Las plantas fueron extraídas de los medios de cultivo sólidos, eliminándose el agar con agua corriente. Luego, éstas se sumergieron en una solución con el fungicida Ridomil 0,5 g/l y se plantaron en un sustrato de vermiculita (6 mm) en contenedores plásticos de 1 l. Las plantas se cultivaron durante dos meses en una cámara de crecimiento Sanyo a temperatura constante de 20°C, luz continua de 25  $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$  y humedad relativa de 90%, la cual se disminuyó progresivamente a 50%. Se efectuaron riegos diarios con agua potable y 2 veces por semana con solución 1/4 (un cuarto de macronutrientes y micronutrientes completos). Luego de 2 meses en cámara de cultivo, se trasplantaron a un invernadero en maceteros de plástico de 3 l con sustrato tierra:perlita:corteza de pino compostada (Gromor® 6 mm), y se cubrieron con malla de sombra para disminuir la pérdida de humedad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

*Germinación y desinfección de semillas:* se ha descrito que para la germinación de semillas de quillay es necesario que éstas sean sometidas a un golpe de frío y humedad (Wiberg 1991). Esta etapa, llamada estratificación (Salisbury y Ross 1994), se ha realizado habitualmente embebiendo las semillas en agua y manteniéndolas a 4°C entre 48 a 60 horas. Durante esta etapa, la semilla se encuentra sumergida en agua activándose su metabolismo y, posiblemente, el de agentes contaminantes. Con el objetivo de determinar la incidencia del proceso de estratificación en la contaminación de las semillas *in vitro*, se realizaron ensayos de estratificación seca en el medio de cultivo después de la desinfección y estratificación en húmedo antes de la desinfección.

Los resultados presentados en el [cuadro 1](#) indican que los tratamientos con etanol no eliminan la contaminación y reducen la germinación de las semillas de quillay. En las semillas estratificadas en humedad, el hipoclorito de sodio al 1,5% reduce la contaminación pero afecta la germinación. Concentraciones más bajas de hipoclorito de sodio no controlaron la contaminación fúngica ni bacteriana, la cual se incrementó durante la estratificación en humedad. Por lo tanto, la estratificación en humedad favorece la contaminación y sensibiliza las semillas a los desinfectantes utilizados.

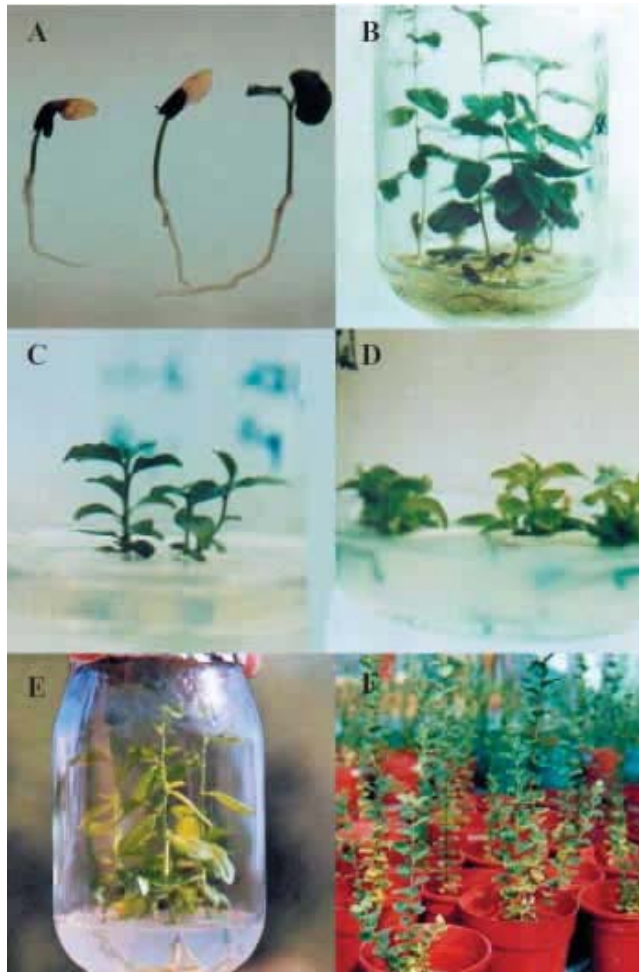
En los ensayos de desinfección de semillas secas se observó que una alta concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  afectó fuertemente el porcentaje de germinación de las semillas ([cuadro 1](#)). Sin embargo, al utilizar concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de 60 volúmenes (por 6 min) se obtuvo un 90% de germinación y un 52% de contaminación, principalmente debida a hongos. Esto indica que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  controló principalmente la contaminación bacteriana y que un 1,4% de hipoclorito de sodio no fue suficiente para eliminar los hongos. Al incrementar la concentración de hipoclorito de sodio al 2%, sobre la base de un tratamiento con 60 volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se obtuvo un 79% (158 de 200) de germinación y sólo un 8% (16 de 200) de contaminación de las semillas. Estos resultados permiten definir que se debe realizar la desinfección de las semillas secas y posteriormente su estratificación en medio MS sólido. El protocolo de desinfección es: Dithane 5 g/l por 25 min, hipoclorito de sodio al 2% por 10 min y 60 volúmenes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 6 min, cada aplicación seguida de 3 enjuagues con agua destilada estéril.

Este protocolo fue validado con 500 semillas de 5 árboles (precordillera VIII Región y RM). Los resultados indican que la germinación depende del árbol madre fluctuando entre 61 y 92%. El establecimiento de las plantas germinadas, que se evaluó a través de su crecimiento, también varió de acuerdo al genotipo del árbol madre. El porcentaje de plantas que elongaron de 2-4 cm/mes fluctuó entre 23 y 83% en los distintos genotipos. También se registraron diferencias importantes en el estado nutricional y en el enraizamiento espontáneo de las plántulas. Los resultados indican que el éxito de la germinación *in vitro* de semillas de quillay, el crecimiento de las plántulas y el enraizamiento se encuentran estrechamente relacionados con el origen materno de las semillas.

En la [figura 1A](#) se observa la secuencia de germinación de una semilla de quillay, destacándose la emergencia de la radícula primaria y el hipocótilo. Después de 2 meses, se produce la formación de plántulas con 5-6 entrenudos y de 6 a 7 cm de tamaño ([figura 1B](#)). Estas plántulas se seccionaron y se



traspasaron a un medio de establecimiento ([figura 1C](#)).



**Figura 1:** Etapas de la micropropagación de quillay a partir de semillas. A. Germinación de semillas de quillay. B. Plántulas de quillay obtenidas a partir de semillas. C. Explantes obtenidos de plántulas de quillay. D. Multiplicación de explantes de quillay. E. Enraizamiento de plántulas de quillay, desarrollo radicular. F. Plantas de quillay en invernadero.

Micropropagation steps of Quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) seeds. A. Quillay seeds germination. B. Quillay seedling plants obtained from the seed. C. Quillay stem cuttings obtained from the seedlings. D. Quillay stem cuttings multiplication. E. Quillay seedlings rooting, rooting system development. F. Quillay plants in greenhouse.

**Suplemento nutricional:** en las plántulas de quillay cultivadas *in vitro* aparecieron síntomas de clorosis aproximadamente a las 6 semanas de cultivo. Para determinar la causa de ésta se realizó un análisis de nutrientes de plántulas y brotes de quillay obtenidos de semillas cultivadas *in vitro*. El análisis foliar del material clorótico arrojó una marcada deficiencia de nitrógeno metabólico, 56% comparado con un 93%



del material proveniente de plántulas verdes. Sin embargo, los valores de nitrógeno nítrico o nitrógeno amoniacal fueron normales. Además, tanto en las muestras de material clorótico como verde se encontró deficiencia de magnesio. Los valores normales de magnesio en plantas van de 0,1-0,8% en tejido seco ([Salisbury y Ross 1994](#)), sin embargo en las muestras *in vitro* se registró un valor de 0,06%.

Con el objetivo de aumentar la cantidad de nitrógeno metabólico disponible para los brotes de quillay mantenidos *in vitro* y diseñar un medio de crecimiento, se ensayaron distintas concentraciones de HC y Glutamina. Además, se evaluó el efecto de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) suplementario. En el [cuadro 3](#) se observa que plántulas sometidas a tratamientos con mayor concentración de HC (100 mg/l y mayores) presentan un mejor estado nutricional pero un bajo porcentaje de raíces y menor tamaño. Suponemos que al no formar raíces se dificulta la absorción de nutrientes, lo que se traduce en un mal transporte de éstos y en un crecimiento deficiente. La ausencia de raíces en los medios con mayores concentraciones de HC se podría deber a que las plántulas detectan la presencia de un exceso de compuestos orgánicos, lo que inhibiría la maquinaria celular encargada de formar raíces. Esto explicaría por qué en ausencia o una concentración baja de HC se promueve la formación de raíces. De este modo, una plántula que enraíza en un medio nutricional pobre crece en forma adecuada, pero el crecimiento en estas condiciones se acompaña de un déficit nutricional. Sin embargo, al adicionar al medio de cultivo Glutamina (150 mg/l), manteniendo 100 mg/l de HC, se observó una disminución importante de la clorosis, aumentó del enraizamiento y elongación del tallo ([cuadro 3](#)). Esta respuesta se explica dado que la Glutamina es el aminoácido que aporta la mayor fuente de nitrógeno en forma de amonio, y al ser incorporado directamente al medio de cultivo permite reducir el gasto energético de las plántulas para la síntesis de aminoácidos y, posiblemente, aumentar la división celular. Además, se observó que el tratamiento con 370 mg/l de magnesio disminuye la clorosis y aumenta la formación de raíces en comparación con el control. El medio recomendado para mantener y elongar de plantas de quillay se presenta en el [cuadro 2](#).

CUADRO 3

Evaluación de requerimientos nutricionales orgánicos e inorgánicos en el cultivo *in vitro* de plántulas provenientes de semillas de quillay.

Evaluation of organic and inorganic nutrients of the *in vitro* culture of quillay seedlings grown from seed.

Tratamientos	Componentes del medio <sup>1</sup>	N° plantas con clorosis <sup>4</sup> /Total (%)	N° plantas con raíz/Total (%)	N° de plantas elongadas <sup>5</sup> /Total (%)
HC	0	34/113 (30)	26/113 (23)	60/113 (53)
	30 mg/l	35/125 (28)	21/125 (17)	55/125 (44)
	100 mg/l	9/90 (10)	10/90 (11)	32/90 (36)
	200 mg/l	11/110 (11)	10/110 (9)	25/110 (23)
	300 mg/l	8/100 (8)	0/100 (0)	20/100 (20)
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ <sup>2</sup>	0	3/80 (4)	16/80 (20)	36/80 (45)
	370 mg/l	8/80 (10)	12/80 (15)	34/80 (43)
	555 mg/l	16/80 (20)	16/80 (20)	28/80 (35)
Glutamina <sup>3</sup>	0	19/80 (24)	20/80 (25)	30/80 (38)
	150 mg/l	13/80 (16)	29/80 (36)	37/80 (46)

1. El medio basal corresponde al medio de establecimiento descrito en la [cuadro 1](#).

2. En todos los tratamientos se utilizaron 100 mg/l de hidrolizado de caseína.

3. En todos los tratamientos se utilizaron 370 mg/l de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (Ver [cuadro 1](#)) y 100 mg/l de hidrolizado de caseína.

4. Corresponde a clorosis de hojas basales y apicales.

5. El porcentaje de elongación corresponde a las plantas que presentaron crecimiento de 2 o más entrenudos.

*Multiplicación y enraizamiento de plantas:* con el objetivo de multiplicar las plántulas de quillay se realizó la inducción durante un mes de brotes laterales utilizando BAP (1 mg/l) y Zeatina (1 mg/l) en concentraciones ajustadas en ensayos previos (datos no mostrados). En el [cuadro 4](#) se observan los resultados del ensayo de multiplicación, aplicados a plantas crecidas por 2 meses en el medio de mantención (sin reguladores de crecimiento). La citoquinina BAP (1 mg/l) fue la más adecuada para esta etapa, ya que se obtuvo una tasa de multiplicación de 3 brotes/mes, con un menor porcentaje de clorosis y callo en los brotes obtenidos. En la [figura 1D](#) se observan plántulas de quillay con brotes laterales en un medio sin hormonas, luego de un mes de inducción con BAP.

Durante el enraizamiento se observó un efecto inhibitorio del HC sobre la formación de raíces, por lo cual se evaluó la remoción de este suplemento. En el [cuadro 5](#) se observa un incremento en la capacidad espontánea de formar raíces en un medio sin HC (30%, 16 de 52 plantas) por sobre el control con HC (1,9%, 1 de 52 plantas). Sin embargo, esto último se acompañó de un mayor porcentaje de plantas que presentaron clorosis. No tenemos conocimiento del por qué plantas arraigadas presentan clorosis en sus hojas, ello puede reflejar incompletos requerimientos nutricionales o condiciones ambientales adversas.

Con el objetivo de inducir raíces en las plántulas obtenidas de semillas de quillay sin comprometer su estado nutricional, se realizó un ensayo con distintas concentraciones de IBA por un mes en un medio de mantención sin HC. En el [cuadro 5](#) se observa que a una concentración de 0,1 mg/l de IBA se obtiene el mayor porcentaje de enraizamiento (59%, 28 de 48), lo cual es consistente con el mayor porcentaje de elongación (70%, 34 de 48). En la figura 1E se observan plántulas con raíces después de 2 meses de inducción con IBA 0,1 mg/l. Luego de 3 meses en el medio sin HC, las plántulas con raíces fueron trasplantadas al medio de mantención con HC, de modo de alcanzar un óptimo estado nutricional previo a la aclimatación en invernadero. Basándose en los resultados obtenidos, se postula que se debe incluir HC (100 mg/l) al inicio del cultivo para nutrir inicialmente el explante, luego removerlo para inducir raíces y finalmente trasplantar las plántulas enraizadas a un medio con HC para obtener un establecimiento adecuado.

#### CUADRO 4

Efecto de BAP y Zeatina en la inducción de brotes en plántulas obtenidas del cultivo in vitro de semillas de quillay.

Effects of BAP and zeatine in shoot induction in seedlings from in vitro culture of quillay seeds.

Tratamiento	Tasa de multiplicación	N° plantas con clorosis/Total (%)	N° plantas con raíz/Total (%)	N° plantas con callo basal/Total (%)
Medio de mantención <sup>1</sup>	1,1	44/80 (55)	3/80 (4)	0/80 (0)
BAP 1 mg/l	3	28/80 (35)	8/80 (10)	37/80 (46)
Zeatina 1 mg/l	2,2	29/80 (36)	5/80 (6)	42/80 (52)

1. El medio de mantención es el descrito en la [cuadro 1](#).

#### CUADRO 5

Efecto de la remoción de hidrolizado de caseína e IBA en el enraizamiento de brotes obtenidos del cultivo in vitro de semillas de quillay.

Effects of casein hydrolysate removal and IBA treatment in the rooting of shoots obtained from in vitro

culture of quillay seeds.

Tratamiento	Componentes del medio de cultivo	Nº plantas con raíz /Total (%)	Nº plantas con clorosis/Total (%)	Nº plantas elongadas <sup>3</sup> /Total
HC	Medio de mantención <sup>1</sup> sin HC	1/52 (2) 16/52 (31)	10/52 (19) 12/52 (23)	8/52 (15) 15/52 (29)
IBA	Medio de enraizamiento <sup>2</sup>	14/48 (29)	12/48 (25)	19/48 (40)
	0,05 mg/l de IBA	15/48 (31)	7/48 (15)	32/48 (67)
	0,1 mg/l de IBA	28/48 (58)	9/48 (19)	34/48 (71)
	0,15 mg/l de IBA	23/48 (48)	9/48 (19)	24/48 (50)
	0,2 mg/l de IBA	23/48 (48)	9/48 (19)	27/48 (56)

1. El medio de mantención contiene 100 mg/l de hidrolizado de caseína.

2. El medio de enraizamiento no posee hidrolizado de caseína.

3. El porcentaje de elongación corresponde a las plantas que presentaron crecimiento de 2 o más entrenudos.

*Aclimatación de plantas enraizadas:* las plántulas enraizadas in vitro fueron traspasadas a sustrato vermiculita y se mantuvieron por 2 meses en una cámara de cultivo con alta humedad. Esta comenzó en un 90% y se disminuyó progresivamente hasta un 50%, previo del traspaso a invernadero. En esta etapa ocurrió una pérdida del 24% de un total de 102 plantas, lo cual se debió principalmente a deshidratación. Seis meses después del traspaso a invernadero, las plantas establecidas poseen un tamaño que fluctúa entre 20 y 70 cm, presentando hojas verdes y activo crecimiento (figura 1F). Se destaca que en esta etapa sólo se registró un 4% (3 de 77 plantas) de pérdida de las plantas traspasadas a invernadero, lo cual indica que el proceso de aclimatación resultó exitoso. Hasta la fecha, en nuestro laboratorio hemos producido 120 plantas en invernadero, las que presentan un excelente estado nutricional y crecimiento normal. En ensayos posteriores se evaluará la calidad de saponinas de estas plantas y se comparará con la de los árboles progenitores. Además, se determinará la variación genotípica presente en estas plantas, obtenidas mediante micropropagación, a través de análisis con marcadores moleculares.

## CONCLUSIONES

Como conclusión de los protocolos desarrollados en este trabajo se puede resumir que a partir de 100 semillas de quillay se establecen 79, las cuales en medio MS con 1 mg/l de BAP se triplican en un mes. Cultivos establecidos por 3 años presentan una tasa de multiplicación de 6 (datos no mostrados). Aproximadamente un 60% de los propágulos estimulados con IBA enraízan en *in vitro*, formando el resto un callo rizogénico. Durante la aclimatación se registran pérdidas (24% de 140 plantas aclimatadas en el ensayo) por una alta susceptibilidad a la deshidratación de las plantas y posteriormente en invernadero puede ocurrir una pequeña pérdida adicional (4% en nuestro caso).

## AGRADECIMIENTOS

A Berta Puebla y Pamela Flores por su contribución técnica en el desarrollo de este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

BOMBARDELLI, E., G. PATRI & R. POZZI. 1988. "Complexes of saponins with phospholipids and pharmaceutical and cosmetic compositions containing them", *Eur. Pat. Application EP*. 283: 713.

CAINELLI, G., V. PETRICEVICH, I. RAU & W. DA SILVA. (1995). "Effect of saponins *Quillaja saponaria* Molina on antibody, tumor necrosis factor and interferon-gamma production", *Biotechnol. Appl. Biochem.* 22: 31-37.

- CHAVALI, R. & J. CAMPBELL. 1987a. "Immunomodulatory effects of orally-administered saponins and nonspecific resistance against rabies infection", *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 84: 129-134.
- CHAVALI, R. & J. CAMPBELL. 1987b. "Adjuvant effects of orally administered saponins on humoral and cellular immune response in mice", *Immunobiology* 174: 347-359.
- CHEEKE, P. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impact on animal production. In: *Saponins Used in Food and Agriculture*. Ed. Waller and Yamasaki, Plenum Press, New York. pp 377-385.
- DALSGAARD, K., M. HENRY, R. SAN MARTIN, H. GRANDE & S. KAMSTRUP. 1995. Saponins with adjuvant activity. PCT Int. Appl. WO 95 09,179.
- HOFFMANN, A. 1995. *Flora silvestre de Chile: Zona Central*. 3ª edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. El Mercurio, Santiago de Chile.
- KENSIL, Ch., U. PATEL, M. ALNICO & D. MACRON. 1991. "Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex", *J. Immunol.* 146: 431-437.
- KENSIL, Ch. 1996. "Saponins as vaccine adjuvants", *Critical Review in Therapeutic Drugs Carrier System*. 13: 1-55.
- LARA, A. 1997. "Catastro de vegetación nativa, la fuerza de los resultados", *Bosque Nativo*. 15: 32-35.
- MITRA, D. & S. DUNGAN. 1997. "Solubilization properties of cholesterol in quillaja saponins solutions". *AIChE Annual Meeting Session 71*. Paper 71 F.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. "A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- NAGASAKA, M. 1995. "Effects of dosing quillaja saponins on wastewater from marine products industry", *Ibaraki Daigaku Kogakubu Kenkū Shuho*. 43: 97-103
- NEWMAN, M. 1992. "Immunogenicity and toxicity testing of an experimental HIV-1 vaccine in nonhuman primates", *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 8: 1413-1418.
- OSBOURN, A. 1996. "Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack", *Plant Cell*. 8: 1821- 1831.
- JP 7112939 Patente Japonesa. 1995. Cellular immune potentiator for mammals and poultry-comprises bark extracts of *Quillaja saponaria* Molina.
- SALISBURY, F. & C. ROSS. 1994. *Fisiología Vegetal*. 4ª edición. Grupo Editorial Iberoamericana, México, pp. 132, 144, 542.
- WU, J. 1992. "Saponins adjuvants enhancement of antigen specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine", *J. Immunol.* 148: 1519-1525.
- WIBERG, S. 1991. Factores que influyen en la germinación y producción de plantas de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.). Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad de Chile.

