

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES**  
**ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES**  
**DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA**

**CULTIVO *IN VITRO* DE**  
***Atriplex halimus***

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**CYNTHIA ISABEL BRAVO MALDONADO**

Profesor Guía: Ing. Forestal, Sr. Angel Cabello Lechuga

**SANTIAGO - CHILE.**  
**2003**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y FORESTALES  
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES  
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA

CULTIVO *IN VITRO* DE  
*Atriplex halimus*

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Forestal

**Cynthia Isabel Bravo Maldonado**

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía: Sr. Angel Cabello L.	6,0	.....
Prof. Consejera Sra. Adelina Manríquez L.	6,0	.....
Prof. Consejero Sr. Rodrigo Infante E.	6,5	.....

SANTIAGO – CHILE.  
2003

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres  
Mis hermanos  
Mi esposo e hijo**

Deseo expresar mis agradecimientos.....

Al señor Angel Cabello, por su constante orientación y recomendaciones durante el transcurso de esta memoria, su apoyo, consejo y ayuda.

Al señor Sergio Lailhacar, por su excelente disposición y ayuda siempre.

Al señor Piere Bertin, por enseñarme a trabajar en cultivo *in vitro*, sin lo cual esta memoria no podría haberse realizado.

Al proyecto de la Comunidad Económica Europea STD3 N° TS3\*CT94-0264: "Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones", por el aporte financiero otorgado a esta investigación.

A la señora Mónica Rallo por su ayuda y disponibilidad siempre.

A mis padres Susana y Raúl, por su constante apoyo, estímulos, fortalezas, consejos y amor entregados durante toda mi vida.

A mis hermanos Vanessa y Rubén, por darme fuerzas, amor y alegrías cuando las necesitaba.

A mi hijo Raúl, por su amor incondicional de niño. Y a mi esposo Cardenio, por su paciencia, ayuda, apoyo y amor.

A Guillermo por su amistad y constante apoyo, y a su familia por su preocupación y cariño.

A Pablo y Andrea por su amistad, ayuda y consejos.

Al personal de biblioteca por su colaboración y ayuda en la búsqueda de información.

Y a todos aquellos que de una u otra manera contribuyeron a la realización y término de esta memoria.

## ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. EL GÉNERO <i>ATRIPLEX</i> .....	3
2.2. <i>ATRIPLEX HALIMUS</i> .....	3
2.2.1. Descripción de la especie .....	3
2.2.2. Distribución y hábitat .....	3
2.2.3. Usos .....	4
2.2.4. Métodos de propagación .....	5
2.2.5. <i>Atriplex halimus</i> en Chile .....	5
2.3. CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	6
2.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Atriplex</i> .....	9
2.4. ACLIMATACIÓN .....	12
3. MATERIAL Y MÉTODO .....	14
3.1. MATERIAL VEGETAL .....	14
3.2. PREPARACIÓN DE LOS EXPLANTES .....	15
3.3. DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES .....	15
3.4. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE TRABAJO .....	15
3.5. COMPOSICIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	16
3.6. INSTALACIÓN DE LOS EXPLANTES Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	16
3.6.1. Efecto de la posición del explante y aplicación de citoquininas sobre la elongación del tallo y la formación de brotes .....	17
3.6.2. Enraizamiento de los brotes obtenidos del cultivo de tejidos .....	17
3.6.3. Aclimatación de los brotes enraizados obtenidos del cultivo de tejidos .....	17
3.7. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	18
4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	20
4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS MADRES .....	20
4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS EXPLANTES .....	20
4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN .....	22
4.3.1. Primer mes de cultivo .....	22
4.3.2. Subcultivos .....	24
4.3.2.1. <u>Contaminación</u> .....	24
4.3.2.2. <u>Muerte y oxidación de los brotes</u> .....	27
4.3.2.3. <u>Sobrevivencia</u> .....	29

4.3.2.4. <u>Activación de yemas</u> .....	30
4.3.2.5. <u>Factor de multiplicación</u> .....	31
4.3.2.6. <u>Crecimiento de los brotes</u> .....	36
4.3.2.7. <u>Enraizamiento</u> .....	37
4.4. ACLIMATACIÓN .....	39
5. CONCLUSIONES .....	43
6. BIBLIOGRAFÍA .....	45

## RESUMEN

En enero de 1998, se colectaron ramillas de 4 individuos de *Atriplex halimus* (procedencia CU-690, de la Cuenca del Mediterráneo), plantados en 1981 en el Centro Experimental "Las Cardas" (IV Región de Chile) y sometidos a una corta a 25 cm del suelo realizada en 1994. De las tres procedencias allí instaladas, CU-690 presenta los mejores rendimientos en fitomasa aérea y leñosa.

Con el material colectado, se establecieron ensayos para determinar si la posición del "explante" en la ramilla y la aplicación de una citoquinina, afectan la producción de brotes, con vista a la propagación vegetativa *in vitro*.

De las ramillas se cortaron segmentos apicales y nodales, de 0,5 a 1,5 cm (con 1-2 yemas axilares) se desinfectaron en alcohol, formaldehído e hipoclorito de calcio, y se cultivaron 30 días, a 22°C y 12 hr de luz, con los macro y microelementos del medio MS, las vitaminas de Morel, 20 g de sacarosa, 8 g de agar, un pH 5,8, con o sin regulador de crecimiento (BAP 0,1 mg/l). Posteriormente, cada 4 semanas, fueron repicados sobre medio MS sin BAP.

El porcentaje de contaminación al cabo del primer mes no superó un 22,50%; sin embargo, sólo un 34,17% de los segmentos nodales y 25,00% de los apicales sobrevivieron y se desarrollaron, pues la mayoría se oxidó durante los 10 primeros días del cultivo. Considerando todo el ensayo, la contaminación fue bajando con los subcultivos, logrando un 2,62%.

Al término del ensayo, la tasa de multiplicación fue de 1,27 y 12,05 para los segmentos apicales y nodales, respectivamente y cultivados inicialmente sin BAP; de los cultivados con BAP, la tasa de multiplicación fue de 30,33 y 4,14 para los apicales y nodales. En promedio, un 62,26% de los brotes enraizó sin aplicar auxinas; el mayor enraizamiento, 64,41%, fue obtenido por los brotes originados por segmentos apicales tratados inicialmente con BAP 0,1 mg/l.

El proceso de aclimatación comenzó con buenos resultados, pero al final no fue exitoso, sobreviviendo sólo 9 "plantlets" de un total de 180.

## SUMMARY

In January of 1998, small shoot was collected of 4 individuals of *A. halimus* (origin CU-690, of the Mediterranean Basin), planted in 1981 in the Experimental Center "Las Cardas" (IV Region of Chile) and subject a short one to 25 cm of the floor carried out in 1994. Of the three origins there installed, CU-690 presents the best yields in aerial and woody phytomass.

With the collected material, essays were fulfilled in order to determine if the position of the "explants" in the small shoot and the application of a cytokinin, affect the production of axillar buds, for *in vitro* vegetative propagation purposes.

Apical and nodal segments, 0,5 to 1,5 cm long (with 1-2 axillar buds) were disinfected in alcohol, formaldehyde and calcium hypochlorite, and were grown at 22°C and 12 hr of light for 30 days, with the macro and microelements of the means MS, vitamins of Morel, 20g of sucrose, 8 g of agar, a pH 5,8, with or without growth regulator (BAP 0,1 mg/l). Every 4 weeks they were peeled on half MS without BAP.

Contamination percent after the first month didn't exceed 22,50%; however, only 34,17% of the segments nodal and 25,00% of the apical ones survived and developed, since most oxidized during the first 10 days.

At the end of the experiment, multiplication rates were 1,27 and 12,05 for the apical and nodal segments, respectively when grown without BAP; while these of the cultivated with BAP, the multiplication rates was of 30,33 and 4,14, respectively. The contamination, decreased, achieving 2,62% for the whole essay. On the average, 62,26% of the buds developed roots, without applying auxins; the highest rooting rate (64,41%), was obtained with buds from apical segments treated with BAP 0,1 mg/l.

The acclimatization was good initiate, but it was not efficient. Surviving only 9 plantlest from to 180.

## 1. INTRODUCCIÓN

La desertificación es un problema ambiental internacional que corresponde a la degeneración de ecosistemas en regiones áridas y semiáridas, medida mediante la pérdida de productividad y/o biodiversidad de especies.

En Chile, las zonas áridas y semiáridas ocupan más de la cuarta parte del territorio nacional, con un alto nivel y avance de la desertificación. Estas regiones presentan una elevada tasa de sobrepastoreo de las comunidades vegetales, observándose que las especies nativas apetecidas por el ganado son cada vez más escasas, persistiendo aquellas poco o nada palatables. Por ello en el ámbito social, estas regiones áridas y semiáridas se caracterizan por ser las más pobres del país. Para lograr un desarrollo y una actividad ganadera positiva, que es la base de la economía, se necesita forestar de manera adecuada las regiones afectadas y así elevar el nivel social del sector (Vita, 1989).

Los arbustos del género *Atriplex*, constituyen especies adecuadas para forestar o reforestar estas zonas debido a la tolerancia que presentan a niveles altos de salinidad y su resistencia a la sequía. Además por poseer un alto contenido de nutrientes, especialmente de proteínas, y una elevada palatabilidad, sirven como alimento para el ganado en períodos de baja disponibilidad de pastos en praderas. Inclusive, mirado desde una perspectiva ambiental, estos arbustos disminuirían el porcentaje de suelo perdido, principalmente por erosión eólica, ofreciendo importantes posibilidades en la lucha contra la desertificación (Olivares, 1983).

En Chile el género *Atriplex* se encuentra representado por especies nativas como *A. atacamensis* Phil., *A. repanda* Phil., *A. deserticola* Phil., *A. mucronata* Phil. y exóticas como *A. canescens* (Pursh.) Nutt., *A. undulata* D. Dietr., *A. nummularia* Lindl. y *A. halimus* L., entre otras. Esta última especie ha dado buenos resultados en la alimentación del ganado y reforestación en zonas áridas y semiáridas de nuestro país.

Sin embargo, las poblaciones de *Atriplex halimus* son muy heterogéneas, por ello es necesario seleccionar los individuos que presenten una mayor resistencia a la aridez y a la salinidad, al igual que características forrajeras favorables para su propagación y posterior reforestación. Por consiguiente, es necesario estudiar las técnicas de propagación adecuadas, dentro de las cuales se encuentra el cultivo *in vitro*, que permitan obviar los problemas de heterogeneidad causado por la propagación por semillas.

El cultivo *in vitro* consiste en el desarrollo de plantas enteras en un medio artificial, en condiciones de asepsia, a partir de proporciones pequeñas de la planta madre (fuente del material). Gracias a este método, se obtienen plantas libres de virus o enfermedades, logrando una mayor producción de individuos en un período de tiempo menor y se puede conseguir un mejoramiento genético de la especie.

Por los antecedentes anteriormente expuestos, el principal objetivo de esta memoria fue propagar vegetativamente, mediante el cultivo *in vitro* de segmentos apicales y nodales, la procedencia CU-690 de *Atriplex halimus* cultivada en la Estación Experimental Las Cardas.

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar el efecto de la ubicación del “explante” en la ramilla para el cultivo.
- Evaluar el efecto del BAP (citoquinina) en la elongación del tallo y activación de yemas.
- Determinar el potencial de producción de brotes *in vitro* de *Atriplex halimus* CU-690.
- Evaluar el efecto de la longitud del tallo y el medio de aclimatación sobre la sobrevivencia *ex vitro*.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. EL GÉNERO *ATRIPLEX*

El género *Atriplex* pertenece a la familia Chenopodiaceae, que consta de 417 especies, de las cuales 21 son nativas de Chile (Rosas, 1989). Las especies del género se distribuyen ampliamente en las zonas templadas y subtropicales del globo (Rosas, 1989; Serra, 1989; Rivera, 1996). En Chile se encuentran en las zonas áridas del norte del país, en las regiones de Tarapacá, Antofagasta, Atacama y Coquimbo (Rosas, 1989; Rivera, 1996).

### 2.2. *ATRIPLEX HALIMUS*

#### 2.2.1. Descripción de la especie

Los arbustos de *Atriplex halimus*, alcanzan una altura de 1 a 3 m, son muy ramificados, con un diámetro de copa de 1 a 3 m. Son perennes, de crecimiento variable, erguidos o postrados, intrincados, de color gris-blanquecino. Sus hojas de 10-30 x 5-20 mm de tamaño, con forma variable, de lanceoladas a orbiculares, pecioladas, alternas u opuestas, más o menos carnosas, brillantes, cubiertas de pelos vesiculares blanquecinos. Sus inflorescencias de tamaño pequeño, se presentan en panículas terminales y son de color amarillo. Sus flores son hermafroditas, masculinas con varios tépalos diminutos y femeninas sin tépalos, con dos bractéolas de forma ovoide. Con 3 a 5 estambres, tecas amarillas muy pequeñas y ovario súpero con 2 estigmas filiformes (FAO, 1971, citado por Cabello y Vita, 1980; Darnaude, 2003).

Florece de junio a septiembre y fructifica de noviembre a abril (hemisferio norte). Sus frutos son aquenios ovoides y comprimidos, protegidos por dos valvas reniformes, enteras, lovuladas o cortamente dentadas, lisas, de aspecto pulverulento, de 2-3,5 x 2,5-6 mm y soldadas en la base. Sus semillas presentan un diámetro de 1-2 mm, de forma orbicular, comprimidas lateralmente, de color blanco pulverulento (Navarro y Gálvez, [s.a.]).

#### 2.2.2. Distribución y hábitat

La especie *Atriplex halimus*, es originaria de toda la región mediterránea (sur de Europa y norte de Africa), costas del Atlántico y de la Mancha (Navarro y Gálvez, [s.a.]).

Habita en zonas cuya precipitación media anual varía entre 1.200 y 300 mm, con temperatura media diaria del mes más frío entre 7°C y 1°C. Crece bien tanto en suelos sin sales como en salinos, tolerando concentraciones de hasta 30 g/l de NaCl. Se encuentra a los pies de los cerros, en afloramientos de margas medianamente yesosas, afloramientos salinos, suelos áridos y estepáricos sometidos al rocío marino o suelos halomorfos, generalmente alcalinos y de textura fina, y vertisoles salinos (FAO, 1971, citado por Cabello y Vita, 1980).

### 2.2.3. Usos

*Atriplex halimus* se utiliza como forraje de reserva en la época de escasez de gramíneas y hierbas anuales, en las regiones áridas, semiáridas y subhúmedas de la región Mediterránea y del Medio Oriente. En Africa del Norte ha sido utilizada desde hace mucho tiempo como forraje para el ganado, especialmente en zonas áridas. Es consumida principalmente por ovejas, también por cabras, vacunos, animales de caza mayor, camellos, conejos (crianza industrial) y gallinas (consumen ávidamente los brotes terminales) (Cabello y Vita 1980).

El beneficio de las plantaciones de *A. halimus*, no sólo se limita al mayor aporte de forraje que estas producen, sino que debe sumarse el efecto, generalmente favorable, que tienen en el comportamiento del estrato herbáceo asociado. Estudios confirman que los arbustos de *Atriplex* contribuyen a aumentar la fertilidad del suelo subyacente a través del depósito de su propio mantillo, ya que entrega materia orgánica y nutrientes al suelo superficial, que provienen de los estratos profundos del suelo, que las raíces de las plantas herbáceas no alcanzan (Torres, 1999; Lailhacar y Torres, 2000). Además mejorar las condiciones microclimáticas inmediatas, reduciendo el efecto de heladas en invierno y brindando sombra, disminuyendo la temperatura y aumentando la humedad del suelo, principalmente en verano, sobre todo en localidades costeras expuestas a la acción de la camanchaca, al actuar como “atrapaniebla”.

También se emplean en la fijación de terrenos arenosos, protección de suelos erosionados por el viento y para mejorar la fertilidad y permeabilidad de ellos (FAO, 1971, citado por Cabello y Vita, 1980). Como la especie requiere grandes cantidades de sal para realizar sus procesos vitales, se utiliza para forestar suelos salinos, siendo muy resistente al estrés hídrico, sobreviviendo en ambientes áridos y semiáridos (Darnaude, 2003).

Un ejemplo es la Fundación Global Nature (2003), que utiliza ejemplares de *A. halimus* para corregir los procesos erosivos y como refugio de la fauna silvestre. Además está experimentando en la construcción de setos vivos en condiciones de aridez.

#### 2.2.4. Métodos de propagación

*Atriplex halimus* se regenera naturalmente de manera satisfactoria, cuando es protegida del sobrepastoreo. Aumentando su valor si se remueve la vegetación sin valor forrajero y posteriormente se efectúa una siembra directa, previo tratamiento pregerminativo de las semillas (FAO, 1971, citado por Cabello y Vita, 1980).

La producción de plantas se realiza a través de estacas o semillas, trabajando en macetas o a raíz desnuda. Las estacas pueden recolectarse de individuos de menos de un año o de podas de rebrotes del año, de plantas de mayor edad. Las estacas se colocan a enraizar en tierra arenosa. Si se trabaja en recipientes, se ponen 3 estacas por maceta. La plantación directa en terreno, debe realizarse a fines de invierno y regar 3 o 4 veces durante el primer mes. En los viveros costeros la reproducción por estacas se realiza a través de todo el año. En cambio, en el interior, se suspende la reproducción vegetativa durante el invierno. Trabajando de esta forma, se obtienen estacas enraizadas y desarrolladas en 3 meses (FAO, 1971, citado por Cabello y Vita, 1980).

Para multiplicar la especie por semillas, se debe realizar un tratamiento pregerminativo. Se recomienda el remojo de ellas en agua, a temperatura ambiente, entre 26 a 36 horas. Durante este período, el agua se cambia 4 veces, con el objeto de eliminar el cloruro de sodio y otras sustancias hidrosolubles presentes en las valvas fructíferas. El número de semillas por kilogramo varía entre 350.000 y 770.000, con un porcentaje de germinación de un 30 a 70% (Cabello y Vita, 1980).

#### 2.2.5. *Atriplex halimus* en Chile

*Atriplex halimus* L. es una especie introducida, poco cultivada en nuestro país. En la Estación Agronómica Las Cardas está representada por tres procedencias de la Cuenca del Mediterráneo: CU-688, CU-689 y CU-690 (Cuadro 1). Los individuos son de buena calidad, con una altura promedio de 2,41 m; un diámetro promedio de 4,68 m y una relación altura/diámetro de 0,52 (Rivera, 1996). El poder calorífico superior (promedio 4.533 kcal/kg) e inferior (promedio 4.237 kcal/kg), es similar en las tres procedencias; en cambio la fitomasa leñosa y aérea total y el rendimiento medio de leña seca, difieren fuertemente. La mejor procedencia es CU-690, pues presenta un 46% de fitomasa leñosa y el mayor rendimiento de leña seca (Lailhacar *et al.*, 1995; Rivera, 1996).

Cuadro 1. Rendimiento medio de leña seca, fitomasa leñosa y aérea total por planta, según procedencia.

Procedencia		CU-688	CU-689	CU-690
Fitomasa leñosa (kg/planta)		6,72	12,42	30,61
Fitomasa aérea total (kg/planta)		26,47	67,41	66,95
Rendimiento medio de leña seca (kg/planta)		7,74	12,69	31,61
Rendimiento medio de leña seca según clase diamétrica (kg/planta)	Diámetro 1,0 a 2,9 cm	6,34	12,08	27,32
	Diámetro 3,0 a 5,9 cm	0,38	0,35	3,15
	Diámetro 6,0 o más cm	0,00	0,00	0,14

Fuente: Modificado de Lailhacar *et al.*, 1995 y Rivera, 1996.

Además, según Lailhacar y Torres (2000), la especie *A. halimus*, ha demostrado adaptarse bien a nuestros pastizales áridos, además de poseer una gran capacidad para regenerarse por si sola cuando está sometidas a ramoneo, característica poco común en las otras especies leñosas del género.

### 2.3. CULTIVO *IN VITRO*

Hartmann y Kester (1980) define éste tipo de cultivo como la producción de plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo, ó en otro recipiente, en que se puedan controlar estrictamente las condiciones ambientales y la nutrición. El cultivo *in vitro* abarca un grupo de técnicas que consisten en el cultivo de tejidos bajo condiciones asépticas. Estas técnicas tienen gran potencial para hacer estudios teóricos de fisiología, bioquímica, morfogénesis y anatomía, así como contribuciones prácticas en la micropropagación y mejoramiento de especies económica y socialmente importantes (Pierik, 1990).

Las principales ventajas de la micropropagación, son la obtención de gran cantidad de plantas en poco espacio y tiempo, durante todo el año, libres de hongos y patógenos, incluso libre de virus, mediante el cultivo de meristemas, utilizando casi cualquier tipo de "explantes", adultos y juvenes, consiguiendo una homogeneidad del material de cultivo. Entre las desventajas, se encuentran el alto costo que implican las instalaciones y la necesidad de una mano de obra especializada, así como la contaminación, que puede afectar a gran parte del material por la mala esterilización tanto del "explante" como del medio de cultivo e instrumental, la aparición de mutaciones y dificultad en la aclimatación (Hartmann y Kester, 1980; Pierik, 1990; Botti, 1998).

Los aspectos fundamentales del cultivo de tejidos vegetales se pueden dividir en dos: aislar los “explantes” (fragmentos de tejidos u órganos vegetales) de una planta madre y proveer un medio de cultivo apropiado para el desarrollo de una nueva planta.

El éxito del cultivo de tejidos está influenciado por factores ambientales, por el estado fisiológico de la planta y, principalmente, por la composición química de los medios de cultivos utilizados (Botti, 1992).

Los medios de cultivos son sustratos gelatinosos o líquidos, constituidos por un conjunto de sustancias orgánicas e inorgánicas y por reguladores de crecimiento de tipo hormonal, en concentraciones y combinaciones determinadas para cada especie, permitiendo el desarrollo de las mismas en condiciones ambientales controladas.

La composición del medio de cultivo es muy importante; debe poseer todas las fuentes nutritivas para el metabolismo de las células y los factores de crecimiento responsables de la diferenciación celular. Contiene macronutrientes como sales de nitrógeno, potasio, calcio, fósforo, magnesio, azufre y hierro; micronutrientes como manganeso, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto, que le sirven a la planta para un adecuado crecimiento. Además, el medio contiene carbohidratos (sacarosa), utilizados como fuente de energía y regulador osmótico (Rossell y Villalobos, 1990).

Las plantas *in vitro* están capacitadas para sintetizar todas las vitaminas que requieren, pero no en las cantidades necesarias para ser utilizadas como cofactores enzimáticos. Por ello, para obtener mejores resultados en el cultivo *in vitro*, se debe incluir al medio compuestos orgánicos como vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. La solución de vitaminas incluye generalmente tiamina (vitamina B1), esencial para el crecimiento de las células vegetales, piridoxina (vitamina B6) y ácido nicotínico (Rossell y Villalobos, 1990).

Los aminoácidos no son esenciales para el crecimiento de tejidos en cultivo *in vitro*, pero se han utilizado experimentalmente (Margara, 1986). Éstos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio (Rossell y Villalobos, 1990).

Los reguladores de crecimiento utilizados en cultivo de tejidos son:

- Auxinas: tienen un papel importante en la elongación y división celular, fomentando el desarrollo de callos (Rossell y Villalobos, 1990). Hartmann y Kester (1980) señalan que la acción fundamental de las auxinas en el cultivo *in vitro* es la inducción de rizogénesis.
- Citoquininas: promueven la división celular y formación de callos. Según Margara (1986) las citoquininas, en pequeñas concentraciones, estimulan la proliferación de los tejidos y a mayores concentraciones desencadenan la neoformación de yemas sobre callos. Pero debido a que generalmente inhiben la rizogénesis, se les utiliza en dosis muy bajas.
- Ácido Giberélico: interfiere en la proliferación celular, ya que su función es favorecer la elongación celular e inducir a la mitosis, lo que conduce a la formación de callos e inhibe la rizogénesis.
- Ácido Abscísico: estimula la sincronización durante la embriogénesis somática en ciertos cultivos, y también inhibe el crecimiento (Rossell y Villalobos, 1990).

Al aislar los “explantes” se debe tener en cuenta que prácticamente con cualquier parte de la planta se puede establecer un cultivo *in vitro*. Sin embargo, el origen del material puede ser determinante para el éxito del establecimiento de los cultivos. Generalmente se seleccionan aquellas partes de las plantas que se encuentran en división activa, como son las regiones meristemáticas (Margara, 1986; Rossell y Villalobos, 1990).

Además es recomendable utilizar plantas jóvenes como fuente de “explantes” y considerar que el tamaño es un factor importante, pues la dificultad para iniciar un cultivo aumenta con la disminución del tamaño del mismo (Rossell y Villalobos, 1990).

Antes del establecimiento de los “explantes” en un medio de cultivo dado, se debe realizar una desinfección del material vegetal, con alcohol, peróxido de hidrógeno, cloruro de mercurio, formalina y/o hipoclorito de calcio o sodio, y una esterilización de los medios de cultivo y material de trabajo por medio de un autoclave.

### 2.3.1. Cultivo *in vitro* de *Atriplex*

#### a) Cultivo de microestacas obtenidas de plántulas originadas por semillas germinadas *in vitro*

Wochok y Sluis (1980), citados por Barrow (1987), obtuvieron buenos resultados en la micropropagación de *Atriplex canescens*, logrando enraizar algunos “explantes”, pero su repique a tierra no fue exitoso.

Barrow (1987) utilizó plántulas de distintas especies de *Atriplex* para el cultivo *in vitro*. Obtuvo los mejores resultados con microestacas de *A. canescens* y *A. griffithsii*. Utilizó el medio BDS modificado del M5 de Gamborg por Dunstan y Short y el medio L2 de Phillips y Collins. En ambos casos empleó distintas concentraciones de BAP (0-4 mg/l), GA<sub>3</sub> (0-4 mg/l) y AIA (0-0,5 mg/l). Las especies formaron callos rápidamente, pero *A. canescens* fue difícil de cultivarlo en el medio BDS. Los “explantes” casi no fueron capaces de enraizar *in vitro*, y los pocos que lo hicieron murieron al ser trasladados al suelo.

Pourrat y Dutuit (1993) cultivaron plántulas obtenidas de la germinación de semillas de *Atriplex halimus*, en 20 medios de cultivo con diferentes concentraciones de sodio y calcio. Todos los medios contenían: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O (15 mg/l), KNO<sub>3</sub> (300 mg/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (13,4 mg/l), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (50 mg/l), los microelementos de Murashige y Skoog (1962), las vitaminas de Morel, sacarosa (20 g/l), Fe-EDTA (0,1 mM/l), agar (8 g/l) y un pH de 5,8. Luego de un mes de cultivo establecieron que pequeñas variaciones de las concentraciones de calcio y sodio, del orden de 0,1 mM, provocaron cambios significativos en los indicadores de crecimiento (número de hojas, largo de tallo y de raíz). Lograron los mejores resultados con una razón Na<sup>+</sup>/Ca<sup>++</sup> igual a uno.

Bessafa (1995) probó el efecto de nitratos y reguladores de crecimiento en plántulas de *Atriplex halimus*. Desinfectó las semillas durante 30 min en una solución de hipoclorito de sodio y las puso a germinar en cápsulas petri, con 4 ml de agua destilada estéril. Luego de cinco días, repicó las plántulas en distintos medios de cultivo. Cada uno contenía los macroelementos y microelementos de Murashige y Skoog, pero los macroelementos diluidos a la quinta parte (concentración 7,89 mM), con o sin modificación en la concentración de nitratos (originando cuatro concentraciones distintas: 3,94; 7,89; 15,78 y 23,67 mM). Además, los medios tenían las vitaminas de Morel (2 ml/l), Fe-EDTA (0,1 mM), sacarosa (20 g/l), los reguladores de crecimiento ANA (0; 0,1 y 1 mg/l) y BAP (0; 0,1 y 1 mg/l) y un pH ajustado en 5,8. Con ellos instaló dos ensayos, uno sin

modificar la concentración de nitratos (ensayo A), y otro con modificación en los nitratos (ensayo B), ambos con reguladores de crecimiento, a una temperatura de 24°C y un fotoperíodo de 12 hr. Luego de 15 días en cultivo, midió el número de hojas, la longitud del tallo y la raíz principal. Después cortó microestacas ( $\pm 0,5$  cm de largo) del segmento apical, incluyendo los cotiledones y los instaló en los mismos medios durante 4 semanas. El mayor porcentaje de callogénesis se logró con ANA 1 mg/l y BAP 1 mg/l, y fue de 37,5% en el ensayo A y 62,5% en el ensayo B, este último con una concentración de nitrato de 23,67 mM. La mayor longitud del tallo se obtuvo con 7,89 mM de nitrato, disminuyendo al aumentar la concentración. El mayor número de hojas (4,65 hojas/planta) se consiguió con una concentración de 7,89 mM de nitrato, sin reguladores de crecimiento. Igualmente, la mayor tasa de enraizamiento (40%) se produjo a una concentración de 7,89 mM de nitrato.

Moran *et al.* (1995), emplearon semillas de *Atriplex halimus* colectadas en dos épocas distintas. Algunas de ellas se desinfectaron durante 5 min con formalina 1%, luego por 10 min en solución de hipoclorito de calcio 4%, se enjuagaron en tres oportunidades con agua destilada estéril y se pusieron a germinar en cápsulas petri, con papel filtro y 4 ml de agua destilada estéril. Luego se repicaron a tierra y se colocaron en un invernadero a 20°C. Al año, las plantas obtenidas, sirvieron como fuente de material vegetal para el cultivo *in vitro*. Los “explantes”, fueron segmentos del tallo principal (5 mm) y del eje secundario (4 mm), pecíolos (4 mm), fragmentos de hojas (4 mm) y yemas (3-4 mm). Estos se desinfectaron de igual manera que las semillas, se colocaron en el medio base de Benrebiha *et al.*, con o sin adición de AIA, BAP o K (kinetina). En los segmentos del tallo principal se obtuvo un 90% de callogénesis con adición de 1,126 mg/l BAP. En los tallos secundarios se logró un 87,5% con adición de 1,126 mg/l BAP o con 0,175 mg/l AIA y 0,215 mg/l K. En los “explantes” de hojas se consiguió un 80% con 0,175 mg/l AIA y 1,126 mg/l BAP.

Otras semillas se utilizaron para el cultivo *in vitro* de embriones y plántulas obtenidas mediante germinación en oscuridad durante 2, 4, 6 u 8 días. Para la callogénesis utilizaron el medio base Benrebiha *et al.* con o sin reguladores de crecimiento: 2,4-D (0,069 a 2,21 mg/l) y BAP (1,126 mg/l) a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  por cuatro semanas, posteriormente, para la regeneración, repicaron sobre el mismo medio base con o sin AIA, BAP o K durante 4 semanas. Observaron que el tiempo de germinación de las plántulas es determinante para la callogénesis, obteniendo el mejor porcentaje (65%) con una germinación de 6 días. La adición de reguladores de crecimiento también estimula la callogénesis, logrando los mejores resultados con 0,069 mg/l de 2,4-D y 1,126 mg/l de BAP (58%), así como con 0,022 mg/l de

2,4-D y 1,126 mg/l de BAP (57,5%). En cambio, no obtuvieron buenos resultados en la regeneración de brotes.

También emplearon semillas y “explantes” de plantas de invernadero (embriones, cotiledones, tallos, pecíolos, fragmentos de hojas y hojas enteras), que fueron desinfectados por algunos segundos en etanol 96%, durante 40 min en una solución de formalina 0,8%, por 20 min en una solución de hipoclorito de calcio 5% y enjuagados en tres oportunidades con agua destilada estéril. Se cultivaron en el medio Linsmaier y Skoog (LS) modificado, con 0,495 mg/l de 2,4-D, 1,0044 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP para la callogénesis y posteriormente, para la regeneración, se trasladaron al medio LS diluido a la mitad con 1,0044 mg/l de ANA y 1 mg/l de BAP. El cultivo de embriones presentó un crecimiento y una hinchazón de los cotiledones y la radícula, seguido de la iniciación de callos en el extremo o a lo largo de ella y en ciertos casos en el hipocotilo y cotiledones. En los “explantes”, los callos formados de segmentos de tallo fueron sanos y blanquecinos, en cambio las hojas adultas no formaron callos y las nuevas los formaron duros y compactos.

Agier y Burry (1996) utilizando hipocotilos de semillas, de *A. halimus*, germinadas en condiciones estériles, lograron la inducción de callos, empleando 7 medios de cultivo, todos ellos con los minerales del medio MS, 30 g sacarosa, 8 g de agar y diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento, 2,4-D (0; 0,011; 0,221; 0,442; 0,552 y 1,105 mg/l), kinetina (0; 0,538 y 1,076 mg/l) y adenina (0 y 0,999 mg/l). Los callos se repicaron y luego del segundo mes, fueron colocados en suspensión celular.

## **b) Cultivo de microestacas obtenidas de plantas de *Atriplex halimus***

Chaouch y Bessafa (1995) realizaron ensayos con microestacas (ramillas de 10 a 15 cm de largo) leñosas y semi-leñosas, obtenidas de ramas del año de *A. halimus*. Estas fueron cortadas en “explantes” de 4 a 5 cm (2 a 3 yemas), desinfectados en distintas combinaciones y tiempos de remojo de alcohol a 70% e hipoclorito de sodio a 16° Cl, para lograr la menor tasa de contaminación posible. Posteriormente, los “explantes” fueron puestos en un medio base que contenía los microelementos del medio MS, Fe-EDTA (10 ml/l), las vitaminas de Morel y White (2 ml/l), sacarosa (20 g/l) y agar (8 g/l). Al medio base se le agregaron distintos macroelementos: MS, MS/2 y Gamborg (G), formando tres medios de cultivo. Analizaron el largo medio de tallos, el número de hojas y el enraizamiento. El mayor largo medio de tallos (2,75 cm) se obtuvo en el medio MS, para ambos tipos de “explantes”. El mayor número de hojas para las microestacas semi-leñosas se

consiguió en los medios MS con 2,61 y MS/2 con 2,74, al igual que en las leñosas, con 3,64 y 3,43 en los medios MS y MS/2, respectivamente. La iniciación de raíces fue muy lenta sobre el medio sin reguladores de crecimiento (auxina), formando las primeras luego de dos meses. Las estacas leñosas presentaron una tasa de enraizamiento de 15% y las estacas semi-leñosas, con un crecimiento mucho más débil, una tasa de 14%.

## 2.4. ACLIMATACIÓN

La aclimatación constituye la última etapa de un programa de multiplicación *in vitro*, determinando el éxito o el fracaso de la micropropagación. Los “plantlets” que han crecido heterotróficamente, en una atmósfera con muy poco intercambio gaseoso, una humedad relativa cercana al 100%, una fuente exógena de carbohidratos metabolizables y de reguladores de crecimiento, deben adaptarse a condiciones autotróficas y humedades relativas moderadas a bajas (Bustos, 2001). En este proceso, llegan a perderse cerca del 20 al 50% de individuos.

Uno de los principales problemas que aparecen, son la poca habilidad del follaje producido *in vitro* para disminuir la pérdida de agua y la poca asimilación de carbón, que incluso puede presentar un balance negativo. Debido a esto, la planta tiene poca oportunidad de regular su propio crecimiento o desarrollo fisiológico que le permita tener éxito al momento de ser llevada a condiciones *ex vitro* (Rubilar, 2000). Como consecuencia de ello, se necesita un período de aclimatación bien diseñado, generalmente de alto costo, antes de llevar los “plantlets” al aire libre.

Según Botti (1992), la aclimatación y endurecimiento de los “plantlets” regenerados *in vitro*, es un proceso difícil y puede que los mayores porcentajes de pérdidas se presenten en estas etapas. Para contrarrestar esta disminución de material, se recomienda un sustrato adecuado (en cuanto a retención de humedad, pH, conductividad eléctrica, etc.); humedad ambiental muy controlada y con posibilidades de ir decreciendo paulatinamente; control estricto de patógenos (hongos y bacterias); control de temperatura y luminosidad.

Marín y Gella (1987), citados por Rubilar (2000), trabajando con “plantlets” micropropagadas de *Prunus cerasus*, aumentaron las tasas de sobrevivencia en la aclimatación de entre 10 y 20% hasta 86%, cambiando solamente las condiciones ambientales. Los menores porcentajes se obtuvieron cuando los “plantlets” se mantuvieron totalmente tapadas para evitar la deshidratación. Sin embargo, el porcentaje aumentó (86%) cuando los “plantlets” se expusieron a baja humedad

relativa pero con un riego constante. Ellos concluyen que los "plantlets" micropropagadas necesitan de un estímulo externo que les permita cambiar su régimen heterotrófico hacia uno autotrófico. Este estímulo puede ser la baja humedad relativa.

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

El cultivo *in vitro* del material vegetal se realizó en el Laboratorio de Micropropagación del Proyecto STD3 N° TS3\* CT 94-0264, de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad de Chile. La investigación se llevó a cabo en el período comprendido entre enero de 1998 y abril de 1999.

#### 3.1. MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se recolectó de plantas de *Atriplex halimus* cultivadas en la Estación Experimental Agronómica Las Cardas, de la Universidad de Chile, a 260 msnm, 30° 15' latitud sur y 71° 17' 30" longitud oeste, Provincia de Coquimbo, Cuarta Región. El clima es mediterráneo árido, con una precipitación anual media de 110 mm, pero extremadamente variable.

Las plantas madres de *A. halimus*, fueron establecidas en 1981. A finales del invierno de 1994, se les practicó un corte a 25 cm del suelo, para determinar el rendimiento de leña y la recuperación al corte, además de una evaluación nutritiva de las especies (Lailhacar, *et al.*, 1993; Lailhacar, *et al.*, 1995.). Hasta la fecha del ensayo se mantuvieron aisladas del ganado, observándose una importante retoñación en los individuos, así como un crecimiento en diámetro y una ramificación hasta el suelo.

De las diferentes procedencias de *A. halimus*, establecidas en las Cardas, se utilizaron los individuos de la procedencia CU-690, que vienen de la Cuenca del Mediterráneo, por poseer los mejores rendimientos de fitomasa aérea y leñosa. De ésta se seleccionaron en terreno, por observación directa, las cuatro plantas madres mejor adaptadas a las condiciones de stres hídrico y salino.

De éstos ejemplares se cortaron ramillas de aproximadamente 10 cm de largo, que fueron trasladadas al laboratorio. En terreno, cada grupo (cuatro, una de cada planta madre) se marcó, se envolvió en toalla de papel absorbente y se colocó en una nevera donde se humedecieron con agua, para evitar así su deshidratación durante el transporte. Luego, en el laboratorio, se prepararon los "explantes" para su posterior asepsia y cultivo.

### 3.2. PREPARACIÓN DE LOS “EXPLANTES”

Las ramillas traídas de terreno se cortaron para preparar los “explantes”. Estos correspondieron al segmento terminal de la ramilla, portador de la yema apical, y al trozo de tallo, obtenido a continuación, con una a tres yemas axilares (aproximadamente 1 a 2 cm de largo). En la memoria son denominados como “apical” y “nodal”, respectivamente.

A los “explantes” se les eliminó parte de las hojas (las más grandes) para obtener mejores resultados en la desinfección, ya que ellas presentan mayor grado de microorganismos y esporas, que son perjudiciales para el cultivo *in vitro*<sup>1</sup>. Posteriormente se colocaron en vasos de precipitado con agua, para eliminar así, parte de la suciedad que traían de terreno.

### 3.3. DESINFECCIÓN DE LOS “EXPLANTES”

Los “explantes” fueron desinfectados por algunos segundos (no más de 5”) en etanol 96%, luego en una solución de formaldehído al 0,8% durante 40 min y posteriormente se trasladaron a una solución de hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) al 5% por 20 min. Luego, en la Cámara de Flujo Laminar, fueron enjuagados en tres oportunidades con agua destilada estéril (Moran *et al.*, 1995).

### 3.4. ESTERILIZACIÓN DEL MATERIAL DE TRABAJO

Todo el instrumental (pinzas, bisturí, tijeras, etc) para la manipulación de los “explantes” y el material requerido para el trabajo (cápsulas petri y vasos de precipitado con agua destilada) fueron envueltos en papel de aluminio y esterilizados en autoclave durante 20 min con una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 121°C. Luego se colocaron en la Cámara de Flujo Laminar para su uso posterior.

---

<sup>1</sup> Bertin, P. 1996. Doctor en Ciencias Agronómicas e Ingeniería Biológica. Faculté des Sciences. Université Catholique de Louvain. Belgique. Comunicación personal.

### 3.5. COMPOSICIÓN Y ESTERILIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo base correspondió a los macronutrientes y micronutrientes del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), las vitaminas de Morel, 20 g de sacarosa y 8 g de agar, con un pH aproximado de 5,8.

Para facilitar la preparación de los medios de cultivo, se prepararon soluciones concentradas para los macronutrientes, el fierro con el sodio, los micronutrientes y las vitaminas. Estas se guardaron a baja temperatura en recipientes de vidrio. La preparación de soluciones madres implica el peso de cantidades mayores de elementos (principalmente micronutrientes) y así se obtiene mayor exactitud.<sup>1</sup>

El medio de cultivo se preparó en un matr az aforado de 1.000 ml, agregando las soluciones madre de macronutrientes, fierro y sodio, micronutrientes y vitaminas. Se complet  aproximadamente 800 ml con agua destilada, luego se agregó la sacarosa y se disolvió en el agitador magnético. Posteriormente se completaron  $\pm$  950 ml y se ajustó el pH a 5,8. Una vez ajustado el pH se agregó el agar, se ajustó el volumen final (1.000 ml) y se agitó con temperatura.

Después se agregaron  $15 \pm 1$  ml del medio en cada uno de los tubos de ensayo, se taparon con algodón y papel aluminio. Luego se autoclavaron durante 20 min a una presión de 1 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 121 C. Una vez terminado el proceso, se ubicaron en la Cámara de Flujo Laminar, donde se dejaron enfriar y reposar por un mínimo de 12 hr, para su posterior utilización e instalación de los "explantes" en los tubos.

### 3.6. INSTALACIÓN DE LOS "EXPLANTES" Y CONDICIONES DE CULTIVO

A cada "explante" apical, ya desinfectado, se le cortó el extremo basal, para eliminar el material vegetal posiblemente dañado por el tratamiento de desinfección; a los nodales se les cortó los dos bordes. Después se ubicaron sobre el medio de cultivo, dentro del tubo de ensayo, en forma polar.

---

<sup>1</sup> Op. cit.

Una vez terminada la instalación, se ubicaron los tubos de ensayo, debidamente marcados, en la Cámara de Cultivo a una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , un fotoperíodo de 12 horas y una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ .

### **3.6.1. Efecto de la posición del “explante” y aplicación de citoquininas sobre la elongación del tallo y la formación de brotes**

Los dos tipos de segmentos (apical y nodal) fueron establecidos en medios de cultivo con y sin reguladores de crecimiento (0,1 mg/l BAP). Se instalaron 240 “explantes” en los tubos de ensayo, 60 de cada una de las plantas madres, distribuidas homogéneamente en los tratamientos. Se observaron todos los días y se retiraron los tubos infectados. Al término del primer mes, se calculó el porcentaje de sobrevivencia, contaminación y pardeamiento u oxidación.

Los brotes desarrollados por los “explantes” sobrevivientes se cortaron en segmentos y se repicaron a medio MS fresco, sin regulador de crecimiento, comenzando así la fase de multiplicación. A pesar de que previamente en esta etapa, se habían proyectado realizar cuatro subcultivos cada 3 a 5 semanas, debido a la contaminación y oxidación de los “explantes”, los subcultivos se alargaron en cuatro oportunidades, con el fin de recuperar el material vegetal.

### **3.6.2. Enraizamiento de los brotes obtenidos del cultivo de tejidos**

Si bien inicialmente en el proyecto de memoria se había determinado aplicar distintas concentraciones de una auxina (ANA) para promover la rizogénesis *in vitro*, debido a la formación espontánea de raíces en el período de multiplicación, no fue necesario ejecutar este ensayo. Por esto, se planteó la realización de un ensayo de aclimatación de los brotes enraizados (que no estaba contemplado inicialmente).

### **3.6.3. Aclimatación de los brotes enraizados obtenidos del cultivo de tejidos**

En una primera etapa, los brotes enraizados se dividieron en tres grupos, según su desarrollo (1,50 a 2,49 cm; 2,50 a 3,49 cm y 3,50 a 4,49 cm), y de cada uno se seleccionaron 60 individuos. De ellos, la mitad se colocaron en medio MS con agua destilada estéril hasta la mitad de su altura y se taparon con papel filtro; la otra mitad de los brotes se colocaron en medio MS solamente y fueron tapados con Alusa Plast. Se mantuvieron en estas condiciones entre cuatro a cinco semanas. Posteriormente en una segunda etapa, se repicaron a tubos de ensayo que

contenían tierra de hoja estéril y se taparon con Alusa Plast, donde permanecieron por un mes. Finalmente, en la tercera etapa, las plantas sobrevivientes se plantaron en vasos de plástico con un sustrato de tierra de hojas y fueron cubiertos con una bolsa de polietileno transparente para mantener una humedad relativa elevada y evitar así su deshidratación. Durante este último mes se fueron destapando paulatinamente hasta que no necesitaron ya la bolsa. Al final del ensayo se determinó el porcentaje de sobrevivencia de las plantas.

### 3.7. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las primeras etapas, se aplicó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial de dos factores, éstos fueron la ubicación del “explante” (apical y nodal) y la concentración de BAP en el medio (0 y 0,1 mg/l). Se instalaron 20 tubos de ensayo por combinación de tratamiento (80 tubos) en tres repeticiones, dando un total de 240 tubos.

En el período de instalación del ensayo se determinó el porcentaje de sobrevivencia, la contaminación y la oxidación de los brotes. Debido a que los porcentajes no cumplen con el supuesto de normalidad de los datos para un análisis de varianza, se transformaron mediante la formula de Bliss (Ostle, 1965):

$$Bb = \arcsen ( \sqrt{ \% / 100 } )$$

Con los nuevos valores se realizó un análisis de varianza a un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Duncan para determinar los grupos homogéneos.

Durante la fase de multiplicación las variables respuestas fueron el crecimiento de los brotes, el número de yemas activadas y el potencial de división de los brotes (factor de multiplicación) en cada subcultivo. Con estos valores se calculó un promedio por planta para poder realizar la comparación de los tratamientos y las plantas madres.

En la fase de aclimatación se aplicó un diseño completamente aleatorio con arreglo factorial de dos factores, éstos fueron el tamaño del “explante” (1,50 a 2,49 cm; 2,50 a 3,49 cm y 3,50 a 4,49 cm) y el tipo de aclimatación (medio MS con agua y papel filtro; y medio MS con alusa plast). Se instalaron 10 plantas por combinación de tratamiento (60 tubos) en tres repeticiones, dando un total de 180 plantas. La

variable respuesta fue el porcentaje de sobrevivencia. Como en el primer caso, se efectuó la transformación de Bliss, se realizó un Andeva con un nivel de confianza de 95% y una prueba de comparaciones múltiples si fue necesario.

## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PLANTAS MADRES

Una vez identificadas las cuatro plantas madres que se utilizaron para obtener los “explantes”, se estimó sus alturas y diámetros. La altura promedio alcanzada por las plantas madres hasta enero de 1998 fue de 1,8 m y el diámetro de copa promedio fue de 142,3 cm (Cuadro 1; Figura 1).

Cuadro 1. Altura y diámetro de las plantas madres.

Planta madre	Altura (m)	Diámetro (cm)
P <sub>1</sub>	2,0	171
P <sub>2</sub>	1,8	133
P <sub>3</sub>	1,7	140
P <sub>4</sub>	1,7	125
Promedio	1,8	142,3

### 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS “EXPLANTES”

Los segmentos apicales presentaron mayor tamaño y número de hojas que los nodales, aunque un menor número de yemas, generalmente sólo la apical. La longitud promedio de los ellos fue 1,13 cm, incluyendo 1,04 yemas y 7,8 hojas, en cambio los nodales tuvieron un tamaño de 0,83 cm con 1,33 yemas y 2 hojas (Cuadro 2; Figura 2).

Cuadro 2. Características iniciales de los “explantes” apicales y nodales.

Tipo de “explante”	Valor	Yemas (N°)	Longitud Tallo (cm)	Hojas (N°)
Apical	Mínimo	1,00	0,47	2,00
	Máximo	2,00	1,85	8,00
	Promedio	1,04	1,13	7,82
Nodal	Mínimo	1,00	0,50	1,00
	Máximo	2,00	1,28	6,00
	Promedio	1,33	0,83	1,99

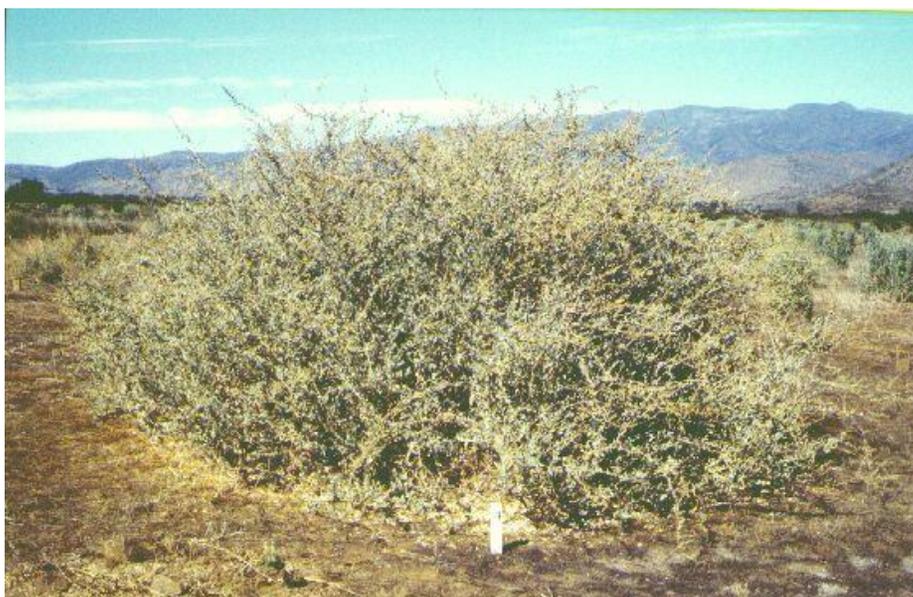
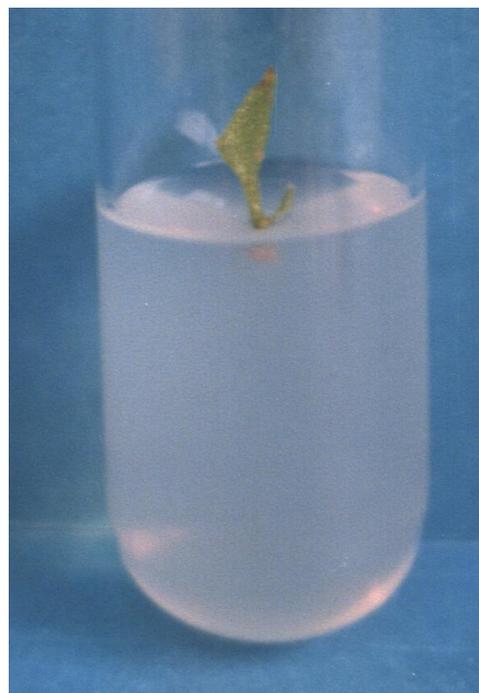


Figura 1. Planta madre de *Atriplex halimus* establecida en 1981, en la Estación Experimental "Las Cardas", IV Región de Chile.



Apical



Nodal

Figura 2. Segmentos apicales y nodales en el inicio del cultivo *in vitro*.

### 4.3. FASE DE MULTIPLICACIÓN

#### 4.3.1. Primer mes de cultivo

El método de desinfección utilizado fue efectivo, obteniendo un porcentaje de muerte por contaminación relativamente bajo, no superando, al término del primer mes de cultivo, un 22,50% para los segmentos apicales, y sin presentar diferencias significativas con los nodales (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores promedios de pardeamiento, contaminación y sobrevivencia de los segmentos apicales y nodales, al finalizar del primer mes de cultivo.

Tipo de Segmento	Respuesta	Porcentaje*
Apical	Pardeamiento	52,50 a
	Contaminación	22,50 a'
	Sobrevivencia	25,00 b''
Nodal	Pardeamiento	46,67 a
	Contaminación	19,17 a'
	Sobrevivencia	34,17 a''

\*Letras distintas indican diferencias significativas entre medias de tratamientos.

Sin embargo, se presentó un problema inesperado: la oxidación o pardeamiento de los "explantes", que se inició al segundo día de cultivo, y que afectó fuertemente, y por igual, a ambos tipos de segmentos. Los brotes comenzaron a tomar una coloración café, probablemente debido a un efecto de oxidación a causa del proceso de desinfección, ya que las células dañadas o muertas por su acción, pueden disminuir o anular el intercambio entre el material vegetal y el medio de cultivo (Kyte y Kleyn, 1996). Con el tiempo esto aumentó, llegando a morir parte de los "explantes". Ya al cuarto día, los segmentos apicales presentaban un 41,67% de "explantes" oxidados y los nodales sólo mostraban un 19,17%. El máximo valor alcanzado fue 60,83%, observado en los "explantes" de ápice al noveno día de cultivo, recuperándose parte de ellos en los días siguientes, en cambio los nodales sólo tuvieron un 46,67% al finalizar el primer mes (Figura 3).

La suma de ambos (contaminación y oxidación) fue causante de diferencias significativas en la sobrevivencia, alcanzando a sólo 34,17% para los segmentos nodales y 25,00% para los apicales (Cuadro 3). Probablemente porque los "explantes" nodales son más resistentes al proceso de desinfección y aunque los

porcentajes de contaminación fueron relativamente similares, los ápices presentaron mayor porcentaje de brotes con oxidación debido a la desinfección.

Meza (2000), trabajando con segmentos apicales y nodales de *A. nummularia* en igual período, obtuvo porcentajes de sobrevivencia de 42,1% y 7,5% respectivamente. Además de presentar un 50,8% y 15% de “explantes” apicales y nodales no desarrollados por muerte de tejidos u oxidación.

En esta memoria, la contaminación fue menor en los segmentos nodales, siendo contrario a lo observado por Souayah *et al.* (1998), que trabajando con material de campo de *A. halimus*, indicaron que la desinfección es más complicada en material vegetal leñoso que herbáceo, logrando una contaminación del 20% en los “explantes” más nuevos. Esto se explica porque mientras más viejo es el material, posee mayor cantidad de contaminantes y su desinfección es más difícil, pues presentan más tricomas en hojas y tallos. Para disminuir estos problemas, sería necesaria la aplicación de un fungicida en las plantas madres, o bien, se pueden trasladar plantas madres de campo a invernadero, teniéndolas en un ambiente controlado libre de muchos de los contaminantes externos, y así obtener material vegetal para el cultivo *in vitro*.

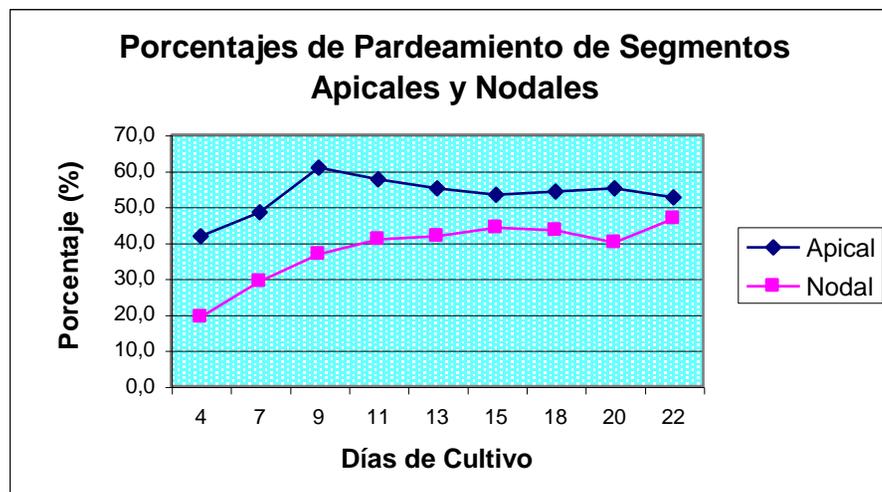


Figura 3: Evolución del pardeamiento del material vegetal, durante el primer mes de cultivo.

Los resultados según la procedencia del material vegetal, indican que los mejores valores durante el primer mes de cultivo (Cuadro 4), se obtuvieron con la planta uno, con un 43,33% de sobrevivencia, pero sin presentar diferencias

significativas con las otras plantas. El material vegetal de la planta cuatro presentó la mayor oxidación o pardeamiento (70,00%), formando un grupo homogéneo con las plantas dos y tres, y con una diferencia significativa con la uno. Finalmente la contaminación fue similar para todas ellas.

Cuadro 4. Valores promedios de pardeamiento, contaminación y sobrevivencia de las plantas madres, al final del primer mes de cultivo.

<b>Planta Madre</b>	<b>Pardeamiento (%)</b>	<b>Contaminación (%)</b>	<b>Sobrevivencia (%)</b>
P1	31,67 b	25,00 a	43,33 a
P2	48,33 a b	30,00 a	21,67 a
P3	48,33 a b	15,00 a	36,67 a
P4	70,00 a	13,33 a	16,67 a

### 4.3.2. Subcultivos

Lamentablemente, en esta memoria sólo se pudo realizar el análisis de varianza, con su respectivo Andeva y test de comparaciones múltiples, hasta el tercer subcultivo, debido a que posteriormente, se perdieron por contaminación u oxidación, todos los segmentos apicales sin citoquinina (BAP) y dos repeticiones de los segmentos nodales con regulador de crecimiento.<sup>1</sup>

#### 4.3.2.1. Contaminación

Durante todo el ensayo se produjo contaminación del material vegetal (Figura 4) y, como se esperaba, el mayor porcentaje ocurrió durante el primer mes de instalación (S0) del ensayo (20,83%), disminuyendo posteriormente, llegando incluso a desaparecer durante el sexto y séptimo subcultivo. La pérdida total al final de los subcultivos fue de 2,62%.

Como es frecuente, la mayor contaminación se produjo durante la etapa de instalación de los ensayos (S0), siendo este uno de los principales problemas para los micropropagadores de plantas del mundo, causando el fracaso y la falta de rentabilidad de muchos laboratorios (Pierik, 1990). Por ello la importancia de un buen método de desinfección del material vegetal, sobre todo, si el material es

<sup>1</sup> Mora, S. Profesor de estado de matemáticas y estadística. Facultad de Ciencias Forestales. Departamento de Recursos Naturales. Universidad de Chile. Comunicación personal.

obtenido directamente de campo, sin ningún tratamiento previo, como en esta memoria.

A pesar de lo anterior, en esta memoria, se obtuvo una baja contaminación en el inicio de los ensayos (S0), con un 22,5 % en los “explantes” apicales y 19,17% en los nodales. Meza (2000), trabajando con “explantes” apicales y nodales en *A. nummularia*, tuvo un 7,1% y 77,5% de contaminación respectivamente durante el mismo período, teniendo una mayor pérdida total a causa de la contaminación.

Al analizar la contaminación por tratamiento durante los subcultivos (Figura 5), se observa que los segmentos apicales sin BAP presentan la mayor pérdida de “explantes”, siendo de 10,53% al término del ensayo. En cambio, la contaminación fue mucho menor, 2,20% y 3,73% para los apicales en presencia de BAP y nodales sin BAP respectivamente, e incluso para los nodales con BAP no existió. Además la contaminación, en la mayoría de los casos, se presentó en los medios de cultivo, a causa de una mala esterilización de ellos, apreciándose en los medios después de 24 horas de instalados los “explantes”.

Como el material vegetal provino de cuatro plantas madres, varia su genotipo y condición fisiológica. Debido a ello se pueden manifestar diferentes respuestas frente a los distintos tratamientos y condiciones de cultivo, así como desiguales porcentajes de contaminación y oxidación. Souayah *et al.* (1997), trabajando con segmentos nodales de *A. halimus*, encontraron respuestas diferentes entre procedencias y entre plantas madres de una misma procedencia.

Con respecto a la condición fisiológica de la planta donante, los mejores resultados se han obtenido con “explantes” colectados en individuos jóvenes o herbáceos, con relación a los provenientes de plantas adultas creciendo en campo (Chaouch y Bessafa, 1995; Souayah, *et al*, 1998), como en el caso de esta memoria.

Si se analizan los porcentajes de contaminación en las cuatro plantas durante los subcultivos (Figura 6), se observa, como es de esperarse, una disminución en el tiempo. Aún así, ésta fue relativamente baja no superando, en casi todas las plantas el 15%, a excepción de la planta cuatro durante el primer mes (27,27%). Al final del ensayo existe una diferencia entre ella (P4) y las otras tres plantas (P1, P2 y P3), con valores finales de 36,36%, 1,75%, 1,68% y 10,00% respectivamente.

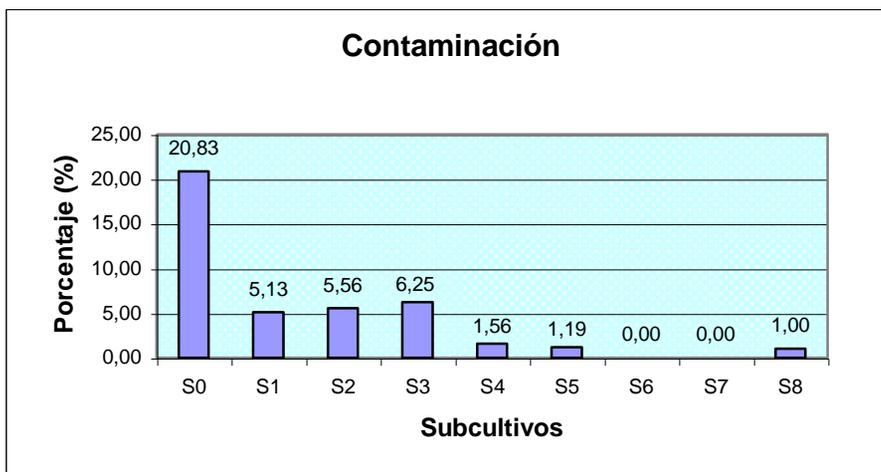


Figura 4: Porcentaje de contaminación en cada subcultivo.

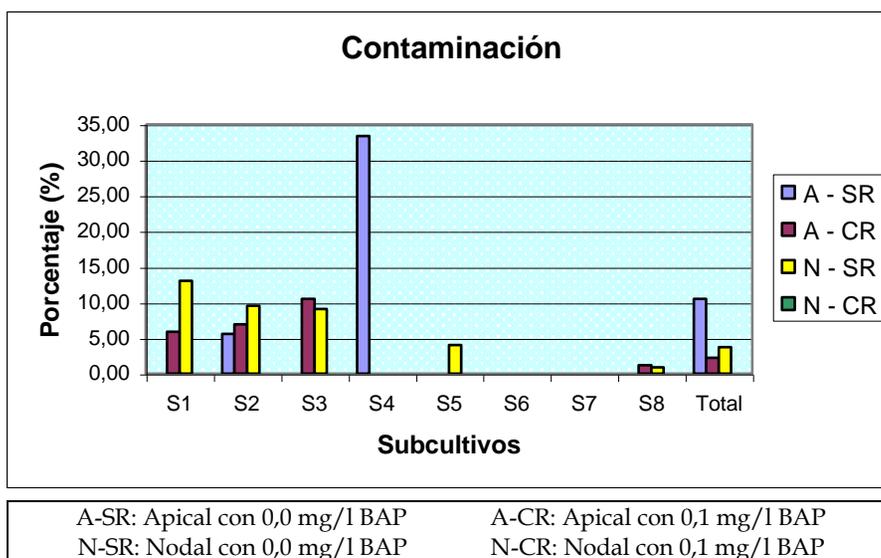


Figura 5: Porcentaje de contaminación por tratamiento, durante los subcultivos.

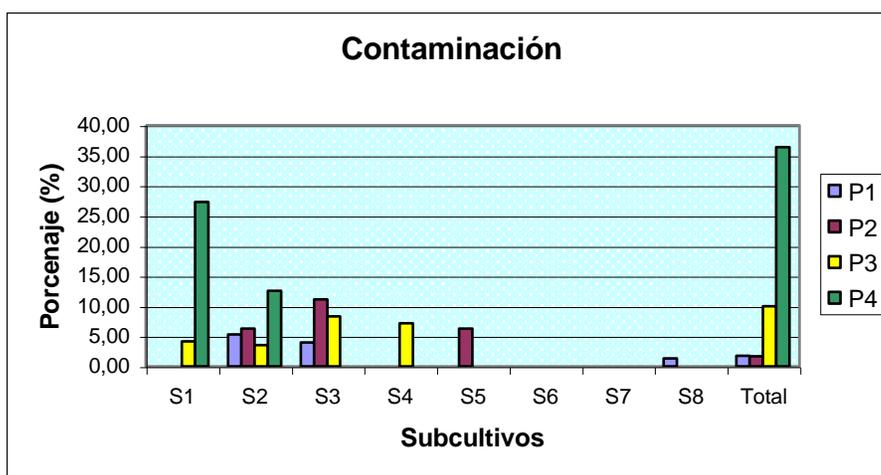


Figura 6: Porcentaje de contaminación por planta.

#### 4.3.2.2. Muerte y Oxidación de los Brotes

La muerte de brotes se produjo durante todo el ensayo, pero fue declinando con los subcultivos (Figura 7), llegando casi al 50% durante la instalación (S0) y el segundo subcultivo (S2), pero con un total, al final del ensayo, de 23,38%. Siendo ésta la causa de las mayores pérdidas de material vegetal para el cultivo *in vitro*.

Al comparar los porcentajes de oxidación en cada tratamiento (Figura 8), se aprecia que los valores, hasta el cuarto subcultivo (S<sub>4</sub>), se mantuvieron altos, y disminuyeron luego su valor, no superando el 9%. Aun así, los segmentos apicales sin regulador de crecimiento, presentaron las mayores pérdidas (89,47%) y una notoria diferencia con los otros tratamientos, que alcanzaron sólo 28,74%, 10,11% y 8,30% para los “explantes” nodales con BAP, apicales con BAP y nodales sin BAP, respectivamente.

Como el material provino de distintas plantas madres, su respuesta frente a la oxidación también varió (Figura 9), provocando incluso la muerte de gran número “explantes” de las plantas cuatro (P<sub>4</sub>) y tres (P<sub>3</sub>) y una menor pérdida en la uno (P<sub>1</sub>) y dos (P<sub>2</sub>), con un 63,64%, 60,00%, 10,66% y 8,94%, respectivamente, generando diferencias notorias entre las dos primeras y las últimas.

El proceso de oxidación se debe, en un principio, a la desinfección (Kyte y Kleyn, 1996) y posteriormente a la manipulación de los “explantes”. Al parecer, la eliminación de algunas estructuras y el seccionamiento demasiado violento, con el fin de obtener la mayor multiplicación por individuo, habría causado un aumento de la deshidratación y el estrés de los brotes. De acuerdo con Pierik (1990); la necrosis progresiva se debería a la falta de oxígeno y la presencia de etileno y CO<sub>2</sub> en los frascos (Figuras 7, 8 y 9).

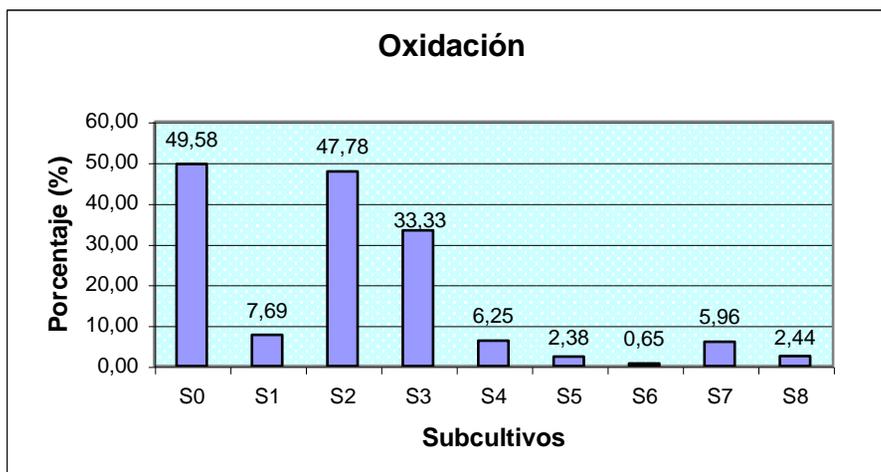
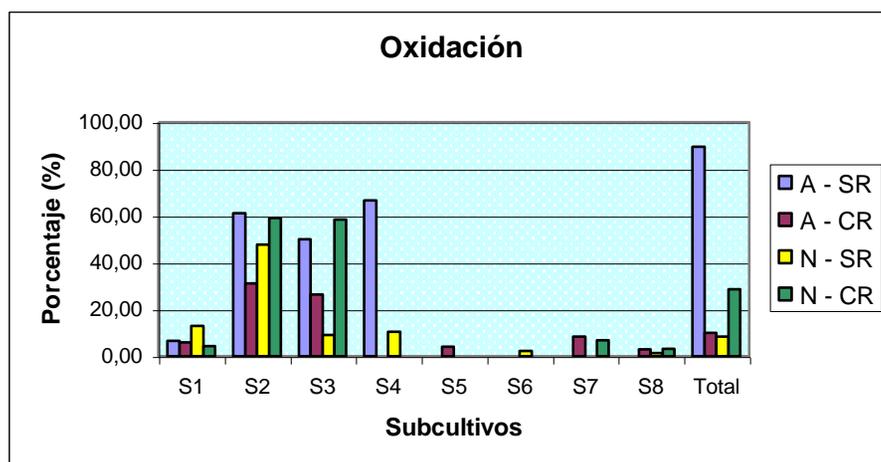


Figura 7: Porcentaje de oxidación por subcultivo.



A-SR: Apical con 0,0 mg/l BAP

A-CR: Apical con 0,1 mg/l BAP

N-SR: Nodal con 0,0 mg/l BAP

N-CR: Nodal con 0,1 mg/l BAP

Figura 8: Porcentaje de oxidación por tratamiento.

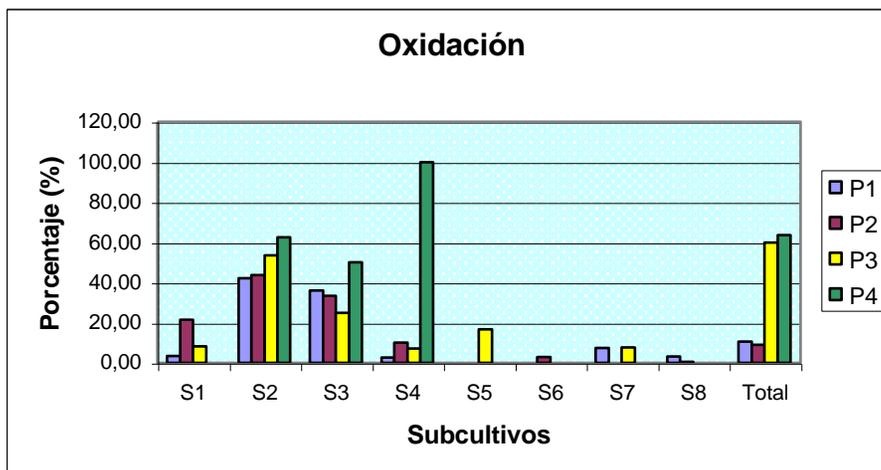


Figura 9: Porcentaje de oxidación por planta.

#### 4.3.2.3. Sobrevivencia

La sobrevivencia en casi todos los tratamientos fue alta, exceptuando los segmentos apicales sin BAP, donde se perdió todo el material vegetal después del tercer subcultivo, al igual que dos repeticiones de los nodales sin BAP (Figura 10). Aún así, el porcentaje de sobrevivencia para todo el ensayo fue de 83,92%.

Al finalizar los ensayos, se obtuvieron 399, 212 y 62 brotes vivos, correspondientes al 87,69%, 87,97% y 71,26% de los tratamientos dos, tres y cuatro, respectivamente (Figura 10).

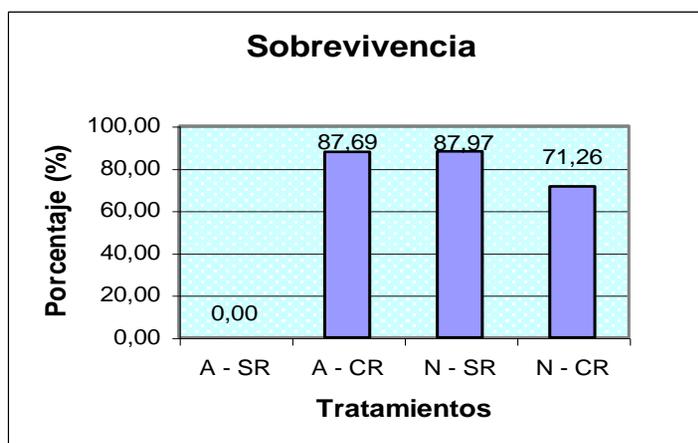


Figura 10: Porcentaje de sobrevivencia por tratamiento.

Se dijo anteriormente que, de acuerdo a las condiciones genéticas y fisiológicas de las plantas, existen diferentes respuestas frente a los distintos estímulos del cultivo *in vitro*, dependiendo del material de origen, incluso entre plantas madres de una misma procedencia o lugar (Souayah *et al*, 1997). Lo anterior explicaría la mayor sobrevivencia de los brotes de las plantas uno y dos, incluso la planta cuatro perdió todos sus “explantos” después del tercer subcultivo (Figura 11).

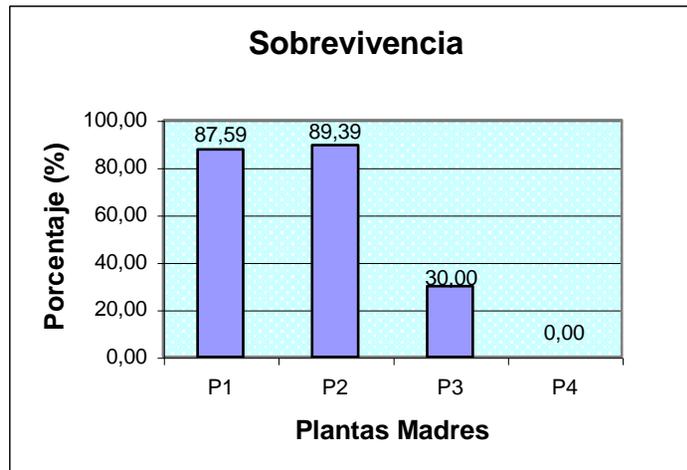


Figura 11: Porcentaje de sobrevivencia por planta madre.

#### 4.3.2.4. Activación de yemas

En cada subcultivo se contó el número de yemas axilares existentes, al comienzo y al final del período, se obtuvo una diferencia y se calculó el número promedio de yemas activadas por “explante” (Cuadro 5). Pero, debido al reducido tamaño de los nuevos brotes, no todos ellos se podían separar, para cultivarlos aisladamente.

Si se compara el número promedio de yemas activadas, en los segmentos nodales con y sin BAP, se aprecia un aumento en la activación de yemas, en presencia del regulador de crecimiento, pero sin existir diferencias significativas durante los tres primeros subcultivos. Este mayor incremento se explica, porque la adición de la citoquinina al medio de cultivo favorece la proliferación de brotes por activación de yemas (Margara, 1986). La influencia de BAP, también se observa en los segmentos apicales, pero sólo en el comienzo del cultivo, debido a la pérdida de material vegetal, siendo significativa sólo en el primer subcultivo.

Las plantas uno y dos se adaptaron mejor a las condiciones de cultivo *in vitro*, debido a que presentaron mayor número promedio de yemas activas acumuladas, por “explante”, que las otras dos plantas (Figura 12).

Cuadro 5: Número de yemas activadas por tratamiento.

Tratamientos	Número promedio de yemas							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
A - SR*	0,47 b	0,1 a	0,67 a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A - CR	1,18 a	0,31 a	1,63 a	1,94	1,42	2,11	2,03	0,39
N - SR	0,43 b	0,33 a	3,00 a	1,95	1,28	1,26	3,25	0,42
N - CR	0,61 ab	0,50 a	3,75 a	2,90	0,73	2,00	1,66	0,58

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

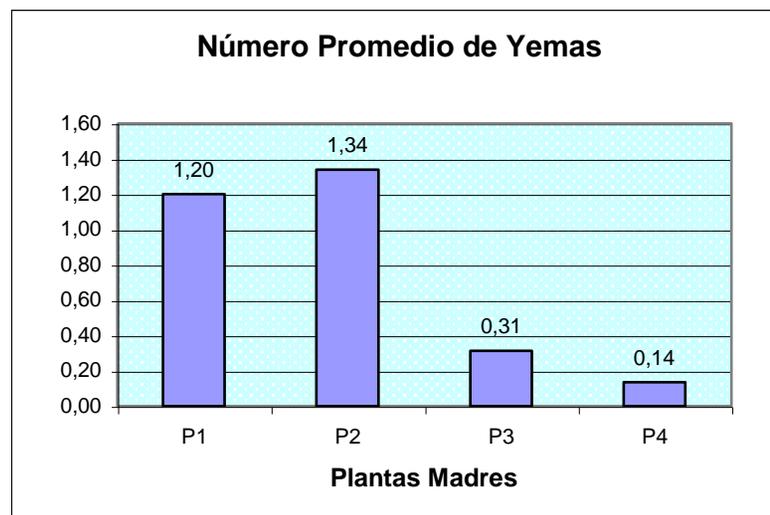


Figura 12. Número promedio de yemas activadas acumuladas por planta madre, al final del ensayo.

#### 4.3.2.5. Factor de multiplicación

Hartmann y Kester (1980), señalan que cada brote producido por división de otro, tiene la capacidad de formar nuevas estructuras, debido a dos características fundamentales que poseen todas las células vegetales vivientes: la Totipotencialidad, que indica que cada célula tiene toda la información genética necesaria para reconstruir todas las partes de la planta y sus funciones; y la Desdiferenciación, o sea la capacidad de las células maduras de volver a una condición meristemática y desarrollar un punto de crecimiento nuevo. Además, en un "explante" cultivado *in vitro*, se puede producir un proceso de rejuvenecimiento (Pierik, 1990), por lo que muchas veces las plantas regeneradas

de esta forma, se parecen más a las producidas por semillas que a las propagadas vegetativamente.

Los brotes que alcanzaron una altura adecuada, se dividieron en dos o más segmentos de tallo, con una o dos yemas axilares cada uno (Figura 13a). Por ejemplo, una altura de 4 cm permitió obtener 2 o 3 secciones que se cultivaron separadamente. En el caso de “explantes” que desarrollaron varios brotes, se separaron y se cultivaron en un medio fresco y, a su vez, ellos también se seccionaron (Figura 13b).

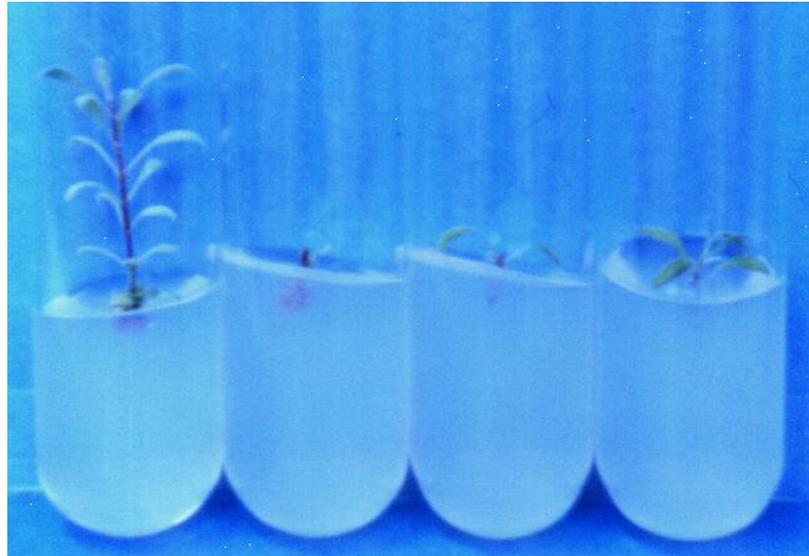
Al término de cada subcultivo se contó el número de “explantes”; luego, si éstos tenían un tamaño adecuado, se dividieron, se cultivaron aisladamente y se contaron nuevamente (Cuadro 6). Posteriormente, por diferencia entre el número inicial de brotes de un subcultivo y el final del subcultivo anterior, dividido por el último, se calculó el incremento promedio de brotes (Cuadro 7).

Cuadro 6: Número de brotes al inicio y final de cada subcultivo.

Trata- mientos	Número de brotes																	
	Subcultivos																	
	S <sub>0</sub>		S <sub>1</sub>		S <sub>2</sub>		S <sub>3</sub>		S <sub>4</sub>		S <sub>5</sub>		S <sub>6</sub>		S <sub>7</sub>		S <sub>8</sub>	
I**	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	
A - SR*	60	15	15	14	18	6	6	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A - CR	60	15	17	15	29	18	19	12	32	32	48	46	95	95	202	185	416	399
N - SR	60	20	23	17	21	9	11	9	19	17	25	24	46	45	88	88	217	212
N - CR	60	21	23	22	22	9	12	5	10	10	11	11	13	13	29	27	64	62

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador. \*\* I: inicio del subcultivo; F: final del subcultivo

El mayor incremento promedio de brotes por subcultivo fue 1,67 para el segmento apical con regulador de crecimiento en el cuarto subcultivo (Cuadro 7), en cambio, los segmentos nodales con y sin regulador, alcanzaron un incremento de 1,37 y 1,47 respectivamente, al final de los cultivos. Estos dos últimos valores, al parecer, no concuerdan con lo indicado por Pourrat (1996) y Amimi *et al.* (1997), que establecen que la citoquinina es indispensable para la formación y multiplicación de brotes en “explantes” de *A. halimus*, pero hay que recordar, que la activación de yemas fue mayor en los brotes con regulador (0,58; Cuadro 5) y esta contradicción, se debió a que la elongación de los tallos no fue suficiente para cultivarlos aisladamente, disminuyendo el incremento promedio de brotes; además de presentar mayores pérdidas de material.



a)



b)

Figura 13: a) División de un brote en tres secciones; b) Separación de varios brotes producidos por multiplicación de un "explanse".

Los mayores incrementos acumulados, al final del ensayo, fueron 440 y 221 brotes, de los segmentos apicales con regulador y nodales sin regulador. En cambio, los segmentos apicales sin regulador y nodales con regulador lograron 4 y 66 brotes, respectivamente. Dando un total de 731 brotes, para todo el ensayo.

Cuadro 7: Incremento promedio de brotes por tratamiento y subcultivo.

Tratamientos	Incremento promedio de brotes							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
<b>A - SR*</b>	0,00 a	0,29 a	0,00 a	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>A - CR</b>	0,13 a	0,93 a	0,06 a	1,67	0,50	1,07	1,13	1,25
<b>N - SR</b>	0,15 a	0,24 a	0,22 a	1,11	0,47	0,92	0,96	1,47
<b>N - CR</b>	0,10 a	0,00 a	0,33 a	1,00	0,10	0,18	1,23	1,37

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

Al dividir el número de brotes inicial de un subcultivo por el número final del subcultivo anterior, se obtuvo un factor de multiplicación por tratamiento (Cuadro 8). Además se calculó un factor de multiplicación potencial (Cuadro 9), con el cociente entre el número inicial de cada subcultivo y la cantidad de brotes al iniciar la fase de multiplicación (número final de “explantos” en S<sub>0</sub>).

Los segmentos apicales sin BAP, presentaron hasta el cuarto subcultivo, un factor de multiplicación de uno (Cuadro 8), lo que significa que no hubo multiplicación, sólo se cambiaron los brotes a un frasco con medio fresco, exceptuando el segundo subcultivo (S<sub>2</sub>), con un valor de 1,29; lo que significa que de cada brote se obtuvieron 1,29 “explantos” nuevos. Los valores ceros restantes, reflejan la pérdida total del material. El valor más alto se logró en el cuarto subcultivo, en los segmentos apicales con BAP, con 2,67 “explantos” nuevos por brote, en cambio en los nodales sin y con regulador, el máximo factor se logró en el último subcultivo con valores de 2,47 y 2,37 respectivamente. Durante los tres primeros subcultivos, no hubo diferencias entre las medias de tratamientos.

Cuadro 8: Factor de multiplicación para cada subcultivo y tratamiento.

Tratamientos	Factor de Multiplicación							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
A - SR	1,00 a	1,29 a	1,00 a	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A - CR	1,13 a	1,93 a	1,06 a	2,67	1,50	2,07	2,13	2,25
N - SR	1,15 a	1,24 a	1,22 a	2,11	1,47	1,92	1,96	2,47
N - CR	1,10 a	1,00 a	1,33 a	2,00	1,10	1,18	2,23	2,37

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

El factor de multiplicación potencial (Cuadro 9), permite evaluar el máximo número de brotes que se podrían lograr al final del ensayo, partiendo de un sólo “explante” inicial, pero sin considerar la multiplicación de los brotes que se perdieron. Esto confirma el inmenso potencial de la multiplicación *in vitro*, pues los valores finales son altos, pero podrían ser aún mayores. Porque si se disminuye al mínimo las pérdidas, con una división adecuada, sin seccionar demasiado los brotes para evitar la oxidación, causante de las mayores pérdidas, se obtendría un número mucho mayor de brotes por subcultivo, que aportarían material vegetal, aumentando el factor de multiplicación.

Souayah *et al.* (1997), obtuvieron 30 brotes a partir de una microestaca semileñosa de *A. halimus*, en el MS/2 con 0,5 mg/l de BAP. Este valor es similar al obtenido por los segmentos apicales con BAP (Cuadro 9). En cambio, para los “explantes” nodales con BAP, se logró sólo un factor de 4,14, debido a la pérdida del 59,09% y 58,33% de los brotes en el segundo y tercer subcultivo respectivamente. Este último tratamiento alcanzó las tasas de multiplicación más altas en los dos últimos subcultivos (Cuadro 8).

Cuadro 9: Factor de multiplicación acumulado al término del ensayo.

Tratamientos	Factor de Multiplicación Potencial							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
A - SR*	1,00	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27	1,27
A - CR	1,13	2,07	2,13	3,47	4,53	7,80	14,93	30,33
N - SR	1,15	1,35	1,45	1,95	2,35	3,45	5,60	12,05
N - CR	1,10	1,10	1,24	1,48	1,52	1,62	2,38	4,14

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

Los “explantes” de las plantas uno y dos obtuvieron los valores más altos de multiplicación potencial (22,00 y 13,77), con un incremento acumulado de 546 y 166 brotes, respectivamente (Figura 14). Estos valores son notoriamente superiores a los logrados por las plantas tres y cuatro, que por las pérdidas ocasionadas por contaminación y oxidación a lo largo de los subcultivos, presentaron un aumento de 18 y 1 brote, respectivamente.

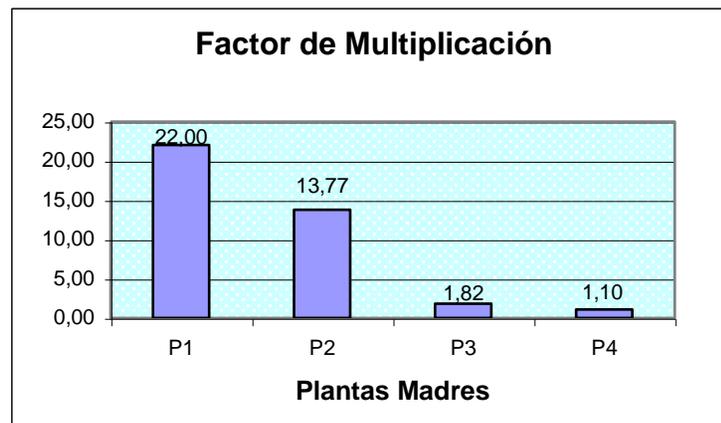


Figura 14: Factor de multiplicación acumulado por planta

#### 4.3.2.6. Crecimiento de los brotes

Para el cálculo del crecimiento de los “explantes”, se midió la altura inicial y final del brote en cada subcultivo. Por diferencia, se obtuvo el crecimiento del período y con él se calculó el promedio por subcultivo y tratamiento o incremento medio en altura (IMA; Cuadro 10). En los segmentos apicales sin BAP, los “explantes” cada vez crecieron menos, llegando a morir en el cuarto subcultivo. En cambio, en los otros tres tratamientos se logró un crecimiento máximo de 1,26 cm durante el último período, en los segmentos nodales sin regulador de crecimiento.

Se observó un aumento del crecimiento a medida que transcurrieron los subcultivos (Cuadro 10). Al comparar los segmentos nodales, con y sin BAP, se apreció una diferencia en la elongación del tallo, siendo mayor en los “explantes” sin citoquinina, esto se explica porque la presencia del regulador de crecimiento inhibe la elongación celular, ya que favorece la activación de yemas axilares (Margarita, 1986). Al comparar estos resultados con los obtenidos por diversos autores, que han realizado trabajos en *A. halimus*, se comprobó que también los brotes presentaron una menor elongación al utilizar reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Bessafa, 1995; Chaouch, 1997; Chaouch y Hassane, 1998).

Cuadro 10: Crecimiento promedio de los brotes por subcultivo.

Tratamientos	Crecimiento Promedio (cm)							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
<b>A - SR*</b>	0,15	0,07	0,04	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>A - CR</b>	0,17	0,19	0,28	0,58	0,36	0,83	0,99	0,98
<b>N - SR</b>	0,09	0,13	0,29	0,53	0,53	0,71	0,58	1,26
<b>N - CR</b>	0,05	0,09	0,22	0,23	0,39	0,40	0,47	1,09

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

Al igual que en el caso de la activación de yemas, las plantas uno y dos, presentaron el mayor crecimiento promedio acumulado por brote (Figura 15), logrando casi una diferencia de 1 cm con las otras dos plantas.

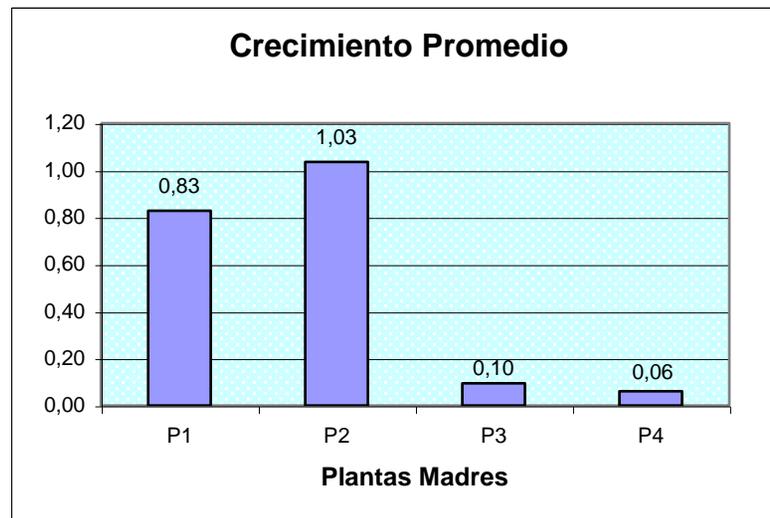


Figura 15. Crecimiento promedio de los brotes por planta madre, al final del ensayo.

#### 4.3.2.7. Enraizamiento

En el transcurso de la etapa de multiplicación un gran número de brotes enraizó (Cuadro 11; Figura 17). La formación de raíces se produjo en la base de los vástagos, lo que indica que existe un movimiento basipétalo de las auxinas, similar al observado en condiciones naturales en las plantas (Salisbury y Ross, 1994).

Cuadro 11: Porcentaje de enraizamiento por subcultivo y tratamiento.

Tratamientos	Porcentaje de Enraizamiento (%)							
	Subcultivos							
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
A - SR*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A - CR	0,00	5,56	25,00	21,88	32,61	36,84	51,89	64,41
N - SR	5,88	22,22	33,33	35,29	41,67	35,56	50,00	63,21
N - CR	4,55	11,11	40,00	30,00	27,27	30,77	37,04	45,16

\* A-SR: apical sin regulador de crecimiento; A-CR: apical con regulador; N-SR: nodal sin regulador; N-CR: nodal con regulador.

Esta capacidad de los “explantos” para formar raíces, tanto en los medios de crecimiento como en los de proliferación, también fue evidenciado en brotes de *A. canescens* (Wochok y Sluis, 1979), *A. halimus* (Chaouch, 1997 y Chaouch y Hassane, 1998) y *A. nummularia* (Meza, 2000).

Se sabe que la aptitud de una especie para formar raíces es controlada por varios factores, tanto externos como internos. Así, según Tripathi (1971) y Bouras (1993), citados por Chaouch y Hassane (1998), el medio MS podría ser el más favorable para la elongación de la raíz principal de *A. halimus*. Esta propiedad particular del medio de cultivo, parece estar relacionado con la presencia de calcio y nitrógeno, dos elementos indispensables para la producción de raíces.

Se dijo anteriormente que el material vegetal cultivado *in vitro* tiende a rejuvenecer debido a la continua fragmentación en cada subcultivo (Pierik, 1990). Este rejuvenecimiento se manifestó con la aparición de la rizogénesis de los brotes; por ello éste proceso y la aptitud rizogénica de la especie, tienen directa relación con la formación de raíces. Esto quedó en evidencia ya que los brotes que presentaban raíces y habían alcanzado un buen desarrollo al finalizar un subcultivo, fueron segmentados y cultivados aisladamente, formando también raíces en la mayoría de los casos.

El porcentaje de enraizamiento para todo el ensayo, fue de 62,26%. Este resultado es similar al 60% obtenido por Gigi y Kinet (1998) en *A. halimus* en un medio con auxinas, sin embargo, en el medio testigo sólo lograron un 13%. Por su parte Mei *et al.* (1997) alcanzaron un enraizamiento de 63% en *A. canescens*, en un medio MS con auxinas y giberelinas. En cambio, Chaouch y Hassane (1998), lograron un 67,71% de brotes enraizados en el medio testigo. También, Meza (2000), en *A. nummularia* obtuvo un 67,15% con presencia de reguladores de

crecimiento, pero sólo logró un 50% en el testigo, además en el medio de multiplicación cerca del 52% de los brotes formaron raíces.

Todos los brotes enraizados provenían de las mismas plantas madres, apreciándose una clara incidencia en el origen del material vegetal (Figura 16). La planta uno (P1) lo hizo desde un principio, en cambio la planta dos (P2) comenzó a formar raíces sólo a partir del tercer subcultivo, pero obteniendo un mayor porcentaje de enraizamiento final.

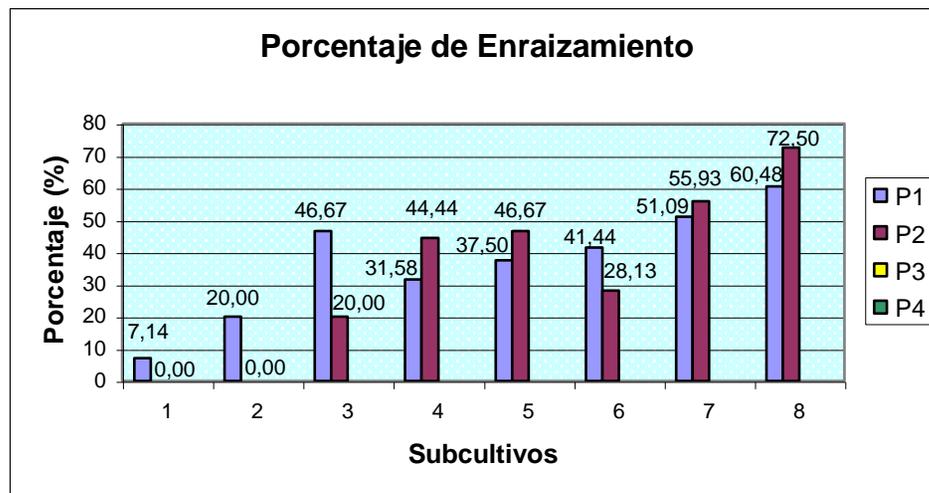


Figura 16: Porcentaje de enraizamiento por planta.

#### 4.4. ACLIMATACIÓN

La aclimatación de los “plantlets” es un proceso complejo y debe realizarse paulatinamente, controlando la humedad relativa, para evitar una deshidratación excesiva y pérdida del material (Botti, 1992). En este caso, no se obtuvo buenos resultados, pero mejorando un poco el proceso, se podría lograr porcentajes mucho mayores.

Al final del primer período, no existieron diferencias significativas entre el porcentaje de sobrevivencia de los distintos tratamientos (Cuadro 12), con una pérdida de sólo 4 individuos. Trasladados los brotes enraizados a sustrato (tierra de hojas), dentro de los tubos de ensayo y tapados con Alusa Plast, se produjo un aumento de la muerte, por efecto de la contaminación. A los 8 días de iniciado el proceso, se habían perdido 21 brotes y al finalizar esta etapa sólo quedaron 25 “plantlets” vivos. El análisis estadístico de los porcentajes de sobrevivencia, indicó que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, pero los brotes

entre 3,50 a 4,49 cm de longitud, colocados inicialmente en medio MS y cubiertos con papel filtro, tuvieron el mayor porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 13, Figura 18a).

Cuadro12. Valores de sobrevivencia al finalizar la primera etapa de aclimatación.

Longitud de los brotes (cm)	Sobrevivencia			
	MS + Agua + Papel filtro		MS + Alusa plas	
	Nº	%	Nº	%
1,50 - 2,49	28	93,33 a	30	100,00 a
2,50 - 3,49	30	100,00 a	30	100,00 a
3,50 - 4,49	29	96,67 a	29	96,67 a

Cuadro 13. Valores de sobrevivencia al finalizar la segunda etapa de aclimatación.

Longitud de los brotes (cm)	Sobrevivencia			
	MS + Agua + Papel filtro		MS + Alusa plas	
	Nº	%	Nº	%
1,50 - 2,49	7	23,33 a	1	3,33 a
2,50 - 3,49	1	3,33 a	4	13,33 a
3,50 - 4,49	10	33,33 a	2	6,67 a

Una vez instalados los "plantlets" en vasos plásticos con sustrato de tierra de hojas, fueron tapados con bolsas de polietileno transparente para evitar su deshidratación (Figura 18b). Poco a poco se fueron destapando por períodos más largos, hasta que se retiró por completo las bolsas al día 13. Este último período se realizó con 25 individuos, sobreviviendo sólo 9. Los cálculos estadísticos indicaron que no existían diferencias significativas entre los tratamientos, pero el valor más alto se logró en el medio MS, con agua destilada estéril hasta la mitad de la altura de los brotes, cubiertos con papel filtro y una longitud inicial entre 3,50 y 4,49 cm (Cuadro 14). Esto concuerda con Pérez (1998) citado por Meza (2000) y Bustos (2001), que señalan que al utilizar "plantlets" con tamaños superiores a 2,5 cm existe una mayor probabilidad de éxito en su aclimatación.

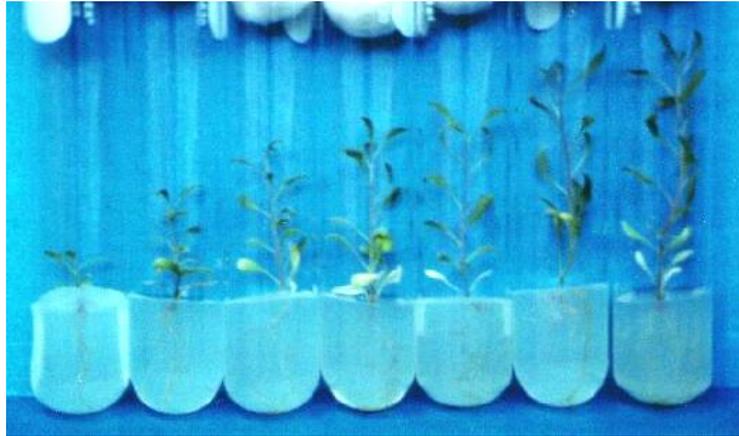


Figura 17: "Plantlets" enraizados durante la fase de multiplicación.



a)



b)

Figura 18: Aclimatación de brotes de *A. halimus*. a) segunda etapa; b) última etapa.

Cuadro 14. Valores finales de sobrevivencia en el proceso de aclimatación.

Longitud de los brotes (cm)	Sobrevivencia			
	MS + Agua + Papel filtro		MS + Alusa plas	
	Nº	%	Nº	%
1,50 - 2,49	3	10,00 a	0	0,00 a
2,50 - 3,49	0	0,00 a	0	0,00 a
3,50 - 4,49	5	16,67 a	1	3,33 a

La muerte de los “plantlets” se debe a que durante el cultivo *in vitro*, los brotes crecen en un ambiente controlado, con alta humedad relativa, baja intensidad luminosa, temperatura constante, escaso intercambio gaseoso y medios ricos en compuestos orgánicos (Pierik, 1990). Estas condiciones provocan cambios en su morfología y fisiología, como por ejemplo, tallos más delgados, menor cantidad de ceras cuticulares, reducción de los tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células, escasa capacidad fotosintética, estomas con baja funcionalidad y crecimiento heterótrofo o mixótrofo (Dixon y González, 1994).

Según Bustos (2001), el traspaso de condiciones *in vitro* a *in vivo* es un proceso gradual, que consiste fundamentalmente en lograr la activación de apertura y cierre estomático que no está funcionando debido a la alta humedad relativa que hay dentro de los frascos. En este ensayo se perdió un 64% de los “plantlets” al trasladar el material a los vasos plásticos y destaparlos. Por otra parte, los brotes enraizados sufrieron el ataque de hongos durante el segundo período (tierra de hoja en tubos de ensayo), aunque el sustrato estaba esterilizado, pues para realizar la plantación en los tubos, se debía lavar bien los “plantlets” en abundante agua, para retirar todo el resto de medio de cultivo.

Para superar estos problemas se deben utilizar técnicas de ambientación que permitan a los brotes enraizados adaptarse a las condiciones *in vivo* (Kyte y Kleyn, 1996). Los resultados demuestran que el método utilizado no fue eficiente por lo que sería conveniente realizar más pruebas en la aclimatación de los “plantlets”, así como mejorar el sistema, incorporando por ejemplo, riegos con mezclas de fungicidas y sistemas de humidificación, como mist (neblina), que disminuyan la evapotranspiración de los “plantlets”.

## 5. CONCLUSIONES

Salvo por la oxidación inicial de los “explantes”, el cultivo *in vitro* de segmentos de tallo de plantas adultas (17 años) de *Atriplex halimus* es relativamente fácil.

El método de desinfección empleado fue bastante efectivo, con una contaminación inicial no superior a 22,5%, debido principalmente a fallas en el autoclavado del medio de cultivo. Posteriormente, en los subcultivos disminuyó, obteniendo una contaminación de 2,62% para todo el ensayo. A su vez, la planta cuatro tuvo la mayor tasa de contaminación, correspondiente a 36,36%.

Debido a la poca experiencia en el cultivo *in vitro*, se presentó un problema inesperado, el pardeamiento u oxidación de los “explantes”, generando las mayores pérdidas de material vegetal, con un máximo de 89,47% en los segmentos apicales sin BAP, 63,64% en la planta cuatro y 60,00% en la tres.

Al final de los subcultivos, el mayor factor de multiplicación fue de los segmentos apicales con BAP (30,33), seguido de los nodales sin BAP (12,05) y con él (4,14). La falta de respuesta de los segmentos apicales sin BAP se debió a la muerte de ellos por oxidación o contaminación.

A pesar de la pérdida de material, se obtuvo suficientes brotes para continuar con la etapa de aclimatación. Así, el número de brotes al final de los subcultivos fue 673, con un aporte de 399 brotes provenientes de los segmentos apicales con BAP, 212 de los nodales sin BAP y 62 de los nodales con BAP. Al analizar las procedencias, la planta uno terminó con 501 brotes, la dos con 160, la tres con 12 y la cuatro no tuvo brotes vivos.

En la práctica la tasa de multiplicación fue mayor a la aquí informada, debido a que las yemas axilares se activan y forman inicialmente una roseta, por lo que debe dejarse pasar algunas semanas para aislar los nuevos brotes formados.

Durante el cultivo *in vitro* de *A. halimus*, se observó que algunos brotes enraízan fácilmente (62,26%), y al ser segmentados y cultivados aisladamente vuelven a hacerlo sin necesidad de la aplicación de auxinas. Además, sólo los “explantes” de las plantas uno y dos enraizaron, demostrando la importancia de la condición fisiológica y genética de la especie para ello.

El proceso de aclimatación no fue exitoso, obteniendo sólo 9 “plantlets” vivos al final del ensayo (5,00%), el mejor resultado (5 “plantlets”) se logró con brotes de longitud entre 3,5 a 4,49 cm, aclimatados en un principio con MS, agua destilada estéril y tapados con papel filtro. Por ello es recomendable realizar más pruebas para mejorar el sistema y lograr una aclimatación más paulatina.

Como la procedencia del material vegetal influye directamente en el cultivo *in vitro*, se deberían extraer los “explantes” de las plantas uno y dos, además de realizar una manipulación adecuada en el período de multiplicación, sin seccionar demasiado y así disminuir la oxidación, causante de las mayores pérdidas.

Finalmente, se puede concluir que *Atriplex halimus*, respondió satisfactoriamente a la multiplicación *in vitro*, pero la principal limitante de su cultivo fue la aclimatación, debido a la fragilidad de los “plantlets” a las condiciones ambientales *ex vitro*, por lo que es necesario mejorar el proceso en forma gradual.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agier, C. et Burry, M. 1996. Etablissement de la souche tissulaire d' *Atriplex halimus* à partir de graines provenant de Djelfa (Algérie). In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l' *Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d' individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1995 au 31 Mar 1996). pp. 12-15.
- Amimi, N. ; Chaabani, N; Ammar, S et Bouzid, S. 1997. Multiplication rapide d' *Atrilex halimus* par les techniques de la culture *in vitro*. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l' *Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d' individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1996 au 31 Mar 1997). 14 p.
- Barrow, J. R. 1987. Organogenesis and shoot-tip multiplication from tissue of *Atriplex* species. In: Proceedings Symposium on Shrub Ecophysiology and Biotechnology, Logan, Utah, June 30 - July 2. pp. 37-39.
- Bessafa, B. 1995. Induction du bourgeonnement chez *Atriplex halimus* L.: Effets des nitrates et des substances de croissance. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l' *Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d' individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1994 au 31 Mar 1995). pp. 25-37.
- Botti, C. 1992. Aplicaciones de la biotecnología en la micropropagación y en el mejoramiento genético de especies vegetales. Simiente 62 (1) : 25-30.
- Botti, C. 1998. Cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Apuntes de clases. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. 63 p.
- Bustos, A. 2001. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Apuntes de clases. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 46 p.
- Cabello, A y Vita, A. 1980. Introducción de especies arbóreas forrajeras. II Antecedentes botánicos-ecológicos y perspectivas de uso de las especies a

introducir. Convenio Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile, y Serplac XI Región. 74 p.

Chaouch, F. Z. 1997. Effets des traitements hormonaux sur la morphogénèse des micro-boutures de l'*Atriplex halimus* L. issues de vitro-semis. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1996 au 31 Mar 1997). 2 p.

Chaouch, F. Z. et Bessafa, B. 1995. Essais de microbouturage (herbacé et semi-ligneux). In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\*CT94-0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1994 au 31 Mar 1995). 12 p.

Chaouch, F. Z. et Hassane, S. 1998. Essais de clonage de l'*Atriplex halimus* à partir de plants obtenus *in vitro*. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1997 au 31 Mar 1998). 34 p.

Darnaude, J. 2003. Plantas silvestres de España. [En línea] <<http://www.hoseito.com/FLORES%20SILVESTRES/Atriplex%20halimus.htm>>. [Consulta 23 agosto 2003].

Dixon, R. and González, R. 1994. Plant cell culture: a practical approach. 2<sup>a</sup> Edition. Oxford. University Press. 230 p.

Fundación Global Nature. 2003. Gestión de fincas en Murcia [En línea] <[http://www.fundacionglobalnature.org/proyectos/gestion\\_agroambiental/gest\\_fincas\\_murcia.htm](http://www.fundacionglobalnature.org/proyectos/gestion_agroambiental/gest_fincas_murcia.htm)>. [Consulta : 23 agosto 2003].

Gigi, N. et Kinet, J. M. 1998. Multiplication *in vitro* d'*Atriplex halimus* L. : bourgeonnement axillaire et adventif. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1997 au 31 Mar 1998). 5 p.

- Hartmann, H. y Kester, D. 1980. Propagación de plantas; Principios y Practicas. 2ª Edición. México. Continental. 814 p.
- Kyte, L. and Kleyn, J. 1996. Plants from test tubes : an introduction to micropropagation. 3ª Edition. Portland, Oregon. Timber Press. 240 p.
- Lailhacar, S.; Padilla, F. y Muñoz, S. 1993. Evaluación nutritiva de especies arbustivas del género *Atriplex* en el secano costero de clima mediterráneo árido de Chile. I. Germoplasma probado hasta 1985. Avances en Producción Animal. 18 (1-2): 121-130.
- Lailhacar, S.; Rivera, H.; Silva, H. y Caldentey, J. 1995. Rendimiento de leña y recuperación al corte en diferentes especies y procedencias arbustivas del género *Atriplex*. Ciencias Forestales. 10 (1-2): 85-97.
- Lailhacar, S. y Torres, C. 2000. Papel de los arbustos forrajeros en la ganadería del secano árido de la zona centro-norte. Circular de Extensión N°26. Departamento de Producción Animal. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. 12 p.
- Margara, J. 1986. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*: los meristemas y la organogénesis. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 230 p.
- Mei, B. ; No, E. ; Mc Williams, E. L. ; Gould, J. H. And Newton, R. J. 1997. *In vitro* regeneration of four-wing saltbush (*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.). Journal of Range Management 50 (4): 413-418.
- Meza, P. 2000. Micropropagación de *Atriplex nummularia* Lindl., a través de cultivo *in vitro*. Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. 55 p.
- Moran, M.; Bajji, M. et Kinet J. 1995. Informe anual del equipo de Belgica. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l' *Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d' individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1994 au 31 Mar 1995).
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

- Navarro, R y Gálvez, C. [s.a.]. Manual para la identificación y reproducción de semillas de especies vegetales autóctonas de Andalucía. Tomo I. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía. 195 p.
- Olivares, A. 1983. Los arbustos del género *Atriplex* y su importancia como especies forrajeras. En: Encuentro del estado de la investigación sobre manejo silvopastoral en Chile. U. de Talca. Talca 3-4 Nov. pp. 5-13.
- Ostle, B. 1965. Estadística aplicada. México. Limusa-Wiley. 629 p .
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. México. Ediciones Mundi-Prensa. 326 p.
- Pourrat, Y. 1996. Etude de la micropropagation *in vitro*. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l' *Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d' individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1995 au 31 Mar 1996). 12 p.
- Pourrat, Y. and Dutuit, P. 1993. Effects of the sodium and calcium concentrations on the *in vitro* growth of *Atriplex halimus* L. plantlets. Journal of Plant Nutrition 16 (8): 1417-1429.
- Rivera, H. 1996. Rendimiento y poder calorífico de la leña de diferentes especies y procedencias del género *Atriplex*. Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. 102 p.
- Rosas, M. 1989. El género *Atriplex* (Chenopodiaceae) en Chile. Gayana Botánica 46 (1-2): 3-82.
- Rossell, C. y Villalobos, V. 1990. Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Roma. FAO. 112 p.
- Rubilar, J. 2000. Enraizamiento y aclimatación de plantas de jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider), cv. Mirov, propagadas *in vitro*. Tesis Ingeniero Agronomo. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 48 p.
- Salisbury, F. y Ross, C. W. 1994. Fisiología vegetal. México. Editorial Iberoamérica. 759 p.

- Serra, M. T. 1989. Manual de dendrología de apétalas. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Agronómicas y Forestales. Universidad de Chile. 44 p.
- Souayah, N. ; Ammar, S. et Bouzid, S. 1997. Essais de clonage de genotypes adultes d'*Atriplex* (*Atriplex halimus* L., chenopodiacees) par bouturage et micro-bouturage. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Projet STD 3 N° TS3\* CT94 -0264. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1996 au 31 Mar 1997). 6 p.
- Souayah, N. ; Ammar, S. et Bouzid, S. 1998. La micropropagation d'*Atriplex halimus* L. en culture *in vitro*. In: Dutuit, P. Coordinateur. Etude de la diversité biologique de l'*Atriplex halimus* pour le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et constitutions de clones. CEE. Rapport Scientifique Annuel (1° Juin 1997 au 31 Mar 1998). Projet STD 3 N° TS3\* CT94 - 0264. 6 p.
- Torres, C. 1999. Efecto de distintas especies y procedencias arbustivas del género *Atriplex* sobre el estrato herbáceo asociado en el secano costero árido de la IV Región. Tesis Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. 115 p.
- Vita, A. 1989. Ecosistemas de bosques y matorrales mediterráneos y sus tratamientos silviculturales en Chile. CONAF/PNUD/FAO. Documento de Trabajo N° 21. 243 p.
- Wochok, Z. S. and Sluis, C. J. 1979. Micropropagation of *Atriplex canescens*. In vitro 15: 176 – 177.