



## INFORME CONTRATO DE DESEMPEÑO 2009

### PRODUCTO 6:

**“Mantención de un banco de germoplasma en condiciones *in vitro* de 40 clones de árboles plus de raulí (*N. alpina*) y 20 clones de árboles de alto valor genético de Lenga (*N. pumilio*)”**

INSTITUTO FORESTAL, SEDE BIO BIO  
GIT: MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BIOTECNOLOGÍA

CONCEPCIÓN, 2009

# **MANTENCIÓN DE CLONES EN BANCO DE GERMOPLASMA *in vitro***

## **Contenido:**

**INTRODUCCIÓN**

**OBJETIVOS**

**MATERIAL Y MÉTODO**

**Material**

**Método**

**RESULTADOS**

**CONCLUSIONES**

## INTRODUCCIÓN

A través de la ejecución de diversos proyectos de I+D en los ámbitos del Mejoramiento Genético de Árboles y de la Biotecnología, en el Laboratorio de Micropropagación de INFOR, se ha conformado un Banco de Germoplasma, donde se encuentran representadas al menos 4 especies tanto nativas como exóticas de alto interés económico. Estas especies, actualmente cuentan con Programas de Mejoramiento Genético en desarrollo, razón por la cual el material vegetal existente en el Laboratorio de INFOR, corresponde a clones de los árboles plus, seleccionados y/o desarrollados en estos programas de mejora.

Los árboles plus, han sido seleccionados de acuerdo a su mayor crecimiento, rectitud y forma del fuste; en algunos casos también se han aplicado criterios de resistencia a estreses abióticos, como tolerancia al déficit hídrico y otros. El diferencial de selección, de los árboles plus, es muy elevado por lo que su productividad potencial es sustancialmente mayor respecto de plantaciones comerciales, lo cual hace que el material vegetal que conforma el Banco de Germoplasma tenga un alto valor genético.

En el Laboratorio de Micropropagación de INFOR, a través de la aplicación de técnicas de organogénesis somática, ha sido posible clonar un número considerable de estos árboles. En la figura N° 1 se muestran algunos ejemplares de árboles plus que han sido clonados, y de los cuales se mantienen copias micropropagadas en el Banco de Germoplasma.

En general, uno de los aspectos más difíciles de abordar en la micropropagación de árboles plus es la introducción de material aséptico a condiciones *in vitro*, por lo mismo esta actividad conlleva el mayor porcentaje de los costos asociados a la clonación de árboles adultos. Ante esta situación, es aconsejable conservar el material *in vitro*, para evitar volver a incurrir en los elevados costos que involucra el establecimiento inicial de los cultivos *in vitro*.

En el caso particular de la especie nativa raulí (*Nothofagus alpina*), muchos de los árboles plus han sido talados, y debido a la sobre-explotación de este recurso, es posible afirmar, que el Banco de Germoplasma constituye uno de los últimos reservorios del material genético más valioso de esta especie, para el país.

Por otro lado, el material *in vitro* tiene una alta importancia desde el punto de vista científico, ya que es muy adecuado para realizar estudios nutricionales y fisiológicos. Además, potencialmente puede utilizarse como base para la aplicación de tecnologías biotecnológicas de reciente desarrollo, donde sus mayores potencialidades se encuentran en la reducción de los costos de propagación, producción de semillas artificiales, criopreservación de germoplasma y regeneración de plantas transformadas genéticamente.

Lo anteriormente expuesto, deja en evidencia la importancia que tiene el resguardar adecuadamente el Banco de Germoplasma *in vitro*, que actualmente mantiene el Instituto Forestal en el Laboratorio de Micropropagación, localizado en la Sede Bío-Bío, VIII región.

En el presente informe se detalla el material genético preservado y se describen los procedimientos realizados para asegurar su mantención y preservación en condiciones *in vitro*.



**Figura Nº 1**  
**ÁRBOLES PLUS DE LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL INSTITUTO FORESTAL,**  
**COPIAS MICROPROPAGADAS DE ESTOS ÁRBOLES SON MANTENIDAS EN EL BANCO DE**  
**GERMOPLASMA *in vitro*.**

## **OBJETIVOS**

Resguardar material vegetal de alto valor genético y económico, a través de la mantención de un Banco de Germoplasma *in vitro* en el Laboratorio de Micropropagación de INFOR.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **Material**

El Banco de Germoplasma *in vitro*, actualmente se compone de diversos clones de árboles plus, en un número variable de cada unos de ellos, de las especies nativas raulí (*Nothofagus alpina*) y lenga (*Nothofagus pumilio*) y de las especies exóticas castaño (*Castanea sativa*) y *Eucalyptus camaldulensis*. Incluye también otras especies como *E. globulus* y especies del género *Acacia*, que se encuentran en proceso de multiplicación para satisfacer los requerimientos de proyectos de investigación en curso.

La colección de germoplasma, se mantiene confinada en frascos de vidrio, donde se le proporciona un medio aséptico y sustancias nutritivas adecuadas para la generación de brotes axilares, que sea permanente en el tiempo.

## **Método**

El material vegetal que compone el Banco de Germoplasma, se mantuvo en una cámara de incubación con control de temperatura y fotoperíodo. Se proporcionó una temperatura que fluctuó entre 21 y 25°C y un fotoperíodo constante de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

El medio de cultivo utilizado fue variable dependiendo de la especie y en algunos casos del tipo de clon. Los medios nutritivos, fueron desarrollados y definidos, durante la ejecución de diversos proyectos de I+D, relacionados con la multiplicación clonal de árboles plus. Para el caso, del presente trabajo, se utilizaron las mismas formulaciones, pero modificadas en su concentración de hormonas vegetales.

Los explantes se cultivaron en frascos de 400 cc de volumen, con 200 ml de medio nutritivo aséptico, adicionado con hormonas del tipo citocininas, y dependiendo de la especie también con auxinas, ambas en concentraciones muy bajas, pero suficientes para permitir la formación de nuevos brotes. En el caso de raulí (*N. alpina*), además se mantuvo un respaldo de la colección, en frascos más pequeños del tipo snapt.

Se realizaron subcultivos cada 60 días. Para minimizar el riesgo de pérdida de genotipos (clones) por contaminación durante su manipulación en cámara de flujo laminar, se tomaron las siguientes precauciones:

- Cada clon contó con un mínimo de 6 réplicas, dispuestas en distintos frascos.
- Para cada subcultivo se dispusieron grupos de clones, de manera que cada uno de ellos contara con al menos una réplica de cada clon.
- Subcultivo de cada grupo, en días separados.
- Seguimiento y monitoreo del programa de subcultivo.

Adicionalmente, se realizaron inventarios en forma mensual y se revisó permanentemente el estado de los cultivos.

## **RESULTADOS**

Los medios nutritivos utilizados permitieron la mantención de brotes vigorosos de los clones y especies que componen el Banco de Germoplasma. La estrategia de cultivo implementada, permitió que no se perdieran clones por efecto de contaminación durante su manipulación en la cámara de flujo laminar. En el Cuadro N° 1, se presenta la colección de clones y especies que actualmente componen el Banco de Germoplasma *in vitro*.

**Cuadro Nº 1**  
**COMPOSICIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO***

<b>Especie: Raulí (<i>Nothofagus alpina</i>)</b>							
ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon
1	<b>3</b>	11	<b>37</b>	21	<b>69</b>	31	<b>120</b>
2	<b>6</b>	12	<b>38</b>	22	<b>80</b>	32	<b>121</b>
3	<b>7</b>	13	<b>40</b>	23	<b>87</b>	33	<b>126</b>
4	<b>10</b>	14	<b>42</b>	24	<b>88</b>	34	<b>128</b>
5	<b>11</b>	15	<b>43</b>	25	<b>89</b>	35	<b>130</b>
6	<b>12</b>	16	<b>44</b>	26	<b>93</b>	36	<b>131</b>
7	<b>18</b>	17	<b>53</b>	27	<b>97</b>	37	<b>132</b>
8	<b>19</b>	18	<b>58</b>	28	<b>98</b>	38	<b>138</b>
9	<b>23</b>	19	<b>64</b>	29	<b>102</b>	39	<b>141</b>
10	<b>26</b>	20	<b>65</b>	30	<b>105</b>		
<b>Especie: Castaño (<i>Castanea sativa</i>)</b>							
ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon		
1	<b>4</b>	3	<b>26</b>	5	<b>28</b>		
2	<b>22</b>	4	<b>27</b>	6	<b>30</b>		
<b>Especie: Lengua (<i>Nothofagus pumilio</i>)</b>							
ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon
1	<b>1</b>	4	<b>16</b>	7	<b>39</b>	10	<b>96</b>
2	<b>7</b>	5	<b>37</b>	8	<b>67</b>	11	<b>142</b>
3	<b>12</b>	6	<b>38</b>	9	<b>89</b>		
<b>Especie: <i>Eucalyptus camaldulensis</i></b>							
ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon	ID	Clon
1	<b>2</b>	3	<b>6</b>	5	<b>28</b>	7	<b>31</b>
2	<b>3</b>	4	<b>9</b>	6	<b>30</b>	8	<b>50</b>

En las figuras siguientes se muestra la colección de germoplasma de las especies raulí, castaño, lenga y *E. camaldulensis*, respectivamente.



**Figura Nº 1**  
**COLECCIÓN DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE RAULÍ (*Nothofagus alpina*)**



**Figura Nº 2**  
**COLECCIÓN DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE CASTAÑO (*Castanea sativa*)**



Figura N° 3  
COLECCIÓN DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE LENGA (*Nothofagus pumilio*)



Figura N° 4  
COLECCIÓN DE GERMOPLASMA *IN VITRO* DE *Eucalyptus camaldulensis*



## CONCLUSIONES

La metodología implementada permitió preservar adecuadamente los 60 clones que componen el Banco de Germoplasma de material genético de alto valor productivo, de las cuatro especies consideradas en este trabajo.

La estrategia de cultivo utilizada resultó ser efectiva, ya que no se observó la pérdida de clones debido a contaminación de los explantes durante los subcultivos, permitiendo la conservación del número inicial de clones.

El material vegetal, mantenido en condiciones *in vitro*, en una etapa permanente de proliferación de nuevos de brotes, puede ser multiplicado a gran escala en cualquier momento, estando de esta manera disponible, permanentemente en el corto y largo plazo, tanto para el sector productivo como para el mundo científico, y de esta forma aprovechar las ventajas productivas asociadas a la silvicultura clonal de especies forestales.