



Artículo / Article

Organogénesis directa para la propagación *in vitro* de *Quillaja saponaria* Molina en Sudamérica Austral

Direct organogenesis for *in vitro* propagation of *Quillaja saponaria* Molina in Southern South America

José Vidal Cob Uicab¹, Darcy Ríos Leal², Ana María Sabja³, Priscila Cartes Riquelme⁴ y Manuel Sánchez Olate²

Resumen

Quillaja saponaria es una especie arbórea endémica de cuatro países de América del Sur. De su corteza, se extraen saponinas, moléculas de importancia económica utilizadas con fines farmacéuticos, industriales y agronómicos. En el presente estudio se evaluó el efecto de componentes hormonales sobre la capacidad morfogénica de *Q. saponaria*, a partir de segmentos caulinares provenientes de árboles adultos. Se empleó el medio de cultivo *Murashige* y *Skoog* (MS) suplementado con nueve concentraciones de ácido indol 3-butírico (AIB) y 6-bencilaminopurina (BAP). Se utilizó un diseño completamente al azar balanceado con cinco repeticiones; la unidad experimental fue un frasco de vidrio con cuatro explantes. El material se mantuvo en una cámara de crecimiento a 25 ± 1 °C en el día y 22 ± 1 °C en la noche, a una intensidad lumínica de 3000 lux y una humedad relativa de 60 %. Se determinaron efectos significativos ($P = 0.01$) de los tratamientos sobre las variables número de brotes y elongación caulinar. La prueba estadística de rangos múltiples de *Duncan* ratificó que los tratamientos con diferencias significativas fueron 1.0 mg L^{-1} de AIB y 2.0 mg L^{-1} de BAP, para número de brotes por explante y 1.5 mg L^{-1} de AIB y 0.5 mg L^{-1} de BAP para la elongación caulinar. El análisis histológico evidenció la proliferación de estructuras meristemáticas a partir de tejido subepidérmico. Estos resultados respaldan los cimientos científicos de la competencia morfogénica de árboles adultos como fuentes de germoplasma para la propagación clonal, clave en un programa de masificación de individuos *elite*.

Palabras clave: Ácido indol 3-butírico, edad fisiológica, estructuras meristemáticas, *Quillaja saponaria* Molina, segmentos nodales, vitroplantas.

Abstract

Quillaja saponaria is an endemic tree species from four countries in South America. From its bark, saponins are extracted which are economically important molecules used in pharmaceutical, industrial and agricultural purposes. In the present study the effect of hormonal components on the morphogenic capacity of *Q. saponaria* from caulinary segments from adult trees were evaluated. *Murashige* and *Skoog* (MS) culture medium supplemented with nine concentrations of 3-indole butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurine (BAP) was used. A completely randomized balanced design with five replications was used; the experimental unit was a glass jar with four explants. The material was kept in a growth chamber at 25 ± 1 °C during day time and 22 ± 1 °C at night, with a light intensity of 3000 lux and a relative humidity of 60 %. Significant effects ($P = 0.01$) of the treatments on the variables number of outbreaks and caulinary elongation were determined. *Duncan's* multiple range test confirmed that the treatments with significant differences were 1.0 mg L^{-1} of IBA and 2.0 mg L^{-1} BAP, for the number of shoots per explant and 1.5 mg L^{-1} of IBA and 0.5 mg L^{-1} BAP for caulinary elongation. The histological analyses revealed that the proliferation of meristematic structures was originated in the subepidermic tissue. These results support the scientific foundation of morphogenic competence of adult trees as sources of germ plasm for clonal propagation, which are crucial in a massive program of elite individuals.

Key words: Indole-3-butyric acid, physiological age, meristematic structures, *Quillaja saponaria* Molina, nodal segments, vitro-plantlets.

Fecha de recepción/Received date: 21 de octubre de 2015; Fecha de aceptación/Accepted date: 5 de mayo de 2016.

¹ Campo Experimental Chetumal. Centro de Investigación Regional Sureste. INIFAP. México. Correo-e: cob.jose@inifap.gob.mx

² Facultad de Ciencias Forestales. Centro de Biotecnología. Universidad de Concepción. Chile.

³ GenFor, S. A. México

⁴ Laboratorio Silvoagrícola Vitroflora Austral, Universidad de Concepción. Chile.

Introducción

Quillaja saponaria Molina (quillay) es un árbol endémico de cuatro países sudamericanos: Chile, Bolivia, Perú y Ecuador (INDAP, 2000). En Chile, su distribución limita al norte con el paralelo 30° 30' de latitud sur, en la IV región de Coquimbo. El límite sur se ubica al norte de la IX región en los alrededores de la ciudad de Algol, 38° de latitud sur (Gallardo y Gastó, 1987).

De acuerdo con el Catastro y Evaluación de los Recursos Vegetacionales de Chile (CONAF *et al.*, 1997), *Q. saponaria* forma parte del tipo forestal esclerófilo que cubre una superficie de 324 631 ha, equivalentes a 2.6 % de los bosques nativos del país (Donoso y Escobar, 2006). De su madera y corteza se extraen saponinas, moléculas de gran importancia económica utilizadas con fines farmacéuticos, industriales y agronómicos (Kensil *et al.*, 1991; Hoffmann, 1995). En la actualidad, la alta demanda de su corteza como principal fuente de saponinas y el cambio de uso del suelo han reducido la presencia de árboles maduros, en particular, en la zona centro de Chile.

Esta situación fue determinante para realizar un proyecto silvícola y de manejo forestal para la especie, respaldado por un programa de propagación vegetativa (Prehn *et al.*, 2003), en el cual se diseñaron protocolos de modelos de desarrollo morfogénico para propagar vegetativa y masivamente árboles adultos de quillay, mediante el uso de semillas como explantes, mismas que reúnen un alto contenido de saponinas de buena calidad y de baja toxicidad (Prehn *et al.*, 2003).

Como una contribución complementaria a la propagación *in vitro*, en el presente estudio se ensayó la técnica de micropropagación denominada organogénesis directa. Se evaluó el efecto de componentes hormonales sobre la capacidad morfogénica de segmentos caulinares, apicales y basales provenientes de árboles adultos.

La utilidad práctica del método consiste en establecer las diferencias y dilucidar aspectos de la competencia morfogénica a partir de segmentos caulinares de individuos adultos, los cuales pueden ser utilizados como fuentes de germoplasma para la propagación clonal.

Materiales y Métodos

El experimento se hizo en el Laboratorio de Biotecnología Forestal de la Universidad de Concepción, ubicada en Concepción, Chile (36°46' S y 73°03' O), 500 km al sur de la capital del país. Concepción es una ciudad y comuna del centro-sur de Chile, y es la capital de la VIII región del Bío Bío.

Introduction

Quillaja saponaria Molina (Quillay) is an endemic tree of four South American countries: Chile, Bolivia, Peru and Ecuador (INDAP, 2000). In Chile its distribution bounded on the north by the parallel 30° 30' south latitude, in the IV region of Coquimbo. The southern boundary is located north of the IX region around the city of Algol, 38° south latitude (Gallardo and Gastó, 1987).

According to the *Catastro y Evaluación de los Recursos Vegetacionales de Chile* (Land Registry and Vegetational Resources Assessment of Chile) (CONAF *et al.*, 1997), *Q. saponaria* is part of the sclerophyllous forest type covering an area of 324 631 ha, equivalent to 2.6 % of the country's native forests (Donoso and Escobar, 2006). From its wood and bark, saponins are extracted which are economically very important molecules used in pharmaceutical, industrial and agricultural endings (Kensil *et al.*, 1991; Hoffmann, 1995). Currently, the high demand for its bark as the main source of saponins and land use change have reduced the presence of adult trees, particularly in the central area of Chile.

This situation was crucial to carry out a forestry and forest management project for the species, supported by a program of vegetative propagation (Prehn *et al.*, 2003), in which protocols of morphogenic development models were designed to propagate vegetatively and massively adult Quillay trees, using seeds as explants as they have a high content of saponins of good quality and low toxicity (Prehn *et al.*, 2003).

As an additional contribution to the *in vitro* propagation, in the present study a micropropagation technique known as direct organogenesis was tested. The effect of hormonal components on the morphogenic capacity of caulinary, apical and basal segments from adult trees were evaluated.

The practical utility of the method is to establish the differences and clarify aspects of the morphogenic competition from caulinary segments of adult individuals, which can be used as sources of germ plasm for clonal propagation.

Materials and Methods

The experiment was performed at the *Laboratorio de Biotecnología Forestal* (Laboratory of Forest Biotechnology) of the *Universidad de Concepción*, located in *Concepción*, Chile (36°46' S and 73°03' W), 500 km south of the capital. *Concepción* is a city and commune in south-central Chile, and is the capital of the VIII region of *Bío Bío*.



Medio de cultivo

El medio básico para el cultivo fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) con sus macronutrientes reducidos a 1/2, suplementado con una combinación y balance hormonal de ácido indolbutírico (AIB) y bencilaminopurina (BAP). Como fuente energética, se adicionó sacarosa (30 g L⁻¹) y, se ajustó el pH a 5.8 con NaOH (hidróxido de sodio); como agente gelificante, se adicionó agar (7 g L⁻¹).

Material vegetal

Se utilizaron explantes provenientes de la zona apical y basal de árboles adultos, los cuales se colocaron en posición vertical en contacto directo con el medio nutritivo; se sembraron 180 explantes por cada réplica y fueron cultivados en frascos de vidrio (5 cm de alto x 4 cm de diámetro) y ubicados en una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz continua (40 μmolm⁻²s⁻¹) y temperatura (25±1 °C). Posteriormente, se efectuaron observaciones cada 15 días, en las que se registraron el tamaño y la coloración del explante; a las seis semanas de cultivo, se llevó a cabo una primera cuantificación de la presencia de puntos de crecimiento, número de brotes y elongación caulinar.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar balanceado, con cinco repeticiones y con arreglo factorial de tratamientos. Los factores que se estudiaron fueron el ácido indol 3-butírico (AIB) y la 6-bencilaminopurina (BAP) en tres niveles, para un total de nueve tratamientos (Cuadro 1). La unidad experimental fue un frasco de vidrio con cuatro explantes, lo cual constituyó 45 réplicas por condición. A los 90 días de cultivo, se evaluaron las variables número de yemas, número de brotes y longitud de entrenudos por explante. A la información, se le practicó un análisis de varianza (ANDEVA) a través del procedimiento PROC GLM del programa estadístico SAS (Statistical Analysis System, 1999). La comparación de medias de los tratamientos se hizo con el procedimiento prueba de rangos múltiples de *Duncan*, con un nivel de significancia de 5 %.

Culture medium

The basic medium for the culture was the MS (Murashige and Skoog, 1962) with macronutrients reduced to 1/2, supplemented with a combination of hormonal balance and indole butyric acid (IBA) and benzylaminopurine (BAP). As energy source, sucrose (30 g L⁻¹) was added and the pH was adjusted to 5.8 with NaOH (sodium hydroxide); as gelling agent agar (7 g L⁻¹) was added.

Vegetal material

Explants from the apical and basal area of adult trees were used. The explants were placed upright in direct contact with the nutrient medium; 180 explants were planted for each replication and were grown in glass jars (5 cm high x 4 cm in diameter) and placed in a growth chamber under continuous light conditions (40 μmolm⁻²s⁻¹) and temperature (25±1 °C). Subsequently, observations were made every 15 days, when the size and coloration of the explant were recorded; at six weeks of culture, a first quantization related to the presence of growth points, number of shoots and caulinary elongation was performed.

Experimental design and statistical analysis

The experiment was established under a completely balanced randomized design with five replications and factorial arrangement of treatments. The studied factors were the indole 3-butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurine (BAP) on three levels, for a total of nine treatments (Table 1). The experimental unit was a glass jar with four explants, which constituted 45 replicates per condition. After 90 days of culture, the number of buds, number of shoots and length of internodes per explant variables were evaluated. The information was subjected to an analysis of variance (ANOVA) through the PROC GLM SAS statistical program (Statistical Analysis System, 1999). Comparison of treatment means was made with the multiple range test of *Duncan* procedure, with a significance level of 5 %.



Cuadro 1. Tratamientos para la inducción de organogénesis directa *in vitro* en explantes de *Quillaja saponaria* Molina extraídos de diferentes zonas del árbol.

Tratamientos	Zona del árbol	
	Apical	Basal
	AIB/BAP mg L ⁻¹	AIB/BAP mg L ⁻¹
T1	0.1/2.0	0.1/2.0
T2	0.1/3.0	0.1/3.0
T3	0.1/0.5	0.1/0.5
T4	1.0/2.0	1.0/2.0
T5	1.0/3.0	1.0/3.0
T6	1.0/0.5	1.0/0.5
T7	1.5/2.0	1.5/2.0
T8	1.5/3.0	1.5/3.0
T9	1.5/0.5	1.5/0.5

Estudio histológico

Para el análisis histológico, se tomaron seis muestras de explantes con brotes durante las etapas de proliferación y elongación. El material se fijó entre 24-48 horas en FAA [formalina (5 %)-ácido acético (5 %)-alcohol etílico (90 %)]. En seguida, se lavaron con agua corriente durante 24 horas. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en soluciones seriadas de alcohol etílico (50, 75, 85 y 95 %) cada dos horas. A continuación, las muestras se pasaron tres veces por alcohol etílico puro, durante dos horas en los primeros dos deslizamientos y toda la noche en la última traslación. Posteriormente, se realizaron tres inmersiones en xilol por dos horas en cada deslizamiento, y se impregnaron en tres pases de parafina cada dos horas. Las muestras se incluyeron en bloques de parafina, a los que se les realizaron cortes en secciones transversales y longitudinales con un grosor de 5-8 µm, con un micrótopo de deslizamiento vertical tipo Minot. Por último, cada corte fue adherido a un portaobjetos y teñido con azul de astra safranina al 1 %. Para la observación del material, se utilizó un microscopio Axioskop OPTON y las imágenes se fotografiaron (40x) con una cámara digital Canon Power Shot G5 adaptada al microscopio.

Resultados y Discusión

En plantas leñosas la propagación *in vitro* resulta más difícil de lograr por su condición estructural y los procesos de la madurez asociados con la edad. Al respecto, se mencionan tres etapas que explican lo anterior: envejecimiento cronológico, referido a cambios expresados en función del tiempo; envejecimiento ontogénico, relacionado a la transición gradual e irreversible regulada bajo control genético; y envejecimiento

Table 1. Treatments for of direct organogenesis induction *in vitro* in *Quillaja saponaria* Molina explants taken from different parts of the tree.

Treatments	Tree Zone	
	Apical	Basal
	IBA/BAP mg L ⁻¹	IBA/BAP mg L ⁻¹
T1	0.1/2.0	0.1/2.0
T2	0.1/3.0	0.1/3.0
T3	0.1/0.5	0.1/0.5
T4	1.0/2.0	1.0/2.0
T5	1.0/3.0	1.0/3.0
T6	1.0/0.5	1.0/0.5
T7	1.5/2.0	1.5/2.0
T8	1.5/3.0	1.5/3.0
T9	1.5/0.5	1.5/0.5

Histological study

For the histological analysis, six samples of explants with shoots were taken during the stages of proliferation and elongation. Samples were fixed 24-48 hours in FAA [formalin (5 %) - acetic acid (5 %) - ethyl alcohol (90 %)]. Then, they washed with running water for 24 hours. Once washing was complete, the tissue was dehydrated in serial solutions of ethyl alcohol (50, 75, 85 and 95 %) every two hours. The samples were then passed three times by pure ethyl alcohol for two hours in the first two slides and all night in the final translation. Then three immersions were conducted in xylol for two hours in each slide, and embedded in paraffin three passes every two hours. The samples were included in paraffin blocks, which were performed in longitudinal and transverse cuts sections with a thickness of 5-8 microns with a Minot vertical sliding type microtome. Finally, each cut was adhered to a slide and stained with safranin astra blue 1 %. An Opton Axioskop microscope and images were used for observation of samples (40x), which were photographed with a Canon Power Shot G5 digital camera adapted to the microscope.

Results and Discussion

In woody plants *in vitro* propagation is more difficult to achieve for its structural condition and maturity processes associated with age. In this regard, three processes that explain the above mentioned are described: chronological aging, based on changes expressed in function of time; ontogenetic aging, related to the gradual and irreversible transition regulated under genetic control; and physiological aging, associated with the loss of vigor caused by hormonal changes, nutritional and

fisiológico, asociado con la pérdida de vigor causada por cambios hormonales, condiciones nutricionales y ambientales (Pierik, 1990; Russell *et al.*, 1990; Gutiérrez, 1995; Pacheco, 1995; Andrés *et al.*, 2002). En particular, la capacidad morfogénica del explante está fuertemente influenciada por la ontogenia, la cual varía de acuerdo con la posición del material vegetal en el árbol (Magini, 1984).

En el presente estudio se observó una capacidad morfogénica superior en los explantes provenientes de la zona basal (Figura 1A), atribuible a las diferencias de la ontogenia de los tejidos donde se originan los brotes, y por las diferentes concentraciones hormonales en las distintas zonas del árbol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fouret *et al.* (1986); Thanh *et al.* (1987) y Yeung *et al.* (1998), quienes demostraron la existencia de una mayor competencia morfogénica en microtallos basales y una mejor utilización de las reservas nutritivas para la elongación celular.

Sánchez-Olate *et al.* (2005) y Hasbún (2006) indican que los microtallos basales son ontogénicamente más jóvenes y ostentan una mejor respuesta morfogénica, debido a que han sido generados a partir de tejidos meristemáticos latentes. Morisset *et al.* (2012) señalan la importancia de otros factores como la cantidad de agua, luz y carbohidratos que los microtallos basales aprovechan del material parental durante su desarrollo. Los microtallos de origen apical tuvieron menores tasas de proliferación y una estrecha elongación caulinar. Von Aderkas y Bonga (2000), Andrés *et al.* (2002), Fraga *et al.* (2002), Tang *et al.* (2004), Ramarosandratnam y Van Staden (2005) sugieren que las diferencias en las respuestas de la proliferación y elongación de los microtallos basales y apicales podría vincularse a la existencia de marcadores de tipo bioquímico y a diferencias en las concentraciones hormonales dentro del árbol donador.

Acorde con los resultados del ANDEVA, para el factor tratamiento se obtuvo efecto significativo ($P < 0.01$, $F = 77.46$ y 12.82) sobre las variables número de brotes, así como para la longitud de entrenudos y brotes. En el caso de la variable número de brotes, el tratamiento T4 (1.0/2.0 mg L⁻¹ de AIB/BAP) fue el que originó un número más grande, con un promedio de siete brotes por explante (Cuadro 2). En contraste, el tratamiento T1 (0.1/2.0 mg L⁻¹ de AIB/BAP) estimuló múltiples puntos de crecimiento (Figura 1A), y el tratamiento T5 (1.0/3.0 mg L⁻¹ de AIB/BAP) promovió brotes de aspecto y forma de roseta con gran cantidad de callo circundante (figuras 1B y 1F).

Congruente con estos resultados, queda demostrado y fundamentado el papel que juegan las relaciones hormonales auxina-citoquinina como factores clave en el control de la morfogénesis. Además, coinciden con los obtenidos en *Persea americana* Mill por Mohamed-Yasseen (1995), Pliego-Alfaro y Murashige (1988), así como en *Persea lingue* Ness

environmental conditions (Pierik, 1990; Russell *et al.*, 1990; Gutiérrez, 1995; Pacheco, 1995; Andrés *et al.*, 2002). Specifically, the morphogenic capacity of the explant is strongly influenced by ontogeny, which varies according to the position of the plant material in the tree (Magini, 1984).

In the present study greater morphogenic capacity explants from the basal area (Figure 1A) were observed, which is attributable to differences in the ontogeny of the tissue where buds originate, and by the various hormone levels in the different areas of the tree. These results agree with those obtained by Fouret *et al.* (1986); Thanh *et al.* (1987) and Yeung *et al.* (1998), who demonstrated the existence of greater competition in basal morphogenic microshoots and better use of nutritional reserves for cell elongation.

Sánchez-Olate *et al.* (2005) and Hasbún (2006) indicate that basal ontogenically microshoots are younger and show a better morphogenic response, because they have been generated from dormant meristem tissues. Morisset *et al.* (2012) point out the importance of other factors such as the amount of water, light and carbohydrates that basal microshoots used from the parent material during their development. The apical microshoots origin had lower rates of proliferation and close caulinary elongation. Von Aderkas and Bonga (2000), Andrés *et al.* (2002), Fraga *et al.* (2002); Tang *et al.* (2004) and Ramarosandratnam and Van Staden (2005) suggest that differences in the responses of proliferation and elongation of the basal and apical microshoots could be linked to the existence of biochemical markers type and to differences in hormone levels within the donor tree.

According to the results of the ANOVA for the treatment factor, a significant effect ($P < 0.01$, $F = 77.46$ and 12.82) was obtained on the variable of number of buds and for the length of internodes and buds. Specifically, for the variable number of buds T4 (1.0 / 2.0 mgL⁻¹ of IBA / BAP) which originated a greater amount, with an average of seven shoots per explant (Table 2). In contrast, the T1 treatment (0.1 / 2.0 mgL⁻¹ IBA / BAP) stimulated multiple points of growth (Figure 1A) and T5 (1.0 / 3.0 mgL⁻¹ IBA / BAP) promoted buds with a rosette look and shape with plenty of surrounding callus (figures 1B and 1F).

Consistent with these results, it is demonstrated and substantiated the role of auxin-cytokinin hormone relations as a key factor in controlling morphogenesis. In addition, consistent with those obtained in *Persea americana* Mill by Mohamed-Yasseen (1995); Pliego-Alfaro and Murashige (1988), and in *Persea lingue* Ness by Cob *et al.* (2010). Also, other studies agree that the organ induction effect of cytokinins is oriented to the formation of growth points, which reflected favorably with high proportions of cytokinin compared to auxin.

por Cob *et al.* (2010). Asimismo, otros estudios confirman que la inducción de órganos por efecto de las citoquininas está orientada a la formación de puntos de crecimiento, que se reflejan favorablemente en proporciones altas de citoquinina, con respecto a la auxina.

En varias especies se ha comprobado que a medida que aumenta la concentración de la citoquinina, se aprecia una disminución en la longitud de los brotes, hasta exhibir una forma de roseta (Sánchez-Olate *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2003; Sotolongo *et al.*, 2003). Al respecto, Orellana (1998) señala que el balance auxina-citoquinina es determinante para el coeficiente de proliferación.

In several species it has been proved that as the concentration of cytokinin gets higher, a decrease in shoot length was found, until a rosette is formed (Sánchez-Olate *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2003; Sotolongo *et al.*, 2003). In this regard, Orellana (1998) notes that the auxin-cytokinin balance is crucial for the coefficient of proliferation.

The length of the microstems is favored by decreasing the concentration of cytokinin in the IBA / BAP relationship; the optimum was reached with the T9 treatment (1.5 / 0.5 mg L⁻¹ of IBA / BAP) (figures 1C, 1D, 1E). In contrast, the microshoots that were grown in T5 (1.0 / 3.0 mgL⁻¹ IBA / BAP) did not elongate, and rosette-shaped explants were observed (Figure 1B).

Cuadro 2. Prueba comparativa entre medias de tratamientos mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Posición del explante en el árbol	Variables	Factor de estudio Ácido indol 3-butírico/6-bencilaminopurina (mg L ⁻¹)	Media ± S
Basal	Número de yemas	1.0/2.0	9±1 a
	Número de brotes	1.0/2.0	7±1 a
	Longitud de yema (mm)	1.5/0.5	3±0.8 a
	Longitud de entrenudos (mm)	1.5/0.5	3.5±1 a
	Longitud de brote (mm)	1.5/0.5	28±0.9 a
Apical	Número de yemas	1.0/2.0	3±1 b
	Número de brotes	1.0/2.0	2±1 b
	Longitud de yema (mm)	1.5/0.5	2±0.6 a
	Longitud de entrenudos (mm)	1.5/0.5	2±0.6 a
	Longitud de brote (mm)	1.0/3.0	12±1.2 b

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0.01).

Table 2. Comparative test between treatment means by Duncan's multiple range test.

Location of the explant on the tree	Variables	Study factor indole 3-butyric acid and 6-benzylaminopurine (BAP)	Mean ± S
Basal	Number of buds	1.0/2.0	9±1 a
	Number of shoots	1.0/2.0	7±1 a
	Length of the bud (mm)	1.5/0.5	3±0.8 a
	Length of internodes (mm)	1.5/0.5	3.5±1 a
	Length of the shoot (mm)	1.5/0.5	28±0.9 a
Apical	Number of buds	1.0/2.0	3±1 b
	Number of shoots	1.0/2.0	2±1 b
	Length of the bud (mm)	1.5/0.5	2±0.6 a
	Length of internodes (mm)	1.5/0.5	2±0.6 a
	Length of the shoot (mm)	1.0/3.0	12±1.2 b

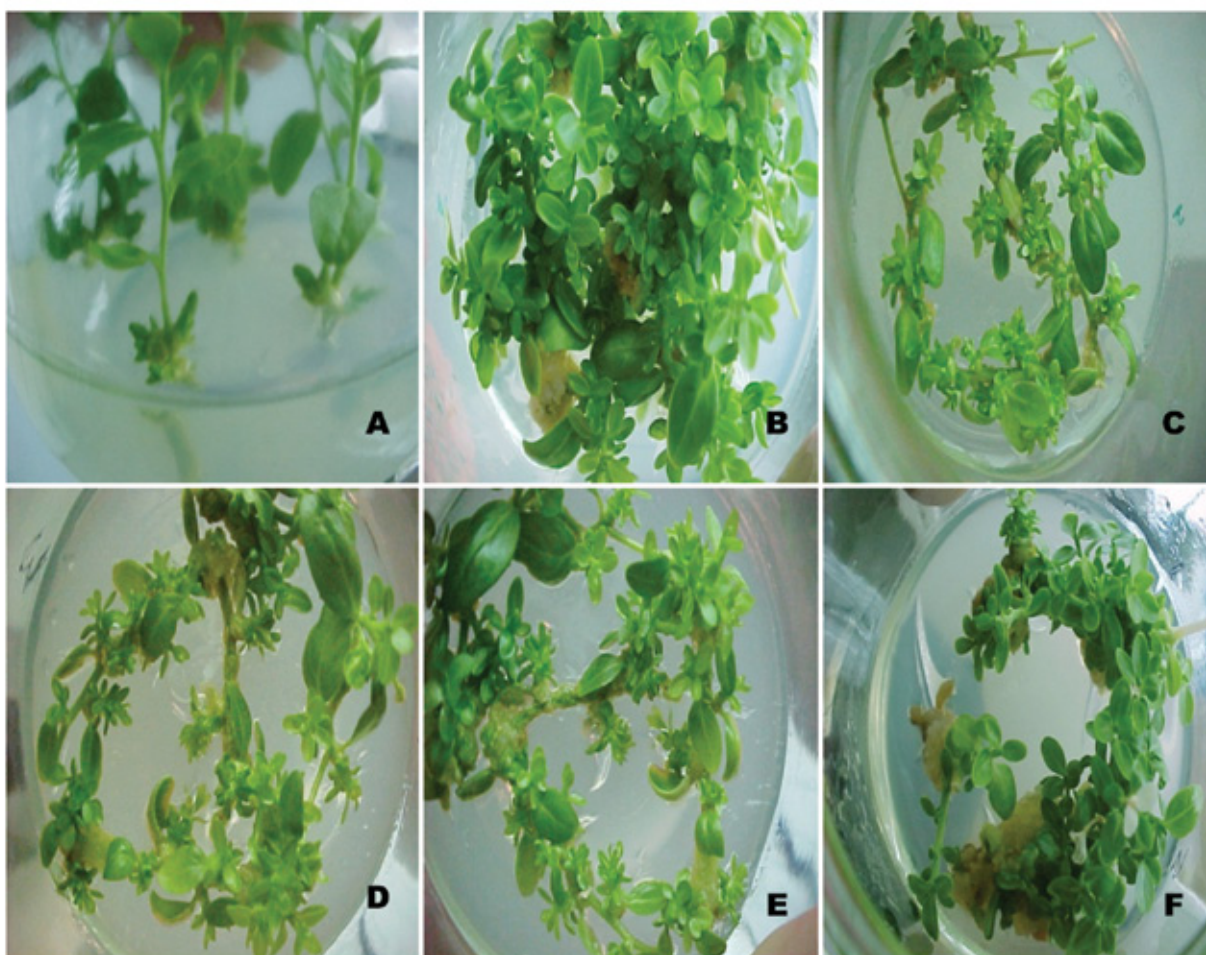
Different letters mean statistical significant differences (P < 0.01).

La longitud de los microtallos se favoreció al disminuir la concentración de la citoquinina en la relación AIB/BAP; el óptimo se alcanzó con el tratamiento T9 (1.5/0.5 mg L⁻¹ de AIB/BAP) (figuras 1C, 1D, 1E). En contraste, los microtallos que fueron cultivados en el tratamiento T5 (1.0/3.0 mg L⁻¹ de AIB/BAP) no elongaron, y se observaron explantes en forma de roseta (Figura 1B). Los del tratamiento T9 alcanzaron, en promedio, 28 mm de longitud y los del T5, en promedio, 12 mm (Cuadro 2).

Lo anterior, coincide con lo obtenido en *Juglans regia* L. (Scaltsoyiannes et al., 1997), en *Nerium oleander* L. (Ollero et al., 2010) y en *Legrandia concinna* (Phil.) Kausel (Uribe and Cifuentes, 2004). Algunos autores registran un incremento en la elongación celular de brotes laterales, mediante el empleo de bencilaminopurina en bajas concentraciones, con respecto a la auxina, esto es atribuible a que disminuye la división celular y se promueve el alargamiento del tejido, debido a la acción de la auxina.

Specifically, those in the T9 treatment reached, on average, 28 mm long and those of the T5 treatment, 12 mm average (Table 2).

These results coincide with those obtained in *Juglans regia* L. (Scaltsoyiannes et al., 1997), *Nerium oleander* L. (Ollero et al., 2010) and *Legrandia concinna* (Phil.) Kausel (Uribe and Cifuentes, 2004). Authors show an increased cell elongation of lateral buds, by employing benzylaminopurine at low concentrations compared to auxin, attributable to decreased cell division and elongation of the tissue is promoted due to the action of auxin.



A, B y C. Proliferación de múltiples zonas de crecimiento; D, E y F. Elongación de microtallos de origen basal.
A, B and C. Proliferation of multi- growth zones; D, E and F. Elongation of microshoots from basal origin.

Figura 1. Secuencia fotográfica que exhibe la proliferación y elongación de los segmentos caulinares de *Quillaja saponaria* Molina a los 120 días de cultivo.

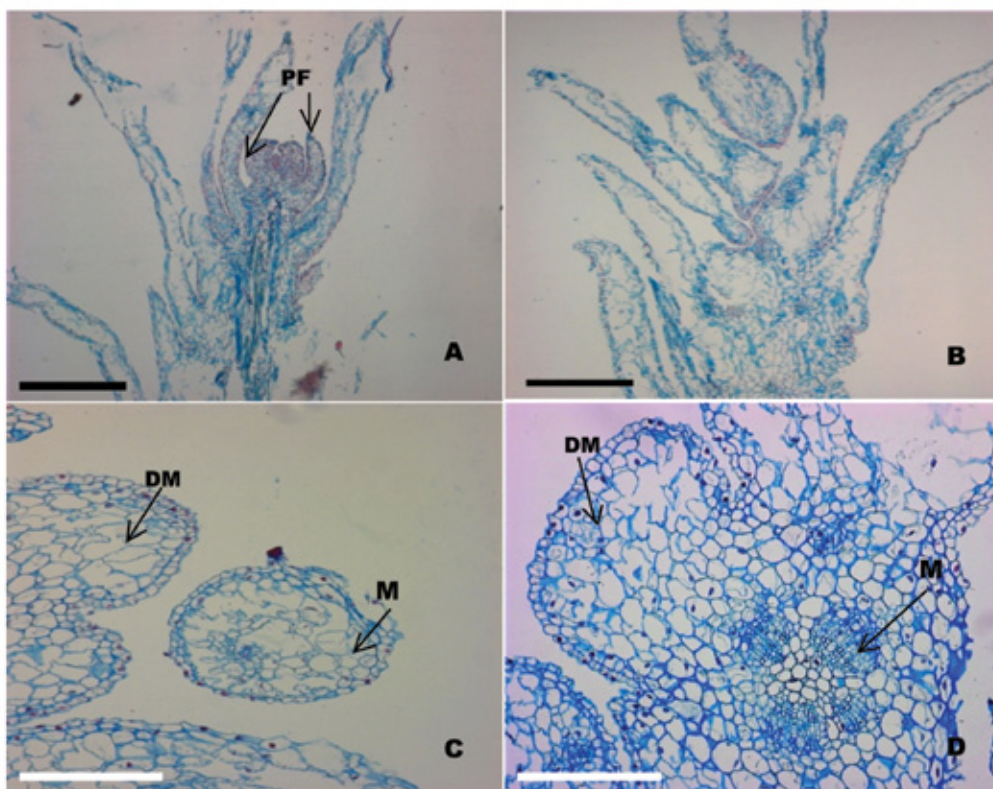
Figure 1. Photographic sequence exhibiting proliferation and elongation of the *Quillaja saponaria* Molina caulinary segments at 120 days of cultivation.

Al respecto, Von Arnold (1988) cita que con frecuencia es necesario reducir la dosis de las citoquininas en el medio nutritivo para lograr un incremento en la elongación de los entrenudos, lo cual redundaría en la obtención de brotes de mayor longitud. Guohua (1998), Read y Preece (2003) registran que las citoquininas en concentraciones altas estimulan la proliferación de múltiples puntos de crecimiento; en contraste, las auxinas inducen el alargamiento de la pared celular, que se refleja en un alargamiento de los microtallos. Tamas (1995) indica que el efecto en la elongación caulinar debido a la adición y concentración hormonal en el medio de cultivo es diferencial para cada tipo de hormona, lo que se evidencia al variar los niveles de la relación auxina-citoquinina.

El análisis histológico incluyó cortes transversales y longitudinales; corroboró el proceso de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa (figuras 2A, 2B, 2C y 2D).

In this regard, Von Arnold (1988) notes that it is often necessary to reduce the dose of cytokinins in the nutrient medium to achieve an increase in the elongation of internodes, resulting in obtaining longest sprouts. Guohua (1998), Read and Preece (2003) cite that cytokinins in high concentrations stimulate the proliferation of multiple growth points; in contrast, auxins induce the elongation of the cell wall, which is reflected in a lengthening of the microshoots. Tamas (1995) points out that the effect on caulinary elongation due to the addition and hormonal concentration in the culture medium is differential for each type of hormone which becomes evident when the auxin-cytokinin ratio levels vary.

Histological analysis included transverse and longitudinal cuts; it corroborated the *in vitro* regeneration process through direct organogenesis (figures 2A, 2B, 2C and 2D).



A. Sección longitudinal de una protuberancia separada del tejido inicial que muestra la presencia de primordios foliares en desarrollo (PF) (barra = 5 mm); B. Sección longitudinal de una protuberancia con primordios foliares después de 45 días de iniciado el cultivo (barra = 5 mm); C. Sección transversal de un ápice caulinar que muestra la formación del domo meristemático (DM) y la presencia de un meristemoide (M) (barra = 8 mm); D. Sección longitudinal de un ápice caulinar, nótese la presencia del domo meristemático (DM) y meristemoides (M) (barra = 8 mm).

A. Longitudinal section of a protuberance separated from the initial tissue showing the presence of developing leaf primordia (PF) (bar = 5 mm); B. Longitudinal section of a protuberance with leaf primordia after 45 days from the start of the culture (bar = 5 mm); C. Cross section of a caulinary apex showing the formation of the meristematic dome (MD) and the presence of a meristemoid (M) (bar = 8 mm); D. Longitudinal section of a caulinary apex; note the presence of meristematic dome (DM) and meristemoids (M) (bar = 8 mm).

Figura 2. Secuencia histológica de la formación de protuberancias a partir de segmentos nodales de *Quillaja saponaria* Molina cultivados *in vitro* (40x).

Figure 2. Histological sequence of formation of protuberances from nodal segments of *Quillaja saponaria* Molina cultured *in vitro* (40x).

La Figura 2A, muestra, claramente, un domo meristemático y primordios foliares bien definidos. El domo meristemático está constituido por una capa de células superficiales alineadas, del cual surgió el primer par de primordios de hojas (figuras 2B y 2C) que marcan el inicio del desarrollo de un brote vegetativo adventicio. Asimismo, se evidenciaron los procesos que implica la formación de nódulos; se observa que la principal actividad morfogénica de las células sucede en los tejidos que conforman a la región meristemática.

Los resultados concuerdan con los de Mitra y Mukherjee (2001) y Lara *et al.* (2003), quienes documentan que las células de las zonas meristemáticas son las que originan a los brotes caulinares, a través de un proceso organogénico. Estas estructuras meristemáticas se caracterizan por permanecer en estado juvenil y son susceptibles a señales externas de inducción y reprogramación celular. Por lo tanto, la formación de áreas con actividad morfogénica siempre estará presente en las zonas meristemáticas (Figura 2D), las cuales mediante procesos mitóticos, primeramente, formarán un domo meristemático y en seguida los primordios foliares. Lo anterior es atribuible a las altas concentraciones de hormonas en las regiones meristemáticas, que promueven, permanentemente, una activa división y expansión celular. Además, la aplicación exógena de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, afectó de manera directa los niveles hormonales endógenos y, por consiguiente, a la actividad meristemática que redundó en un incremento de los procesos de desarrollo celular.

Conclusiones

El cultivo *in vitro* de *Quillaja saponaria* es exitoso en las etapas de la multiplicación y elongación caulinar de microtallos provenientes de explantes de la zona basal. Específicamente, mediante la aplicación de una relación óptima de ácido indol 3-butírico (AIB) y 6-bencilaminopurina (BAP) en el medio nutritivo, se estimuló el desarrollo de organogénesis adventicia. Por otro lado, la contribución de este estudio radica en afirmar los cimientos científicos en torno a la competencia morfogénica de explantes provenientes de diferentes alturas del árbol donador. No obstante, aún existen interrogantes en torno al tema, dignos de ser incorporados en futuros estudios. Asimismo, se requiere optimizar los procesos con base en la replicación de otros ensayos bajo condiciones similares.

Agradecimientos

Los autores desean extender su reconocimiento al Programa Internacional de Becas del *International Fellowships Fund* (IFF) de la Fundación Ford por la beca otorgada al primer autor para realizar estudios de doctorado en la Universidad Austral de Chile y Universidad de Concepción. A la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales por el financiamiento parcial otorgado para la adquisición de productos químicos en la fase experimental. Al personal investigador de GenFor S.A. por las facilidades, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la fase experimental.

Figure 2A clearly shows a well-defined meristematic dome and leaf primordia. The meristematic dome is constituted by a layer of aligned surface cells, from which emerged the first pair of leaf primordia (figures 2B and 2C) that mark the beginning of the development of an adventitious vegetative shoot. Also, the processes involved in the formation of nodules became evident; it is observed that the main morphogenic activity of cells occurs in the tissues that make the meristematic region.

The results agree with those of Mitra and Mukherjee (2001) and Lara *et al.* (2003), who point out that the cells of the meristematic zones are originating caulinary sprouts, through an organogenic process. These meristematic structures are characterized by always staying in a juvenile condition and are susceptible to external signals of induction and cellular reprogramming. Therefore, the formation of areas with morphogenic activity keep present in meristematic zones (Figure 2D), which by mitotic processes, first, form a meristematic dome and then the primordial leaves. This is attributable to high concentrations of hormones in the meristematic regions that promote active cell division and expansion permanently. Moreover, the exogenous application of growth regulators in the culture medium directly affected the endogenous hormone levels and, therefore, the meristematic activity that resulted in an increase of cellular development processes.

Conclusions

The *in vitro* culture of *Quillaja saponaria* is successful in the stages of multiplication and elongation of caulinary microshoots explants from the basal area. Specifically, by applying an optimal ratio of indol3-butyric acid (IBA) and 6-benzylaminopurine (BAP) in the nutrient medium, the development of adventitious organogenesis was stimulated, which is corroborated by histological analysis. On the other hand, the contribution of this study lies in affirming the scientific foundation around the morphogenic competition explants from different heights of the donor tree. However, there are still questions on the subject, worthy of being incorporated in future studies. It is also required to optimize processes based on the replication of other assays under similar conditions.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to the International Scholarship Program of the International Fellowships Fund (IFF) of the Ford Foundation scholarship granted to the first author for doctoral studies at the *Universidad Austral de Chile* and *Universidad de Concepción*. To the *Escuela de Graduados* of the *Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales* for the partial financial support for the purchase of chemicals used in the experimental phase. To the research staff of GenFor S.A. for the facilities, comments and suggestions during the development of the experimental phase.



Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribuciones por autor

José Vidal Cob Uicab: establecimiento, seguimiento y evaluación de experimentos; Darcy Ríos Leal: preparación de medios de cultivo; Ana María Sabja: análisis estadístico de la información; Priscila Cartes Riquelme: análisis histológico; Manuel Sánchez Olate: recolección de germoplasma.

Referencias

- Andrés, H., B. Fernández and R. Rodríguez. 2002. Phytohormone contents in *Corylus avellana* L. and their relationship to age and other developmental processes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70 (2): 173-180.
- Cob, J., A. M. Sabja, D. Ríos, A. Lara, P. Donoso, L. Arias and B. Escobar. 2010. Potencial de la organogénesis como estrategia para la masificación *in vitro* de *Persea lingue* en la zona centro-sur de Chile. *Bosque* 31(3): 202-208.
- Corporación Nacional Forestal (CONAF). 1997. Catastro y Evaluación de los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. Informe Nacional. CONAMA, BIRF, Universidad Austral de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad Católica de Temuco. Santiago, Chile. 88 p.
- Donoso, C. y B. Escobar. 2006. Autoecología de las especies latifoliadas: *Quillaja saponaria* Mol. In: Donoso, C. (ed). Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Ediciones Marisa Cuneo. Valdivia, Chile. pp. 545-555.
- Fouret, Y., Y. Arnaud, C. Larrieu and E. Miginiac. 1986. *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. as an *in vitro* rejuvenation model. *New Zealand Journal of Forestry Science* 16 (3): 319-327.
- Fraga, M., M. Canal and R. Rodríguez. 2002. *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70 (2): 139-145.
- Gallardo, S. y J. Gastó. 1987. Estado y Planteamiento del cambio de estado del ecosistema de *Quillaja saponaria* Mol. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Informe de Investigación. Sistemas en Agricultura. Santiago, Chile. 248 p.
- Guohua, M. 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 1-7.
- Gutiérrez, B. 1995. Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. *Ciencia e Investigación Forestal* 9(2): 261-276.
- Hasbún, R. 2006. Monitorización Epi-genética del desarrollo y producción de plantas de castaño (*Castanea sativa*). Tesis Doctor en Biotecnología. Universidad de Oviedo, Oviedo, España. 234 p.
- Hoffmann, A. 1995. Flora silvestre de Chile, zona araucana. 3ª ed. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. 257 p.
- Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP). 2000. INDAP en Cifras 1989-1999. Desarrollo de la Agricultura Familiar Campesina. Santiago, Chile. pp. 72.
- Kensil, R., U. Patel, M. Lennick and D. Marciani. 1991. Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from *Quillaja saponaria* Molina cortex. *Journal of Immunology* 146: 431-437.
- Lara, A., R. Valverde y L. Gómez. 2003. Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(1): 37-48.
- Magini, E. 1984. Il ringiovanimento del materiale forestale di propagazione. In: Azienda regionale delle Foreste (ed). *Propagazione in vitro: Ricerche su alcune specie forestali*. Roma, Italia. 298 p.
- Mitra, S. and K. Mukherjee. 2001. Direct organogenesis in Indian spinach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67(2): 211-215.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Contribution by author

José Vidal Cob Uicab: establishment, monitoring and assessment of the experiments; Darcy Ríos Leal: culture media; Ana María Sabja: statistical analysis of the data; Priscila Cartes Riquelme: histologic analysis; Manuel Sánchez Olate: germ plasm collection

End of the English version

- Mohamed-Yasseen, Y. 1995. *In vitro* propagation of avocado (*Persea americana* Mill.). *California Avocado Society Yearbooks* 79: 107-111.
- Morisset, J., B. Mothe, F. Bock, J. Breda and N. Colin. 2012. Epicormic ontogeny in *Quercus petraea* constrains the highly plausible control of epicormic sprouting by water and carbohydrates. *Annals of Botany* 109: 365-377.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth an bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Ollero, J., J. Muñoz, J. Segura and I. Arrillaga. 2010. Micropropagation of *oleander* (*Nerium oleander* L.). *HortScience*. 45(11) 98-102.
- Orellana, P. 1998. Introducción a la propagación masiva. In: Pérez J., N. (ed). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 125-132.
- Pacheco, J. 1995. Revigorización de material adulto de *Pinus nigra* Arn.: criterios morfológicos y moleculares. Tesis Doctor. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 200 p.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Multiprensa. Madrid, España. 326 p.
- Pliego-Alfaro F. and T. Murashige. 1988. Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 12: 61-66.
- Prehn, D., C. Serrano, C. Berrios and P. Arce-Johnson. 2003. Micropropagación de *Quillaja saponaria* Mol. a partir de semilla. *Bosque* 24: 3-12.
- Ramarosandratnam, A. and J. Van Staden. 2005. Changes in competence for somatic embryogenesis in Norway spruce zygotic embryo segments. *Journal of Plant Physiology* 162: 583-588.
- Read, P. and J. Preece. 2003. Environmental Management for Optimizing Micropropagation. *Acta Horti* 616:49-58.
- Rodríguez, R., M. Daquinta, I. Capote, D. Pina, Y. Lezcano y J. González. 2003. Nuevos aportes a la micropropagación de *Swietenia macrophylla* x *Swietenia mahogami* (caoba híbrida) y *Cedrela odorata* (cedro). *Cultivos tropicales* 24(3): 23-27.
- Russell, J., S. Grossnickle, C. Ferguson and D. Carson. 1990. Yellow cedar stockings: nursery production and field performance. Ministry of Forests, FRDA. Victoria, British Columbia, Canada. Report Num. 148. pp. 34-35.
- Statistical Analysis System (SAS). 1999. SAS. Institute Inc. 1999. Versión 8. Institute Inc. Cary, NC, USA. n/p.
- Sánchez-Olate, M., D. Ríos y R. Escobar. 2005. La Biotecnología Vegetal y el Mejoramiento Genético de Especies Leñosas de Interés Forestal y sus Proyecciones en Chile. In: Sánchez-Olate, M. y D. Ríos. (eds.). *Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal*. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. pp. 17-28.
- Sotolongo, R., M. García, L. Junco, G. Geada y E. García. 2003. Micropropagación de *Psidium salutare* (Myrtaceae). *Revista del Jardín Botánico Nacional* 24(1-2): 245-250.
- Scaltsoyiannes, A., P. Tsouipha, K. P. Panetsos and D. Moulalis. 1997. Effect of genotype on micropropagation of walnut trees (*J. regia* L.). *Silvae Genetica*. 46: 326-332.

- Tamas, I. A. 1995. Hormonal regulation of apical dominance. *In: Davies, P. J.* (ed). Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht, The Netherlands. pp. 572-597.
- Tang, W., L. Harris, C. Outhavong and R. Newton. 2004. The effect of different plant growth regulators on adventitious shoot formation from *Pinus virginiana* Mill. zygotic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78(3): 237-240.
- Thanh, T., D. Yilmaz and T. Trinh. 1987. *In vitro* control of morphogenesis in conifers. *In: Bonga, J. and D. Durzan.* Tissue culture in forestry. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 168-182.
- Uribe M., 2000. Poliaminas y manipulación de la morfogénesis en el género *Pinus L.* Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Oviedo, Asturias, España. 178 p.
- Uribe, M. y L. Cifuentes. 2004. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación de *Legrandia concinna*. *Bosque* 25(1): 129-135.
- Von Aderkas, P. and J. Bonga. 2000. Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology* 20: 921-928.
- Von Arnold, S. 1988. Tissue culture methods propagation of forest trees. *Newsletter (Holland)* 1(56): 1-13.
- Yeung, E., C. Stasolla and L. Kong. 1998. Apical meristem formation during zygotic embryo development of white spruce. *Canadian Journal of Botany* 76: 751-761.



