



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGÍSTER EN HORTOFRUTICULTURA**

Propagación *in vitro* de maqui (*Aristotelia chilensis*) mediante
condiciones autotróficas

POR

DENISSE ANDREA BASCUÑÁN MUÑOZ

PROFESOR TUTOR: DRA. HERMINE VOGEL

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER

TALCA - CHILE

2021



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
MAGÍSTER EM HORTOFRUTICULTURA**

In vitro propagation of maqui (*Aristotelia chilensis*) in
autotrophic conditions

By

DENISSE ANDREA BASCUÑÁN MUÑOZ

PROFESOR TUTOR: DRA. HERMINE VOGEL

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER

TALCA - CHILE

2021

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

Propagación *in vitro* de maqui (*Aristotelia chilensis*) mediante condiciones autotróficas

In vitro propagation of maqui (*Aristotelia chilensis*) in autotrophic conditions

Nombre del estudiante: Denisse Andrea Bascuñán Muñoz

Fecha de inicio: Marzo 2019

Fecha de término: Marzo 2021

Profesor Guía: Hermine Vogel

Universidad de Talca. Facultad de Ciencias Agrarias.

Aprobación

Profesora Guía: Ing. Agr. Ph.D. Hermine Vogel

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca.

Profesora Co- Guía: Ing. Msc. Agr. Ph.D. Valeria Muñoz.

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Talca.

Profesora Informante: Ing. Agr. Ph.D. Ursula Doll

Facultad de Ciencias Forestales

Universidad de Talca.

Agradecimientos:

Agradezco profundamente al equipo de maqui del Centro de investigación de plantas Nativas de la Universidad de Talca, por su apoyo, la buena energía y la disposición que siempre tuvieron durante todo el desarrollo del trabajo, a Valeria Muñoz, Benita Gonzalez, Mariana Moya, Vivian Cabrera. Y en especial a la profesora Hermine Vogel, por confiar en mí para contribuir en este proyecto, por compartir su experiencia y motivación. A los profesores que contribuyeron a mi formación, gracias por lo entregado. Y a mis amigos y familia por su constante apoyo.

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto FONDEF ID14I20108 “Efecto de factores determinantes en la micropropagación de clones seleccionados de maqui (*Aristotelia chilensis*) para el desarrollo de un protocolo eficiente de multiplicación *in vitro*- Etapa II”.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	III
INDICE.....	IV
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Descripción de la especie.....	2
2. Cultivo <i>in vitro</i>	3
1. Cultivo <i>in vitro</i> heterótrofo.....	3
2. Cultivo <i>in vitro</i> mixótrofo.....	3
3. Cultivo <i>in vitro</i> autótrofo.....	3
3. Cultivo <i>in vitro</i> de plantas nativas, Queule, Kunth y Maqui en Chile.....	5
4. Investigaciones en cultivo <i>in vitro</i> mixótrofo y autótrofo.....	6
5. El soporte de crecimiento en condiciones autotróficas.....	7
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
OBJETIVO ESPECIFICO.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
1. Material Vegetal	
2. Cultivo <i>in vitro</i>	
3. Diseño experimental	
4. Análisis de datos	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17

CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS.....	24
ANEXOS.....	28
FIGURAS Y CUADROS.....	
Figura 1. Cámara de crecimiento de CO₂ 1500 ppm.....	11
Figura 2. Crecimiento CO₂ 400 ppm.....	11
Figura 3. Cambio de soporte, etapa de adaptación.....	12
Figura 4. Escala visual desarrollo de raíz en plántulas etapa <i>in vitro</i>...13	
Figura 5. Cuantificación área foliar.....	14
Figura 6. Evaluación con equipo Dualex.....	15
Cuadro 1. Resumen condiciones evaluadas.....	10
Cuadro 2. Resumen de la data obtenida.....	16
Cuadro 3. Desarrollo de plántulas de maqui <i>in vitro</i>.....	18
Cuadro 4. Desarrollo de plántulas de maqui <i>ex vitro</i>.....	20

Resumen:

Aristotelia chilensis (Maqui) es un árbol o arbusto nativo de Chile cuya demanda por su fruto en los últimos años ha tenido un mayor auge debido a su alta concentración de antioxidantes. Es considerado un “superberry” altamente demandado por la industria, por lo que para producir materia prima homogénea y de calidad, se requiere clonar de manera más eficiente plantas seleccionadas. En el presente estudio de propagación *in vitro*, se evaluó la importancia de suministrar carbono exógeno que promoviera los mecanismos anabólicos propios de la planta, junto con el uso de sustratos que permitiesen un mejor desarrollo de la plántula. Para esto, se utilizó la variedad de maqui 'Luna Nueva', propagada por estacas, la cual se caracteriza por una alta concentración de antocianinas. Con el fin de optimizar el proceso se determinó el efecto de un aumento en la concentración de CO₂ ambiental, además del impacto tipo de soporte: semiporoso (turba-perlita) versus semisólido (agar con vitaminas y minerales). En dos ensayos se determinó la supervivencia de las plántulas junto con diferentes características morfológicas (desarrollo radicular, aéreo, peso fresco, altura) y fisiológicas (producción de antocianinas, clorofila, índice de balance de nitrógeno).

Los resultados muestran que, tanto en su desarrollo *in vitro*, como *ex vitro*, el soporte afecta características morfológicas y fisiológicas de las plantas obtenidas bajo condiciones autotróficas, con mejores resultados usando turba-perlita, por sobre el uso del medio “Woody plant” gelificado sin azúcar (autotrófico) y con azúcar (mixotrófico).

Summary

Aristotelia chilensis (Maqui) is a tree or shrub native to Chile whose demand for fruit in recent years increased due to its high concentration of antioxidants, being considered a "superberry" highly demanded by the food industry. To produce homogeneous and high quality raw material, it is necessary to clone selected plants more efficiently. In the present *in vitro* propagation study, the importance of supplying exogenous carbon that promoted the plant's own anabolic mechanisms was evaluated, together with the use of substrates that would allow a better development of the seedling. For this, the maqui variety 'Luna Nueva', rich in anthocyanins, was propagated by cuttings. The effect of increased ambient CO₂ concentration as well as the growing substrate was determined, together with the effect of the type of support: semi-porous (peat-perlite) versus semi-solid (agar with vitamins and minerals).

In two trials, seedling survival, morphological characteristics (root development, aerial development, fresh weight, height) and physiological characteristics (anthocyanin production, chlorophyll, nitrogen balance index) were evaluated.

The results showed that both, *in vitro* and *ex vitro* plants, grown under autotrophic conditions, developed better on substrate peat-perlite than on gelled "Woody plant" medium with (mixotrophic) or without sugar (autotrophic).

Keywords:

Micropropagation; Growing substrate; Environmental CO₂; CO₂ enrichment.

Introducción:

En los últimos años, *Aristotelia chilensis* (maqui) ha adquirido importancia agrícola y comercial por su interés como materia prima para la industria nutracéutica, cosmética y farmacéutica, ya que su fruto destaca por su alto contenido de polifenoles y antocianinas, mayor a otros berries y plantas en general (Fredes, 2009), siendo denominado “superberry” por la gran capacidad antioxidante que le confieren estos compuestos (Alonso, 2012; Misle *et al.*, 2011). Aunque el pueblo Mapuche ha utilizado las hojas y el fruto para preparar medicina herbal desde tiempo ancestrales (Alonso, 2012), sus propiedades medicinales han sido estudiadas recientemente por la comunidad científica, dentro de las cuales destaca las propiedades: analgésica (Farias, 2009), antioxidante (Céspedes *et al.*, 2009), antiinflamatoria (Céspedes *et al.*, 2010), cardioprotectora (Céspedes *et al.*, 2008), antibacteriana contra *Sarcina lucta* y *Staphylococcus aureus* (Torres, 2010), gastroprotectora (Ojeda *et al.*, 2011) y neuroprotectora (Fuentealba *et al.*, 2012). Además, es considerado por la industria farmacéutica una especie con potenciales efectos anti-edad por su capacidad antioxidante (Alonso, 2012). Por su coloración también tiene usos como colorante natural en alimentos y cosméticos, siendo altamente demandado por la industria europea.

Dadas las características beneficiosas del maqui, la demanda mundial de este producto ha aumentado (Fundación Chile, 2014), por lo que la recolección silvestre no es sustentable, y se estima que la oferta futura será incierta, debido al agotamiento del recurso (Romo *et al.*, 2018). Esto ha llevado a la búsqueda de domesticación de la especie, con el fin de tener cultivos homogéneos que suplan la necesidad comercial del fruto sin causar impacto en el ecosistema, ya que su extracción excesiva puede generar una baja en la población del maqui silvestre.

Las plantas de maqui se pueden propagar vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas o micropropagación *in vitro*. Ambas técnicas son asexuadas, lo que permite conservar las características genéticas de la planta madre. Sin embargo, el cultivo *in vitro* se destaca por su rápida producción de

plantas de alta calidad, en un ambiente físico-químico controlado, libre de microorganismos patógenos como bacterias y hongos. Provee un material uniforme en periodos relativamente cortos de tiempo, y de forma continua en el año, lo que confiere ventaja sobre la propagación por estacas.

Dentro de las formas de cultivo *in vitro* comúnmente utilizadas, se usa el tipo mixótrofo, agregando azúcar al medio de cultivo, como por ejemplo en la micropropagación de la papa, boniato, ajo, frutilla, manzano, ciruelo, duraznero, peral, vid, frambuesa, zarzamora, arándanos, eucaliptos (Castillo, 2004). Sin embargo, ha surgido el cultivo *in vitro* autótrofo, sin azúcar. Este método ha demostrado tener una serie de ventajas tanto en la fisiología de la planta como en la adaptación de esta al medio *ex vitro* (Kosai *et al.*, 2016). Debido a lo anterior, el presente trabajo pretende contribuir a la optimización de la clonación de maqui (variedad 'Luna Nueva') mediante el estudio de los efectos de la propagación *in vitro* autótrofo, en comparación con el cultivo *in vitro* convencional (mixótrofo).

1 Descripción de la especie

Aristotelias chilensis, de nombre común maqui, es un arbusto leñoso perteneciente a la familia de las Elaeocarpaceae (Muñoz, 1992). Es una planta endémica del suroeste de Argentina y Chile, encontrándose en este último país entre la IV y la XI región, incluyendo la isla de Juan Fernández (Hoffman, 1992). Se distribuye desde cercano al nivel del mar hasta los 2500 m.s.n.m (Montes y Wilkomirsky, 1985), y crece en climas variados como el mediterráneo, templado, húmedo y sub-húmedo (Vogel *et al.*, 2008). El arbusto puede alcanzar aproximadamente 4 m de altura (Grupta, 1996). Es una planta dioica cuyo fruto es una baya negra brillante de aproximadamente 6 mm (Cabello, 2003), la que madura entre los meses de diciembre y abril, dependiendo de su ubicación geográfica. En las regiones más cálidas la cosecha es más temprana (Valdebenito *et al.*, 2003).

2 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro*, que es una técnica de micropropagación, se define como la producción de plantas a partir de semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos y células, cultivadas asépticamente, ya sea en un tubo de ensayo u otro recipiente, en el cual se controlan las condiciones ambientales y nutricionales (Hartmann y Kester, 1980; Pierik, 1997). Según la fuente de obtención de carbono se clasifica en tres tipos, los cuales se detallan a continuación (Kosai y Kubota, 2005; Xiao y Kozai, 2006).

2.1 Cultivo *in vitro* heterótrofo

En este tipo de micropropagación los carbohidratos son agregados al medio de cultivo de forma exógena como única fuente de energía, por ejemplo, en la formación de callos en oscuridad (blanco-amarillo), los cuales no poseen la capacidad fotosintética.

2.2 Cultivo *in vitro* mixótrofo

Las plantas no solo usan carbohidratos endógenos, producidos mediante fotosíntesis, sino que además el medio es suplementado con carbohidratos exógenos, usando azúcar como fuente de energía. Por lo tanto, independiente de la concentración de azúcar en el medio, los cultivos que crecen en medios que contienen azúcar deben ser considerados como mixótrofo. Las etapas de este método de micropropagación son la introducción, multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

2.3 Cultivo *in vitro* autótrofo

Las plántulas utilizan como fuente de energía el carbohidrato endógeno, sintetizado por el organismo en la fotosíntesis. Para todos los fines prácticos se

refiere a la micropropagación sin adición de azúcar al medio. El cultivo autótrofo consta de dos etapas:

Introducción (Etapa I): Esta se desarrolla bajo condiciones heterótrofo / mixótrofo, ya que un cultivo *in vitro* libre de microorganismos patógenos se establece cultivando tejidos meristemáticos, también llamados explantes, de los cuales no todos poseen órganos fotosintéticos, por lo que se requiere un medio de cultivo suplementado con azúcar exógena. Una vez que se desarrollen los órganos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, el cultivo está en condiciones de pasar a la micropropagación autótrofa.

Multiplicación/ Enraizamiento (Etapa II): Una vez que la plántula haya desarrollado hojas con sistemas fotosintéticos activos, es trasplantada o subcultivada a un soporte libre de azúcar, con los macro- y micronutrientes junto con las hormonas vegetales necesarios para su desarrollo. Cobra relevancia la concentración de CO₂ dentro del recipiente de cultivo, ya que esta es la fuente de carbono para la síntesis de glucosa. Para aumentar su concentración en el ambiente suelen usarse filtros permeables a gas (a mayor número de filtros porosos mayor será la ventilación), en frascos con propiedades de ventilación mejoradas, que permiten alcanzar concentraciones mayores a las del ambiente. O bien se utilizan cámaras con ventilación forzada, aumentando la concentración de CO₂ por sobre 1000 µmol/mol (Kosai *et al.*, 2016), con ellas se obtienen mejoras en la tasa de crecimiento y la aclimatación *ex vitro* (Kapchina y Toteva, 2014). Al aumentar la ventilación del recipiente, disminuye la concentración de etileno, compuesto que tiene efectos adversos sobre la planta en desarrollo, como regeneración de brotes y expansión de hojas por sobre los rangos normales (Biddington, 1992). Además, el uso de estos recipientes ventilados aumenta la transpiración de la planta y la evaporación media, lo que a su vez mejora la absorción de nutrientes, y por ende es beneficioso para el crecimiento de la planta, a diferencia de los recipientes herméticos (mixótrofo) en los cuales la planta tiene una pobre formación de la cutícula y un mal funcionamiento estomático (Kozai, 2010). En un cultivo autótrofo

la etapa de aclimatación se elimina, debido a que las plántulas en estas condiciones poseen los sistemas radiculares y fotosintéticos funcionales.

Es importante destacar que, en ambas formas de micropropagación, mixótrofo y autótrofo, está presente la introducción El acondicionamiento de la planta madre sigue siendo relevante ya que provee material vegetal inicial de calidad, junto con una adecuada desinfección de este previo a la introducción. Ambos sistemas, mixótrofo y autótrofo, requieren de una fuente de luz PAR (Radiación solar fotosintéticamente activa) (Kozai y Kubota, 2005).

3. Cultivo *in vitro* de plantas nativas, Queule, Kunth y Maqui en Chile

En la última década, el cultivo *in vitro* ha sido utilizada en Chile para la propagación de plantas superiores de difícil multiplicación, tal como *Gomortega keule* (Queule), un árbol en peligro de extinción que ha sido propagado por cultivo *in vitro* mixótrofo (Muñoz y Davey, 2011). Además, los investigadores destacan las mejoras en el cultivo *in vitro* mixótrofo, mediante la aplicación de inhibidores de etileno y mejorando el intercambio gaseoso, para la *Colobanthus quitensis* (Kunth), una planta modelo para el estudio del estrés abiótico, capaz de vivir en climas adversos como la antártica (Cuba *et al.*, 2014).

Dentro de las líneas de investigación del laboratorio de cultivo *in vitro* del Centro de Plantas Nativas de Chile de la Universidad de Talca, se han seleccionado y propagado clones de maqui, destacando dos variedades que presentan altos niveles de antocianinas en fruto: 'Luna Nueva' (cercano a 1,5% de peso seco) y 'Morena' (cercano a 1,2% de peso seco) (Brauch *et al.*, 2017). Actualmente, las plantas de estas variedades son propagadas mediante el método de cultivo *in vitro* mixótrofo a partir de material vegetal de la planta madre.

4. Investigaciones en cultivo *in vitro* mixótrofo y autótrofo

A pesar de lo eficiente de la micropropagación mixotrófica, se han mostrado efectos positivos con el cultivo *in vitro* autótrofo en la fotosíntesis y por ende en el desarrollo de la planta (Kozai y Kubota, 2005). El cultivo autótrofo promueve un mayor crecimiento y fotosíntesis de las plántulas *in vitro* (Desjardins y Hdider, 1995). Previene desordenes fisiológicos y morfológicos, uno de los principales problemas del cultivo *in vitro* convencional (Desjardins y Hdider, 1995). Los explantes autótrofos poseen estructura anatómica normal y estomas funcionales, lo que aumenta las tasas netas de fotosíntesis y transpiración y contribuye a mejorar los porcentajes de supervivencia tras la transferencia del cultivo *in vitro* al ambiente *ex vitro* (Zobayed, 1999a).

La ausencia de sacarosa en el medio de cultivo minimiza las pérdidas de plántulas por contaminación con bacterias u hongos, lo que significa una mayor eficiencia y un menor costo a nivel productivo.

Investigaciones actuales confirman las ventajas de este método por ejemplo en la especie ornamental *Billbergia zebrina*, en la cual se obtienen plántulas sin trastornos anatómicos y fisiológicos mediante la micropropagación autotrófica. Las plantas obtenidas mediante esta técnica han mostrado un mejor crecimiento *ex vitro*, comparadas con aquellas propagadas por cultivo *in vitro* mixótrofo, con distintas concentraciones de sacarosa (Martins *et al.*, 2015). En papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) se vio que el efecto combinado de la zeolita, ácido indol butírico (IBA), en ausencia de sacarosa en el medio de cultivo y el aumento de la ventilación permitió condiciones de cultivo autotróficas que tuvieron un 60% de supervivencia de la planta en condiciones de aclimatación *ex vitro*, lo cual en esta especie es crítico ya que por condiciones mixótrofa es inferior al 30% (Pérez *et al.*, 2015).

5. El soporte de crecimiento en condiciones autotróficas

Otro aspecto que cobra relevancia, aún más con los avances biotecnológicos actuales, es el sustrato utilizado. En lugar de agentes gelificantes se usan soportes porosos, como la perlita o vermiculita. Estos permiten un mejor desarrollo del sistema radicular, lo que a su vez mejora la hidratación de la planta, favoreciendo su aclimatación *ex vitro*.

Lo anterior sugiere que el cultivo *in vitro* de *Aristotelia chilensis* autótrofo confiere mejores características morfológicas y de supervivencia que el mixótrofo. El presente trabajo pretende determinar las características morfológicas, fisiológicas y la supervivencia de las plántulas cultivadas en sistemas autótrofo y mixótrofo, con el fin de optimizar el cultivo *in vitro* de maqui.

Hipótesis:

El cultivo *in vitro* autótrofo de *Aristotelia chilensis* confiere mejores características morfológicas, fisiológicas y de supervivencia en plántulas que el cultivo mixotrófico

Objetivo general:

Determinar los efectos del cultivo *in vitro* autótrofo y mixótrofo sobre la micropropagación de *Aristotelia chilensis*.

Objetivos específicos:

- I. Establecer diferencias en las características morfológicas, fisiológicas y la supervivencia de las plántulas cultivadas mediante el método autótrofo y mixótrofo.
- II. Desarrollar un método optimizado para el cultivo *in vitro* autótrofo de *Aristotelia chilensis*.

Materiales y métodos:

1. Material Vegetal

Las plantas madre utilizadas corresponden a *Aristotelia chilensis* variedad 'Luna Nueva' propagadas vegetativamente a través de cultivo *in vitro* en la Universidad de Talca.

2. Cultivo *in vitro*

Como medio de cultivo se utilizó el medio Woody Plant (Lloyd and Mc Cown's; 2018) ajustando a pH 5,7. En los tratamientos que corresponda (ver Tabla 1) se agregó sacarosa y el agar. La mezcla se distribuyó en frascos previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos.

Los explantes fueron desinfectados superficialmente, cortados (un corte basal que toma contacto con el medio de cultivo y otra en diagonal parte superior) e introducidos en el medio previamente preparado. Todo este proceso se desarrolló bajo cámara de flujo laminar. Los explantes introducidos en el medio se llevaron a la cámara de cultivo bajo condiciones de fotoperiodo controlado (16 h luz/ 8 h oscuridad), con una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez que las primeras hojas emergieron de la plántula éstas se cambiaron de medio y se sometieron a las condiciones del ensayo.

Los tratamientos mixótrofo y autótrofo se realizaron en recipientes Magenta GA-7 (Merckmillipore).

Mixótrofo: Con medio de cultivo gelificado Woody Plant (WP), que contiene sacarosa (azúcar) (Pierik, 1990).

Autótrofo: Se usó una cámara hermética de acrílico, en cuyo interior se dispuso un sensor de dióxido de carbono infrarrojo no dispersivo, NDIR, (GS-CDR, Distech controls), con rango de detección de CO₂ de hasta 2000 ppm. En los tratamientos de CO₂ enriquecido el gas se inyectó desde una bombona mediante un sistema de inyección automático para mantener 1500 ± 5 ppm al interior de la cámara.

3. Diseño experimental

El experimento se condujo bajo un diseño bifactorial, cuya unidad experimental es un frasco Magenta GA-7 con 3 plántulas en su interior. Cada tratamiento contó con 10 unidades experimentales, con 2 repeticiones en el tiempo. Se aplicó un diseño de Split-block, con un bloque con CO₂ ambiental y otro con CO₂ enriquecido (1500 ppm) (Figura 1 y 2). Dentro de cada Split-block se distribuyeron los tratamientos al azar.

Los factores evaluados son medio de soporte y concentración de CO₂ en la cámara, con los siguientes tratamientos para cada factor:

Soporte:

- Medio WP gelificado con azúcar
- Medio WP gelificado sin azúcar
- Turba-perlita + nutrientes inorgánicos

Concentración CO₂

- : CO₂ ambiental (aprox. 400 ppm)
- CO₂ 1500 ppm en cámara.

Cuadro 1. Resumen de condiciones evaluadas

Fuente de carbono	Soporte		Tipo de cultivo
	WP gelificado	Turba perlita	
Sacarosa + CO ₂ ambiental 400 ppm aprox.	X		Mixotrófico
Sacarosa + CO ₂ enriquecido 1500 ppm aprox.	X		Mixotrófico
CO ₂ ambiental 400 ppm aprox.	X	X	Autotrófico
CO ₂ enriquecido 1500 ppm aprox.	X	X	Autotrófico



Figura 1. Cámara de crecimiento CO₂ 1500 ppm



Figura 2. Crecimiento CO₂ 400 ppm

Al introducir las plantas a las distintas condiciones se registró el peso (mg), altura (cm) de los explantes y número de nudos.

El cultivo se mantuvo por cuatro semanas en las condiciones de cada tratamiento. Luego se procedió a la etapa de adaptación *ex vitro*, crucial en cultivo mixótrofo, momento en que se cambiaron las plantas del soporte con agar a bandejas con sustrato por turba perlita (1:2) (Figura 3). Las plantas cultivadas en turba-perlita se mantuvieron sin cambio de su soporte durante el paso a *ex vitro*. Estas fueron llevadas a condiciones ambientales, invernaderos dentro de las instalaciones de la UTAL, con riego periódico por aspersión y CO₂ ambiental de 400 ppm aproximadamente en donde fueron paulatinamente aclimatadas, con apertura de la bandeja gradual para evitar deshidratación.


Turba perlita (TP) CO ₂ 400 ppm	Woody Plant sin sacarosa (WP SS) CO ₂ 1500 ppm	Woody Plant con sacarosa (WP + S) CO ₂ 400 ppm
		
Turba perlita (TP) CO ₂ 1500 ppm	Woody Plant sin sacarosa (WP SS) CO ₂ 400 ppm	Woody Plant con sacarosa (WP + S) CO ₂ 1500 ppm

Figura 3. Cambio de soporte, etapa de aclimatación para los 6 tratamientos evaluados.

Evaluaciones:

a) Supervivencia:

Se evaluó por periodo *in vitro* 4° semana y *ex vitro* 3° semana el número de plántulas o plantas no viables, ya sea por contaminación o estrés (% plantas sobrevivientes).

b) Caracterización morfológica durante el periodo de cultivo *in vitro*

Se evaluó el desarrollo del sistema radicular y aéreo. Para la evaluación del sistema radicular se aplicó una escala visual, considerando 0= nulo crecimiento, y 4= excelente desarrollo (Figura 4).

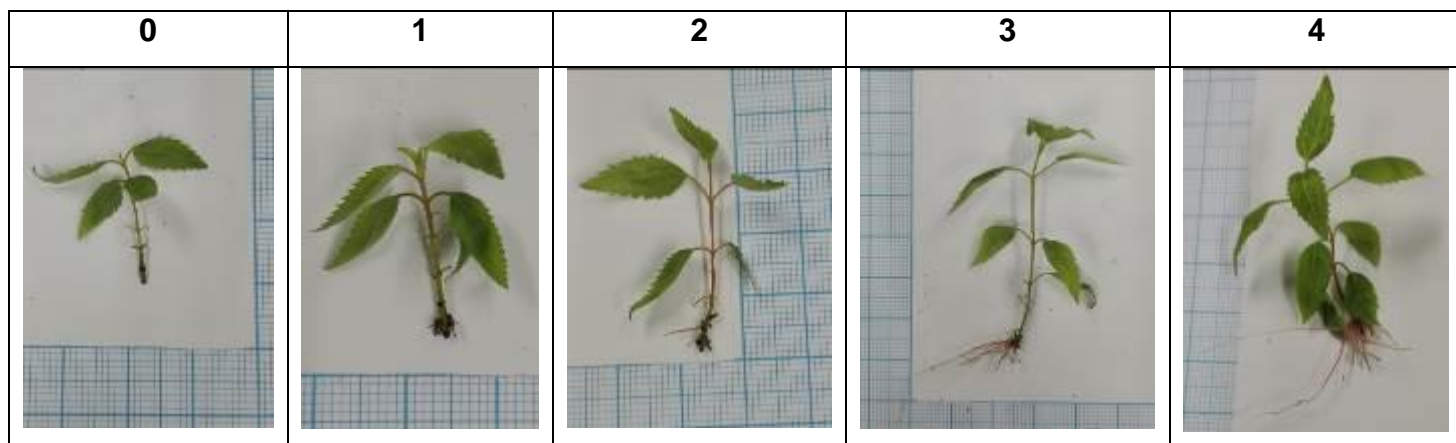


Figura 4. Escala visual desarrollo de raíz en plántulas en etapa *in vitro*.

En la región aérea se registró el desarrollo de la planta según:

- a) Altura (cm) = Altura 4° semana (cm)
- b) N° de Nudos= n° nudos 4° semana
- c) N° de hojas= n° de hojas 4° semana

Y para evaluar planta completa, se consideró aumento de peso

Peso (mg)= Peso 4° semana (mg)

Las mediciones se realizaron al inicio de aclimatación, durante el traspaso de plántulas a soporte turba perlita, para el caso de aquellas plantas crecidas en soporte gelificado.

c) Características morfológicas área foliar

El área foliar se determinó luego de dos días *ex vitro*, ya que posterior al cambio de sustrato del *in vitro* al *ex vitro* las plantas sufrían estrés reflejado en deshidratación, por lo que las hojas debían recuperar la hidratación adecuada para obtener una imagen representativa. La obtención del área se realizó mediante el programa Image J (Schneider *et al.*, 2012), considerando el canal verde para la selección del área a cuantificar. Los valores entregados son en cm², por unidad analizada, como muestra la figura 4.

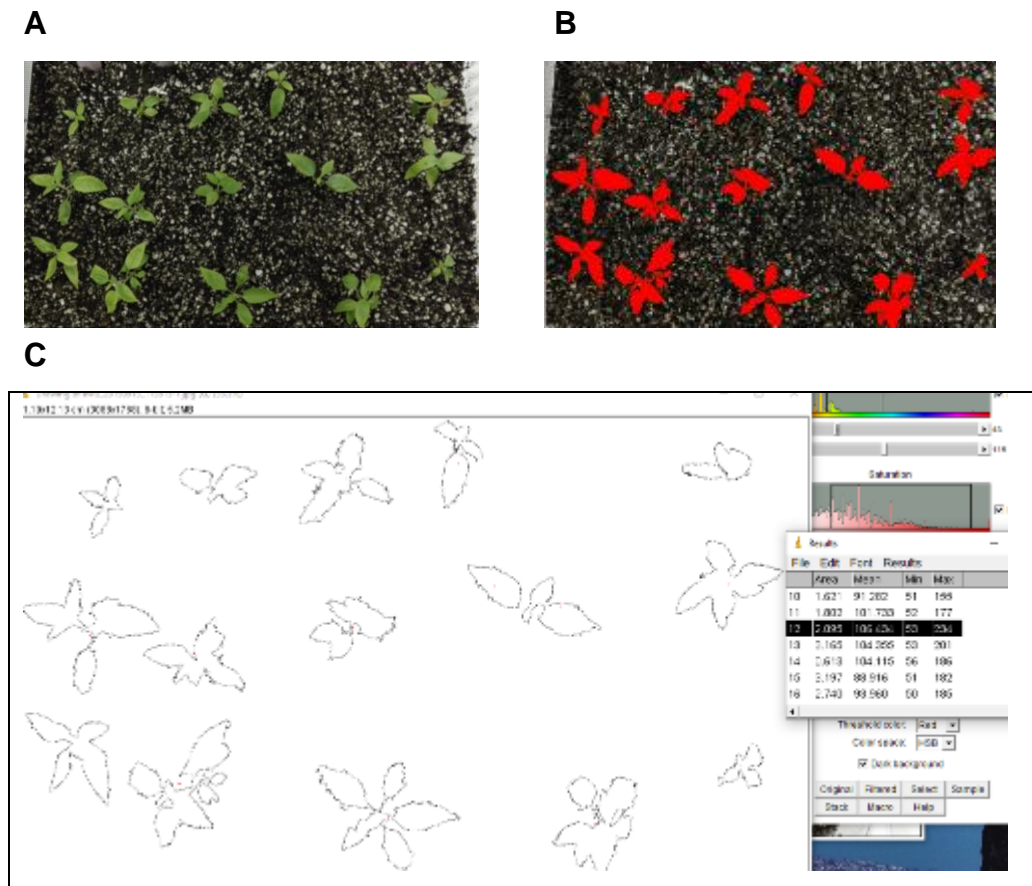


Figura 5. Cuantificación de área foliar usando Image J, A imagen original formato RGB, B selección de canal verde y regulación de saturación. C Cuantificación de área seleccionada cm².

Los datos obtenidos se procesaron como sumatoria de área por bandeja (1 bandeja contaba con máximo 15 plantas). Cada tratamiento contaba con dos bandejas por fecha evaluada, bajo la siguiente formula:

$$\text{Área foliar normalizada por valor máximo} = (\sum \text{áreas por bandeja} / n^{\circ} \text{ de plantas en bandeja}) / (\text{Valor máximo } \sum \text{área por bandeja} / n^{\circ} \text{ de plantas en bandeja})$$

Esto permitió obtener valores entre 0 y 1, por cada fecha evaluada

d) Caracterización Fisiológica

Se cuantificaron las siguientes características fisiológicas usando el equipo Dualex, mediante el principio de emisión y absorbanza de luz UV, Infrarrojo cercano (NIR) y Visible (VIS),:

- I. Índice de balance de nitrógeno (NBI): Es la relación entre clorofila y flavonoides, su rango varía entre 0 y 999.
- II. Índice Clorofila: Medida en el mesofilo de la hoja, su rango varía entre 0 y 150 (unidad)
- III. Índice Antocianinas: Medido en la epidermis de la hoja , su rango varía entre 0 y 3 (unidad)
- IV. Índice Flavonoides: Medido en la epidermis de la hoja, su rango varía entre 0 y 3 (unidad)

Para la medición se tomó la cara superior de las hojas pertenecientes al primer o segundo nivel superior de la planta entre las pinzas del equipo (Figura 5). Además, es importante considerar que las hojas debían poseer un ancho superior a 1 cm para poder hacer una correcta evaluación con el instrumento. Las evaluaciones se realizaron en el momento del cambio de *in vitro* a *ex vitro*, para el caso de las dos fechas evaluadas, y a los 20 días después, sólo en el caso de la primera fecha.



Figura 6. Evaluación con equipo Dualex.

Cuadro 2. Resumen de la data bajo las tres condiciones de cultivo, en el desarrollo *in vitro* y *ex vitro* de las plántulas.

Mixótrofo, Autótrofo	<i>in vitro</i>	<i>ex vitro</i>
Supervivencia	X	X
Características Morfológicas (n° nudos, altura, N° hojas, área foliar)	X	
Características Fisiológicas (Índice de balance de nitrógeno, clorofila, contenido de antioxidantes)		X

Análisis de datos

Los datos fueron procesados por la Dra. Benita Gonzalez. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Stargraphic (Software, Inc). En el caso de las evaluaciones se utilizaron covariables para eliminar el error de usar un material inicial poco homogéneo. Se determinaron diferencias significativas mediante Kruskal Wallis, además se realizó bloqueo según fecha de evaluación N=2 ($p < 0,05$).

Resultados y discusión:

Los resultados presentados en el Cuadro 3 se basan en dos ensayos que se repitieron en el tiempo (bloques), destacando un mejor desempeño general en el último, posiblemente debido la experiencia ganada y un monitoreo más frecuente de la hidratación de las plántulas en las cámaras de crecimiento. Es importante destacar que, bajo las metodologías usadas, las plántulas no presentaron deficiencias nutricionales visibles, desordenes morfológicos, ni contaminación. En todos los tratamientos el 100% de la plántulas se adaptó *ex vitro*, sin pérdida alguna.

Supervivencia *in vitro*

La supervivencia de las plántulas, luego de cuatro semanas de cultivo *in vitro*, solo se vio disminuida en el tratamiento autotrófico, en soporte turba perlita, CO₂ 400 ppm, en un 27% aprox. Estos resultados pueden deberse a que las plántulas, al estar en un ambiente abierto y contar con un sustrato poroso, presentaban una mayor deshidratación. En el caso del tratamiento de turba perlita en condiciones de CO₂ enriquecido 1500 ppm, la supervivencia fue del 100%. Este efecto podría atribuirse a que en el tratamiento de CO₂ 1500 ppm se mantenía la humedad por ser una cámara hermética, lo que se reflejaba en la condensación de agua en las paredes de la cámara.

Características morfológicas *in vitro*

El desarrollo radicular fue similar entre plántulas tratadas con 1500 o 400 ppm de CO₂. En cambio, al evaluar soporte se obtuvieron mejores resultados con el sustrato turba perlita (Cuadro 3), seguido por el medio Woody Plant con sacarosa, y por último, sin sacarosa. Lo anterior puede deberse a que, un sustrato poroso permite mejor desarrollo del sistema radicular por la necesidad de captar agua y nutrientes, a diferencia de un sustrato tipo gel que presenta mayor disponibilidad, por lo que la planta no requiere un buen desarrollo de raíz para obtener, el agua, los macro y micronutrientes esenciales para su crecimiento.

Cuadro 3: Desarrollo de plantulas de maqui a 4 semanas de cultivo *in vitro*

	Raíz (escala numérica 0-4) ²	Peso (mg)	Altura (cm)	Hojas (número)	Nudos (número)	Área Foliar ³ 0-1	
CO ₂ (ppm)	400	2,3 ± 0,2	68 ± 6 b	2,9 ± 0,1 b	7,6 ± 0,3	3,1 ± 0,1	0,48 ± 0,06
	1500	2,6 ± 0,1	94 ± 13 a	3,5 ± 0,2 a	7,7 ± 0,4	3,2 ± 0,1	0,48 ± 0,08
<i>Valor p</i>	0,20	<0,01	<0,01	0,73	0,83	0,69	
Soporte:							
WP ¹ Agar + azúcar	2,3 ± 0,2 b	56 ± 2 b	3,0 ± 0,1 b	8,4 ± 0,5 a	3,4 ± 0,1 a	0,36 ± 0,04 b	
WP Agar sin azúcar	1,5 ± 0,2 c	44 ± 3 c	2,7 ± 0,1 c	7,4 ± 0,4 b	3,1 ± 0,1 b	0,30 ± 0,02 b	
Turba + perlita	3,7 ± 0,1 a	144 ± 7 a	3,9 ± 0,2 a	7,3 ± 0,3 b	3,0 ± 0,2 b	0,76 ± 0,06 a	
<i>Valor p</i>	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	0,01	<0,01	
Tratamiento:							
WP Agar + azúcar 400 ppm	1,8 ± 0,3 c	57 ± 4 bc	2,9 ± 0,1	7,9 ± 0,5	3,3 ± 0,2	0,40 ± 0,04	
WP Agar + azúcar 1500 ppm	2,8 ± 0,2 b	56 ± 3 bc	3,2 ± 0,1	8,8 ± 0,8	3,5 ± 0,2	0,35 ± 0,06	
WP Agar sin azúcar 400 ppm	1,2 ± 0,2 c	43 ± 3 c	2,6 ± 0,1	7,6 ± 0,5	3,1 ± 0,2	0,30 ± 0,00	
WP Agar sin azúcar 1500 ppm	1,7 ± 0,3 c	45 ± 4 c	2,8 ± 0,2	7,1 ± 0,5	3,1 ± 0,2	0,30 ± 0,04	
Turba + perlita 400 ppm	3,9 ± 0,1 a	105 ± 14 ab	3,2 ± 0,2	7,4 ± 0,4	3,0 ± 0,2	0,73 ± 0,05	
Turba + perlita 1500 ppm	3,5 ± 0,1 ab	182 ± 32 a	4,7 ± 0,4	7,1 ± 0,5	3,0 ± 0,2	0,80 ± 0,12	
<i>Valor p</i>	<0,01	0,02	0,14	0,32	0,59	0,67	
Repetición en el tiempo:							
1	2,0 ± 0,2 b	49 ± 3 b	2,6 ± 0,1 b	5,9 ± 0,1 b	2,5 ± 0,1 b	0,48 ± 0,06	
2	2,9 ± 0,1 a	115 ± 13 a	3,8 ± 0,2 a	9,5 ± 0,3 a	3,8 ± 0,1 a	0,48 ± 0,08	
<i>Valor p</i>	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,15	

¹ WP: Medio Woody Plant

² Escala visual 0: sin desarrollo y 4: excelente desarrollo

³ Datos normalizados entre 0: sin desarrollo y 1: máximo desarrollo foliar.

n=10. Datos Media ± Error estándar Kruskal Wallis $p < 0,05$

Tanto en peso como en altura de las plántulas, el ambiente con CO₂ enriquecido favoreció el desarrollo vegetativo. Además, al evaluar soporte, turba perlita obtiene mejores resultados, al igual que en el caso de la raíz. El mejor desarrollo aéreo puede deberse a que un ambiente de carbono enriquecido favorece la fotosíntesis, con lo cual la plántula tiene mayor energía disponible para su desarrollo, lo que, junto con el mayor desarrollo radicular en un sustrato poroso favorece la captación de agua y nutrientes y por ende el crecimiento de la plántula, incluso se observa un peso fresco tres veces mayor a los tratamientos mixotróficos.

El mayor número de hojas y nudos se registran en el medio Woody plant agar suplementado con sacarosa, independiente de la concentración de CO₂. También son los tratamientos con estos soportes los que presentan una mayor tendencia al desarrollo de estas estructuras al evaluar interacciones. Es interesante destacar que el mayor número de nudos y hojas no se relaciona con el peso fresco o desarrollo del área foliar, ya que estas plántulas presentaban hojas más pequeñas en su mayoría, mientras que en las plantas cultivadas en turba perlita el área foliar midió más del doble (Cuadro 3).

Características fisiológicas *ex vitro*

La concentración de CO₂ durante la propagación *in vitro* no afecta el contenido de clorofila de las plántulas al ser sacado *ex vitro* (Cuadro 4). Sin embargo, plantas cultivadas en turba perlita muestran mayor contenido de clorofila, tanto al día uno como al día 20. Al evaluar las interacciones al día 20, el tratamiento turba perlita con CO₂ de 400 ppm presenta el mejor resultado, esto puede deberse a que en la etapa *in vitro* este tratamiento presentó mortalidad, eliminando posiblemente aquellas plantas que presentaban un menor desarrollo vegetativo y/o funcionalidad fisiológica.

Cuadro 4: Desarrollo de plantulas de maqui a 1 y 20 días de cultivo *ex vitro*

	Índice Clorofila ² día 1	Índice Clorofila ² día 20	Índice Flavonoides ³ día 1	Índice Flavonoides ³ día 20	Índice Antocianinas ⁴ día 1	Índice Antocianinas ⁴ día 20	Índice de balance de nitrógeno ⁵ día 1	Índice de balance de nitrógeno ⁵ día 20	
CO ₂ (ppm)	400	17,5 ± 0,7	21,3 ± 0,6	0,55 ± 0,01 b	0,74 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01 a	32,5 ± 1,5	29,4 ± 1,2
	1500	18,4 ± 0,7	22,1 ± 0,3	0,58 ± 0,01 a	0,73 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,01 b	33,1 ± 1,6	31,8 ± 1,1
<i>Valor p</i>	0,18	0,11	0,02	0,64	0,63	0,03	0,51	0,13	
Soprote:	8	7	8	6	8	8	8	6	
WP ⁴ Agar + azúcar	16,6 ± 0,8 b	20,5 ± 0,4 b	0,60 ± 0,01 a	0,71 ± 0,03	0,31 ± 0,01a	0,26 ± 0,01	28,2 ± 1,5 b	30,4 ± 1,5 ab	
WP Agar sin azúcar	15,0 ± 0,7 b	20,8 ± 0,5 b	0,60 ± 0,01 a	0,75 ± 0,02	0,30 ± 0,01 a	0,27 ± 0,01	25,4 ± 1,3 b	28,5 ± 1,1 b	
Turba + perlita	22,5 ± 0,4 a	23,9 ± 0,5 a	0,50 ± 0,00 b	0,74 ± 0,03	0,25 ± 0,01 b	0,25 ± 0,01	45,2 ± 0,8 a	33,6 ± 1,5 a	
<i>Valor p</i>	<0,01	<0,01	<0,01	0,46	<0,01	0,10	<0,01	0,02	
Tratamiento:	8	7	8	7	8	8	8	7	
WP Agar + azúcar 400 ppm	15,1 ± 1,0	19,7 ± 0,5 c	0,58 ± 0,01 a	0,75 ± 0,04	0,31 ± 0,01 a	0,30 ± 0,00 a	26,3 ± 1,8	26,8 ± 2,0 b	
WP Agar + azúcar 1500 ppm	18,0 ± 1,2	21,4 ± 0,5 bc	0,61 ± 0,02 a	0,66 ± 0,04	0,30 ± 0,01 a	0,22 ± 0,01 b	30,0 ± 2,3	33,8 ± 1,7 ab	
WP Agar sin azúcar 400 ppm	14,9 ± 0,9	19,4 ± 0,8 c	0,58 ± 0,02 a	0,75 ± 0,03	0,32 ± 0,01 a	0,28 ± 0,01 ab	25,8 ± 1,6	26,0 ± 1,3 b	
WP Agar sin azúcar 1500 ppm	15,1 ± 1,1	21,8 ± 0,4 bc	0,63 ± 0,02 a	0,75 ± 0,03	0,29 ± 0,01 a	0,27 ± 0,01 ab	24,9 ± 2,2	30,3 ± 1,6 ab	
Turba + perlita 400 ppm	22,6 ± 0,5	24,8 ± 0,7 a	0,50 ± 0,00 b	0,72 ± 0,02	0,24 ± 0,01 b	0,24 ± 0,02 ab	45,6 ± 1,2	35,5 ± 1,8 a	
Turba + perlita 1500 ppm	22,3 ± 0,5	23,1 ± 0,5 ab	0,50 ± 0,01 b	0,77 ± 0,05	0,27 ± 0,01 ab	0,26 ± 0,01 ab	44,8 ± 1,2	31,8 ± 2,4 ab	
<i>Valor p</i>	0,29	<0,01	0,25	0,16	0,01	<0,01	0,48	0,02	
Repeticiones en el tiempo									
1	17,2 ± 0,7		0,58 ± 0,01 a		0,29 ± 0,01		31,0 ± 1,6 b		
2	18,8 ± 0,6		0,55 ± 0,01 b		0,29 ± 0,01		34,8 ± 1,4 a		
<i>Valor p</i>	0,06		0,01		0,43		0,01		

¹WP: Medio Woody Plant;

² Índice de clorofila: 0- 150 (unidades arbitrarias)

³Índice de flavonoides: 0-3 (unidades arbitrarias)

⁴Índice de antocianinas: 0-3 (unidades arbitrarias)

⁵Índice de balance de nitrógeno: Relación clorofila/ flavonoides 0-999

n=10. Datos Media ± Error estándar; ⁶LSD; ⁷Tukey; ⁸Kruskall Wallis. p<0,05.

El contenido de flavonoides al día uno es mayor en plantas cultivadas en un ambiente con CO₂ enriquecido, igualándose a las tres semanas *ex vitro* con aquellas plantas provenientes de un ambiente de CO₂ natural. Este efecto se podría explicar por una mayor tasa de metabolización de la planta y por ende mayor producción de metabolitos secundarios. La menor concentración de flavonoides en plantas con soporte turba perlita puede deberse a que estas poseen un mejor desarrollo aéreo, mejor desarrollo cuticular y estomas más funcionales, pudiendo estar morfológicamente más adaptadas para enfrentar situaciones de estrés. Lo anterior, a su vez, disminuiría la necesidad de producir compuestos antioxidantes como son los flavonoides. Sin embargo, ya al día 20 y luego de la exposición al ambiente y a estrés ambiental, todas las plantas responden de igual manera independiente de su tratamiento *in vitro*.

En contenido de antocianinas se observa una tendencia a disminuir entre el día uno y 20 en la mayoría de los tratamientos, lo que según literatura sería un comportamiento normal de la aclimatación. Un ejemplo de ello informa Brito *et al.* (2009) sobre la aclimatación de *Olea maderensis*, ya que la producción de estos metabolitos es una respuesta de la planta a situaciones estresantes, como son por ejemplo la luz UV-B, estrés hídrico o por nutrientes. Las antocianinas además juegan un rol de protección contra la fotoinhibición (Steyn *et al.*, 2002). Las plantas aclimatadas se mantenían con régimen de hidratación y nutrición adecuadas. Las plántulas crecidas en turba perlita mantenían su índice de antocianinas, incluso 20 días en condiciones *ex vitro*, mostrando tener la funcionalidad fisiológica necesaria para responder al estrés ambiental sometida desde el día uno. Plantas provenientes de un ambiente de CO₂ enriquecido presentaron menor contenido de antocianinas al día 20 que aquellas cultivadas en un ambiente natural, lo que podría entenderse por una mayor adaptación de la planta bajo condiciones enriquecidas.

Una posible explicación para este comportamiento es que las plantas sometidas a condiciones autotróficas, y en este caso en un soporte de turba perlita, son fisiológicamente más adaptadas y capaces de desarrollar una cutícula durante la etapa *in vitro* (Zobayed *et al.*, 2000), lo que les podría conferir mayor

protección a radiación por mecanismos diferentes a la producción de antocianinas, por ejemplo, la capacidad de la cutícula de reflejar parte de la radiación incidente, lo que a su vez reduce la fotooxidación, el daño provocado por especies reactivas de oxígeno (ROS), esto se ha visto documentado en plantas leñosas (Yeats *et al.*, 2013; Pfündel *et al.*, 2006).

Por último, la relación entre carbono y nitrógeno dentro de la planta está dada por el balance de índice de nitrógeno (NBI), siendo mayor en plántulas provenientes de cultivo en turba perlita. A tres semanas *ex vitro*, esta diferencia tiende a disminuir. Esto podría implicar que la planta favorece la producción de clorofila por sobre metabolitos secundarios que produciría bajo condiciones de estrés biótico o abiótico, favoreciendo la fotosíntesis y por ende la disponibilidad de energía para su desarrollo vegetativo.

Conclusiones

El presente trabajo ha mostrado una exitosa propagación *in vitro* de plantas de *Aristotelia chilensis*, tanto por los métodos mixotróficos como autotróficos, obteniendo plantas libres de desórdenes morfológicos evidentes y contaminación. La supervivencia *in vitro* de las plántulas sólo se vio afectada en el tratamiento con turba perlita y CO₂ ambiental. Todas las plántulas aclimatadas *ex vitro* mostraron una supervivencia del 100%.

.Al considerar sólo los tratamientos con Woody plant gelificado (WP), tanto el autotrófico (WP agar sin azúcar), y mixotrófico (WP agar con azúcar), hay un mayor desarrollo de la raíz, altura, peso por plántula y número de hojas en el cultivo *in vitro* mixotrófico que en el autótrofo; pero no se observó diferencia en características fisiológicas y supervivencia Sin embargo, al comparar entre soportes, los mejor resultado se obtuvieron con soporte turba perlita, ya que presentó un mejor desarrollo radicular y aéreo, así como una mejor adaptación *ex vitro*, dada por bajos índices de estrés y altos índices de desarrollo, tanto al terminar el proceso *in vitro* como al finalizar el proceso de aclimatación (hardening).

Por su parte, CO₂ enriquecido, favorece el desarrollo aéreo de la plántula, dada por peso y altura. Además, disminuye el estrés *ex vitro* a los factores abióticos, al considerar el índice de antocianinas al día 20.

Por último, el método de propagación autotrófica *in vitro*, desarrollado con soporte de turba perlita y CO₂ enriquecido de 1500 ppm, fue el que presentó en general mejores resultados, por lo que se considera el método optimizado de propagación *in vitro*.

Referencias

1. Alonso J (2012) Maqui (*Aristotelia chilensis*): un nutraceutico chileno de relevancia medicinal. *Revista de Farmacología de Chile*, 5(2): 95-100 p.
2. Biddington, N.L., (1992). The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regul.* 11, 173–187.
3. Brauch J, Reuter L, Conrad J, Vogel H, Schweiggert R, Carlea R (2017) Characterization of anthocyanins in novel Chilean maqui berry clones by HPLC–DAD–ESI/MSn and NMR-spectroscopy Institute of Food Science and Biotechnology.
4. Brito, G., Costa, A., Coelho, C. *et al.* Large-scale field acclimatization of *Olea maderensis* micropropagated plants: morphological and physiological survey. *Trees* **23**, 1019–1031 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0344-x>
5. Castillo A, 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*, una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA las brujas Uruguay
6. Cabello P (2003). Viabilidad polínica en dos estados florales de Maqui, *Aristotelia chilensis* (Mol) stuntz (Elaeocarpaceae). Tesis lic. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Chile. 76p.
7. Céspedes C, El-Hafidi M, Pavón N, Alarcón J (2008) Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. *Food Chem.*107: 820–829 p.
8. Céspedes C, Alarcón J, Valdez-Morales M, Paredes-López O (2009) Antioxidant activity of an unusual 3-hydroxyindole derivative isolated from fruits of *Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz. *Z Naturforsch C.*64(9-10):759-62p.
9. Céspedes C, Alarcón J, Ávila J, Nieto A (2010) Antiinflammatory activity of *A. chilensis*. *Blacpma* 2: 127 – 135 p.
10. Cuba, Marely & Acuña, Daniela & M. Cordero, Cristian & Klagges, Macarena. (2014). Optimización de parámetros para la propagación *in vitro* de *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl.. *Gayana. Botánica.* 71. 10.4067/S0717-66432014000100009.
11. Desjardins Y, Hdider C, Rick J (1995) Carbon nutrition *in vitro* – regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Eds. J Aitken-Christie, T Kozai and M L Smith. pp 441-471
12. Farías M (2009) Determinación de los mecanismos involucrados en la actividad analgésica de las hojas de *Aristotelia chilensis* en un modelo de dolor térmico agudo. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.
13. Fredes C (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(6): 469-478 p.

14. Fuentealba J, Dibarrart A, Saez-Orellana F, Fuentes-Fuentes M, Oyanedel, Guzmán L, Pérez C, Becerra J, Aguayo L (2012) Synaptic Silencing and Plasma Membrane Dyshomeostasis Induced by Amyloid- β Peptide are Prevented by *Aristolelia Chilensis* Enriched Extract. *J Alzheimers Dis* Jun 22.
15. Fundación Chile (2014). Comunicado: demanda de Maqui Crece en forma Exponencial. www.fundacionchile.com/.../Comunicado_Maquis_RevVL_FAM.docx
16. Gupta MP (1996). 270 plantas medicinales Iberoamericanas. CYTED-SECAB, Santa fé de Bogotá, Colombia. 262-263.
17. Hartmann, H. y Kester, D. 1980. Propagación de plantas; Principios y Practicas. 2ª Edición. México. Continental. 814 p.
18. Hoffmann A, Farga C, Lastra J, Veghazi E (1992). Plantas medicinales de uso común en Chile. Edic. Fundación Claudio Gay. Chile.
19. Kapchina-Toteva, V., Dimitrova, M.A., Stefanova, M., Koleva, D., Kostov, K., Yordanova, Z.P., Stefanov, D., Zhiponova, M.K., (2014). Adaptive changes in photosynthetic performance and secondary metabolites during white dead nettle micropropagation. *J. Plant Physiol.* 171, 1344–1353.
20. Kosai T, Niu G, Takagaki M (2016). Chapter 20 Photoautotrophic Micropropagation. *Plant Factory* 1 st edition. 271-283 p.
21. Kozai T, Kubota C. (2005). Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disadvantages. In: Kozai T, Afreeen F, Zobayed SMA (eds). *Photoautotrophic (sugar- free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system*. Springer, Dordrecht. 19–30p.
22. Kozai, T., (2010.) Photoautotrophic micropropagation: environmental control for promoting photosynthesis. *Propag. Ornam. Plants* 10 (4), 188–204.
23. Pierik R.L.M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Springer Science and Business Media, Springer, Dordrecht, the Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-011-5750-6.
24. Martins, J.P.R., Verdoodt, V., Pasqual, M. et al. *Plant Cell Tiss Organ Cult* (2015) 123: 121. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0820-5>
25. Misle E, Garrido E, Contardo H, González W. (2011). Maqui [*Aristolelia chilensis* (Mol.) Stuntz]- the amazing chilean tree: a review. *Journal of Agricultural Science and Technology B*, 1(4b): 473-482, 2011.
26. Montes M, Wilkominsky T (1987). *Medicina Tradicional chilena*. Editorial Universidad de Concepción, Chile. 86 p.
27. Munoz-concha D y Davey M. (2011). Micropropagation of the endangered Chilean tree, *Gomortega keule*. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 47. 170-175. 10.1007/s11627-010-9331-6.

28. Muñoz O y colaboradores, (1992). Química de la flora de Chile, departamento técnico de investigación. Primera Edición. Universidad de Chile, Chile. 351 p.
29. Ojeda, J., Jara, E., Molina, L., Parada, F., Burgos, R., Hidalgo, M., & Hancke, J., (2011). Effects of *Aristotelia chilensis* berry juice on cyclooxygenase 2 expression, NF-κB, NFAT, ERK1/2 and PI3K/Akt activation in colon cancer cells. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(6), 543-552
30. Pérez LP, Montesinos YP, Olmedo JG, Sánchez RR, Montenegro ON, Rodríguez RB, Ribalta R, RCR Escriba, D Daniels, R Gómez-Kosky . (2015). Effects of different culture conditions (photoautotrophic, photomixotrophic) and the auxin indole-butyric acid on the in vitro acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Red Maradol) plants using zeolite as support- *African Journal of biotechnology*.
31. Pfündel EE, Agati G, Cerovic ZG (2006) Optical properties of plant surfaces. In M Riederer, C Müller, eds, *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell, Oxford, pp 216–249.
32. Romo R, Bastías JM, Monje R, Campos F (2018) Perspectiva del Mercado internacional para el desarrollo de la industria del maqui, un análisis de las empresas en Chile.
33. Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012), "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* 9(7): 671-675, PMID 22930834
34. Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol* 155:349–361. doi:10.1046/j.1469-8137.2002.00482.x
35. Torres V. (2010). Evaluación de las actividades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas de las hojas de *Aristotelia chilensis* y de sus potenciales efectos tóxicos. Santiago, Universidad de Chile.
36. Valdebenito G, Campos J, Larraín O, Aguilera M, Kehler G, Ferrado M, Garcia E, Sotomayor A (2003). *Boletín Divulgativo N°1, Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz, Maqui. Maquei, Clon, Queldrón*. Investigadores INFOR-Fundación Chile, Gobierno de Chile, CONICYT, Proyecto FONDEF. 5 p.
37. Vogel H, Razmilic I, San Martín J, Doll u, González B (2008). *Plantas medicinales Chilenas: Experiencias de domesticación y cultivo de Boldo, Matico, Bailahuén, Canelo, Peumo y Maqui*. Editorial Universidad de Talca. Talca 145-148.
38. Xiao, Y., Kozai, T, (2006). In vitro multiplication of static plantlets using sugar-free media. *Sci. Hortic.* 109, 71–77.
39. Yeats TH, Rose JK. (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol.* Sep;163(1):5-20. doi: 10.1104/pp.113.222737. Epub 2013 Jul 26. PMID: 23893170; PMCID: PMC3762664.

40. Zobayed S M A, Afreen-Zobayed F, Kubota C and Kozai T (1999a) Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35, 183-188 p

41. Zobayed S M A, Afreen F, Kubota C and Kozai T (2000) Water control ability of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation. *Ann. Bot.* 85, 603-610

Anexo

World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human and Animal Welfare
(WOCMAP VI)

Poster presentation:

Micropropagation *in vitro* of maqui (*Aristotelia chilensis*) by autotrophic conditions
Denisse Bascuñán, Valeria Muñoz, Mariana Moya, Benita González, Ursula Doll,
Hermine Vogel

CENATIV, Magister en Hortofruticultura, Facultad de Ciencias Agrarias,
Universidad de Talca, Av. Lircay S/N Casilla 747, Talca, Chile.

1 dbascunan@utalca.cl, 2vamunoz@utalca.cl, 3 hvogel@utalca.cl.

Aristotelia chilensis (maqui) is a tree native to Chile with an increasing demand for its fruit. Maqui-berry, considered as a “superfruit”, is a rich source of antioxidants. For sustainable production domestication of the species is required to produce homogeneous and standardized quality of the raw material. The variety 'Luna Nueva' with high anthocyanin concentrations (1.5% dry weight) is being propagated by rooting cuttings or micropropagation. The *in vitro* propagation in mixotrophic conditions contains sucrose in the medium, whereas the autotrophic culture, without sucrose, is based on CO₂ as the only carbon source. This technique is expected to optimize plant development, prevent morphologic and physiologic disorders, as well as to improve adaptation *ex vitro*. In the present study maqui explants were exposed to treatments with enriched (1500 ppm) and environmental CO₂ concentrations. After three weeks explants were evaluated for morphologic characteristics (root and shoot growth; disorders such as hyperhydricity), physiologic characteristics (net photosynthesis) and adaptation to *ex vitro* conditions.

The present study was financially supported by CONICYT (Chile), project FONDEF ID14I20108