

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
CAMPUS LOS ÁNGELES
ESCUELA DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO *in vitro* PARA
Copiapoa megarhiza* (Rümppler) Britton & Rose y *Copiapoa
***coquimbana* Britton & Rose.**

PROYECTO DE TÍTULO PARA
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA
EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

MARCELA ELIANA DÍAZ CONTRERAS
LOS ÁNGELES – CHILE

2023

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO *in vitro* PARA
Copiapoa megarhiza (Rümppler) Britton & Rose y *Copiapoa coquimbana*
(autor) Britton & Rose**

Alumna

**Marcela Eliana Díaz Contreras
Ingeniera en Biotecnología Vegetal**

Profesora Guía

**MSc. Carol Peña Hernández
Colaboradora Docente
Bióloga**

Jefe de Carrera

**Ing. Pedro Lindor Quiroz Hernández
Profesor Instructor
Ingeniero en Ejecución Forestal**

Directora de Departamento

**Dra. Marely Cuba Díaz
Profesora Titular
Bióloga**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi profesora guía, quien hizo que renaciera mi amor por la carrera y las plantas al mostrarme un enfoque diferente sobre lo que podemos hacer por la naturaleza. Agradezco su guía, paciencia y consejos en cada etapa del desarrollo de esta tesis, así como su tranquilidad al recordarme que siempre hay soluciones.

A mi hermana, mi fiel confidente, y a mi sobrinito, quien ha sido la alegría al llegar a casa durante todo este proceso, y por supuesto, a mi padre.

Quiero agradecer a todas las personas que han estado presentes durante todo este camino: a Barbarita, quien ha sido mi apoyo incondicional, animándome, aconsejándome, motivándome a seguir adelante y siendo un hogar. A Silvana, por su constante apoyo, amistad y palabras de aliento. A mi grupo de amigas tesistas: Solange, Constanza y Vjeruscka, gracias por tanto y por estar siempre ahí para mí, las palabras no son suficientes para expresar mi gratitud hacia ustedes.

También quiero agradecer a mis compañeras de laboratorio, donde estuve de visita este semestre, quienes se tomaron el tiempo para enseñarme y resolver cualquier duda que pudiera tener y amigos de universidad, Barbara, Yadiana y Francisca.

A mi madre, cuyo espíritu ha estado conmigo todos estos años, y quien fue la primera persona en enseñarme el valor y el amor por las plantas, así como su importancia en la vida de las personas. Sé que estarías orgullosa de ver que llegué hasta aquí a pesar de lo difícil del camino.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mis perritos, fieles compañeros día a día: Orion, mi pequeño gigante, y Lila, mi pequeña luchadora, que decidió desafiar a la muerte y quedarse a mi lado. Su presencia ha sido una fuente constante de consuelo y alegría.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. MARCO TEÓRICO	11
Género <i>Copiapoa</i> (Cactácea)	11
<i>Copiapoa megarhiza</i>	14
<i>Copiapoa coquimbana</i>	17
Estrategias de conservación en plantas	19
Estrategias de conservación en cactáceas.....	22
Objetivo general	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Material vegetal	27
3.2. Ensayo de germinación.	29
3.3. Producción de plantas <i>in vitro</i>	31
3.4. Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS	33
4.1. ENSAYO DE GERMINACIÓN	33
4.1.2. Tiempo medio de germinación (MGT)	35
4.1.3. Índice de germinación (GI).....	36
4.1.4. Porcentaje de contaminación.....	37
4.2. PRODUCCIÓN DE PLANTAS <i>IN VITRO</i>	39
<i>Copiapoa megarhiza</i>	39
4.2.1. Porcentaje de germinación (PG)	39

4.2.2. Tiempo medio de germinación (MGT)	40
4.2.3. Índice de germinación (GI).....	41
4.2.4. Porcentaje de supervivencia	42
<i>Copiapoa coquimbana</i>	43
4.2.5. Porcentaje de germinación (PG)	43
4.2.6. Tiempo medio de germinación (MGT)	44
4.2.7. Índice de germinación (GI)	45
4.2.8. Porcentaje de supervivencia	46
4.2.9. Porcentaje de supervivencia total de las especies.....	47
5. DISCUSIÓN	50
5.1. Ensayo de germinación	51
5.2. Producción de plantas <i>in vitro</i>	52
7. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Copiapoa coquimbana</i> en sitio de relocalización (Peña, 2022)	15
FIGURA 2. <i>Copiapoa megarhiza</i> en sitio de relocalización (Peña, 2022).....	16
FIGURA 3. <i>Copiapoa megarhiza</i> en ambiente natural donde se puede observar el crecimiento de sus raíces y sus botones florales (Peña, 2022)	17
FIGURA 4. Distribución geográfica de <i>C. megarhiza</i> en los cerros y valles de Copiapó (Schulz 2006).....	18
FIGURA 6. Crecimiento y floración de <i>C. coquimbana</i> en hábitat natural (Peña, 2023).....	19
FIGURA 7. Distribución actualizada geográfica de <i>C. coquimbana</i>	19
FIGURA 8. Número de semillas de la familia Cactácea conservadas en los bancos de germoplasma de semillas del INIA. (Fuente. Categorías de géneros conservados en el Banco Base de Semillas INIA, 2022)	26
Tabla 1. Sitios de recolección de semillas de <i>Copiapoa megarhiza</i> y <i>Copiapoa coquimbana</i> utilizados.....	30
FIGURA 9. Zona de recolección de semillas para <i>Copiapoa megarhiza</i>	31
FIGURA 10. Zona de recolección de semillas para <i>Copiapoa coquimbana</i>	31
FIGURA 11 . Desarrollo y germinación total de las especies en estudio a los 20 días. a) Germinación de <i>C. megarhiza</i> . b) Germinación de <i>C. coquimbana</i> ., bar= 0.5 cm.	35
FIGURA 12. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 20 días para <i>C. coquimbana</i> y <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%. Diferencias significativas (p0,05).....	36
FIGURA 13 . Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 20 días para <i>C. coquimbana</i> y <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Test utilizado HSD Tukey; existieron diferencias significativas entre tratamientos (p0,05).	37

FIGURA 14. Índice de germinación evaluado en un periodo de 20 días para <i>C. coquimbana</i> y <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%. Test HSD de Tukey, las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	38
FIGURA 15. Placas que muestran el porcentaje de contaminación en semillas para los tratamientos con fungicida en su proceso de desinfección y para los controles para ambas especies: a) <i>C. coquimbana</i> b) <i>C. megarhiza</i>	39
FIGURA 16. Porcentaje de contaminación evaluado en un periodo de 20 días para <i>C. coquimbana</i> y <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%. Test de Tukey, nivel de diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	40
FIGURA 17. Desarrollo y germinación total luego de 8 semanas de la especie <i>C. megarhiza</i>	41
FIGURA 18. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%.	42
FIGURA 19. Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en días. Nivel de significancia ($p < 0,05$).....	43
FIGURA 20. Índice de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. megarhiza</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en valores de 0 a 1. Test de Tukey, las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$). Las líneas indican errores estándar. Las barras indican errores estándar.	44
FIGURA 21. Porcentaje de supervivencia para <i>C. megarhiza</i> en un periodo de 6 meses propagadas en medio de cultivo con reguladores de crecimiento; plantas desarrolladas a partir de las plantas que tuvieron respuesta germinativa luego de las 8 semanas.	

Diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	45
FIGURA 22. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. coquimbana</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%.....	46
FIGURA 23. Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. coquimbana</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en días. Diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	47
FIGURA 24. Índice de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para <i>C. coquimbana</i> con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en valores de 0 a 2. Test de Tukey, diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	48
FIGURA 25. Porcentaje de supervivencia para <i>C. coquimbana</i> en un periodo de 6 meses propagadas en medio de cultivo con reguladores de crecimiento; plantas desarrolladas a partir de las plantas que tuvieron respuesta germinativa luego de las 8 semanas. Test de Tukey, diferencias significativas ($p < 0,05$). Las barras indican errores estándar.	49
FIGURA 26. Análisis comparativo en porcentaje total de las especies germinadas totalmente que desarrollaron plántulas de las especies <i>C. megarhiza</i> y <i>C. coquimbana</i>	48
FIGURA 27. Desarrollo de planta y raíces luego de 6 meses en medio de cultivo con reguladores de crecimiento para <i>C. coquimbana</i> y <i>C. megarhiza</i> . 9: a) Cultivo <i>in vitro</i> de <i>C. coquimbana</i> b) Cultivo <i>in vitro</i> <i>C. megarhiza</i> . 10): a) Desarrollo radicular y vegetal de <i>C. coquimbana in vitro</i> b) Desarrollo radicular y vegetal de <i>C. megarhiza in vitro</i>	51

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un protocolo para la germinación *in vitro* y producción de plantas de *Copiapoa megarhiza* (Rümpfer) Britton & Rose y *Copiapoa coquimbana* Britton & Rose, especies de cactáceas endémicas de Chile y en categorización como vulnerable y en peligro de extinción.

En la fase de ensayo de germinación, se aplicó tratamiento de desinfección, utilizando como fungicida, hipoclorito de sodio y etanol, junto con el control sin la adición de fungicida para determinar su efecto en la germinación de las semillas. Se realizaron análisis estadísticos paramétricos de ANOVA de una vía y test HSD de Tukey para comparar los resultados. Además, se calculó el porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación e índice de germinación para cada tratamiento. Los resultados demostraron que el tratamiento con fungicida durante la germinación *in vitro* fue crucial, alcanzando un 100% a los 20 días, en comparación al no tratado donde el porcentaje de germinación fue de 62,5 para *C. megarhiza* y de 78% para *C. coquimbana*. Las semillas tratadas con fungicida también mostraron un tiempo medio de germinación más corto de 5 y 4 días; y un índice de germinación más alto de 1,94 y 2,49 a diferencia de las no tratadas de 1,18 y 1,77.

Para la producción de plantas *in vitro*, se utilizó un medio de cultivo complementado con hormonas de crecimiento para la producción de brotes y elongación de raíces en la propagación de las plántulas germinadas y se obtuvo un 100% de supervivencia para las plántulas desarrolladas *in vitro* en un período de 6 meses.

En conclusión, el protocolo de desinfección con fungicida durante la germinación *in vitro* fue crucial para el éxito en la germinación y propagación de las especies de la familia Cactaceae estudiadas. Además, el protocolo de producción de plantas *in vitro* resultó en la generación exitosa de plántulas saludables y con características morfológicas similares a las especies de origen. Estos resultados tienen implicancias importantes para la conservación de especies en peligro de extinción y proporcionan una base para futuras investigaciones y aplicaciones en la propagación y manejo sostenible de estas especies únicas y valiosas.

ABSTRACT

The present study aimed to develop a protocol for *in vitro* germination and plant production of *Copiapoa megarhiza* (Rümppler) Britton & Rose and *Copiapoa coquimbana* Britton & Rose, cacti species endemic to Chile and categorized as vulnerable and endangered.

In the germination test phase, disinfection treatment was applied, using sodium hypochlorite and ethanol as fungicide, together with the control without the addition of fungicide to determine its effect on seed germination. Parametric statistical analyses of one-way ANOVA and Tukey's HSD test were performed to compare the results. In addition, germination percentage, mean germination time and germination index were calculated for each treatment. The results showed that the fungicide treatment during *in vitro* germination was crucial, reaching 100% after 20 days, compared to the untreated one where the germination percentage was 62.5 for *C. megarhiza* and 78% for *C. coquimbana*. The fungicide-treated seeds also showed a shorter mean germination time of 5 and 4 days; and a higher germination index of 1, 94 and 2.49 as opposed to the untreated of 1.18 and 1.77.

For the production of *in vitro* plants, a culture medium supplemented with growth hormones was used for the production of shoots and root elongation in the propagation of germinated seedlings, and 100% survival was obtained for the seedlings developed *in vitro* in a period of 6 months.

In conclusion, the fungicide disinfection protocol during *in vitro* germination was crucial for the successful germination and propagation of the studied Cactaceae family species. In addition, the *in vitro* plant production protocol resulted in the successful generation of healthy seedlings with morphological characteristics similar to the species of origin. These results have important implications for the conservation of endangered species and provide a basis for future research and applications in the propagation and sustainable management of these unique and valuable species.

1. INTRODUCCIÓN

La conservación de la biodiversidad es crucial para garantizar la existencia y el uso sostenible de especies únicas y endémicas. En el caso de Chile, reconocido como uno de los hotspots de biodiversidad a nivel mundial, alberga una flora destacada por su alto nivel de endemismo y su importancia para la identidad, cultura y economía del país. Sin embargo, muchas especies vegetales en Chile enfrentan amenazas que ponen en riesgo su supervivencia, y un preocupante porcentaje se encuentra en peligro o en peligro crítico de extinción (Pañitrur- De la Fuente et al. 2022). Este es el caso del género *Copiapoa* Britton & Rose, restringido a un cinturón latitudinal en Chile, entre Tocopilla y el Valle del Choapa (Hoffman y Walter 2004). Las especies de este género habitan en condiciones específicas, como laderas rocosas orientadas al norte y noreste, baja abundancia de vegetación y mayor sequedad (Schultz 2006). Su distribución es discontinua, formando poblaciones separadas por kilómetros (Schultz 2006). Dos especies de este género enfrentan distintas amenazas, *Copiapoa megarhiza* (Rümppler) Britton & Rose endémica de la Región de Atacama y *Copiapoa coquimbana* Britton & Rose endémica de la Región de Coquimbo (Schultz 2006).

C. megarhiza, caracterizada por espinas gruesas y pocos tallos, ha experimentado la fragmentación de sus poblaciones debido a la antropización del paisaje, con la afectación de grandes áreas debido a la actividad minera. Su distribución natural se encuentra severamente fragmentada, y se estima una disminución en la disponibilidad de hábitat en el contexto de cambio climático actual (MMA 2023). Por otro lado, *C. coquimbana*, de crecimiento en cojín y con una distribución más meridional, se enfrenta a amenazas como la expansión de zonas urbanas, construcción de tranques y desertificación en su distribución natural (MMA 2006). Además, ambas especies se han visto afectadas por la destrucción de sus ecosistemas originales debido a la actividad humana y efectos del cambio climático. Un ejemplo de intervención humana son los intentos de relocalización que se centran en el rescate de germoplasma y reubicación de especies vegetales, pero para las cactáceas, especialmente las de tipo globular, se ha optado por el trasplante completo del individuo, mientras que, para las especies columnares de mayor tamaño,

se considera la reproducción vegetativa a partir de esquejes (Ministerio del Medio Ambiente, 2021). Lamentablemente, en muchas ocasiones, estos intentos de relocalización han resultado en un bajo porcentaje de supervivencia para las especies trasplantadas (Peña 2023. com. pers).

Ante este panorama, es fundamental establecer estrategias de conservación efectivas para garantizar la supervivencia de estas especies y su presencia en su hábitat natural. Una técnica viable para lograrlo es el cultivo *in vitro*, que consiste en la germinación de semillas y la conservación de los recursos genéticos. Junto con la creación de bancos de germoplasma, esta técnica se presenta como una estrategia fundamental para la restauración de especies en estado crítico.

2. MARCO TEÓRICO

Género *Copiapoa* (Cactácea)

El género *Copiapoa* perteneciente a la familia Cactácea, está restringido a un cinturón latitudinal en Chile, habitando exclusivamente entre Tocopilla (22°S) y las colinas costeras al norte del Valle del Choapa (31° 20° S), desde el nivel del mar hasta los 1300 m de altitud (Myers et al. 2000). Los factores que lo restringen en su distribución son simples en cuanto al género, pero para las poblaciones individuales son complejos. La ubicación geográfica es muy importante en la distribución del género *Copiapoa*, ya que las laderas rocosas orientadas al norte y al noroeste, más secas, calurosas y con menos vegetación, son las más pobladas, lo que indica que la competencia de otras plantas puede haber sido el factor más importante para su establecimiento geográfico; lo que no significa que las cactáceas de este género no puedan crecer en laderas con menos horas de sol directo o con ubicación más al sur de su zona de distribución, es solo que las poblaciones más densas siempre se encuentran en las laderas más soleadas y con menos vegetación (Schulz 2006). A menudo tienen una distribución discontinua, formando poblaciones distintas separadas de las poblaciones vecinas por kilómetros. Algunas excepciones a esto ocurren en los valles de Huasco y Elqui (Schulz 2006).

Copiapoa tiene flores insertas en la lanosidad apical característica de este género. Las yemas florales se producen en las areolas dentro de la lana, que no se abren rápidamente y parece que las temperaturas más altas y el aumento de la luz solar aceleran la velocidad a la que se abren los capullos (Schulz 2006). Entre octubre y noviembre, es el periodo de máxima floración de los cactus en Chile, y las copiapoa también florecen en estos meses, pero también se puede extender durante un periodo más prolongado hasta el mes de marzo (Schulz 2006). Las flores generalmente solo se producen una o dos a la vez desde cada ápice. Teniendo en cuenta el tamaño del género, el tamaño y el color de las flores es notablemente similar, con un diámetro de 15 a 30 mm. El color de la flor es amarillo y el rojo está presente en diversos grados en muchas especies. El color de los tépalos exhibe color más rojo que los pétalos y, a menudo, poseen una raya central roja (Schulz 2006).

Un individuo de *Copiapoa* con múltiples ramas producirá literalmente cientos de miles de semillas a lo largo de su vida. Estas semillas son pequeñas, negras y brillantes. Por lo general, varían en tamaño de 0,8 a 1,8 mm (Schulz 2006). Además de la genética, el tamaño de las semillas depende de una serie de factores ambientales que incluyen la estación, la salud de la planta y la cantidad de semillas fértiles en la fruta (Schulz 2006). Las semillas en cultivo germinan rápidamente, dentro de 4 o 5 días y las plántulas crecen relativamente lentas. En el hábitat, las plántulas de menos de 3 meses se encuentran con frecuencia después de grandes eventos de lluvia, sin embargo, ninguna parece sobrevivir a su primer año (Schulz 2006).

En cuanto al crecimiento, en su hábitat natural es lento y se mide en uno o dos milímetros por año en todas las especies. Las especies inmaduras de este género carecen de lanosidad apical, ya que solo varias especies producen una harina blanquecina a medida que maduran mientras que las plantas con un ápice grande son de mediana edad y están en la flor de la vida y aquellas plantas con un ápice alargado están cerca del final de sus vidas (Schulz 2006). Otra forma de ver la salud y la edad es por la proporción de verde fotosintético en el tallo superior en comparación con el tallo inferior negro o naranja; cuanto menor es el porcentaje de tallo superior fotosintético, más vieja es la planta, lo que significa más cerca de la muerte, ya que una vez que la planta decae, parece no poder recuperarse, incluso si se dan las condiciones ideales (Schulz 2006).

Las especies de este género enfrentan múltiples factores de vulnerabilidad que aumenta la susceptibilidad a las amenazas a su conservación, en los que se pueden mencionar sus distribuciones restringidas, vulnerables a la recolección ilegal tanto de plantas longevas como de semillas para el comercio hortícola y las colecciones privadas, la minería, la agricultura, la construcción de carreteras, erosión genética, etc. (Villalobos et al. 2023). Sumado a lo anterior, el aumento de la aridez debido al cambio climático es una amenaza que representa un riesgo directo para la supervivencia de las especies de este género (Goettsch et al. 2015). También se suman los Planes de manejo de flora como una problemática que afectan a las especies del género, que consisten en el rescate y trasplante de especies arbustivas, suculentas y herbáceas, singulares y en

categorías de conservación, mediante la recuperación de su germoplasma (semilla) y material vegetativo, dentro de los cuales se encuentra la medida de rescate y relocalización de cactáceas (Figura 1 y 2), donde el manejo para estas en cactáceas globulares se enfoca en el trasplante del individuo completo, y para especies columnares de mayor tamaño se considera la reproducción vegetativa a partir de esquejes, para lo cual se buscan preservar los perfiles de suelos en la relocalización, considerando las características de los tipos vegetativos, como distribución, pero con planes de monitoreo mínimos donde muchas veces más del 50% de las especies relocalizadas no logran supervivencia dentro de los plazos estipulados, teniendo grandes pérdidas de especies vulnerables (Peña 2023, com. pers).



FIGURA 1. *Copiapoa coquimbana* en sitio de relocalización (Peña, 2022)



FIGURA 2. *Copiapoa megarhiza* en sitio de relocalización (Peña, 2022)

Copiapoa megarhiza

Se caracteriza por espinas gruesas y pocos tallos. Los tallos de la especie, especialmente los de mayor tamaño están unidas a las raíces tuberosas por un cuello estrecho, por lo que es común ver tallos aparentemente removidos por animales, tiene una floración con especial rigurosidad después de la lluvia, en ocasiones hasta 10 botones florales pueden aparecer (Figura 3). Las espinas son inicialmente de color marrón oscuro cuando son nuevas y rápidamente se vuelven de un gris apagado (Schulz 2006). La polinización de esta especie la realizan distintas especies de abejas y moscas, y se ha observado que hormigas cumplen un rol importante como polinizadores y dispersores de semillas (Hoffman y Walker 2004).



FIGURA 3. *Copiapoa megarhiza* en ambiente natural donde se puede observar el crecimiento de sus raíces y sus botones florales (Peña, 2022)

Las plantas de *C. megarhiza* que crecen en zonas, donde la niebla no penetra libremente, tienen espinas de color marrón dorado en sus tallos inferiores, y las plantas expuestas en laderas orientadas al oeste conservan el color gris en la parte inferior de sus tallos, aunque las plantas más viejas pueden tener tallos alargados de hasta 350 mm, la mayoría están moribundas o en mal estado (Schulz 2006). Estas plantas, que crecen en lo que no se considera el típico entorno ideal, suelen ser más sanas que las plantas de las laderas más soleadas del norte y pese a que las laderas sur parecen ser las más ideales para el establecimiento y crecimiento de la especie, ya no tiene la capacidad de establecer plántulas en un entorno tan hostil y seco, lo que significa que solo sobreviven las maduras y establecidas en las laderas rocosas. *C. megarhiza* es endémica de la región de Atacama, posee poblaciones severamente fragmentadas por la antropización del paisaje, hay extirpación de grandes áreas con individuos producto de la actividad minera (Ficha técnica de MMA de *C. megarhiza*, 2023). Habita en los cerros y valles al sur y norte de Copiapó (Figura 4). La comparación entre la distribución potencial presente y la futura sugiere una fuerte disminución en la disponibilidad hábitat bajo cambio climático y su extensión abarca 272 km² (Pillet et al. 2022, Ficha técnica de MMA de *C. megarhiza*, 2023).

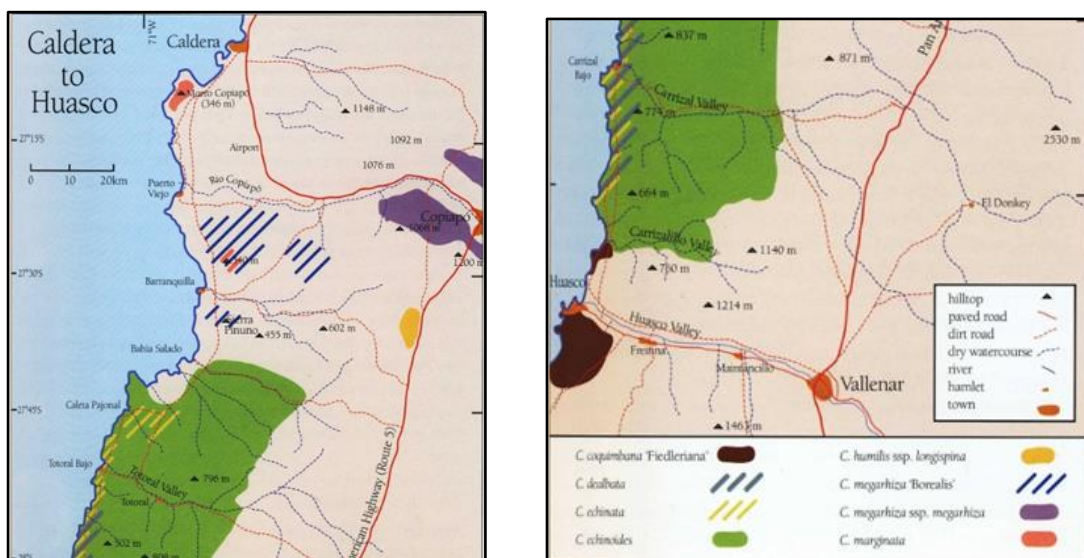


FIGURA 4. Distribución geográfica de *C. megarhiza* en los cerros y valles de Copiapó (Schulz 2006).

Actualmente se ha propuesto categorizar a esta especie de Vulnerable a En Peligro (MMA 2023). Dentro de las principales amenazas que ponen en peligro se encuentran la recolección ilegal, cambio climático y sequía, construcción de caminos, proyectos energéticos y minería (Ficha técnica de MMA de *C. megarhiza*, 2023).

Copiapoa coquimbana

Cactus de crecimiento en cojín, ramifica vigorosamente desde la base con cabezas redondeadas, presenta raíz pivotante corta (Hoffmann y Walter 2004). Las plantas pueden ser bajas y formar matas o tener tallos erectos, Pueden ser espinosos y grises o ser oscuros con espinas cortas y tallos más anchos. Las espinas pueden ser rectas o curvas, gruesas o delgadas. Las costillas pueden ser rectas u onduladas, el cuerpo puede ser de color verde oscuro, oliva o claro, flores de 2,5 a 5,5 cm de longitud, perfumadas, de color amarillo o rojizas por dentro y rojas o marrones por fuera y posee frutos de color café rojizo (Figura 6) (Hoffmann y Walter 2004).



FIGURA 6. Crecimiento y floración de *C. coquimbana* en hábitat natural (Peña, 2023)

El rango de distribución geográfica la hace ser la especie de *Copiapoa* con distribución más meridional, creciendo entre las latitudes $29^{\circ} 20'$ y los $31^{\circ}16'S$, es endémica de la Región Coquimbo (Figura 7). Se estima que su rango de extensión es de 17.536 km² (Villalobos et al. 2023).

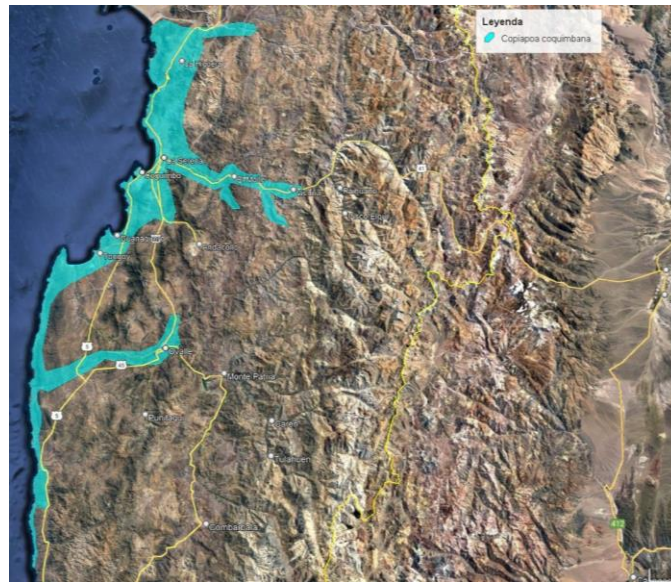


FIGURA 7. Distribución actualizada geográfica de *C. coquimbana*

Sus principales amenazas en el corto plazo son la ampliación de zonas urbanas, construcción de tranques y trabajos agrícolas, mientras que la principal amenaza a largo es el proceso de desertificación. Está clasificada como especie Casi Amenazada (MMA 2006).

Ambas especies se encuentran clasificadas en rangos de amenaza según el Ministerio de Medio Ambiente. Las clasificaciones según el Reglamento para la Clasificación de Especies Silvestres, se puede definir como especie Casi Amenazada cuando habiendo sido evaluada, no satisface, actualmente los criterios para las categorías En Peligro Crítico, En Peligro o Vulnerable, pero está próximo a satisfacer los criterios de estos últimos, o posiblemente los satisfaga, en el futuro cercano, mientras que para una especie categorizada En Peligro, enfrenta un riesgo muy alto de extinción en estado silvestre, es decir, cuando la probabilidad de que la especie desaparezca en el mediano plazo es alta (UICN, 2012).

Dado su carácter endémico que distinguen a las especies del género *Copiapoa*, es de vital importancia establecer un sistema de conservación que salvaguarde la biodiversidad, ya que su reproducción natural es difícil, lo que aumenta riesgo de extinción de estas especies, de esta manera, se puede fomentar la recuperación de sus

poblaciones en su hábitat original, siendo una estrategia viable para lograr este objetivo la utilización del cultivo *in vitro*, como lo han demostrado investigaciones previas en investigaciones con cactáceas (Lázaro-Castellanos et al. 2018).

Estrategias de conservación en plantas

La diversidad de plantas en el mundo está disminuyendo de manera alarmante, y solo alrededor del 10% han sido evaluadas por la Lista Roja Mundial de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (WWF, 2020). Las principales amenazas incluyen la destrucción del hábitat y el cambio en el uso del suelo debido a la urbanización y la expansión de la agricultura; además, el cambio climático plantea nuevos desafíos para la gestión de los recursos vegetales (Le Roux et al. 2019; Petit et al. 2018).

Es importante comprender el papel fundamental que desempeñan las especies y reconocer la necesidad de desarrollar estrategias de conservación a largo plazo. Las plantas son elementos esenciales en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres, ya que constituyen la base estructural y ecológica de estos sistemas. Su existencia resulta vital para garantizar la salud, alimentación y bienestar humano. Además, las plantas son responsables de la producción del oxígeno que respiramos, regulan la humedad ambiental, mantienen la calidad de los suelos y contribuyen a la estabilidad climática (Antonelli et al. 2019). Además, la flora y la vegetación son fundamentales para la identidad, cultura y economía de un país, ya que proporcionan bienes y servicios que afectan el bienestar humano (Ardisana et al. 2017).

En este contexto, los recursos genéticos se convierten en un pilar fundamental para hacer frente a estos desafíos (Walters et al. 2021). La conservación de los recursos genéticos puede llevarse a cabo *in situ* (en la naturaleza) o *ex situ* (generalmente en bancos de germoplasma) (Pañitrur-De la Fuente et al. 2022). Dependiendo de la especie, se pueden utilizar diferentes métodos, como el almacenamiento de semillas, la preservación de tejidos vegetales *in vitro*, la criopreservación o la conservación de plantas en el terreno (Salazar et al. 2006).

La conservación de las diversas especies vegetales en Chile reviste una importancia crucial debido a su reconocimiento como uno de los 34 hotspots mundiales de biodiversidad (Martinez-Harms et al. 2021). Chile alberga una flora única y destacada por su alto nivel de endemismo (Mittermeier et al. 2011). Lamentablemente, al igual que ocurre a nivel mundial, estas especies no están exentas de amenazas que ponen en riesgo su supervivencia (Urbina-Casanova et al. 2016). Aunque solo se ha evaluado y clasificado el 13% de las plantas en Chile según el reglamento de clasificación de especies silvestres, una preocupante cifra del 46% de ellas se encontraría en peligro o en peligro crítico de extinción (Pañitrur- De la Fuente et al. 2022).

Dado que las plantas representan un recurso único e invaluable para Chile, es fundamental protegerlas para asegurar su existencia, conservación y uso sostenible, tanto para las generaciones presentes como las futuras (Pañitrur- De la Fuente et al. 2022). La conservación de la diversidad vegetal no solo es esencial para preservar el patrimonio natural de Chile, sino que también tiene un impacto directo en la calidad de vida de las personas, en la provisión de servicios ecosistémicos y en el desarrollo sostenible del país (Squeo et al. 2012); por lo que se requiere una atención urgente y acciones concretas para salvaguardar estas especies vegetales y garantizar continuidad en el tiempo (MMA 2017).

Es por esto, que los bancos de germoplasma son una estrategia fundamental para el mantenimiento del material vegetal (Alcántara et al. 2017). El término "germoplasma" se refiere a cualquier tejido vivo de una planta capaz de generar un nuevo individuo (Ardisana et al. 2017). Puede incluir semillas u otras partes utilizadas para la propagación vegetativa convencional, como esquejes, bulbos, tubérculos, así como la regeneración a través del cultivo de tejidos, como células, yemas o polen (Walters et al. 2021). El concepto de germoplasma se originó en la descripción de August Weismann sobre los componentes de las células germinales responsables de la herencia, lo que se relaciona con la función del ADN como portador de información genética (Black et al. 2006). En el contexto de los recursos fitogenéticos, el banco de germoplasma se refiere a un lugar

dedicado a la conservación de la diversidad genética de las especies vegetales mediante el resguardo del germoplasma (Donoso 2022).

Dentro de los bancos de germoplasma, se encuentran los bancos de germoplasma de material *in vitro*, los cuales son especialmente utilizados para la micropropagación o propagación clonal *in vitro* (Lema- Rumincka et al. 2014). Esta técnica de cultivo *in vitro* se ha extendido ampliamente y se utiliza como una herramienta para obtener múltiples plantas de manera asexual; además, se utiliza para superar problemas de germinación de semillas en diversas especies vegetales (Abdalla et al. 2022). La propagación *in vitro* garantiza una multiplicación rápida y masiva de copias genéticamente idénticas de plantas individuales en un período relativamente corto y en un espacio limitado que permite rejuvenecer variedades antiguas y regenerar rápidamente nuevas variedades (Cardoso et al. 2018). Además, las plantas propagadas *in vitro* pueden adquirir características más deseables para investigaciones específicas (Bhojwani & Dantu, 2013). Posee ventajas este tipo de banco de germoplasma, dentro de las cuales se mencionan espacio y recursos reducido donde se almacena una gran cantidad de material genético, un menor riesgo de contaminación al estar en un ambiente estéril y controlado, multiplicación rápida de los recursos materiales disponibles, mantención de características genéticas al preservar la integridad genética del material (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo 2018), mientras que dentro de las desventajas de esta técnica están las limitaciones en la diversidad genética ya que las muestras están limitadas a la diversidad genética inicialmente recolectado lo que podría no reflejar la variabilidad genética de la especie, también el riesgo de pérdida total del material en laboratorio , y posteriores problemas de adaptación a condiciones naturales (Das et al. 2017).

También existen los bancos de semillas, que funcionan como verdaderas bóvedas donde se almacenan y protegen millones de semillas en condiciones de baja temperatura (-20°C) y humedad (15% HRe) (Alcántara et al. 2017). Esta conservación especializada permite mantener las semillas viables durante largos periodos de tiempo. La principal finalidad de estos bancos es proporcionar una copia de seguridad o respaldo de diferentes especies de plantas, ya sean cultivadas o nativas, ante el riesgo de su

completa desaparición o extinción (Pañitrur- De la Fuente et al. 2022). Principales ventajas de los bancos de semillas es la conservación a largo plazo del material y de una diversidad de especies vegetales incluyendo conservación de especies silvestres, lo que también conlleva facilidad de almacenamiento y manejo lo que también permite la facilidad de intercambio entre instituciones y países (Peres 2016), pero a la vez posee limitaciones que lo vuelven una desventaja como la dependencia constante de técnicas de conservación tradicionales con las condiciones controladas, como bajas temperaturas y humedad, la viabilidad de las semillas se puede ver comprometida, también limitaciones en especies recalcitrantes (Das et al. 2017).

Estrategias de conservación en cactáceas

Como modo de estrategia de conservación en cactáceas, en los últimos años, se ha llevado a cabo la propagación *in vitro* de aproximadamente 300 especies de cactus, siendo el mayor productor Corea del Sur (Lema-Rumińska et al. 2014). Esta técnica se ha utilizado principalmente con fines ornamentales, agrícolas e industriales. Además, se han establecido bancos de germoplasma con el objetivo de preservar y restablecer especies en su hábitat natural, también a nivel mundial, se pueden encontrar grandes colecciones de cactus resguardados en Jardines Botánicos (Torres-Silva et al. 2021). Estas colecciones albergan especies endémicas de diversos países y desempeñan un papel importante en la conservación de la biodiversidad de los cactus (Medeiros et al. 2006; Zoghiami et al. 2012; Civatti et al. 2017).

En Chile, se han establecido bancos de germoplasma basados en la colección de semillas conocidos como Red de Bancos de Germoplasma constituidos por cinco bancos fitogenéticos, como resultado de un arduo trabajo de recolección durante 20 años (2001-2021) a cargo del INIA. Estos bancos albergan un total de 1302 especies diferentes, lo que representa aproximadamente el 28% de la flora chilena. La colección incluye diversas poblaciones de semillas, abarcando una amplia diversidad genética que engloba 118 familias y 405 géneros, y dentro de las funciones más relevantes de estos bancos se encuentra la preservación de los recursos genéticos (León-Lobos et al. 2018).

Este banco de germoplasma no solo proporciona una muestra representativa de la población, sino que también es de gran utilidad para el desarrollo de protocolos de germinación, evaluación de viabilidad a largo plazo y distribución de duplicados a otros bancos de semillas (Pañitrur-De la Fuente et al. 2022). Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de las especies de la flora chilena conservadas en este banco de germoplasma (84%) aún no han sido evaluadas oficialmente en cuanto a su estado de conservación según los procesos establecidos por el RCE del Ministerio de Medio Ambiente (MMA 2023). Por lo tanto, la información actualizada sobre su estado de conservación es limitada. A pesar de esta limitación, se estima que alrededor del 33% de las plantas amenazadas (clasificadas como vulnerables, en peligro o en peligro crítico de extinción) que han sido evaluadas mediante los procesos del RCE, se encuentran siendo conservadas en estos bancos de germoplasma (MMA 2022). Esta labor de conservación resulta fundamental para asegurar la supervivencia de estas especies en peligro (Pañitrur-De la Fuente et al. 2022).

Dentro de la colección de semillas que posee el INIA, se destacan las muestras resguardadas de la familia Cactaceae (Figura 8) entre las que se encuentran *C. megarhiza* (8 muestras conservadas) y *C. coquimbana* (9 muestras conservadas). Estas especies representan ejemplos de la diversidad y la importancia de conservar el germoplasma de la flora chilena para futuras investigaciones y acciones de conservación (Hoffman y Walker 2004).

Familia	Géneros	Conservadas por género	Conservados por género	Endémicas por género	Nativas por género	Conservadas por género	Conservadas por familia	Conservados por familia	Conservadas por familia	Conservados por familia
CACTÁCEA	<i>Airampoa</i>	1	1	0	1	1	294	14	81	87
	<i>Austrocactus</i>	2	2	1	1	3				
	<i>Browningia</i>	1	1	0	1	2				
	<i>Copiapoa</i>	17	18	17	0	39				

<i>Corryocactus</i>	1	1	0	1	1				
<i>Cumulopuntia</i>	2	2	0	2	30				
<i>Eriosyce</i>	35	38	35	0	103				
<i>Eulychnia</i>	6	6	6	0	37				
<i>Halageocereus</i>	1	1	1	0	5				
<i>Leucostele</i>	6	8	5	1	20				
<i>Maihuenia</i>	1	1	0	1	2				
<i>Maihueniopsis</i>	6	6	6	0	27				
<i>Miqueliopuntia</i>	1	1	1	0	20				
<i>Oreocereus</i>	1	1	0	1	4				

FIGURA 8. Número de semillas de la familia Cactácea conservadas en los bancos de germoplasma de semillas del INIA. (Fuente. Categorías de géneros conservados en el Banco Base de Semillas INIA, 2022)

La conservación de la diversidad genética es de vital importancia para la preservación de la biodiversidad en su nivel más fundamental ya que se refiere a la variedad de genes presentes en una especie, tanto dentro de sus poblaciones como entre ellas (Korotkova et al. 2021). Esta diversidad genética desempeña un papel crucial en la resistencia de las especies a su entorno, ya que, a mayor variabilidad genética, mayor será la probabilidad de supervivencia frente a cambios ambientales (Ministerio del Medio Ambiente, 2016). También almacena el valor evolutivo y la capacidad de adaptación de una especie a los ecosistemas en los que habita (Pañitru-De la Fuente et al. 2022).

Ante las amenazas tanto antropogénicas como del cambio climático, resulta imperativo desarrollar nuevas técnicas de conservación y preservación para las especies endémicas de nuestro país. Estas técnicas desempeñarán un papel fundamental en el resguardo de la integridad genética de estas especies y facilitarán la restauración de sus poblaciones en su hábitat natural (Pérez-Molphe-Balch et al. 2015).

Para cactáceas en el ámbito de conservación y de sus estudios en las diversas especies que existen, se han hecho diversas investigaciones y acciones para poder abordar los principales problemas y aprovechar las potencialidades, las que son conservación y estudio en bancos de germoplasma con conservación de semillas y de tejidos en cactáceas, investigaciones de técnicas de propagación y cultivo *in vitro*, estudios de ecología y distribución lo que proporciona información y manejo de las especies en sus hábitats naturales; restauración de hábitats (Lema-Rumińska et al. 2014).

En el caso particular de Chile , que alberga una gran variedad de cactus, en los que muchos poseen características de ser especies endémicas y que enfrentan amenazas similares a las ya mencionadas en las especies en estudio, se han implementado esfuerzos significativo para la conservación de estas especies, donde se han incluido creación de áreas protegidas tales como el Parque Nacional Pan de Azúcar ubicado en la región de Antofagasta y Atacama (Conaf 2023), junto con los bancos de germoplasma de semilla que están bajo el funcionamiento del INIA (Pañitrur-De la Fuente et al. 2022), donde se realizan diversos estudios en las semillas que tienen en el banco, como estudios de germinación con diversos tratamientos (Pañitrur et al. 2020).

La elección de estas cactáceas no es aleatoria; *Copiapoa*, perteneciente a una familia botánica única, simboliza la riqueza endémica de Chile. Su fragilidad frente a la degradación del hábitat y baja tasa de supervivencia en intentos de reubicación como se mencionó, subrayan la urgencia de estrategias efectivas para las especies en estudio (MMA 2006, Peña 2023).

La propuesta de cultivo *in vitro* se fundamenta en su potencial para la conservación genética y la creación de bancos de germoplasma, esenciales para la restauración de estas especies en peligro. Este enfoque no solo protege a *Copiapoa*, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones, aportando al entendimiento y conservación de la biodiversidad única de Chile.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un protocolo de cultivo *in vitro* optimizado para la germinación y propagación de dos especies de *Copiapoa*: *C. megarhiza* y *C. coquimbana* .

Objetivos específicos

- Evaluar ensayos de germinación *in vitro* utilizando un diseño aleatorio y diferentes tratamientos de desinfección, para medir el porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación, índice de germinación en ambas especies y porcentaje de contaminación.
- Evaluar el porcentaje de supervivencia de las plántulas para determinar la viabilidad del protocolo de cultivo *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Se utilizaron semillas recolectadas en terreno de 9 sitios de recolección de *Copiapoa megarhiza* y 7 sitios de recolección de *Copiapoa coquimbana* (Tabla 1) (Figura 9, Figura 10). Las semillas fueron sometidas a siembras *in vitro* de manera aleatoria para cada especie. Se realizaron pruebas de germinación para ambas especies y se llevaron a cabo ensayos de germinación en cuadruplicado durante un periodo de 8 semanas para la producción de plántulas.

A partir de las plántulas germinadas, se obtuvieron brotes que fueron utilizados previamente en el proceso de micropropagación del material vegetal para el estudio en medio de cultivo alimentado con reguladores de crecimiento, donde se observó crecimiento de la planta como de raíces, para comparar el crecimiento característico de raíz pivotante junto con un cuello de unión a la planta en *C. megarhiza* y la raíz pivotante corta de *C. coquimbana*.

<i>C. megarhiza</i>	<i>C. coquimbana</i>
CM1	CC1
CM2	CC2
CM3	CC3
CM4	CC4
CM5	CC5
CM6	CC6
CM7	CC7
CM8	-
CM9	-

Tabla 1. Sitios de recolección de semillas de *Copiapoa megarhiza* y *Copiapoa coquimbana* utilizados

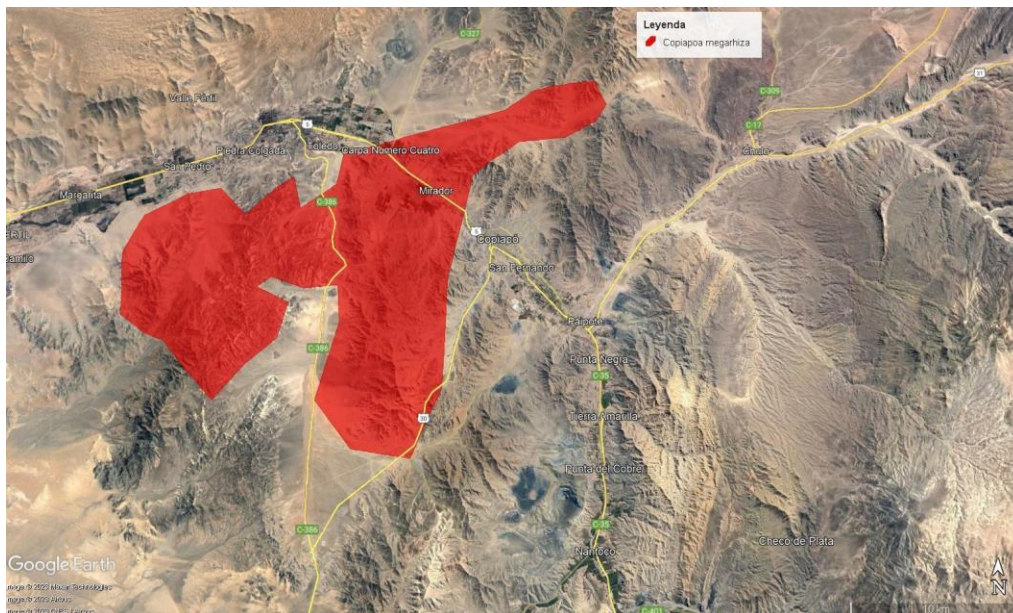


FIGURA 9. Zona de recolección de semillas para *Copiapoa megarhiza*.

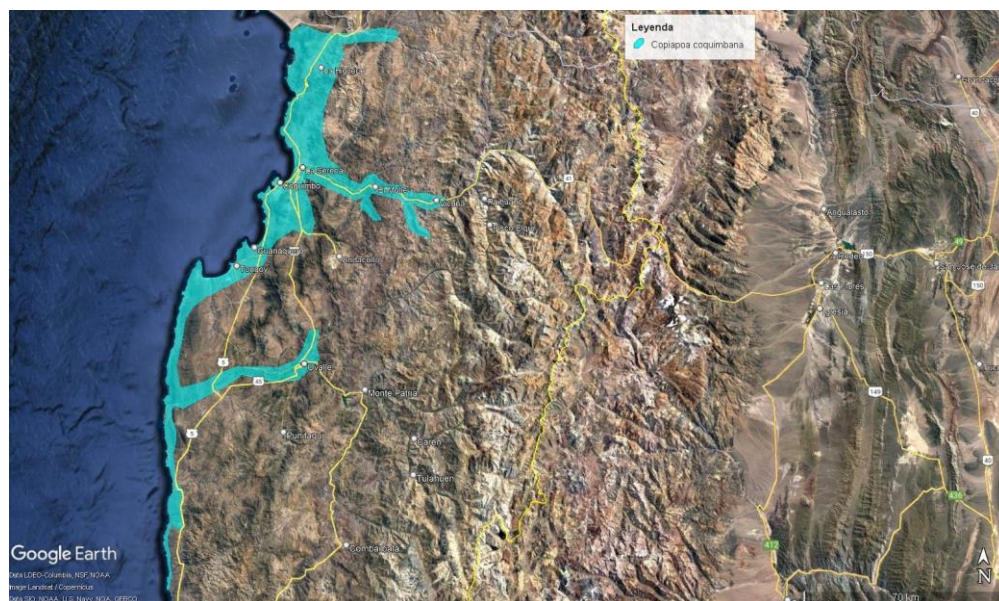


FIGURA 10. Zona de recolección de semillas para *Copiapoa coquimbana*

3.2. Ensayo de germinación.

Se asignaron al azar semillas de cada especie de sus zonas de recolección (*C. megarrhiza* y *C. coquimbana*) en el Laboratorio de Bioquímica y Biotecnología de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Cada tratamiento constó de la siembra de semillas en condiciones de asepsia bajo una cámara de flujo laminar horizontal (Esco® AHC-2A1). Se utilizaron 4 placas Petri por tratamiento, considerando cada una de ellas como una réplica. En cada placa se sembraron 8 semillas, lo que resultó en un total de 35 semillas por tratamiento. Las semillas germinaron durante un periodo de 20 días bajo condiciones controladas de temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperiodo de 16/8 horas y una intensidad lumínica de $28\text{-}45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se realizaron diferentes tratamientos de desinfección de semillas. El primer tratamiento consistió en sumergir en una solución de fungicida (Captan 100 gr Anasac) disuelto en agua destilada durante 20 minutos con agitación continua. Luego, las semillas fueron desinfectadas con etanol al 70% durante un minuto con agitación continua, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos con agitación continua, todo en vortex. Finalmente, las semillas se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, durante un minuto cada vez, se secaron con papel absorbente esterilizado. Fueron llevadas a cabo en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El segundo tratamiento fue el control, que siguió los mismos pasos que el tratamiento anterior, pero sin la adición de fungicida.

Los medios de cultivo utilizados para la siembra de semillas *in vitro* consistieron en el medio basal MS (Murashige & Skoog, 1967). Este medio se complementó con sacarosa al 3% ajustando el pH a 5,7, y se añadió agar al 0.8%. Antes de su utilización, el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave (Huxley® HL-340) a 121°C y 1 atm durante 20 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, se homogeneizó mediante agitación manual y se dispensaron 20 ml de medio en cada placa Petri. Las placas fueron selladas con Parafilm y se etiquetaron con las fechas correspondientes.

En este ensayo se determinaron el porcentaje de germinación, el tiempo medio de germinación, el índice de germinación y el porcentaje de contaminación para ambas especies.

Estos índices de germinación se calcularán en base a:

- El porcentaje de germinación fue obtenido a partir del cálculo (Caroca et al. 2016):

$$PG (\%) = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ de semillas sembradas}} \right) \times 100$$

- El tiempo medio de germinación fue calculado a partir (Tompsett & Pritchard, 1998):

$$MGT = \frac{(\Sigma \text{ de días de germinación de todas las semillas})}{N^{\circ} \text{ total de semillas germinadas}}$$

- El índice de germinación fue calculado a partir (Walter et al. 2006):

$$GI = \left(\frac{N^{\circ} \text{ total de semillas germinadas}}{N^{\circ} \text{ total de semillas sembradas}} \right) \times 100$$

3.3. Producción de plantas *in vitro*

Con base en los mejores resultados de germinación *in vitro* obtenidos mediante el tratamiento de desinfección con fungicida, se realizaron siembras de semillas de los 9 sitios de recolección de *C. megarhiza* y los 7 p *C. coquimbana*. Para lograr la germinación total, se sembraron 3 semillas por frasco y se mantuvieron durante un periodo de 30 días. Se analizó el porcentaje de germinación, el tiempo medio de germinación, el índice de germinación para cada especie para medir la eficacia de la germinación en ambas especies. Los ensayos se generaron en cuadruplicado para cada punto de las zonas de recolección.

A partir de las plántulas germinadas, se llevó a cabo la propagación del material vegetal durante periodos de 4 semanas en un medio de cultivo complementado con hormonas de crecimiento. El medio de cultivo utilizado fue el medio basal MS (Murashige y Skoog 1967), complementado con las hormonas reguladoras de crecimiento KIN (Kinetina) 1 mg/L y AIA (ácido-indolacético) a 0,1 mg/L. Como fuente de carbono se le adicionó sacarosa al 3% complementado con agar al 0.8% con un pH al 5,7%. Antes de su utilización, el medio de cultivo fue esterilizado en autoclave (Huxley® HL-340) a 121 °C

y 1 atm durante 20 minutos, y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego, se homogeneizó mediante agitación manual y se dispensaron 30 ml de medio en cada frasco de vidrio. Todos los frascos fueron sellados con papel celofán transparente para mantener las condiciones de esterilidad.

Después de un periodo de 6 meses desde la siembra, se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plantas para determinar su viabilidad y eficacia del protocolo de cultivo *in vitro*.

3.4. Análisis estadístico

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos y el control para el ensayo de germinación se evaluaron mediante ANOVA de una vía y aplicando test a posteriori de HSD Tukey, usando el software STADISTICA (v12.0) con un nivel de significancia de $p \leq 0,05$. Los gráficos fueron realizados utilizando el promedio DS con el programa SigmaPlot (v12.0). Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0,05$)

4. RESULTADOS

4.1. ENSAYO DE GERMINACIÓN

4.1.1. Porcentaje de germinación (PG)

Fue calculado para los tratamientos con previa desinfección fungicida y control sin fungicida para ambas especies (Figura 11). Las semillas alcanzaron un 100% de germinación total entre los 15 y 20 días (Figura 12), mientras que las semillas sin previo tratamiento de desinfección sin fungicida fueron contaminadas en su totalidad o sin respuesta a germinación.



FIGURA 11 . Desarrollo y germinación total de las especies en estudio a los 20 días. a) Germinación de *C. megarhiza*. b) Germinación de *C. coquimbana*., bar= 0.5 cm.

En la Figura 12 se puede observar que para los tratamientos con captan utilizados en su etapa de desinfección presentan un 100% de germinación total a los 20 días de tratamiento para ambas especies de cactáceas en comparación a los tratamientos en los que no se les fue aplicado el fungicida en su proceso de desinfección, demostrando que si hay diferencia significativa en los tratamientos.

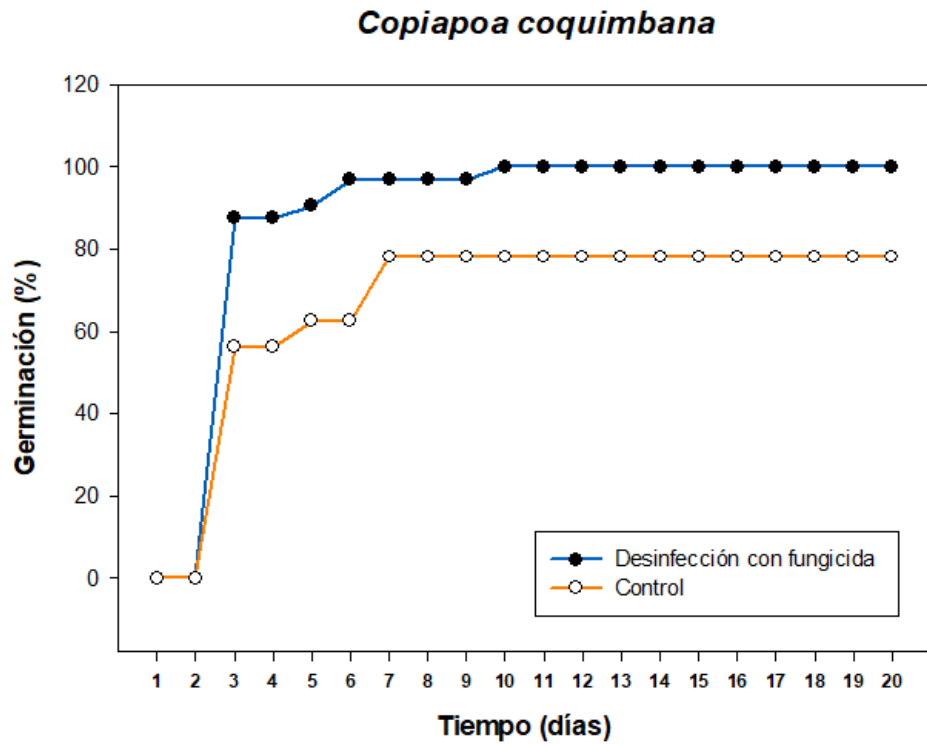
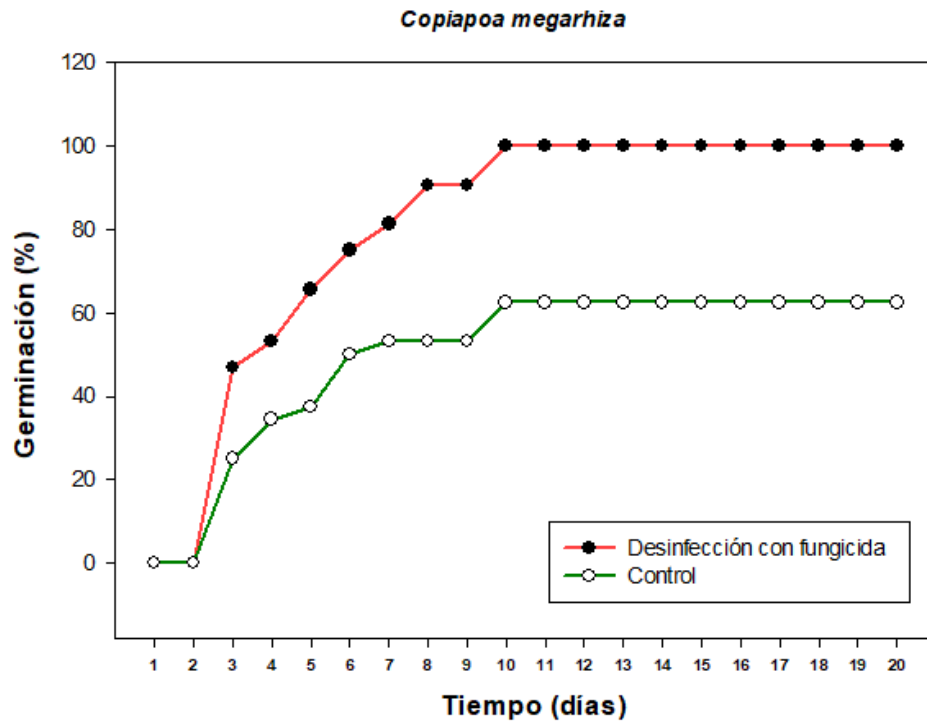


FIGURA 12. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 20 días para *C. coquimbana* y *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.1.2. Tiempo medio de germinación (MGT)

El tiempo medio de germinación para *C. megarhiza* con fungicida en su proceso de desinfección y para el control fue de 5 días y para *C. coquimbana* con fungicida en su proceso de desinfección y para el control fue 4 días, habiendo diferencias significativas en MGT entre especies, pero no tratamientos (Figura 13).

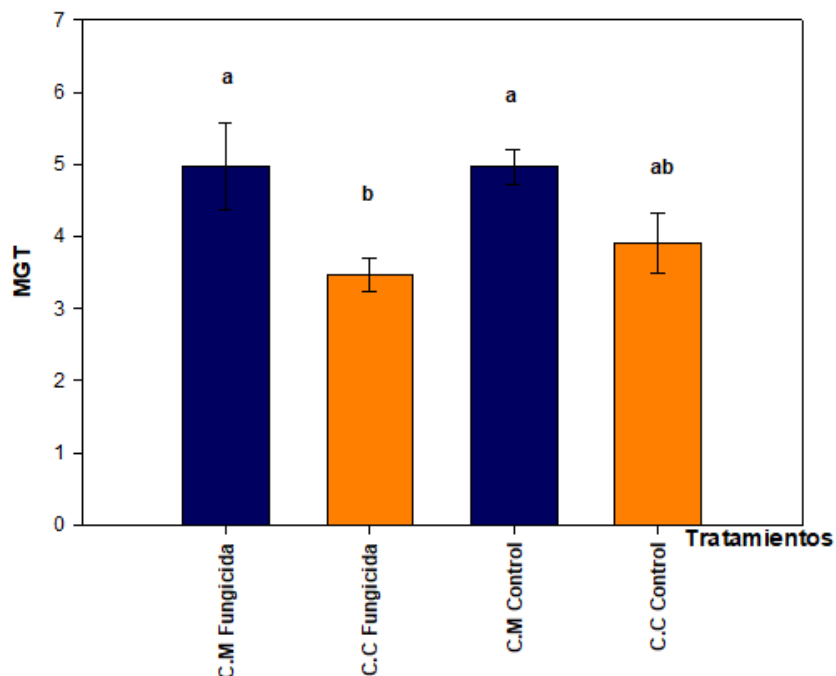


FIGURA 13 . Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 20 días para *C. coquimbana* y *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Test utilizado HSD Tukey; existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0,05$).

4.1.3. Índice de germinación (GI)

A partir de este parámetro se evaluó el éxito de la germinación de las semillas para los tratamientos en las especies evaluadas. Los resultados arrojaron diferencias significativas para ambas especies en los dos tratamientos llevados a cabo (Figura 14), pero para *C. coquimbana* tuvo un mayor índice de germinación de 2,49 en la germinación que utilizó captan en su proceso de desinfección y sin captan fue de 1,77. Para *C. megarhiza* con la utilización de captan fue de 1,94, teniendo un índice mayor que sin la utilización de capitán que fue de 1,18.

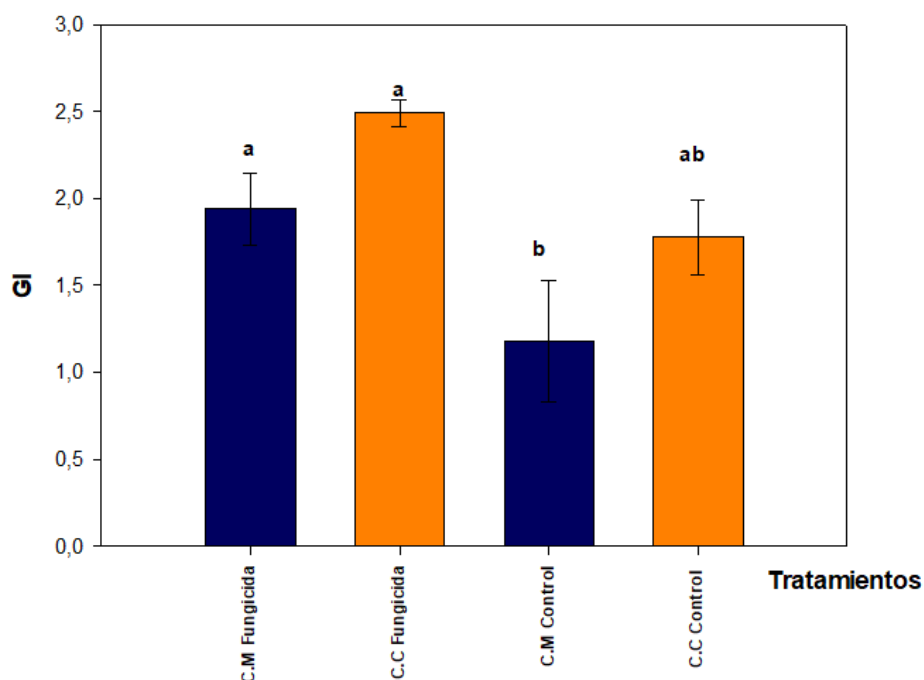


FIGURA 14. Índice de germinación evaluado en un periodo de 20 días para *C. coquimbana* y *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100 Test HSD de Tukey, las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

4.1.4. Porcentaje de contaminación

El porcentaje de contaminación en las semillas indicó la proporción de semillas que presentan un tipo de contaminación, como microorganismos, y se calculó tanto para el tratamiento con fungicida como el control (Figura 14).

$$\text{Contaminación (\%)} = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de semillas contaminadas}}{N^{\circ} \text{ total de semillas analizadas}} \right) \times 100$$

Los mejores resultados fueron evaluados para el tratamiento que tuvo menor porcentaje de contaminación, y los peores resultados los que tuvieron mayor porcentaje de contaminación (Figura 15). Para los tratamientos con captan *C. megarhiza* tuvo una respuesta de 34% y para *C. coquimbana* un 0%, mientras que para los tratamientos controles fue para *C. megarhiza* de 72% de contaminación y para *C. coquimbana* fue de 4% (Figura 16).

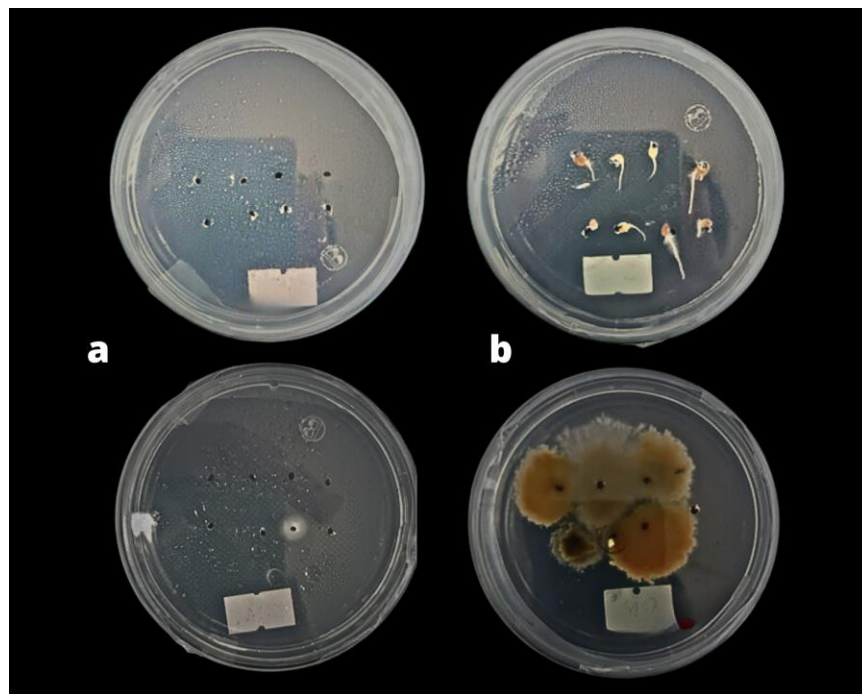


FIGURA 15. Placas que muestran el porcentaje de contaminación en semillas para los tratamientos con fungicida en su proceso de desinfección y para los controles para ambas especies: a) *C. coquimbana* b) *C. megarhiza*.

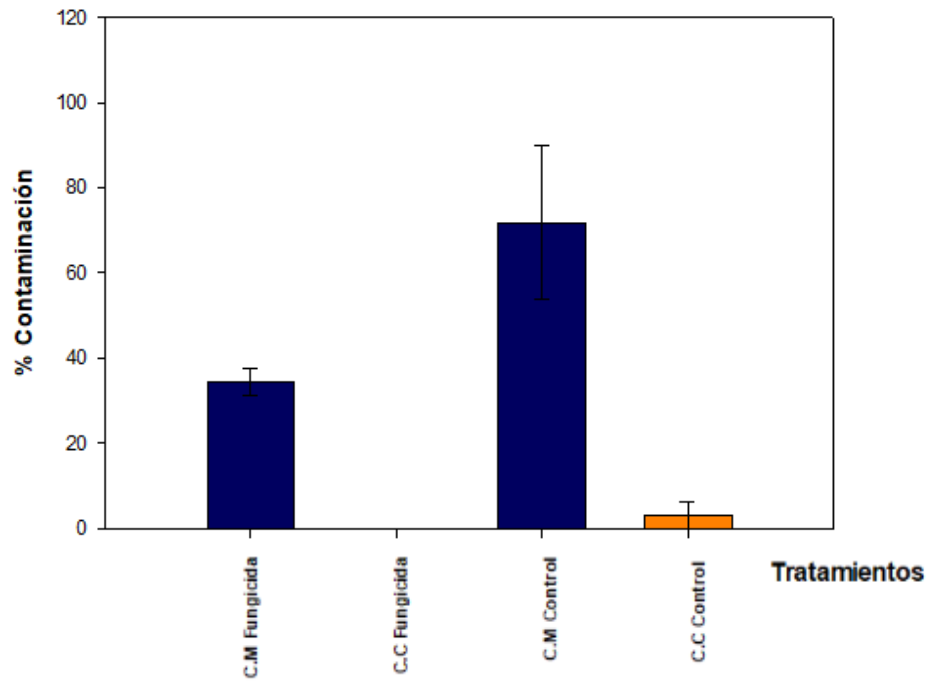


FIGURA 16. Porcentaje de contaminación evaluado en un periodo de 20 días para *C. coquimbana* y *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida y sin captan. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%. Test de Tukey, nivel de diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

4.2. PRODUCCIÓN DE PLANTAS *IN VITRO*

Copiapoa megarhiza

4.2.1. Porcentaje de germinación (PG)

Para el establecimiento del siguiente tratamiento para la producción de plantas, luego de la germinación de semillas y su periodo de tiempo de 8 semanas de estudio, se obtuvo el porcentaje de germinación para todas las semillas de *C. megarhiza*, obteniendo diversos resultados (Figura 17). Se registró un porcentaje de germinación total de un 45,37% del total de 108 semillas sembradas, lo que fue demostrado con una curva de germinación total. (Figura 18).

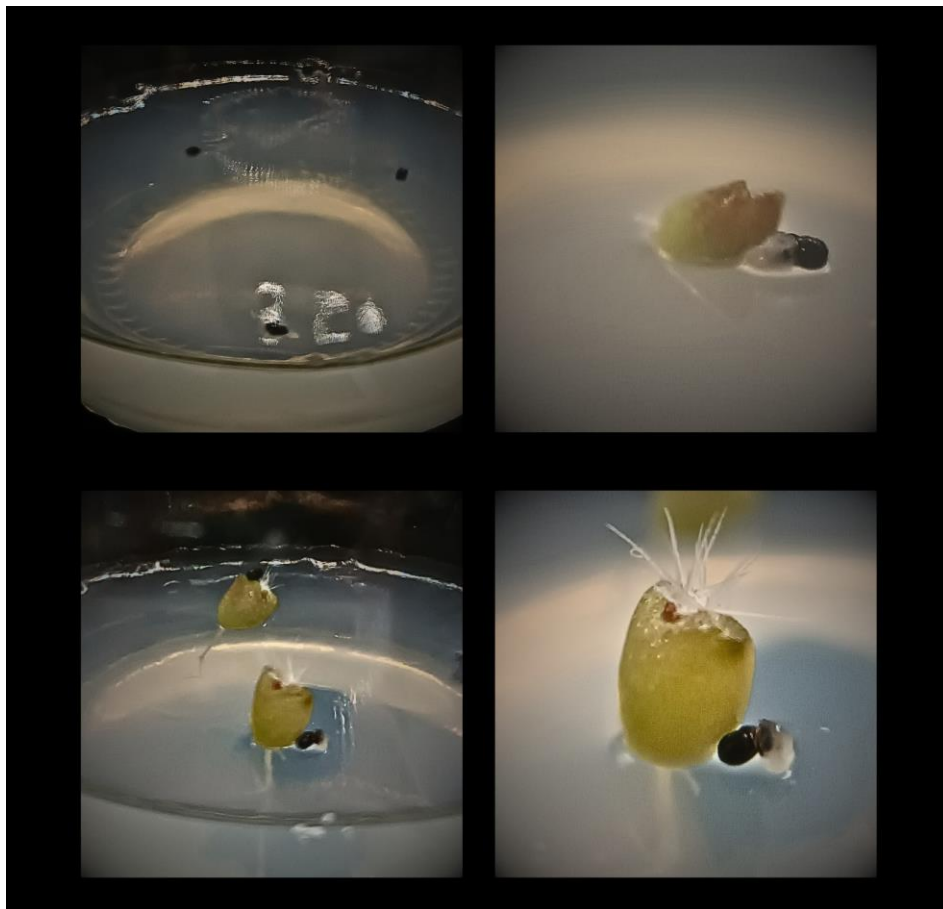


FIGURA 17. Desarrollo y germinación total luego de 8 semanas de la especie *C. megarhiza*.

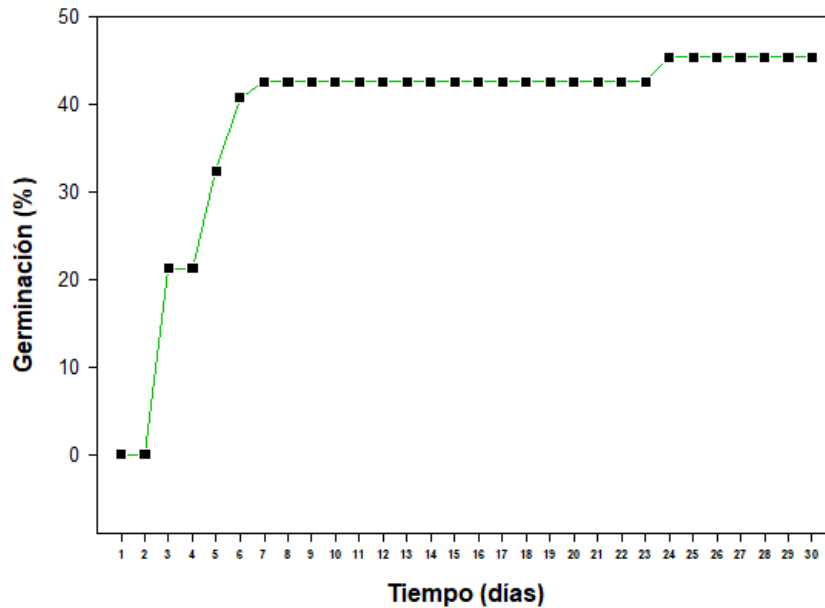


FIGURA 18. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%.

4.2.2. Tiempo medio de germinación (MGT)

El tiempo medio de germinación fue evaluado durante las 8 semanas en las que se llevó a cabo el ensayo (Figura 19). Para lo que fue analizado por los puntos de localización de la especie para tener un promedio estándar del tiempo, dando diferentes respuestas, estableciendo que no hubo un tiempo medio de germinación estándar para todas las semillas ya que CM1 fue de 9 días, CM2 de 2 días, CM3 de 3 días, CM4 de 5 días, CM7 de 2 días y CM8 de 5 días, observándose distintas respuestas, excepto para las semillas de los puntos CM5, CM6 y CM9 donde no hubo respuesta germinativa.

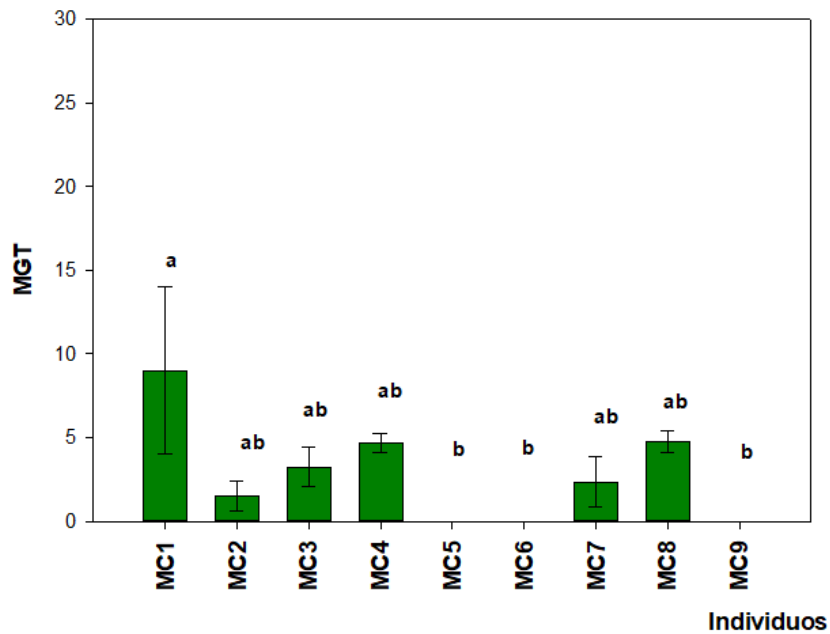


FIGURA 19. Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en días. Nivel de significancia ($p \leq 0,05$).

4.2.3. Índice de germinación (GI)

Los resultados para el índice de germinación de las semillas luego de las 8 semanas fueron analizados con los distintos puntos de la zona de recolección de la especie para la obtención de resultados (Figura 20). Todos los índices de germinación estuvieron cercanos al valor 1, a excepción de aquellos que no tuvieron respuesta germinativa.

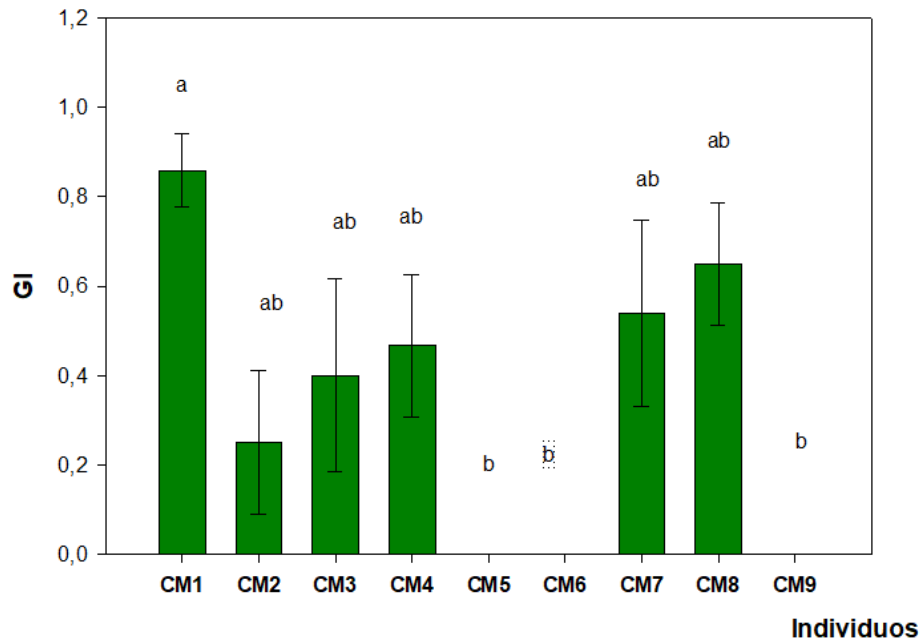


FIGURA 20. Índice de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. megarhiza* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en valores de 0 a 1. Test de Tukey, las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las líneas indican errores estándar. Las barras indican errores estándar.

4.2.4. Porcentaje de supervivencia

El porcentaje de supervivencia fue calculado a partir de las semillas germinadas durante las 8 semanas, para su posterior crecimiento por un periodo de 6 meses de propagación en medio de cultivo con reguladores de crecimiento. Fue calculado para a partir de los puntos de recolección de la especie, y presentaron respuesta germinativa a las 8 semanas (Figura 21). El porcentaje de germinación para CM1 fue de 100%, para CM8 fue de 92%, el CM7 fue 89%, para CM4 de 75% siendo los mejores resultados de supervivencia, y para CM3 fue de 66% y CM2 de 50%, teniendo respuestas favorables para todos los que tuvieron respuestas germinativas, desarrollando plantas con raíces.

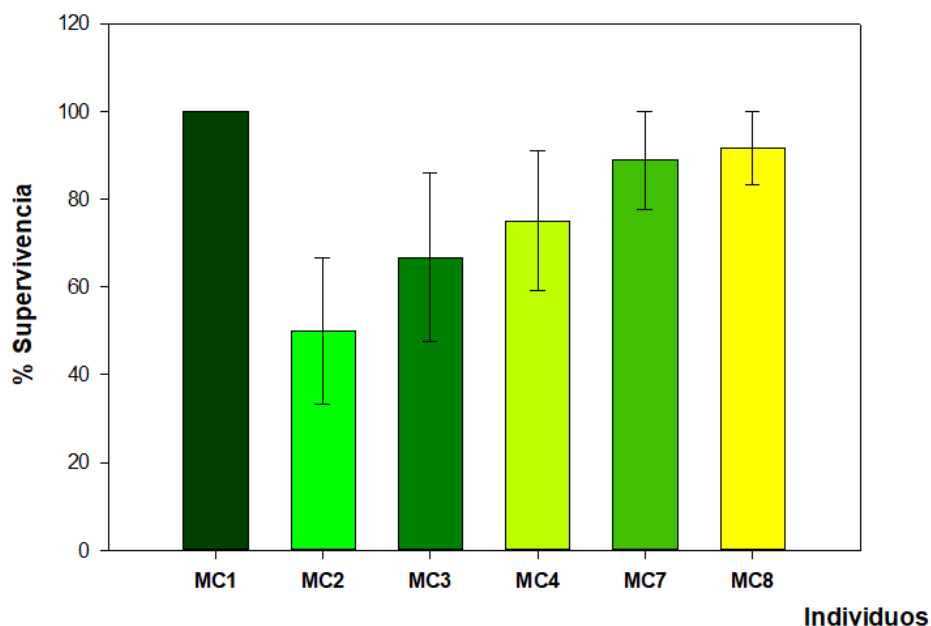


FIGURA 21. Porcentaje de supervivencia para *C. megarhiza* en un periodo de 6 meses propagadas en medio de cultivo con reguladores de crecimiento; plantas desarrolladas a partir de las plantas que tuvieron respuesta germinativa luego de las 8 semanas. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

Copiapoa coquimbana

4.2.5. Porcentaje de germinación (PG)

Para el establecimiento del siguiente ensayo para la producción de plantas, luego de la germinación de semillas y su periodo de tiempo de 8 semanas de estudio, se obtuvo el porcentaje de germinación para todas las semillas de *C. coquimbana*, obteniendo un 38,09% de germinación de un total de 84 semillas sembradas en los primeros 30 días, que permanecieron constante. Los resultados fueron representados mediante la figura 22.

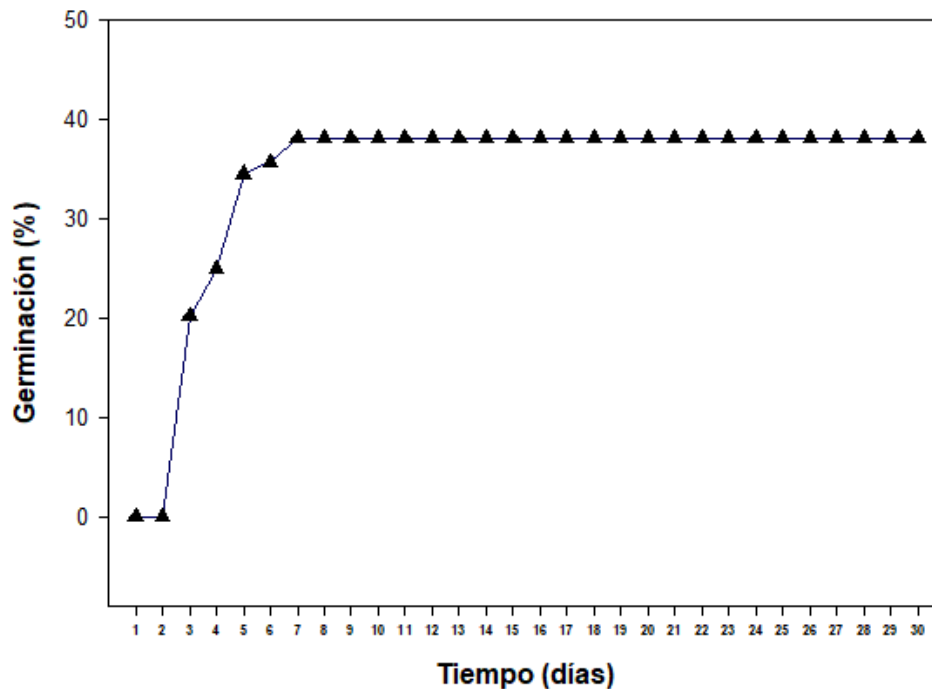


FIGURA 22. Porcentaje de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. coquimbana* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en porcentaje del 1 al 100%.

4.2.6. Tiempo medio de germinación (MGT)

El tiempo medio de germinación fue evaluado durante las 8 semanas en las que se llevó a cabo el ensayo (Figura 23). Lo que fue analizado por los puntos de localización de la especie, para tener un promedio estándar del tiempo, dando diferentes respuestas, estableciendo que no hubo un tiempo medio de germinación estándar para todas las semillas ya que el CC1 fue de 4 días, para el CC3 y CC5 de 3 días, para el CC6 de 5 días, mientras que para el CC7 fue de 1. Para los CC2 y CCC4 no hubo tiempo medio de germinación al no tener respuesta germinativa.

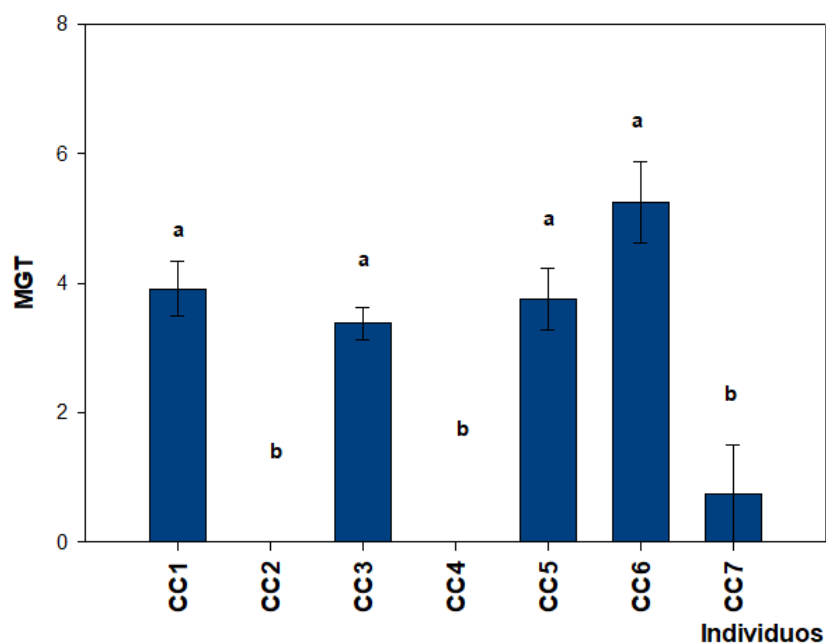


FIGURA 23. Tiempo medio de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. coquimbana* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en días. Diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

4.2.7. Índice de germinación (GI)

Los resultados para el índice de germinación de las semillas luego de las 8 semanas fueron analizados con los distintos puntos de la zona de recolección de la especie para la obtención de resultados (Figura 24). Los índices de germinación variaron en valores entre 1 a 2, a excepción de aquellos que no tuvieron respuesta germinativa.

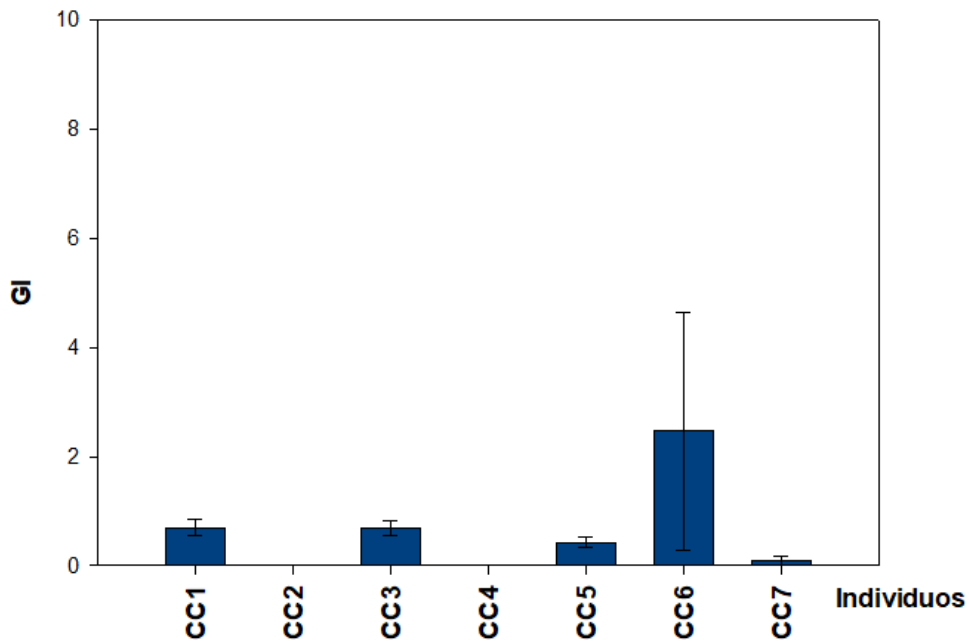


FIGURA 24. Índice de germinación evaluado en un periodo de 8 semanas para *C. coquimbana* con tratamiento de desinfección utilizando captan como fungicida. Los valores fueron expresados en valores de 0 a 2. Test de Tukey, diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

4.2.8. Porcentaje de supervivencia

El porcentaje de supervivencia fue calculado a partir de las semillas germinadas durante las 8 semanas, para su posterior crecimiento por un periodo de 6 meses de propagación en medio de cultivo con reguladores de crecimiento. Fue calculado a partir de los puntos de recolección de la especie, y presentaron respuesta germinativa a las 8 semanas (Figura 25). El porcentaje de supervivencia para el CC1 fue de 83%, para el CC3 fue de 75%, para el CC5 y CC6 de 50% y para el CC7 de 33%, lo que indicó respuestas favorables y posteriormente tuvieron desarrollo de plantas con raíces.

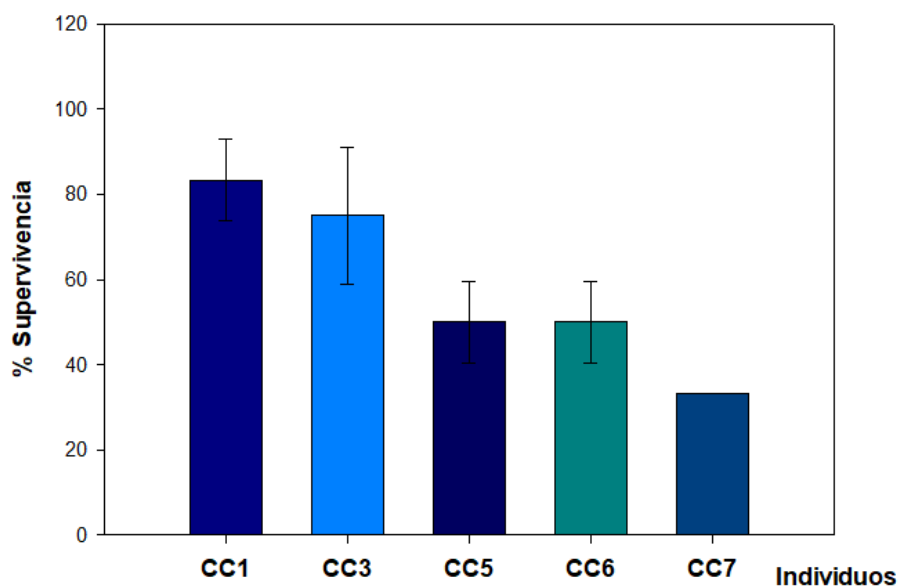


FIGURA 25. Porcentaje de supervivencia para *C. coquimbana* en un periodo de 6 meses propagadas en medio de cultivo con reguladores de crecimiento; plantas desarrolladas a partir de las plantas que tuvieron respuesta germinativa luego de las 8 semanas. Test de Tukey, diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Las barras indican errores estándar.

4.2.9. Porcentaje de supervivencia total de las especies

De un total de 108 semillas (9 sitios de recolección) semillas sembradas de *C. megarhiza*, un total de 49 semillas dieron respuesta germinativa total, produciendo plántulas con raíces pivotantes con cuello de unión a la planta, correspondiendo a un 45,37% del total sembrado (Figura 26). Para *C. coquimbana*, de un total de 84 (7 muestras de sitios) semillas sembradas, 32 semillas presentaron germinación total con posterior desarrollo de plantas y raíces pivotantes cortas, correspondiendo a un 38,10% del total sembrado. Esto demostró una similitud de desarrollo con las plantas que crecen en su zona de origen (Figura 27).

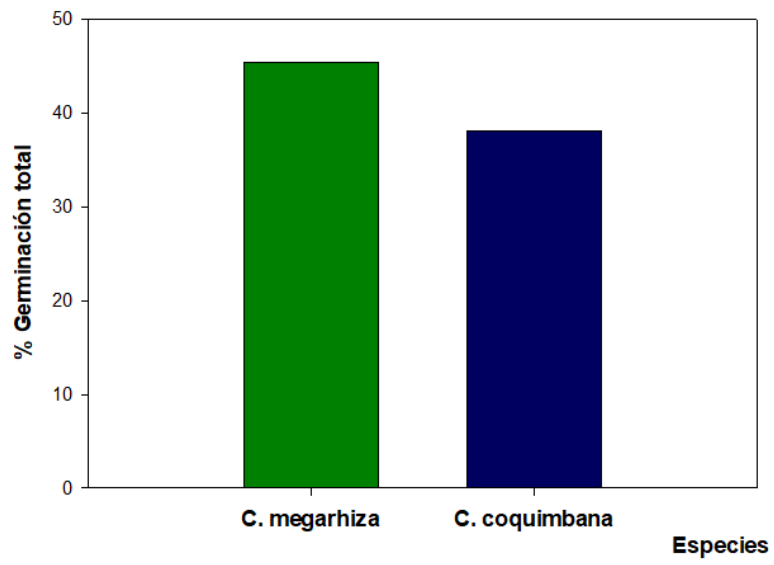
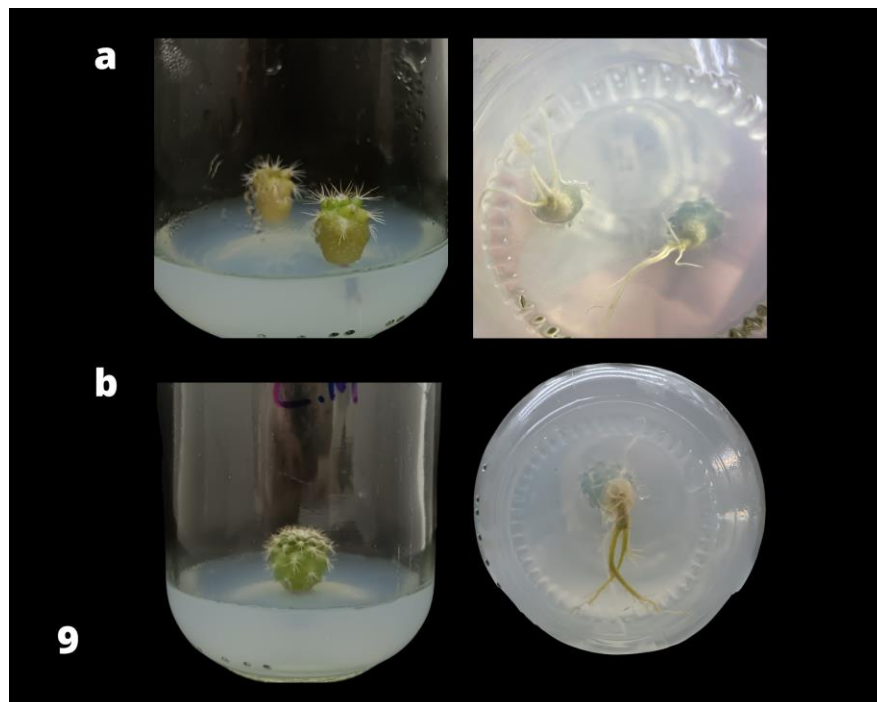


FIGURA 26. Análisis comparativo en porcentaje total de las especies germinadas totalmente que desarrollaron plántulas de las especies *C. megarhiza* y *C. coquimbana*



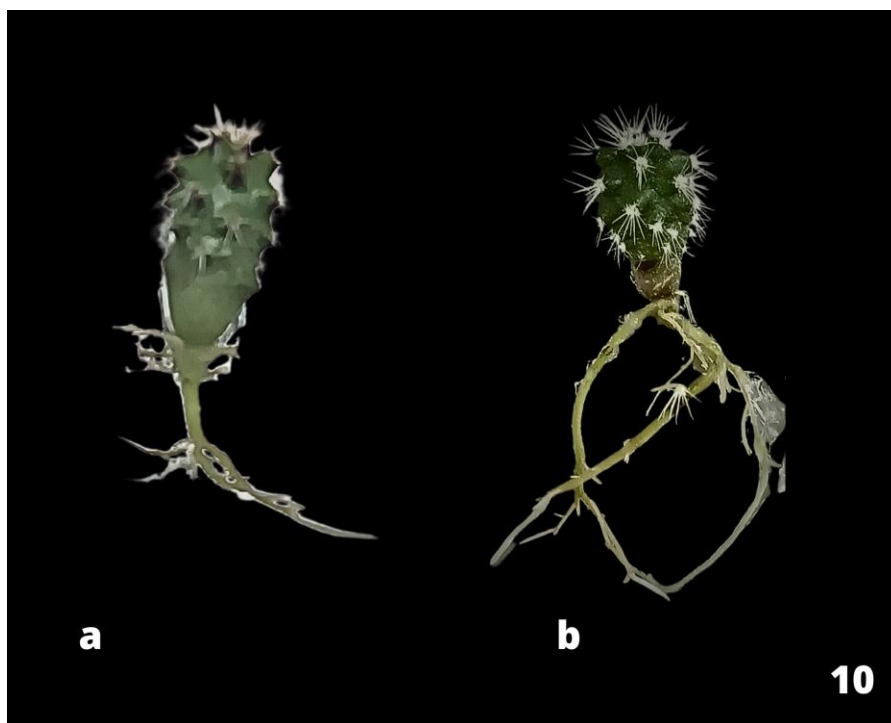


FIGURA 27. Desarrollo de planta y raíces luego de 6 meses en medio de cultivo con reguladores de crecimiento para *C. coquimbana* y *C. megarhiza*. 9: a) Cultivo *in vitro* de *C. coquimbana* b) Cultivo *in vitro* *C. megarhiza*. 10): a) Desarrollo radicular y vegetal de *C. coquimbana in vitro* b) Desarrollo radicular y vegetal de *C. megarhiza in vitro*

5. DISCUSIÓN

El estudio de especies, como las presentadas en este estudio, *C. megarhiza* y *C. coquimbana*, adquiere una importancia significativa debido a las diversas problemáticas que afectan su desarrollo en sus hábitats de origen. Como se mencionó, estas especies integrantes de la familia Cactaceae enfrentan desafíos en su conservación, especialmente cuando son especies endémicas que están expuestas a la reducción de su población debido a diversos factores, como interferencia antropogénica, destrucción, degradación y deterioro de la biodiversidad, expansión de la agricultura, recolección como recursos biológicos, y desarrollo residencial y comercial, las que son solo algunas de las amenazas (Lynch et al. 2020; Goettsch et al. 2015).

Al ser especies endémicas de Chile que enfrentan disminución de sus poblaciones, existe la responsabilidad de preservar su patrimonio natural para garantizar la conservación de estas cactáceas que se encuentran dentro de categorías como vulnerable o en peligro de extinción (Hoffmann y Walker 2004). La pérdida de hábitat y la degradación de los ecosistemas han llevado a una reducción preocupante de sus poblaciones (MMA 2006; MMA 2023), lo que aumenta la importancia de realizar investigaciones que permitan restaurar su población, y establecer estrategias de conservación efectivas y acciones de manejo sostenible que contribuyan a la preservación de estas y su biodiversidad única ante un contexto nacional en constante cambio y desarrollo.

Generar nuevas técnicas para un resguardo del material genético, es de gran importancia para especies de carácter endémico y con reducción en sus poblaciones, por lo que el estudio de un protocolo para generar material *in vitro* y garantizar muestras vegetales que presenten características similares a las especies en su entorno natural y sitios de origen.

Los resultados de este estudio muestran que el protocolo generado obtuvo respuestas favorables para la germinación y posterior producción de plantas *in vitro* para las especies estudiadas:

5.1. Ensayo de germinación

El proceso de desinfección fue crucial para la germinación de ambas especies, usando fungicida, concentración de hipoclorito de sodio y etanol, con un lavado, y fue crucial en la generación de plantas *in vitro*, especialmente en el caso de especies en peligro como de extinción como las cactáceas estudiadas, ya que preservar las plantas madre en su hábitat natural es de suma importancia (Lema-Rumińska et al. 2014). Esto se puede discutir a partir de que la cubierta de la semilla de cactáceas confiere una mayor resistencia a altas concentraciones y duraciones de agentes de esterilización en comparación con las partes verdes de las plantas (Da Costa et al. 2001), lo que ha llevado al uso de diversos agentes desinfectantes para mejorar la germinación *in vitro*. En cactáceas, se ha empleado ampliamente el hipoclorito de sodio, aunque su eficiencia es baja si no se combina con otros agentes desinfectantes, como el etanol, lo que ha demostrado ser más efectivo para neutralizar la contaminación (Estrada-Luna et al. 2008; Bhau and Wakhlu 2015; Pérez-Molphe-Balch et al. 2015). También se han utilizado soluciones biocidas que contienen fungicidas, como captan a 3 mg/L, para lograr una eficiencia de esterilización cercana al 90% en la desinfección de la superficie de las semillas (Astello-García et al. 2013), lo que demuestra la eficacia de los resultados en la prueba de germinación. Respecto a las concentraciones de hipoclorito y etanol, se han obtenido buenos resultados al desinfectar las semillas de cactus con etanol al 70% durante 1 minuto y soluciones de hipoclorito de sodio cercanas al 1% (Castro et al. 2011).

En el caso de las condiciones *in vitro*, la humedad en el recipiente de cultivo favorece a algunas especies de semillas que naturalmente tienen una baja tasa de germinación o germinan de forma retardadas, antecedentes expuestos resaltan que las semillas de Copiapoa tienen una germinación *ex situ* más lenta o poco exitosa en comparación con

los resultados obtenidos en el presente estudio, donde las especies *Copiapoa megarhiza* y *Copiapoa coquimbana* alcanzaron un porcentaje de germinación del 100% a los 20 días del ensayo.

Es importante mencionar que las semillas utilizadas para la micropropagación deben germinar a temperaturas típicas de cultivo *in vitro* de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Bouzroud et al. 2022). Además, en este estudio se demostró que la germinación puede ocurrir incluso sin agregar reguladores de crecimiento al medio de cultivo, solo con la adición de fuentes de carbono como sacarosa y agentes gelificantes como el agar, lo que presenta ventajas al evitar la estimulación de contaminación endófitas no deseada y sus efectos negativos en la regeneración y enraizamiento temprano de las plántulas generadas (Vidican et al. 2011).

5.2. Producción de plantas *in vitro*

Los resultados presentados indican que la generación de plantas a través de técnicas de cultivo *in vitro* fue exitosa para ambas especies. Esto puede atribuirse a que la micropropagación es un proceso realizado bajo condiciones asépticas y que utiliza pequeñas porciones de una planta y ha sido demostrado a través de diversos estudios en el cual se han obtenido plantas a producción de gran escala para diversas variedades y especies comerciales, y utilizada como una herramienta para la conservación de especies en peligro de extinción (Lema-Rumińska et al. 2013; Lema-Rumińska et al. 2014; Hughes 2017; Jesús et al. 2019; Bouzroud et al. 2022).

Se obtuvieron plantas *in vitro* sanas y con características morfológicas como las especies de origen, esto se pudo haber debido a la composición del medio de cultivo, que incluyó reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, pH ajustado y agar jugó un papel importante en la generación de plantas *in vitro*. Es esencial encontrar el equilibrio adecuado de reguladores de crecimiento, ya que un exceso puede ser perjudicial y

provocar deformaciones morfológicas y retraso en el enraizamiento (Quiala et al. 2009; Arellano-Perusquía et al. 2013; Lema-Rumińska et al. 2014). El aumento en la longitud de los brotes *in vitro* observado en este estudio se atribuye a la presencia de auxinas, que estimulan la división y elongación natural de las células, este estímulo también puede lograrse mediante la combinación de altas cantidades de citoquininas y cantidades moderadas de auxinas (La Ojl and Pe 2020); los brotes generados mediante micropropagación crecen más rápidamente en comparación con las plantas propagadas tradicionalmente en invernaderos, lo cual es de particular importancia para taxones de crecimiento lento (Lema-Rumińska y Kulus 2014) ya que en condiciones naturales, el crecimiento del tallo de algunas especies de cactus puede tardar de 2 a 3 años en invernaderos y más de 4 años en la naturaleza (Santos-Díaz et al. 2003). Sin embargo, bajo condiciones *in vitro* controladas como las que se mantuvieron en este estudio en la que se incluyen humedad, contenido de sacarosa y reguladores de crecimiento adecuados, el desarrollo de las plántulas de cactáceas puede ser varias veces más rápido que en condiciones *ex vitro* (Balén et al. 2009; Hua et al. 2015). Esto fue verificado en el presente estudio, donde las especies estudiadas lograron desarrollar sistemas radiculares y crecimiento en un periodo de solo 6 meses.

Se obtuvieron plantas *in vitro* saludables y con características morfológicas similares a las especies de origen. Estos resultados pueden atribuirse a la composición adecuada del medio de cultivo Murashige and Skoog, que es el más utilizado en cactáceas para cultivo *in vitro*, junto con reguladores de crecimiento, fuente de carbono como la sacarosa, pH ajustado y agar, lo que desempeñó un papel crucial en la generación exitosa de las plantas *in vitro*. Es importante destacar que encontrar el equilibrio adecuado de reguladores de crecimiento es esencial, ya que un exceso de estos puede provocar deformaciones morfológicas y retrasar el enraizamiento (Lema-Rumińska et al. 2013; Lema-Rumińska et al. 2014; Hughes 2017; Jesús et al. 2019; Bouzroud et al. 2022).

El incremento en la longitud de los brotes *in vitro* observado en este estudio se debe a la presencia de auxinas, que estimulan la división y elongación natural de las células. Este

estímulo también puede lograrse mediante la combinación de altas cantidades de citoquininas y cantidades moderadas de auxinas (La Oji and Pe 2020) como fue utilizado en este estudio.

Se obtuvieron plantas *in vitro* saludables y con características morfológicas similares a las especies de origen. Estos resultados se atribuyen a la composición adecuada del medio de cultivo, que incluyó reguladores de crecimiento, una fuente de carbono, pH ajustado y agar, lo cual desempeñó un papel crucial en la generación exitosa de las plantas *in vitro*. Es importante destacar que encontrar el equilibrio adecuado de reguladores de crecimiento es esencial, ya que un exceso de estos puede provocar deformaciones morfológicas y retrasar el enraizamiento (Quiala et al. 2009; Arellano-Perusquía et al. 2013; Lema-Rumińska et al. 2014).

Los brotes generados tuvieron un crecimiento positivo bajo condiciones *in vitro* controladas como las utilizadas en este estudio junto con el desarrollo de sistemas radiculares, esto debido a que las cactáceas crecen más rápidamente bajo estas condiciones y puede ser varias veces más rápido que en condiciones *ex vitro* (Balén et al. 2009; Hua et al. 2015) como las tradicionalmente propagadas en invernaderos, lo cual es especialmente relevante para taxones de crecimiento lento (Lema-Rumińska y Kulus 2014) ya que en condiciones naturales, el crecimiento del tallo de algunas especies de cactus puede tomar de 2 a 3 años en invernaderos y más de 4 años en la naturaleza (Santos-Díaz et al. 2003), permitiendo tener plantas durante todo el año, siendo especialmente relevante para plantas con requisitos específicos (Lema-Rumińska y Kulus 2014), como las cactáceas de este estudio, que presentan diferentes zonas geográficas con distintos niveles de disponibilidad de agua y temperatura, por lo que la técnica de micropropagación permite superar las limitaciones asociadas con el clima y las estaciones, lo que facilita la propagación y conservación de especies en condiciones controladas.

6. CONCLUSIONES

- Los ensayos de germinación *in vitro* utilizando diferentes tratamientos de desinfección demostraron la importancia de la desinfección en la germinación exitosa de las semillas. El tratamiento con fungicida (Captan 100 gr Anasac) demostró resultados significativamente superiores en cuanto a porcentaje de germinación, tiempo medio de germinación e índice de germinación en comparación con el tratamiento sin fungicida en el proceso de germinación.
- Los resultados obtenidos en la tasa de germinación de ambas especies demostraron que las semillas tratadas con el fungicida alcanzaron una tasa de germinación del 100% en un periodo de 20 días. Por otro lado, las semillas que no fueron desinfectadas con el fungicida mostraron alta contaminación o falta de respuesta germinativa. Además, se observó que las semillas tratadas con el fungicida tuvieron un tiempo medio de germinación más corto, lo que indica una germinación más rápida en comparación con las semillas no tratadas. El índice de germinación también fue significativamente mayor en las semillas tratadas con el fungicida, lo que indica la eficacia del tratamiento para el éxito de la germinación. Por último, el porcentaje de contaminación en las semillas fue menor cuando se aplicó el fungicida durante el proceso de desinfección, lo que confirma la efectividad de este tratamiento en la reducción de la contaminación.
- El establecimiento exitoso de las plantas germinadas *in vitro* de las semillas de los puntos de recolección de *C. megarhiza* y *C. coquimbana* en medio de cultivo complementado con hormonas de crecimiento fue evidenciado por el porcentaje de supervivencia alcanzado en un periodo de 6 meses. Los individuos que tuvieron respuesta germinativa presentaron porcentajes exitosos de supervivencia, lo que puede demostrar una viabilidad del protocolo de cultivo *in vitro* con la formación de plántulas y raíces.

Estos resultados proporcionan una base para estudios a futuro en estas especies y aplicaciones en la propagación y conservación de estas especies de cactus, para lo cual se pueden añadir estudios posteriores de citología para estudios de viabilidad genética en las plantas producidas mediante este protocolo, o protocolos en base al diseñado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla N, El-Ramady H, Seliem MK, El-Mahrouk ME, Taha N, Bayoumi Y, Shalaby TA, Dobránszki J (2022) An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. *Horticulturae* 8:677.
- Almond R, Grooten M, Petersen T (Eds) WWF, Gland, Switzerland.
- Antonelli A, Smith RJ, Simmonds MSJ (2019) Unlocking the properties of plants and fungi for sustainable development. *Nat Plants* 5:1100–1102.
- Ardisana E, Pérez S, Moreira R, Mille B (2017) Perspectivas futuras e impacto social de las biotecnologías vegetales. *Alternativas* 17:44.
- Arellano-Perusquía A, López-Peralta MCG, Chablé-Moreno F, Estrada-Luna (2013) A EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON THE ORGANOGENESIS AND MULTIPLICATION OF ORTEGOCACTUS MACDOUGALLII ALEXANDER.
- Astello-García M, Robles-Martínez M, Barba-de la Rosa A, Santos-Díaz M (2013) Establishment of callus from *Opuntia robusta* Wendl., a wild and medicinal cactus, for phenolic compounds production. *Afr. J. Biotechnol.* 12, 3204–3207.
- Balen B, Tkalec M, Pavoković D, Pevalek-Kozlina B, Krsnik-Rasol M (2009) Growth Conditions in *In Vitro* Culture Can Induce Oxidative Stress in *Mammillaria gracilis* Tissues. *J Plant Growth Regul* 28:36–45.
- Bhau BS, Wakhlu AK (2015) A highly efficient *in vitro* propagation protocol for elephant tusk cactus: *Coryphantha elephantidens* (Lem.) Lem. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13:215–219.
- Bhojwani SS, Dantu PK (2013a) *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer, Nueva Delhi 245–274.

- Black M, Bewley J, Halmer P (2006). The encyclopedia of seeds-science, technology and uses. Cromwell Press, Trowbridge, UK. 828.
- Bouzroud S, El Maaiden E, Sobeh M, Devkota KP, Boukcim H, Kouisni L, El Kharrassi Y (2022) Micropropagation of Opuntia and Other Cacti Species Through Axillary Shoot Proliferation: A Comprehensive Review. *Front Plant Sci* 13:926653.
- Cardoso JC, Sheng Gerald LT, Teixeira Da Silva JA (2018) Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant Cell Culture Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp 17–46.
- Caroca R, Zapata N, Vargas M (2016) EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA GERMINACIÓN DE CUATRO GENOTIPOS DE MANÍ (*Arachis hypogaea* L.). *Chil j agric anim sci* 32:94–101.
- Castro J, Araújo E, Rêgo M, Rêgo R (2011) *In vitro* germination and disinfestation of sweet cactus (*Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dyck). *Acta Sci. Agron.* 33, 509–512.
- Civatti LM, Marchi MNG, Schnadelbach AS, Bellintani MC (2017) *In vitro* multiplication and genetic stability of two species of *Micranthocereus* Backeb. (Cactaceae) endemic to Bahia, Brazil. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131:537–545.
- Conaf (2023) Parques. Parque Nacional Pan de Azúcar. En: Conaf.cl. Consultado el 19 de junio de 2023.
- Das A, Varma A, Pandey R, Chaudhury R (2017) Ex Situ Conservation Strategies in Litchi Germplasm. In: Kumar M, Kumar V, Prasad R, Varma A (eds) *The Lychee Biotechnology*. Springer Singapore, Singapore, pp 381–3.
- Donoso M (2022) Diagnóstico del estado nacional de la conservación *ex situ* de semillas en Chile y estudio de caso: Colección de semillas del jardín botánico chagual (Order No. 29155588). Available from ProQuest One Academic. (2689297683).

- Ellis RH (2007) The encyclopaedia of seeds: science, technology and uses. *Annals of Botany* 100:1379–1379.
- Estrada-Luna AA, Martínez-Hernández JDJ, Torres-Torres ME, Chablé-Moreno F (2008) *In vitro* micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm–Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. *Scientia Horticulturae* 117:378–385.
- Goettsch B, Hilton-Taylor C, Cruz-Piñón G, Duffy JP, Frances A et al (2015) High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants* 1:15142.
- Hoffmann A, Walter H (2004) *Cactáceas en la flora silvestre de Chile*. Fundación Claudio Gay .
- Hua Q, Chen P, Liu W, Ma Y, Liang R, Wang L, Wang Z, Hu G, Qin Y (2015) A protocol for rapid *in vitro* propagation of genetically diverse pitaya. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 120:741–745.
- Hughes FM (2017) Spatial pattern and cover effect on the abundance of a currently obliterated population of *Melocactus violaceus*: a threatened species in Brazilian sandy coastal plain. *Braz J Bot* 40:915–922.
- Js AC, Mg CP, Rm SM Importancia de los cultivos vegetales Invitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación.
- Korotkova N, Aquino D, Arias S, Eggli U, Franck A, Gómez-Hinostrosa C, Guerrero PC, Hernández HM, Kohlbecker A, Köhler M, Luther K, Majure LC, Müller A, Metzging D, Nyffeler R, Sánchez D, Schlumpberger B, Berendsohn WG (2021) Cactaceae at Caryophyllales.org – a dynamic online species-level taxonomic backbone for the family. *Willdenowia* 51.
- La Ojl R, Pe R-P (2020) Micropropagation of selected materials of *Opuntia ficus indica* L through culture *in vitro* of areols. *JABB* 7:121–126.

- Lázaro-Castellanos JO, Mata-Rosas M, González D, et al (2018) *In vitro* propagation of endangered Mammillaria genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *Vitr Cell Dev Biol - Plant* 54:518–529.
- Le Roux JJ, Hui C, Castillo ML, Iriondo JM, Keet J-H, Khapugin AA, Médail F, Rejmánek M, Theron G, Yannelli FA, Hirsch H (2019) Recent Anthropogenic Plant Extinctions Differ in Biodiversity Hotspots and Coldspots. *Current Biology* 29:2912-2918.
- Lema-Rumińska J, Goncerzewicz K, Gabriel M (2013) Influence of Abscisic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *mostruosa*. *The Scientific World Journal* 2013:1–7.
- Lema-Rumińska J, Kulus D (2014) Micropropagation of cacti—a review. *Haseltonia* 19:46–63.
- León-Lobos P, Barra-Bucarel L, Ortega-Klose F (2018) Gestión para la conservación de la biodiversidad. Conservación ex situ. Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos. Santiago de Chile: Ministerio del Medio Ambiente. Ed 3: 224–232.
- Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (2018) An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) *Plant Cell Culture Protocols*. Springer New York, New York, NY, pp 3–13.
- Lynch KE, Blumstein DT (2020) Effective Conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 35:857–860.
- Martínez-Harms, MJ, Wilson, KA, Costa, MDP, et al. Planificación de la conservación para las personas y la naturaleza en un hotspot chileno de biodiversidad. *Gente Nat.* 2021; 3: 686 – 699.
- Ministerio del Medio Ambiente (2006) Clasificación según estado de conservación. Listado de especies y fichas finales 6º proceso RCE.

- Ministerio del Medio Ambiente (2016) Ministerio de Medio Ambiente – GEF/UNEP. Diagnóstico y Caracterización de las Iniciativas de Conservación Privada en Chile. Proyecto. "Creación de un Sistema Nacional Integral de áreas Protegidas para Chile: Estructura Financiera y Operacional". 174.
- Ministerio del Medio Ambiente (2023) Clasificación según estado de conservación. Listado y fichas de especies que serán clasificadas.
- Ministerio del Medio Ambiente (MMA) (2017) Estrategia Nacional de Biodiversidad 2017-2030. Disponible en: https://mma.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Estrategia_Nac_Biodiv_2017_30.pdf.
- Mittermeier RA, Turner WR, Larsen FW, Brooks TM, Gascon C (2011) Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: Zachos FE, Habel JC (eds) Biodiversity Hotspots. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 3–22.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Myers N, Mittermeier R, Mittermeier C. et al. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853–858.
- Pañitru C, Navarro J, Ibacache E, Sandoval A (2020) Germinación de especies nativas de Chile *Eriosyce aurata* (Pteiff.) (Sandillon) INIA Intihuasi. Ficha técnica 87.
- Pañitru-De la F (2022) Preservando la Flora Chilena: Colección de germoplasma de especies nativas en el Banco Base de Semillas de INIA. Boletín INIA N° 460. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena, Chile. 352.
- Peres S (2016) Saving the gene pool for the future: Seed banks as archives. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 55:96–104.

- Pérez-Molphe-Balch E, Santos-Díaz MDS, Ramírez-Malagón R, Ochoa-Alejo N (2015) Tissue culture of ornamental cacti. *Sci agric (Piracicaba, Braz)* 72:540–561.
- Petit I, Campoy A, Hevia M, Gaymer C, Squeo F (2018) Protected areas in Chile: are we managing them? *Rev Chil de Hist Nat* 91:1.
- Pillet M, Goettsch B, Merow C, et al (2022) Elevated extinction risk of cacti under climate change. *Nat Plants* 8:366–372.
- Quiala E, Matos J, Montalvo G, de Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez N, Barbón R, Kowalski B (2009) *In Vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus
- Salazar E., León-Lobos P, Rosas M, Muñoz C (2006) Estado de la conservación *ex situ* de los recursos fitogenéticos cultivados y silvestres en Chile. Santiago, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA Nº 156: 180.
- Santos-Díaz M, Méndez-Ontiveros R, Arredondo-Gómez A, Santos-Díaz M (2003) *In vitro* organogenesis of *Pelecypora aselliformis* erhenberg (cactaceae). *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 39:480-484.
- Schulz R (2006) . Copiapoa 2006. Printed by Everbest Printing Co Ltd. China. 239.
- Squeo FA, Estévez RA, Stoll A, Gaymer CF, Letelier L, Sierralta L (2012) Towards the creation of an integrated system of protected areas in Chile: achievements and challenges. *Plant Ecology & Diversity* 5:233–243.
- Tompsett P, Pritchard H (1998) The effect of chilling and moisture status on the germination, desiccation tolerance and longevity of *Aesculus hippocastanus* L. seed. *Annals of Botany* 82: 249-261.
- Torres-Silva G, Schnadelbach AS, Bezerra HB, Lima-Brito A, Resende SV (2021) *In vitro* conservation and genetic diversity of threatened species of *Melocactus* (Cactaceae). *Biodivers Conserv* 30:1067–1080.

- UICN. (2012). Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN 34.
- Vidican I ,Urdea O (2011) Study on the regenerative capacity and organogenesis of *Aylostera heliosa* (Speg.) explants, in the presence of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in culture medium. *Analele Universitatii din Oradea - Fascicula Protectia Mediului* 17: 305–312.
- Villalobos A, Peña C, Varas-Myrik A, Goettsch B et al (2023) Impulsores antropogénicos y abióticos del aumento del riesgo de extinción de *Copiapoa* (Cactacea). Tesis de Magister. Universidad de Concepción, Concepción.
- Walter I, Martínez F, Cala V (2006) Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. *Environmental Pollution* 139:507–514.
- Walters C, Pence VC (2021) The unique role of seed banking and cryobiotechnologies in plant conservation. *Plants People Planet* 3:83–91.
- WWF (2020) Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss.
- Zoghlami N, Bouamama B, Khammassi M, Ghorbel A (2012) Genetic stability of long-term micropropagated *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Plantlets as assessed by molecular tools: Perspectives for *in vitro* conservation. *Ind Crops Prod* 36:59.