

MONOGRAFÍA RESULTADOS FINALES

Proyecto “Selección Genotípica y Desarrollo Industrial de Extractos de Quillay” Fondef D03I1012

Autores:

Juan Velozo
John Alarcón
Pablo Honeyman
Benjamín Castro
Rodrigo Aguilar
Javier Sainz

IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO

CÓDIGO DEL PROYECTO	D03I1012
TÍTULO DEL PROYECTO	Selección Genotípica y Desarrollo Industrial de Extractos de Quillay.
AÑO DE ADJUDICACIÓN	2004
DURACIÓN	4 años
ÁREA PRIORITARIA	Forestal
ÁREAS SECUNDARIAS	Manufactura
MONTOS TOTALES	472.756.000
MONTOS FONDEF ASIGNADOS	150.000.000
DIRECTOR	Juan Velozo Soto
DIRECCIÓN	Camino La Pirámide 5750, Huechuraba, Santiago
TELÉFONO	56-2-3281415
CORREO ELECTRÓNICO	juan.velozo@umayor.cl
INSTITUCIÓN PRINCIPAL	Universidad Mayor, Escuela de Ingeniería Forestal
EMPRESA ASOCIADA	Natural Response S.A.

I. PRESENTACIÓN

El proyecto “Selección Genotípica y Desarrollo Industrial de Extractos de Quillay” es una iniciativa que nace como respuesta a una necesidad de la empresa Natural Response S.A., institución dedicada a la producción de extractos naturales provenientes del quillay (*Quillaja saponaria mol.*). El desafío planteado por la empresa fue mejorar el rendimiento productivo de los extractos de quillay, optimizando, por una parte, el proceso industrial en planta, y por otra, el abastecimiento y calidad de la materia prima.

En este contexto, nace la asociación con la Universidad Mayor, entidad académica que por medio de su Escuela de Ingeniería Forestal se ha dedicado a la investigación y desarrollo de los ecosistemas Mediterráneos o Esclerófilos.

En conjunto, ambas instituciones plantearon un proyecto a FONDEF Conicyt, que proponía como principales objetivos:

1. Desarrollar extractos comerciales de Quillay con altos estándares de calidad, a partir de la purificación de los componentes y la selección de la materia prima.
2. Seleccionar genotipos de Quillay en función de los requerimientos industriales para la producción de extractos, mediante la evaluación de la diferenciación genecológica de la especie.

Para el cumplimiento del primer objetivo fue necesario caracterizar en detalle los componentes químicos de los extractos industriales del quillay y montar técnicas simples para la caracterización de la materia prima. Con estos nuevos conocimientos, fue posible mejorar y optimizar el proceso productivo y la purificación de los componentes activos y así desarrollar productos específicos para la penetración en nuevos mercados.

Para cumplir el segundo objetivo, se realizó una evaluación de la diferenciación genecológica del quillay en Chile, muestreando individuos a lo largo de toda la distribución de la especie, entre la IV y la IX Región. Esta evaluación permitió preseleccionar un grupo de individuos en función de su rendimiento industrial, los que fueron clonados y usados en ensayos de terreno. Paralelamente, se hizo un estudio de la diversidad genética que presenta esta colección representativa del germoplasma de quillay, utilizando la técnica de análisis genético denominada AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Estos estudios permitieron describir el desempeño de los genotipos preseleccionados, sentar bases respecto a la incidencia genética y ambiental en la producción de los extractos del quillay, y además, seleccionar individuos para la implementación de un huerto semillero clonal. El producto tecnológico servirá para dar comienzo al desarrollo del mejoramiento genético de la especie y los futuros cultivos intensivos de ésta.

En los siguientes capítulos de este documento se detallan los principales resultados del proyecto, así como sus desafíos y proyecciones.

II. EL QUILLAY COMO ESPECIE EMBLEMÁTICA DEL BOSQUE NATIVO MEDITERRÁNEO

El quillay es un árbol endémico de Chile, que crece en una amplia distribución, formando parte de bosques y matorrales de la zona Mediterránea. Es posible encontrar al quillay creciendo en quebradas y laderas de los áridos suelos de la IV Región, bajo nieve a 2.500 metros sobre el nivel del mar en la cordillera central, o en arenales volcánicos del sur de la VIII Región. Su plasticidad fenotípica y capacidad de adaptación fisiológica le permite desarrollarse en variados ambientes y en asociación con diversas especies arbóreas y arbustivas.

Foto 1

Población de quillay en Canela IV Región

Foto 2

Población de quillay en suelos arenosos de la VIII Región

Por otra parte, el quillay es probablemente la especie forestal nativa con mayor valor productivo en la zona central, debido a la presencia de saponinas abundantes en su

biomasa. Estos compuestos naturales son muy diversos estructuralmente y tienen un alto valor comercial debido a las múltiples aplicaciones industriales en que pueden ser usados. La alta resistencia a las sequías prolongadas, su rápido crecimiento y alto porcentaje de establecimiento en plantaciones, han transformado al quillay en la especie arbórea nativa más utilizada en forestaciones, reforestaciones, obras de recuperación de suelos, restauraciones, entre otros. Además, el quillay es un árbol melífero muy valorado en la incipiente apicultura nacional.

Sin embargo, todas estas características han generado una presión histórica sobre la especie y los ecosistemas en los cuales se desarrolla de forma natural, existiendo actualmente un importante estado de degradación en ellos.

Es en este contexto donde la especie se proyecta como un árbol emblemático para la zona central de Chile, integrándose como pilar en las siguientes líneas de desarrollo:

- *Preservación y Conservación de Ecosistemas Mediterráneos*: Este proceso es una deuda y compromiso pendiente del sector forestal y de toda la sociedad. Declarados como un Hot-Spot, estos ecosistemas deben estar mejor representados en el SNASPE o en parques de carácter privado. Pero no basta solo con proteger y evitar los factores de alteración, también se debe apoyar la recuperación y restauración de estos ambientes degradados, y es ahí donde el quillay juega un rol principal como insumo para plantaciones.
- *Manejo productivo sustentable de Bosques y Matorrales Mediterráneos*: La aprobación e inminente entrada en vigencia de la nueva ley de Bosque Nativo, permitirá a miles de propietarios de la zona central, poner en producción sustentable sus recursos nativos. Apoyados por los incentivos del estado, estos propietarios podrán comenzar a producir de manera permanente y sostenida productos madereros y no madereros, abriendo y formalizando nuevos mercados. Nuevamente el quillay es una especie clave para este proceso, dado que a partir de ella se generan dos de los principales productos provenientes de estos ecosistemas: la biomasa para extracción de saponinas (maderero) y las flores para apicultura (no maderero).
- *Cultivos intensivos de quillay*: Una forma de disminuir la presión sobre los ecosistemas naturales por parte de los sectores industriales, y además de mejorar los procesos productivos, es sin duda la generación de cultivos. En este escenario, el quillay aparece como una interesante especie para formar monocultivos o plantaciones destinadas a la industria de la saponina., utilizando suelos áridos y semiáridos que actualmente no tienen usos productivos y que están en procesos de erosión y desertificación.

Estas tres líneas de desarrollo requieren esfuerzos importantes en investigación y asociatividad técnica entre todos los sectores involucrados, las empresas, los propietarios, el sector público (CONAF) y el sector académico, con experiencias como la desarrollada en este proyecto.

III. RESULTADOS DEL PROYECTO

3.1 Resultados Industriales

Avances en la mejora de Procesos

Para este proceso, se montaron técnicas de análisis de polifenoles, polisacáridos y proteínas para caracterizar los diferentes extractos y las materias primas, lográndose dilucidar un 80% de los componentes químicos de los extractos. El mejor conocimiento de éstos ha permitido elaborar productos de mayor estandarización y utilizar herramientas de proceso específicas para la purificación según la aplicación, como por ejemplo, un nuevo producto para espumante en cerveza. Estas nuevas técnicas implementadas aún tienen un potencial amplio en otras aplicaciones que no han sido exploradas.

Avances en Emulsificantes

El proyecto ha permitido tener una primera aproximación del uso de los extractos de quillay como estabilizadores de algunas emulsiones en aplicaciones alimenticias. Por ejemplo, utilizando extractos de quillay se logró estabilizar espumas por más de dos días a temperatura ambiente en sistemas polisacáridos, leche y agua. Este es un resultado muy auspicioso para extenderlo a algunos sistemas específicos donde se requieren estabilizar sistemas mixtos de emulsiones y espumas. Sin embargo, la aplicación todavía está en fase de desarrollo preliminar, y una proyección de esta área requiere de mayor inversión y relación de largo plazo con los clientes, con el objetivo de capitalizar los resultados auspiciosos observados.

Producto Espumante para Cerveza

Como resultado de producción del proyecto, se desarrolló un nuevo producto para la estabilización de espuma de cerveza, y como complemento, se implementaron las técnicas para hacer pruebas en los laboratorios de la empresa.

El producto desarrollado se puede adaptar con pequeños cambios a un amplio espectro de cerveza. Lo anterior se ha demostrado en pruebas exitosas de la aplicación, realizadas en importantes empresas del rubro en Chile, Europa, USA y Australia. En los dos últimos países ya se están realizando pruebas piloto y se espera una pronta introducción en este difícil mercado.

Estos resultados con el producto han permitido presentar una solicitud de patente sobre el uso de los extractos de quillay en la estabilización de espuma de cervezas, documento que está en proceso de evaluación.

Foto

Muestra de cerveza con aplicación de espumante

Los resultados del desarrollo industrial se potencian y complementan con los resultados de la selección genotípica, ya que su integración permitirá a futuro tener cultivos en base a genotipos mejorados en aspectos muy relevantes, tanto para la optimización del proceso industrial, como para la elaboración y desarrollo de aplicaciones específicas.

3.2 Resultados Selección de Quillay

Esta selección de carácter genotípica se realizó con los siguientes objetivos:

- Identificar y caracterizar poblaciones de quillay a lo largo de la distribución de la especie.
- Evaluar la existencia de ecotipos o razas de quillay en Chile.
- Evaluar la incidencia genética y ambiental en el contenido de extractos del quillay.
- Seleccionar individuos o genotipos plus que sean la base para el desarrollo de la mejora genética de la especie y para el desarrollo de cultivos industriales.

Para el logro de estos objetivos se realizaron diversas actividades y estudios, los que se resumen a continuación.

Muestreo de Quillay

Debido a la amplia distribución de la especie, entre la Región de Coquimbo y la Región de la Araucanía, se utilizaron tres niveles o escalas de trabajo para realizar el muestreo. Primero se definieron Macrozonas, es decir, grandes áreas delimitadas por factores fisiográficos y bioclimáticos. A partir del establecimiento de ocho Macrozonas para el área de estudio, se seleccionaron 33 poblaciones de quillay, que se transformaron en la segunda escala de trabajo. Esta elección se realizó en base a la cartografía del Catastro de Bosque Nativo, utilizando como criterios de selección de Poblaciones la importancia del quillay en la formación vegetal, el tamaño de la población, la accesibilidad y el posible aislamiento geográfico de otras poblaciones.

Figura

Mapa de Macrozonas y Poblaciones de quillay

Finalmente, la tercera escala de trabajo fue a nivel de individuo, seleccionando en terreno una muestra de 76 árboles provenientes de las 33 poblaciones a lo largo de toda la distribución. Estos individuos se seleccionaron en base a criterios productivos industriales, factibilidad de acceso para la toma de muestras, y las características fenotípicas. Estas últimas muy variadas y heterogéneas (ver figuras).

Figura

Diferencias fenotípicas en hojas de quillay

Figura

Diferencias fenotípicas en corteza de quillay

A cada individuo seleccionado se le referenció y caracterizó respecto a su fenotipo, crecimiento y entorno ambiental. Además, se tomaron de ellos muestras de madera para análisis de extractos en dos temporadas y se recolectó material vegetal para el proceso de propagación vegetativa.

Los resultados de los análisis de los extractos, más la evaluación del incremento en biomasa de los 76 individuos, permitieron hacer un ranking de los árboles. Éste se usó para hacer una preselección de 20 individuos, entre ellos los 13 primeros en la clasificación, cinco con características poco comunes, y los dos individuos con menor contenido de saponinas.

Análisis genético molecular

Este estudio se realizó mediante un convenio de investigación con INIA La Platina, y tuvo como objetivo identificar marcadores moleculares que permitieran caracterizar la diversidad genética del quillay en su gradiente de distribución y lograr hacer huella genética de individuos selectos. Para el estudio se utilizó la técnica de análisis genético denominada AFLP. Se consideró el análisis de 32 árboles, incluyendo en la muestra nueve árboles selectos y clones *in vitro*. Los amplicones polimórficos se analizaron con el programa PAUP, usando el algoritmo de agrupamiento UPGMA y el índice de similitud “Neighbor-Joining”. Se analizaron ocho combinaciones de partidores, de las cuales se eligieron cuatro que presentaban un patrón de bandeo interesante. En relación a los resultados, se pudo apreciar una gran cantidad de polimorfismos en las muestras analizadas, lo cual indica que existe una alta diversidad genética en el quillay.

El análisis de los polimorfismos mediante agrupamiento (índices de similaridad) permitió establecer que existen dos grupos genéticos principales, uno más estrechamente relacionado entre las 23 accesiones que lo integran, y otro, en el que se detectaron mayores diferencias genéticas entre sus integrantes. Algunas muestras no diferenciadas coincidieron con clones de material *in vitro*.

Este tipo de marcadores e información de polimorfismos servirán para hacer “fingerprinting” de los individuos selectos, y también para estudios de mapeo de ligamiento en poblaciones generadas de cruzamientos controlados, que ayuden a la identificación de genes relacionados a caracteres de interés productivo para identificar y diferenciar clones. Los resultados son un importante avance sobre el conocimiento de la especie y permitirán avanzar en investigaciones futuras tendientes al mejoramiento genético del quillay con fines productivos.

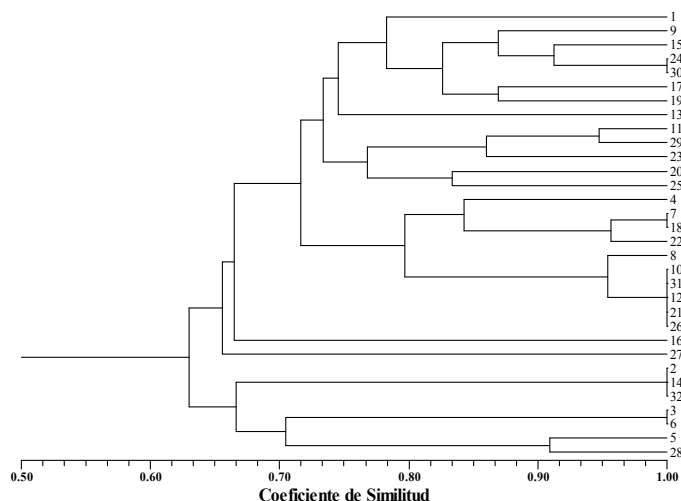


Figura. Dendrograma de grupos de genotipos de quillay identificados mediante AFLP.

Propagación vegetativa de quillay

Este proceso tuvo dos objetivos principales:

- Generar plantas (clones) de los individuos preseleccionados (18), para su utilización en los ensayos de terreno, en un huerto semillero clonal y para un banco genético de quillay.
- Evaluar la capacidad de propagación de los individuos para incorporar este factor en la selección final. La capacidad regenerativa de un genotipo es una variable altamente relevante desde el punto de su utilización para desarrollar cultivos.

El proyecto contempló realizar ensayos de propagación por estacas, y además un estudio micropropagación *in vitro* de material adulto, para todos los individuos que se seleccionaron para el estudio.

Foto

Micropropagación in vitro de quillay

Foto

Macropropagación en invernadero con estacas de quillay

Para el procedimiento de propagación por estacas, se colectaron ramas en terreno las que fueron trasladadas al invernadero para ser estaquilladas. Se diseñó un ensayo que sintetizaba experiencias anteriores, básicamente la aplicación de ácido indol butírico (AIB), el uso de estacas herbáceas y condiciones óptimas de invernadero. Los ensayos fueron insatisfactorios, observándose un bajo nivel de enraizamiento. El fenómeno se relacionó con el origen del material, la época de colecta y el tiempo de respuesta del material asociado a la edad del árbol. Debido a lo anterior, se decidió explorar la alternativa de la micro propagación.

Se realizaron ensayos de multiplicación *in vitro* mediante el uso de micro estacas con una a dos yemas. Se hicieron una serie de ensayos multifactoriales donde se

evaluaron dosis hormonales, medios de cultivo y tipos de material vegetal. Se lograron tratamientos hormonales muy satisfactorios en estimular la brotación axilar. No obstante, el tratamiento para inducir enraizamiento directo de las micro estacas no fue exitoso y lo anterior cambió drásticamente al usar brotes rejuvenecidos *in vitro*. De los resultados se destaca que *in vitro* es posible inducir la brotación de material adulto de quillay, pero con distintos niveles de eficiencia, lo que se relaciona con el origen del material vegetativo usado.

Así la multiplicación de material establecido *in vitro*, presenta una alta eficiencia y se constituye como una alternativa funcional para regenerar genotipos selectos de quillay. La etapa de enraizamiento *in vitro* es el período limitante, debido a que este material se observa muy susceptible a los niveles de auxinas. Lo es coincidente con todos los estudios realizados y su explicación sigue siendo una tarea pendiente. Los avances realizados en el establecimiento y multiplicación *in vitro* de material adulto de quillay representa un gran avance y posibilitará en el mediano plazo una metodología de micro propagación a escala industrial.

También fue posible definir los individuos de la muestra que tienen la mayor facilidad o disposición de reproducción vegetativa, siendo equivalente esta caracterización para la macro y micropropagación, lo que indica una posible incidencia genética para esta característica.

Ensayos en terreno

La actividad contempló el establecimiento de tres ensayos en terreno, donde se evaluó durante 1 año las plantas (clones) originadas con la propagación vegetativa de individuos preseleccionados de quillay.

El objetivo de estos ensayos fue evaluar el desempeño de los clones en diferentes sitios, buscando sacar las primeras conclusiones respecto al impacto que tiene la genética y el ambiente en el contenido de extractos saponínicos en quillay, y además complementar al análisis genético molecular, en la identificación de potenciales grupos o razas de quillay.

Para estos ensayos se seleccionaron 6 clones de diferentes orígenes (Regiones IV, V, RM, VI, VIII), y con diferentes rendimientos industriales (contenido de extractos e incremento en biomasa). Los 6 clones y sus repeticiones, fueron plantados en tres sitios, Codegua VI Región, Casablanca V Región, y Santiago RM.

Foto5

Ensayo en Casablanca

Foto 6

Ensayo en Codegua

Luego de un año de crecimiento, se evaluó el incremento en biomasa de cada clon, y el contenido de extractos de su madera y hojas. Estas mediciones permitieron comparar el desempeño de cada clon respecto a sí mismo y respecto

a los otros en los tres ensayos, y además, comparar su desempeño respecto a su árbol padre.

Los resultados validaron en parte lo visualizado en el análisis genético molecular, ya que el contenido de extractos se comportó relativamente homogéneo en todos los clones y en todos los ensayos, excepto los clones provenientes de las poblaciones de la misma Macrozona diferenciada genéticamente a nivel molecular.

Estos resultados permitieron concluir que efectivamente existen dos poblaciones de quillay con diferenciación genética y que además, esta diferenciación incide en la capacidad de las plantas para producir extractos saponínicos.

Finalmente, la combinación sitio/clon podría permitir identificar los mejores genotipos para sitios determinados, logrando sustantivos incrementos en extractos industriales y en crecimiento de biomasa.

Selección final

Una vez integrados todos los resultados antes descritos, se generó una tabla de datos para los 18 clones preseleccionados. A cada variable se le asignó un factor de importancia y se generó una ecuación simple para estimar un Valor de Selección (VS) y definir los mejores árboles.

$$V.S= (\text{Prom.Saponin.} \times 0.3) + ((1-\text{Coef.Var}) \times 0.15)) + (\text{Crec.bio} \times 0.25) + (\text{Ind. Propag} \times 0.3)$$

Donde:

Prom.Saponin: Es el promedio de contenido de extractos en las dos muestras realizadas a los árboles padres.

Coef.Var: Coeficiente de variación entre el contenido de extractos en las dos muestras realizadas a los árboles padres.

Crec.bio: Crecimiento en biomasa de los árboles padres

Ind. Propag: Índice de capacidad de propagación (valores entre 1-5)

Así, el resultado de la ecuación permitió definir para cada una de las dos poblaciones (posibles razas) definidas, los 4 mejores individuos, de acuerdo a la integración de todas las variables señaladas.

Los 8 individuos seleccionados serán utilizados para instalar un huerto semillero clonal destinado a la producción de semillas y plantas mejoradas de quillay; y además, para continuar la investigación y desarrollo de esta importante especie.

Foto 7

Planta de dos años seleccionada para huerto semillero

IV. PRINCIPALES PROYECCIONES DEL PROYECTO

El Proyecto “Selección Genotípica y Desarrollo Industrial de Extractos de Quillay” ha generado resultados que permiten tener expectativas positivas respecto al futuro del desarrollo del quillay en Chile, incluyendo el de la industria de los extractos, el de los propietarios rurales y el de los cultivos o plantaciones productivas de quillay.

En este contexto, la Universidad Mayor y Natural Response S.A. pretender mantener su relación de colaboración, y buscar instancias para darle continuidad al desarrollo logrado, potenciando los resultados y transfiriéndolos a los diferentes sectores productivos relacionados.

Una primera iniciativa será implementar un Proyecto de Transferencia Tecnológica (PTT), con el apoyo de CONICYT. Esta iniciativa busca generar una unidad o centro tecnológico destinado a la generación de plantas y semillas mejoradas de quillay, y a la investigación aplicada del cultivo de la especie con fines industriales a gran escala.