



INFORME FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

Abril 2014

OFICINA DE PARTES 2 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	10 ABR 2014
Hora	16
Nº Ingreso	12894

INFORME DE FINAL TÉCNICO Y DE DIFUSIÓN

EJECUTOR : SOCIEDAD AGRICOLA PEHUEN DE CURICO LTDA

NOMBRE DEL PROYECTO : UTILIZACION DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS PARA LA PRODUCCION CLONAL DE NOGALES

CODIGO : PYT-2009-0144

Nº INFORME : FINAL

PERIODO : desde 01/04/2009 hasta 31/03/2014

**NOMBRE Y FIRMA
COORDINADOR PROYECTO** : JOSE ALEJANDRO NAVARRO DIAZ

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	



I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código: PYT-2009-0144
- Nombre del Proyecto: "UTILIZACION DE HERRAMIENTAS BIOTECNOLOGICAS PARA LA PRODUCCION CLONAL DE NOGALES"
- Región o Regiones de Ejecución: Región del Maule
- Agente Ejecutor: Sociedad Agrícola Pehuén de Curicó Ltda. (Viverosur)
- Agente(s) Asociado(s):
- Coordinador del Proyecto: Alejandro Navarro Díaz (Coordinador principal); Ximena Fernández Durán (Coordinador alterno)
- Costo Total: Programado; Real
- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total): Programado; Real
- Período de Ejecución: 1 de abril 2009 al 31 de marzo 2014 (Programado y Real)

II. RESUMEN EJECUTIVO

El presente proyecto se realizó entre los años 2009 a inicios de 2014 con la finalidad de producir plantas clonales de nogal, inicialmente variedades, pero finalmente reprogramado para producir y vender portainjertos clonales de variedad Vlach. Este portainjerto se convirtió en nuestro interés debido a sus aptitudes de homogeneizar el cultivo del nogal en campo y aumentar rendimientos y viabilidad del huerto debido a su tolerancia a la infección por phytophthora o a nematodos del suelo.

Al no estar presente en nuestro país, este material fue importado con éxito durante estos años, fue establecido y multiplicado in vitro, alcanzando un volumen de plantas de importancia. Para ello logramos generar protocolos que han quedado dentro nuestros procesos productivos de laboratorio. Luego de superadas estas etapas, al momento de evaluar y obtener una eficaz técnica de enraizamiento y aclimatación de la planta terminada en contenedor, los resultados al término del proyecto no han sido favorables, sin poder superar principalmente los obstáculos de prendimiento del material en el sustrato en invernadero. Se ensayaron diversas dosis hormonales, medios y sustratos, los cuales no han dado los resultados esperados.

III. INFORME TÉCNICO

1. Objetivos del Proyecto:

- Lograr la metodología necesaria y efectiva para la introducción de material de campo a cultivo in vitro, lo cual fue especialmente utilizado en las primeras etapas del proyecto para obtener una base de material vitro de nogal variedad Hayward. En el caso de portainjertos variedad Vlach, esta base inicial de

material fue satisfactoriamente importado y liberado de cuarentena in vitro en los plazos correspondientes.

- Incorporar a nuestro laboratorio de propagación in vitro una tecnología y sus respectivos procedimientos para la multiplicación de material de nogal, variedad Hayward y portainjertos variedad Vlach. Esto fue logrado a cabalidad a fines de este proyecto, luego del ensayo y modificaciones a múltiples recetas de medios de cultivo y técnicas de micropropagación.
- No ha sido posible lograr una metodología efectiva para las etapas de enraizamiento y, por lo tanto, posterior aclimatación de plantas in vitro, pese a tener toda la infraestructura, insumos y equipo humano necesarios como para lograr estas etapas tan relevantes y difíciles particularmente en la especie nogal como explantes in vitro.
- Debido a lo anterior, no se logró presentar al mercado en el tiempo propuesto este nuevo producto chileno que será el portainjerto clonal de nogal variedad Vlach, no obstante, los ensayos continúan vigentes en nuestro Vivero.
- La producción y venta real de portainjertos variedad Vlach será llevada a cabo una vez se logre establecer dentro de nuestros protocolos una técnica efectiva de enraizamiento y aclimatación de nogal generado in vitro.

2. Metodología del Proyecto:

Para el desarrollo del proyecto se dividieron las actividades originalmente en 4 etapas, secuenciales y cada una dependiente de los resultados obtenidos en el desarrollo de la etapa anterior. Las etapas se engloban en:

1. Establecimiento del material.

Para el caso de las variedades de nogal, por ejemplo Chandler, Serr, Hayward, se colectó material juvenil de brotaciones de temporada en campo. Luego este material pasó por un proceso de deshoje y estaquillado para crear estacas de 3 cm aproximadamente y que contengan 1 yema cada una. Luego, estas estaquillas se desinfectaron de posibles agentes contaminantes de campo, como agentes físicos y biológicos, sean polvo, hongos y bacterias; para ello se utilizó diversos insumos y reactivos como: detergente, bactericida, hipoclorito de sodio y agua esterilizada, según protocolo expuesto en el Anexo 1.

Una vez pasado el proceso de desinfección, el material ingresó a cámara de flujo laminar, en donde la operaria dentro de un ambiente estéril introduce cada una de las estaquillas con su respectiva yema a un contenedor con medio de cultivo DKW + 0,1 mg/L de IBA + 1 mg/L BAP. Una de las problemáticas a enfrentar es que las estaquillas de nogal tienden a la producción de fenoles, que son compuestos oxidativos que genera el tejido vegetal como respuesta defensiva frente a estos cortes y

exposición a reactivos que ha tenido el material. Por ello, y de manera de ir "lavando" el material introducido de estos compuestos fenólicos, es que las yemas son trabajadas en cámara de flujo laminar para hacerles un cambio de medio hacia en frascos nuevos a las 24, 48 y 72 horas desde su introducción a laboratorio.

Dentro de un período de un mes el material introducido de nogal mostró signos de brotación, aunque a un porcentaje mucho menor del esperado. Las yemas que sí generaron brotes juveniles fueron rescatadas, es decir, en cámara, la operaria retira la yema del frasco, y corta el nuevo brote desde su base, para colocar este material en un frasco nuevo, con medio de cultivo fresco y estéril.

Todo el procedimiento anteriormente descrito no generó los resultados totalmente esperados, por tanto, y frente al cambio de perspectiva en el proyecto, lo que llevó a emitir una solicitud de reprogramación, nuestras actividades se enfocaron en trabajar material de portainjertos de nogal, principalmente la variedad Vlach. Para el establecimiento de este material no se realizaron introducciones de campo, sino que establecimos contactos con proveedores estadounidenses, privados y de universidades, teniendo finalmente proveedores directos de material ya establecido in vitro. Se importaron durante el año 2012 y 2013 los siguientes lotes de material Vlach:

Código de ingreso	Plantas importadas	Origen	Año de la cuarentena
VL 003 003	123	Estados Unidos	2012 - 2013
CDA 004 962	58	Estados Unidos	2012 - 2013
VL 005 707	340	Estados Unidos	2013
VL 001 981	711	Estados Unidos	2013

El material llegó de manera general en buenas condiciones sanitarias, todos en contenedores plásticos en su medio de cultivo. Sin embargo, se observó evidentemente una diferencia en el desarrollo posterior de cada uno de los lotes, siendo el lote VL 001 981 el que contenía los explantes con mejor desarrollo y crecimiento in vitro.

El procedimiento fue recibir el material in vitro desde el extranjero, bajo inspección del Servicio Agrícola y Ganadero, e ingresarlo a laboratorio a un estado de cuarentena, período dentro del cual el material puede ser trabajado y multiplicado, pero siempre bajo autorización e inspección de agentes del SAG. Dentro de este período el material fue muestreado y testeado para analizar contra virosis y patógenos cuarentenarios. Una vez teniendo los resultados de que el material estaba libre de patógenos, el SAG liberó cada una de las cuarentenas, pasando entonces el material por este otro tipo de establecimiento y así fue posible ingresar los nogales Vlach a nuestros programas de micropropagación.

2. Micropropagación

Para la propagación del material de nogal in vitro durante estos años de proyecto se ensayaron diversas fórmulas y recetas conformadas por diferentes mezclas de reactivos.

En las primeras oportunidades el material no presentaba un crecimiento sano ni elongaba lo suficiente como para multiplicar el material. Siempre la base del medio de cultivo se mantuvo en el medio DKW, sobre el cual se realizaron diversas modificaciones principalmente en cuanto a aumento o disminución en la concentración de ciertos componentes reactivos, o a la adición o supresión de algunos reguladores del crecimiento.

Finalmente, el medio que generó las mejores muestras de crecimiento en los explantes fue el medio DKW modificado que se describe en el Anexo 2.

No obstante, es de considerar de importancia también la técnica de micropropagación. Es decir, fue fundamental para nosotros comenzar por instruir a un par de operarias en la correcta manipulación del material en cámara de propagación. El material, luego de ser clasificado en la sala de crecimiento en cuanto a su condición sanitaria, principalmente por presencia de bacterias contaminantes, fue entregado a la operaria. Ella, en cámara de flujo laminar, abre el pote y extrae el material con pinzas estériles, para depositarlo en un papel estéril. El explante consiste en un crecimiento de un eje, con 3-5 hojas, dependiendo de la altura que haya alcanzado. La operaria extrae las hojas del explante y lo troza en secciones menores de crecimiento que contengan 2 yemas por corte. Luego de los cortes de multiplicación, todas las secciones, incluyendo las secciones apicales, son plantadas en un nuevo medio de cultivo, separadas en categoría según origen del corte: base, medio o ápice del explante madre.

El material una vez multiplicado, es puesto en la sala de crecimiento del laboratorio a una temperatura constante de 21°C y un fotoperíodo de 16 hrs luz y 8 horas de oscuridad. Luego de 30 días de crecimiento, el

material es vuelto a multiplicar, en caso de explantes de 3-5 hojas de altura, o es cambiado de medio a uno frasco nuevo, en caso de explantes de menor altura, para que continúe su crecimiento.

El nogal en sí tiene la problemática como cultivo in vitro de ser una especie de muy lento crecimiento, por lo que la propagación in vitro una vez estable solo logra alcanzar una tasa 2 de multiplicación, máximo 2,5. Es decir, de un explante inicial se obtuvieron 2 ó 2,5 finales, teniendo lapsos de un mes entre multiplicaciones, es por esto que la propagación vitro del nogal conlleva bastante tiempo y meticulosidad en lo que respecta para crear grandes volúmenes de material comercial.

3. Inducción al enraizamiento

El material de portainjertos de nogal variedad Vlach que fue finalmente importado, pasó por cuarentena, fue liberado, y se propagó en laboratorio, para finales del año 2013 llegó a alcanzar una cantidad de 40.000 explantes vitro en laboratorio ubicado en Casablanca, V región.

Para diciembre 2013 realizamos un viaje a Casablanca con el fin de retirar unos 20.000 explantes in vitro de nogal Vlach, de calidad sanitaria y vegetativa, los cuales ingresaron sin problemas a nuestras salas de crecimiento del laboratorio en Viverosur Teno.

Fotografía: Ingreso de plantas vitro de nogales Vlach a laboratorio de Viverosur en Teno, Diciembre 2013.



Tabla: Ingreso de plantas vitro de nogales Vlach a laboratorio de Viverosur en Teno, Diciembre 2013.

Fecha	Cantidad potes	Cant Plantas	Categoría
09-dic-2013	1.404	13.528	A
09-dic-2013	468	4.952	B
09-dic-2013	221	1.768	C
		20.248	

Una vez llegado el material, éste fue clasificado según su altura, siendo los materiales de mayor tamaño, de 3 – 5 hojas, ingresados como categoría A; los pots que contenían explantes uniformes de 1-3 hojas de altura, fueron clasificados como categoría C, y aquellos pots con plantas desuniformes y altura variable fueron destinados a categoría B.

Para la categoría A en su totalidad, y para aquellos explantes más altos de la categoría B, se preparó un medio de cultivo especial, para inducir a la formación de raíces. Este medio, que contiene mayor concentración de reguladores Auxina (IBA) en comparación al medio de propagación, se utilizó en las plantas más grandes de nogal Vlach para estimular a la base del tejido vegetal a diferenciarse en raíces, pero sin llegar a emitirlos. Esto se realizó tomando las plantas vitro de nogal de 4 o más centímetros de altura, a las cuales las operarias les quitaron la base o callo, cortaron sus hojas dejando la mitad del área foliar y las plantaron en este medio de cultivo de inducción. Se expusieron los explantes a diversos tratamientos, los cuales variaron en cuanto a concentración de hormona IBA (ácido indolbutírico) y tiempos de exposición (días en el medio de cultivo y en oscuridad). Los diferentes tratamientos se exponen en el apartado 4 Plantación y Enraizamiento.

En cuanto a las plantas de nogal Vlach que no alcanzaron la altura necesaria como para ingresar a inducción, generadas de los pots de categoría B y categoría C, éstas fueron ingresadas por las operarias a medio de multiplicación para continuar con su elongación esperando alcanzar la altura necesaria para inducirlos a enraizamiento en el siguiente repique.

4. Plantación y enraizamiento

4.1. Plantación y enraizamiento ex vitro

Tal como se mencionó en el apartado anterior, las plantas de nogal Vlach pasaron por un período de inducción al enraizamiento en distintos

tratamientos, que abarcaron 5 concentraciones distintas de hormona IBA y 5 períodos distintos de exposición a esta hormona.

Luego, los pots con las plantas vitro fueron sacados de laboratorio y las plantas de nogal fueron cosechadas y plantadas entre los días 23 y 28 de diciembre 2013, tal y como se detalla en la siguiente tabla:

Fecha de plantación	Variedad	Plantas	IBA (mg/L)	Días Exposición	Contenedor
23-12-2013	VL981	152	3	7	250 cc
23-12-2013	VL981	448	6	7	250 cc
23-12-2013	VL981	544	12	5	250 cc
23-12-2013	VL981	1.992	20	5	250 cc
23-12-2013	VL981	720	40	5	250 cc
26-12-2013	VL981	3.726	40	7	250 cc
27-12-2013	VL981	648	12	11	250 cc
27-12-2013	VL981	3.186	20	8	250 cc
27-12-2013	VL981	1.620	40	8	250 cc
28-12-2013	VL981	334	12	9	250 cc
28-12-2013	VL981	1.202	20	9	250 cc
TOTAL:		14.572			

Las casi 14.500 plantas de nogal fueron sacadas del medio de cultivo, se les repasó el corte de la base con bisturí y se plantaron en contenedores plásticos individuales de 250 cc. Fue importante evitar la deshidratación del material en el mesón de trabajo, por lo que las trabajadoras debieron asperjar el material salido de vitro con agua en todo momento.

Los contenedores fueron rellenos con una mezcla de sustrato única y estéril que contenía ½ medida de turba kekillá y ½ medida de perlita, con el fin de otorgar una aireación y percolación adecuada del sustrato, además de una acidez tendiente al pH neutro.

Además, se ensayó la plantación de los nogales en otras mezclas de sustratos, los que incluían:

- 1/3 de turba kekillá + 1/3 de perlita + 1/3 de capotillo de arroz
- 1/3 de turba kekillá + 1/3 de arena + 1/3 de acícula de pino compostada

Los nogales Vlach una vez plantados en los contenedores fueron ingresados a cajas plásticas transparentes, cerradas, con el fin de mantenerlos en un ambiente con alta humedad relativa, evitando un estrés por deshidratación. A su vez, estas cajas plásticas fueron ingresadas a los minitúneles de enraizamiento de nuestro invernadero especializado en esta etapa. Estos mesones al estar cubiertos de plástico y sellados herméticamente, permitieron mantener una temperatura

óptima de enraizamiento y a la vez evitar una pérdida de humedad ambiente.

Las plantas de nogal se mantuvieron durante la primera semana en un ambiente de ahogo, es decir alta humedad relativa llegando casi al 100%. A partir de la segunda semana, tanto los minitúneles como las cajas plásticas fueron abiertas durante las menores horas de temperatura del día (generalmente en primeras horas de la mañana) para comenzar a forzar una disminución gradual de la humedad relativa ambiente, bajando a 80%, 70% y finalmente al 60%.

Se procuró evitar el encharcamiento y el exceso de humedad en el sustrato, ya que las plantas de nogal necesitan una buena aireación para generar raíces. Para ello, en las primeras semanas no se regaron las plantas, sino que se utilizó la aplicación de humedad mediante un sistema de agua a alta presión que genera gotas muy finas, solamente en caso que fuese necesario aportar a la humedad ambiente que rodeaba las plantas y evitar estrés por transpiración.

Teniendo en consideración el ambiente de ahogo al que debían estar expuestas las plantas en enraizamiento, junto con altas temperaturas, era muy probable la aparición de hongos y bacterias. Por lo tanto, desde la plantación se realizó un programa preventivo de aplicación de fungicidas, lo que incluyó la aplicación de una mezcla de fungicida preventivo Tebuconazol + el fungicida curativo Captan.

4.2. Plantación y enraizamiento in vitro.

Con la finalidad de evaluar la emisión de raíces de plantas de nogales inducidas pero ahora en condiciones in vitro, el día 20 de diciembre de 2013 se realizó un medio enraizamiento formulado según los siguientes componentes:

Receta		Ensayo realizado		
Componente	Dosis o cantidad	Litros de medio	Evaluación de la fuente de carbohidratos	Vermiculita
Medio base MS	concentraciones diluidas al 25%	4,5	3 L de medio con Glucosa	+ 2,5 Lt vermiculita
Glucosa o Azúcar	30 gr/L			
Agar	5 gr/L		1,5 L de medio con Azúcar	+ 1,2 Lt vermiculita
pH	6			

* sin hormonas

Vermiculita	363,4 mL/Lt medio enraizamiento
-------------	---------------------------------

Esta mezcla de medio de cultivo estéril con agar + vermiculita se envasó en laboratorio en pote plásticos (a 200 cc / pote), los mismos utilizados

para la propagación in vitro del nogal. Bajo cámara de flujo laminar, las operarias cosecharon plantas salidas de inducción y realizaron la plantación de éstas en este medio de enraizamiento in vitro, con un promedio de 8 plantas por pote.

Cabe destacar que este medio de enraizamiento in vitro no contuvo hormonas debido a que su funcionalidad se centra en otorgar soporte y aireación, dado principalmente por la vermiculita, y nutrientes, dado por el medio base MS, a la planta de nogal con raíces en formación.

Se evaluaron dos fuentes de carbohidratos debido a que la receta original indicaba la glucosa como componente, pero es de común uso en nuestro laboratorio el azúcar (sacarosa) como fuente de energía.

Fecha	Variedad	Plantas	IBA (mg/L)	Días Exposición	Formato
21-12-2013	VL981	120	3	5	pote medio + vermiculita
21-12-2013	VL981	120	6	5	pote medio + vermiculita
21-12-2013	VL981	152	12	5	pote medio + vermiculita
		392			

3. Actividades del Proyecto:

Etapas N°: 1

Nombre etapa: Establecimiento

Descripción: también llamada de introducción. En esta etapa se debe determinar el agente antioxidante y la dosis necesaria que se debe colocar al medio de cultivo de propagación a objeto de evitar la oxidación durante el cultivo de tejidos a partir de yemas subapicales.

Actividades de la propuesta original:

- Ensayos de desinfección
- Ensayos de medio cultivo + antioxidantes
- Ensayos de tiempo de cultivo + condiciones de cultivo

Actividades del programa real:

- Ensayos de desinfección en material de temporada de variedades comerciales de nogal, Serr, Chandler, Howard.
- Ensayos de medios de cultivo y antioxidantes en material de temporada de variedades comerciales de nogal, Serr, Chandler, Howard.
- Ensayos de tiempo y condiciones de cultivo en material de temporada de variedades comerciales de nogal, Serr, Chandler, Howard.
- Con la reprogramación, a esta primera etapa de establecimiento de material vitro se añade y realiza la actividad de importación de material in vitro de portainjertos de nogal variedad Vlach, desde Estados Unidos. Esto se realiza



frente a los resultados de los ensayos de introducción antes mencionados, los que no arrojaron un porcentaje de éxito cercano al 100%. Además, y como causa principal, se modificó el enfoque del proyecto, originalmente el de propagar y vender plantas clonales de variedades comerciales de nogal, por el de propagar y vender portainjertos clonales de nogal, ello en vista de tener a disposición el portainjerto Vlach, que es reconocido por su tolerancia a la infección por phytophthora y nematodos del suelo, haciendo de los potenciales huertos de Chile unos cultivos más rentables, homogéneos y viables para los agricultores.

Etapa N°: 2

Nombre etapa: Propagación

Descripción: también llamada de proliferación. En estricto rigor se puede dividir en dos subetapas: brotación y proliferación.

Actividades de la propuesta original:

- Ensayos medios de cultivo + reguladores de crecimiento
- Ensayos tiempo de cultivo + condiciones de cultivo

Actividades del programa real:

- Ensayos medios de cultivo + reguladores de crecimiento, tomando como base el medio DKW.
- Ensayos tiempo de cultivo + condiciones de cultivo, en material de propagación in vitro de variedades Chandler, Serr y Howard, y en portainjerto de nogal Vlach. En cuanto a las condiciones, se trabajó en base a recomendaciones de asesores externos, sumado a observaciones propias del cultivo en laboratorio establecido.

Etapa N°: 3

Nombre etapa: Enraizamiento y Aclimatación

Descripción: corresponde al cambio de medio de cultivo por un sustrato en el cual se producirá el enraizamiento definitivo de la planta.

Actividades de la propuesta original:

- Ensayos enraizamiento in vitro.
- Ensayos enraizamiento ex vitro.
- Ensayos aclimatación diferentes condiciones de cultivo.

Actividades del programa real:

Durante el desarrollo del proyecto, esta etapa se dividió en dos subetapas, siendo la primera la inducción del material in vitro para dar pie a la formación de raíces en la siguiente etapa, que fue el enraizamiento del explante in vitro o de la planta ex vitro. Todo esto se desarrolló mediante las siguientes actividades:

- Ensayos de enraizamiento in vitro de variedades de nogal Chandler, Serr y Howard.
- Ensayos enraizamiento ex vitro en variedad de nogal Howard.

- Ensayos de medio de cultivo de inducción con distintas concentraciones de regulador de crecimiento IBA, en portainjertos de nogal Vlach.
- Ensayos de distintos tiempos de exposición al regulador de crecimiento IBA, siempre en oscuridad, en portainjertos de nogal Vlach.
- Ensayos de distintas mezclas de sustratos para el enraizamiento ex vitro de portainjertos de nogal Vlach.
- Ensayos para el enraizamiento in vitro en vermiculita + medio de cultivo de portainjertos de nogal Vlach.

Etapa N°: 4

Nombre etapa: Obtención de plantas terminadas de nogal.

Descripción: Desarrollo de sustrato y condiciones de nutrición para la obtención de plantas aptas para el mercado chileno.

Actividades de la propuesta original:

- Ensayos de sustrato en bolsa.
- Ensayos de nutrición foliar.
- Ensayos de nutrición por fertirriego.

Actividades del programa real:

- Dentro del período de proyecto no se logró realizar las actividades programadas originalmente para esta etapa, debido a que, como se mencionó anteriormente, cada una de las etapas es dependiente de los resultados obtenidos en su etapa antecesora. Y como los ensayos realizados en enraizamiento no otorgaron plantas finalmente aclimatadas, no se obtuvo material para evaluar técnicas de nutrición vegetal ni plantación en diversos sustratos.

4. Resultados del Proyecto:

4.1. Establecimiento del material.

En los ensayos de medios de cultivo y tipos de sellado de contenedor para establecer las introducciones de material de nogal, los resultados obtenidos no fueron los esperados, principalmente debido a las pérdidas por oxidación (o producción de fenoles) en el material ingresado a vitro; sin embargo, se obtuvo los mejores resultados en la variedad de nogal Serr, que tal y como se observa en la figura no posee altos grados de fenolización a comparación de la variedad de nogal Chandler.

Figura: Estado del material de nogal cvs. Chandler y Serr, a las 48 horas de plantado antes del 2° repique. Año 2011.

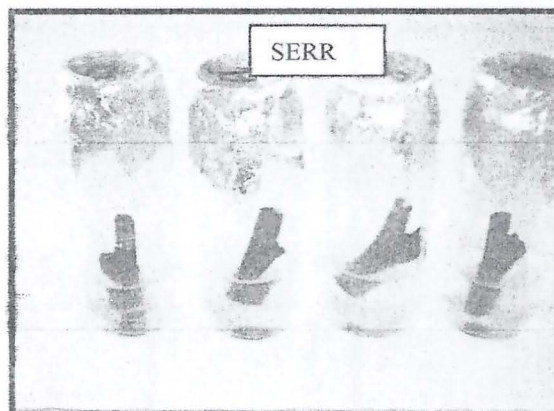
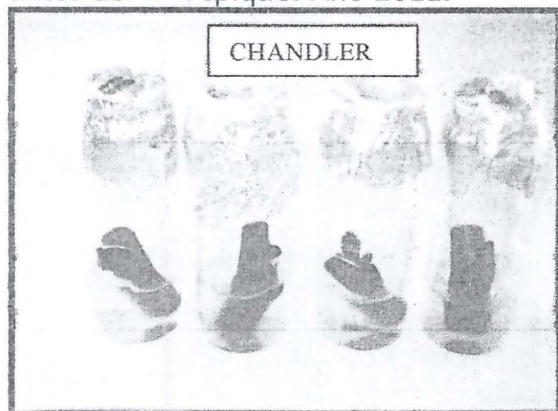


Figura: Estado del material de nogal cvs. Chandler y Serr, 3,5 días plantadas después del último repique. Años 2011.

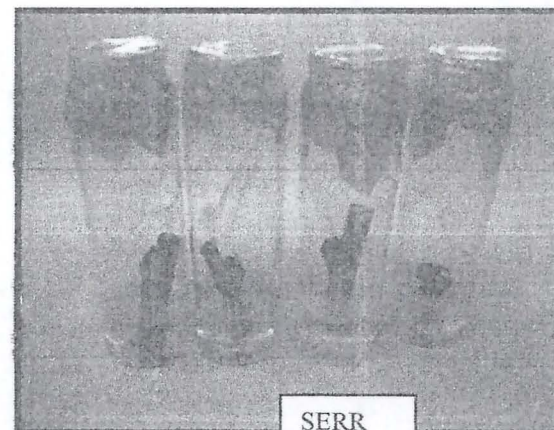
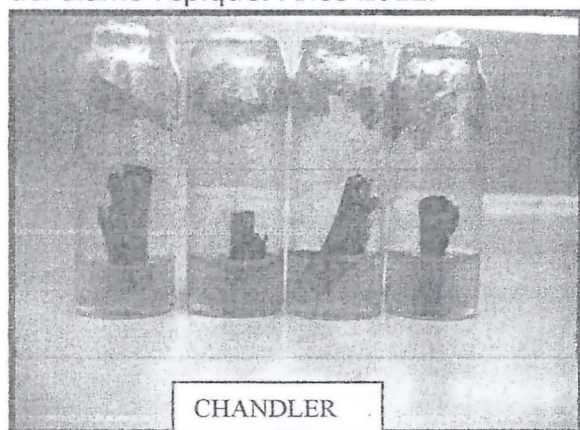
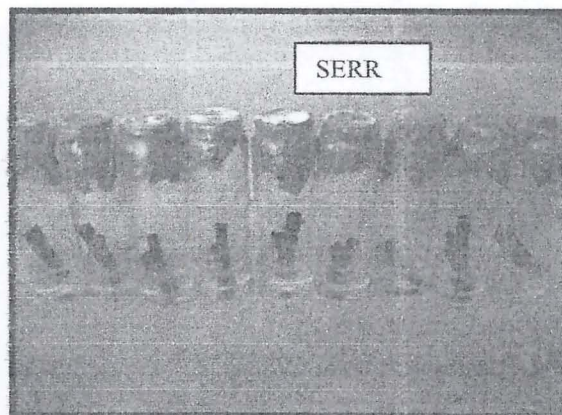
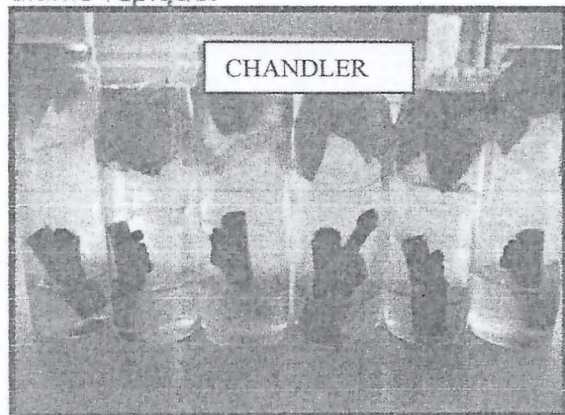


Figura: Estado del material de nogal cvs. Chandler y Serr, 1 mes plantadas después del último repique.





Para el establecimiento del material de portainjertos de nogal Vlach, las importaciones inicialmente pasaron por una brecha de pérdidas debido a contaminaciones por hongos y bacterias, para luego repuntar su crecimiento al trabajar solo con el material inicial sano.

Del material importado en Septiembre 2012 (Anexo 3), se obtuvo material inicial para trabajar relativamente sano, tal y como se detalla:

Fecha ingreso	Variedad	Categoría	Plantas
13-09-2012	Vlach	A	10
13-09-2012	Vlach	B	90
13-09-2012	Vlach	C	23
TOTAL			123

Descripción de categorías: A: planta totalmente limpia. B: planta con poca bacteria. C: planta con mucha bacteria.

De esta importación, se ocuparon 100 plantas para repique, de las cuales se obtuvo 207 plantas. Las 23 plantas de categoría C se descartaron.

Durante octubre 2012 se realizó otra importación de 600 plantas Vlach in vitro (Anexo 4), sin embargo, de la totalidad de pots con plantas ingresados a nuestro laboratorio, considerable cantidad venía con tapas rotas y medio licuado, lo que condujo a mermas por contaminación principalmente de hongos. Finalmente, se liberaron de cuarentena 118 explantes sanos en noviembre de 2012.

Fotografía: Potes con nogal VLACH importados desde E.E.U.U., se observa el detalle de tapas rotas y abiertas.





Fotografía: Copia del informe que dio término a la cuarentena de nogales variedad VLACH importados desde E.E.U.U. Se observa que de las 600 plantas importadas, solo se liberaron 118 plantas vivas sanas.



SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO
DIVISION PROTECCION AGRICOLA
SUBDEPTO. DEFENSA AGRICOLA

INFORME DE TÉRMINO DE DEPÓSITO PARTICULAR

REGION	OFICINA
Valparaíso	Valparaíso

ANTECEDENTES GENERALES			
Nº y FECHA CDA	Nº/FECHA RESOLUCION INTERNACION	PAIS DE ORIGEN	IMPORTADOR
1962 09-10-2012		USA	SOCIEDAD AGRICOLA PHILIPIN CURICO LTDA.
TIPO DEPÓSITO PARTICULAR		NOMBRE LABORATORIO O ESTRUCTURA	REPRESENTANTE
Laboratorio ☒ Estructura confinamiento ☐		MULTIFLORA CASAHUANCAS S.A.	PABLO RIESCO V.
FECHA RECEPCIÓN		FECHA PRIMER REPIQUEL (Laboratorio) O ESTABLECIMIENTO (Estructura)	
31-10-2012		07-11-2012	
Nº INSPECCIONES	FECHA MUESTREO*	FECHA ENVIO MUESTRA A LABORATORIO	FECHA RECEPCIÓN INFORME
4	05-11-2012	07-11-2012	14-11-2012

*En Laboratorios puede corresponder a la fecha de recepción, envíos mas de 100 unidades por variedad o a la fecha en la que se formó el frasco muestra (envíos escasos)

DECLARACIONES ADICIONALES SOLICITADAS

CHERRY LEAF ROLL VIRUS

RECuento MATERIAL Y RESULTADO ANALISIS

ESPECIE (Nombre científico)	VARIEDAD / CLON	CANTIDAD INGRESADA (Plantulas)	CANTIDAD LIBERADA (Plántulas)	INFORME FITOSANITARIO (Nº, Fecha)	RESULTADOS (Indicar plaga)
Juglans regia x Juglans hindii	Paradox x Vlach	600	118	77412-6 14-11-2012	Negativo a Cherry leaf roll virus

OBSERVACIONES

Alta mortalidad de plántulas por contaminantes presentes en Chile.

CONCLUSIONES

Habiéndose dado cumplimiento a las inspecciones y verificaciones analíticas disponibles tendientes a confirmar que el material se encuentra libre de plagas cuarentenarias, se pone término a las restricciones cuarentenarias, quedando el material a libre disposición del importador.

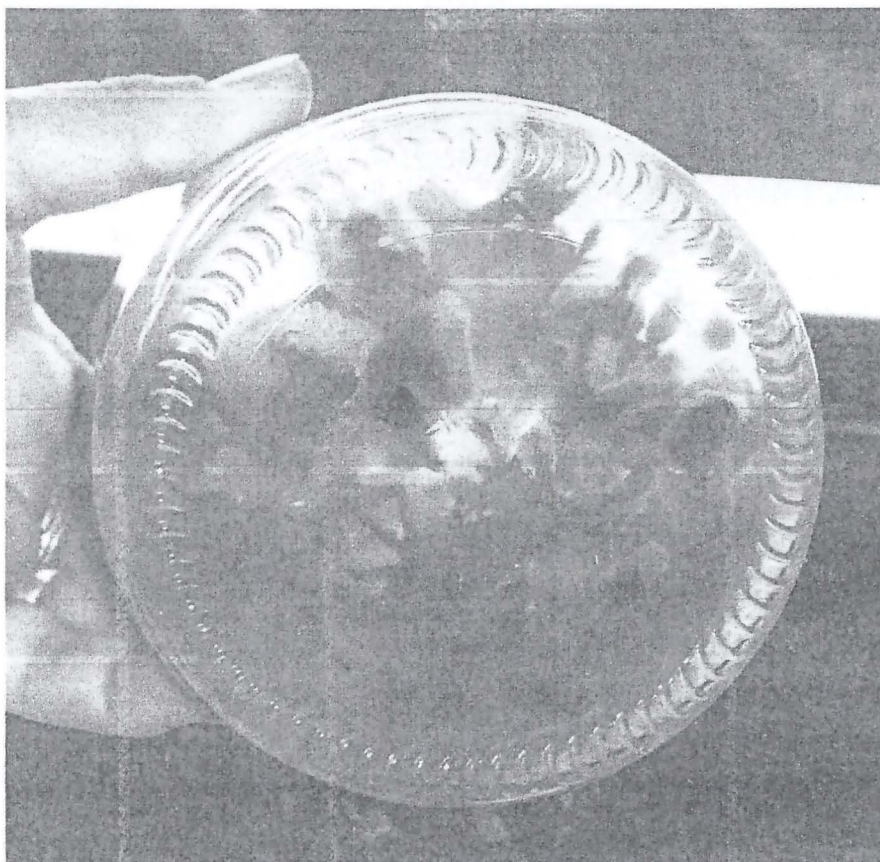
Además, durante Mayo de 2013 se realizó una importación adicional de 500 plantas de Vlach (Anexo 5), no obstante, tampoco generó material inicial de calidad en su totalidad, obteniéndose solo 40 plantas con poca bacteria y ninguna planta totalmente limpia para establecer el nuevo lote.

Fecha	Variedad	Categoría	Cantidad plantas
22-05-2013	Vlach	A	0
22-05-2013	Vlach	B	40
22-05-2013	Vlach	C	300
22-05-2013	Vlach	D	160
		TOTAL	500

Descripción de categorías: A: planta totalmente limpia. B: planta con poca bacteria. C: planta con mucha bacteria. D: desecho o descarte por total contaminación.

Fotografía: Detalle de material importado con bacterias.





4.2. Micropropagación

Se ensayaron diversas concentraciones de reguladores de crecimiento, además de cambiar concentraciones o fuentes de reactivos, siempre modificando el medio de cultivo base DKW.

El medio que evidenció mejores resultados en cuanto a mayor elongación del explante, grosor del eje de crecimiento y sanidad del material fue el medio DKW modificado, el cual es descrito en el Anexo 2.

Adicionalmente, para obtener una técnica de propagación *in vitro* con buenos resultados, no solo fue necesario ensayar diversos medios de cultivo, sino además mejorar la manipulación y corte del material, además del período de tiempo de cultivo.

Para definir el tiempo de cultivo óptimo (período de tiempo que transcurre entre multiplicaciones del material), durante principios del proyecto se ensayaron distintos tiempos bajo las mismas condiciones de cultivo. Para la variedad RX1 se obtuvieron los siguientes resultados:

		Período de cultivo				
	04-10-2010	15 días	20 días	30 días	35 días	
Variedad	N° plantas iniciales	Plantas finales	Plantas finales	Plantas finales	Plantas finales	Tasa de multiplicación
RX1	50	65				1,3
RX1	50		140			2,8
RX1	50			145		2,9
RX1	50				125	2,5

Finalmente, y frente a los resultados repetidos también en otras variedades, se definieron 30 días entre repique, ya que mostró la mayor tasa de multiplicación del material inicial; a períodos menores las plantas aún no se han desarrollado lo suficiente como para multiplicarlas, y a períodos mayores de tiempo el material se encuentra envejecido y comienza a deteriorarse.

En cuanto a la técnica de corte, se instruyó a operarias a realizar solo cortes verticales, los que implican sacar la planta del frasco o pote, cortar la base o callo, cortar todas las hojas del eje principal (el material nuevo se debe generar a partir de la brotación de yemas axilares), y seccionar el eje en trozos menores que incluyan a lo menos 2 yemas. Luego, el material se plantó en pots conteniendo 8 explantes cada uno, cada pote con material clasificado según su origen: base, zona media o ápices de la planta, sin mezclar distintos orígenes en un mismo pote, tendiendo así a homogeneizar el futuro crecimiento de los explantes.

Fotografía: Material de nogal Vlach durante su propagación en laboratorio. Arriba se observan los pots con medio fresco, con el material final recién multiplicado. En las bandejas inferiores se observa el material inicial, nogales de 30 días de crecimiento in vitro.



4.3. Inducción al enraizamiento

Desde diciembre 2013, en cuanto obtuvimos una partida de casi 20mil plantas de nogal Vlach in vitro, se evaluó la inducción del material para pasar después a la etapa de enraizamiento. El material seleccionado fueron plantas de 4 o más centímetros de altura, el cual se colocó en otro medio DKW modificado (Anexo _) con mayor concentración de auxinas en comparación al medio de multiplicación. Se evaluaron diversas dosis y tiempos de exposición (en oscuridad) de los explantes en este medio:

Fecha	IBA (mg/L)	Cantidad de Plantas	Tiempo de almacenaje de potes en oscuridad
09-12-2013	10	17	5 y 7 días
14-12-2013	3	392	5 y 7 días
16-12-2013	3	152	5 y 7 días
16-12-2013	6	440	5 y 7 días
16-12-2013	12	584	5 y 7 días
18-12-2013	12	544	5 y 7 días
18-12-2013	20	1.992	5, 7 y 8 días
18-12-2013	40	5.624	5, 7 y 8 días
19-12-2013	12	744	9 y 10 días
19-12-2013	20	4.080	5, 7 y 8 días
19-12-2013	40	3.328	5, 7 y 8 días
TOTAL		17.897	

Fotografía: Plantas de nogal Vlach pasadas a medio de inducción a inicios de diciembre 2013. Se observa que son plantas grandes, con hojas desarrolladas, a diferencia del material de propagación.



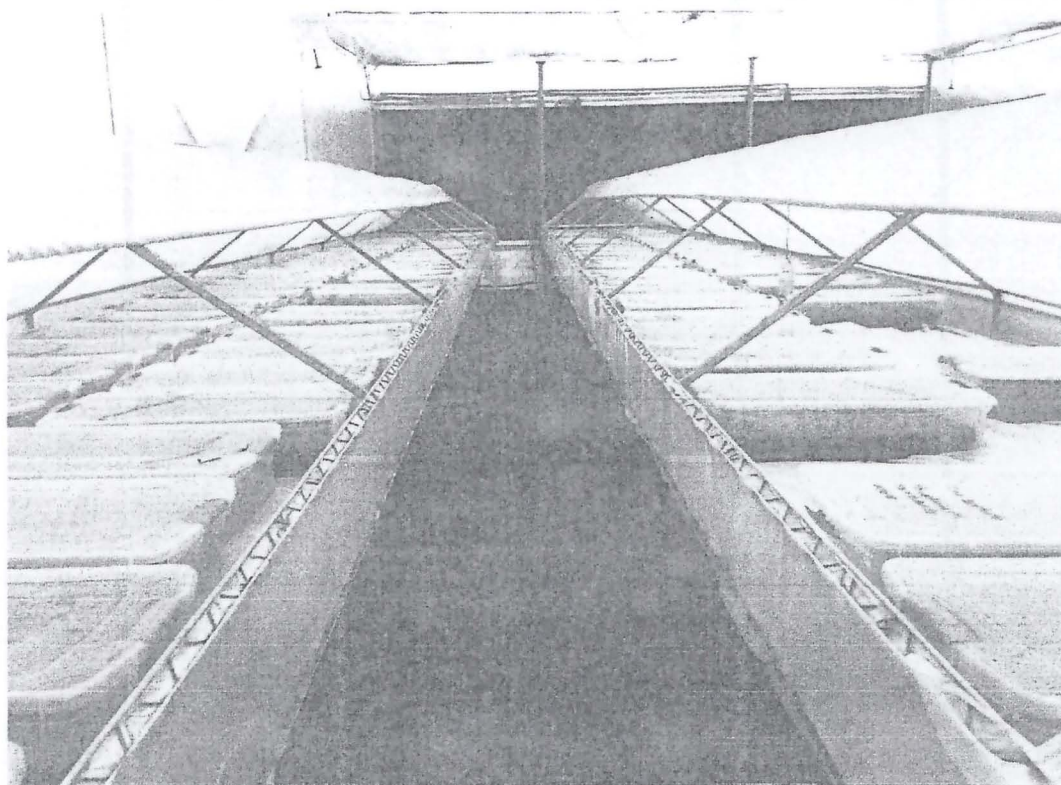
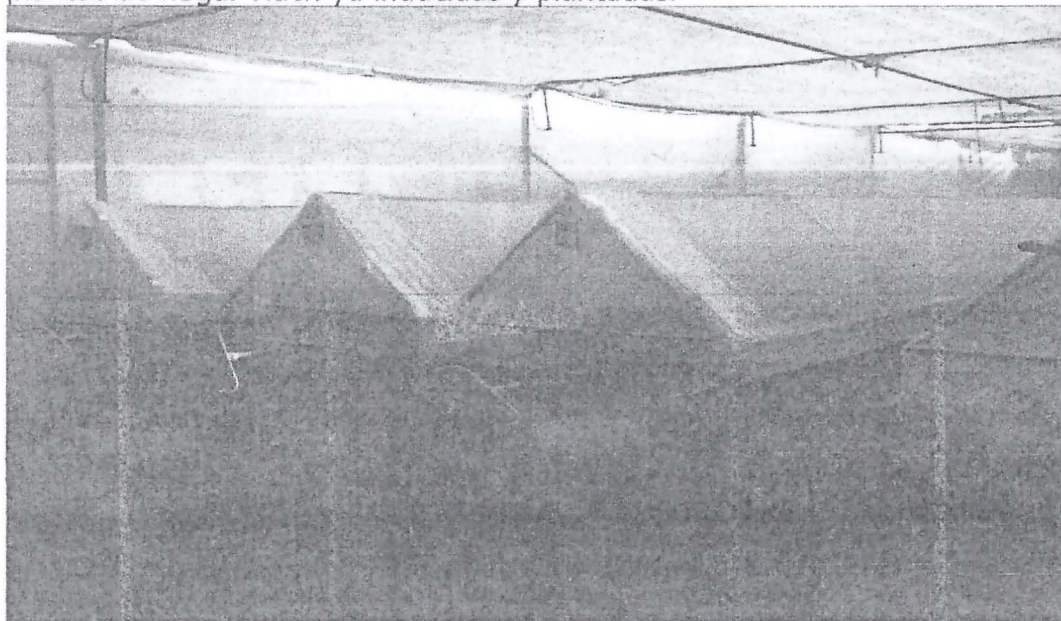
Los resultados de estos tratamientos se exponen en el siguiente apartado, debido a que van en directa relación con el enraizamiento in vitro o ex vitro de los explantes.

4.4. Plantación y enraizamiento

4.4.1. Plantación y enraizamiento ex vitro

De las 17.800 plantas de nogal Vlach puestas en medio de inducción, 14.500 plantas fueron cosechadas fuera de laboratorio y plantadas en nuestro invernadero especializado en enraizamiento y aclimatación, entre los días 23 y 28 de diciembre 2013.

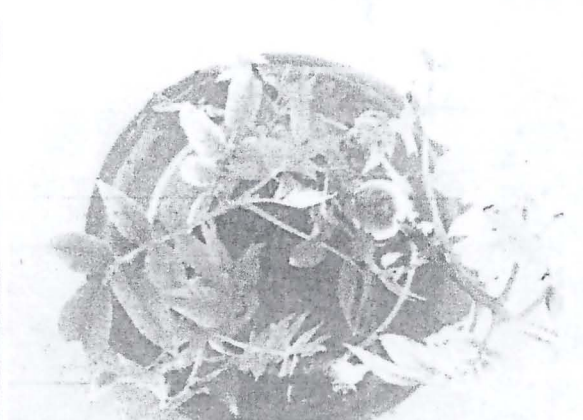
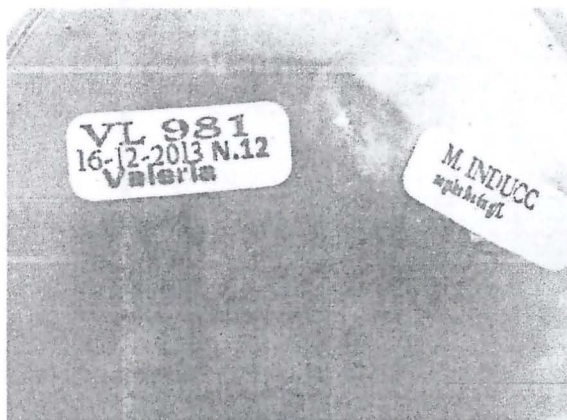
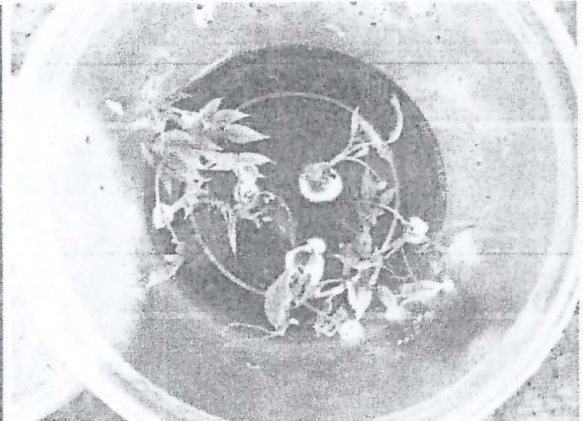
Fotografías: Minitúneles de enraizamiento, sistema que otorga un ambiente cerrado de temperatura y humedad controladas. Dentro de ellos se dispusieron las plantas de nogal Vlach ya inducidas y plantadas.



Fotografía: De fondo, plantas de nogal Vlach cosechadas y ya plantadas en contenedores de 250 cc. En primer plano, acercamiento a una planta vitro inducida, se observa hojas con algunas necrosis.



Fotografías: Detalle de un pote con plantas inducidas y salidas a cosechar. Se observa a la derecha que hubo mermas de material debido a contaminación por hongos en la base del explante. Destaca que a mayor concentración de hormona IBA en la inducción, hubo mayor cantidad de mermas.



Fotografía: Las plantas inducidas al momento de ser cosechadas mostraron en general una necrosis y tejido vegetal blando en la base. Si no era posible removerlo, la planta era descartada para plantación.



Las plantas se evaluaron en invernadero luego de 10 y 15 días de la plantación para observar enraizamiento y prendimiento.

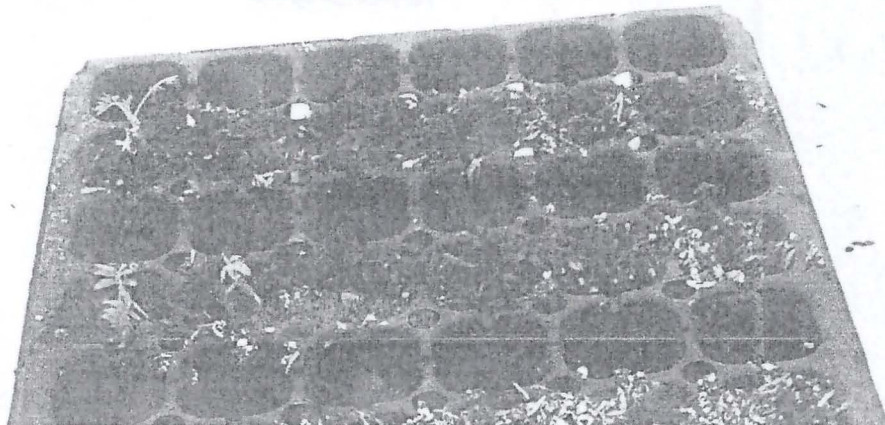
Las plantas expuestas a enraizamiento en la mezcla de sustrato $\frac{1}{3}$ de turba + $\frac{1}{3}$ de arena + $\frac{1}{3}$ de acícula de pino compostada necrosaron en casi un 60% de la cantidad ensayada, a diferencia de las plantas establecidas en el sustrato general utilizado, mezcla de $\frac{1}{2}$ medida de turba kechilla y $\frac{1}{2}$ medida de perlita, el cual necrosó solo en un 15%.

Fotografía: En la zona superior de la fotografía se observan las plantas de nogal en turba + arena + acícula de pino compostada, con 15 días de plantación. En la zona inferior de la fotografía, las mismas plantas bajo mismo ambiente y días de plantación, pero en sustrato turba + perlita.

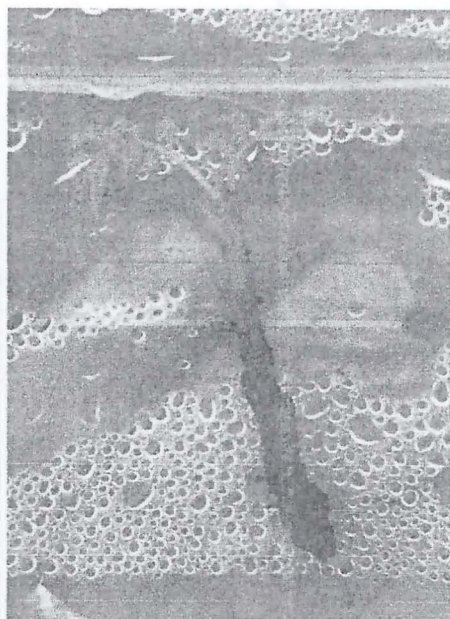


Las plantas expuestas a enraizamiento en la mezcla de sustrato $\frac{1}{3}$ de turba + $\frac{1}{3}$ de perlita + $\frac{1}{3}$ de capotillo de arroz resultaron en una pérdida casi absoluta, llegando al 92% de pérdida y 8% de sobrevivencia solo con 3 plantas a los 12 días de plantación, a diferencia de sus similares pero plantadas en el sustrato general utilizado, mezcla de $\frac{1}{2}$ medida de turba kekillá y $\frac{1}{2}$ medida de perlita.

Figura: En el detalle de la fotografía se observan 3 plantas de nogal sobrevivientes luego de 12 días a la plantación en sustrato mezcla de $\frac{1}{3}$ de turba + $\frac{1}{3}$ de perlita + $\frac{1}{3}$ de capotillo de arroz, de un total de 64 plantadas inicialmente.



Las plantas de nogal establecidas en su mayoría en sustrato turba + perlita, al 50% cada uno, a las 3 semanas desde la plantación mostraron en general necrosis apical y basal, tal y como se muestra en las fotografías:



De las sobrevivientes, solo algunas generaron raíces, siendo un resultado muy por debajo de lo programado para esta etapa en desarrollo. De la escasa cantidad de plantas enraizadas, el 80% resultó a partir de la dosis 20 mg/L de IBA y 5 días de exposición.

Fotografía: Nogal VL981 (Vlach) plantado el 26 diciembre 2013 y evaluado el día 14/1/2013. Originario de una inducción durante 7 días en oscuridad y 10 mg/l de IBA. Se observa una raíz emitida de 1 cm aprox.

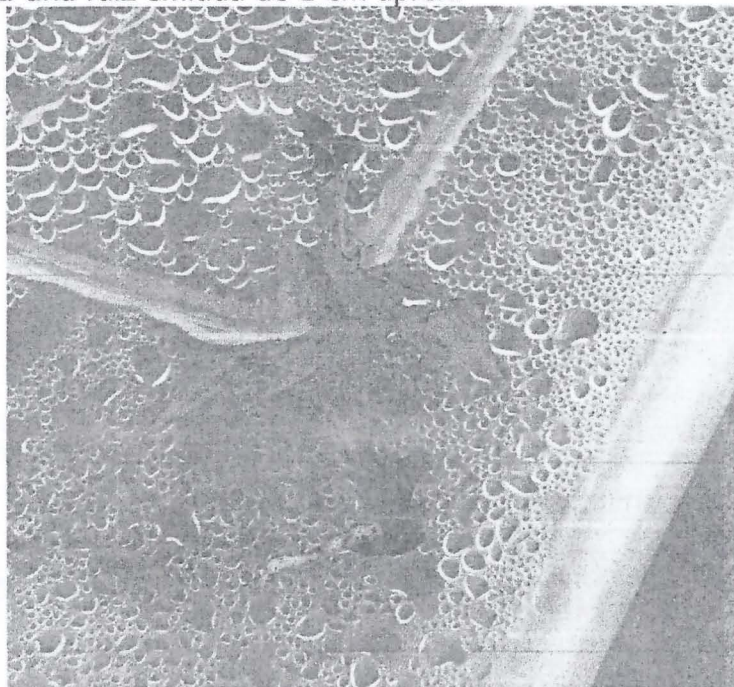
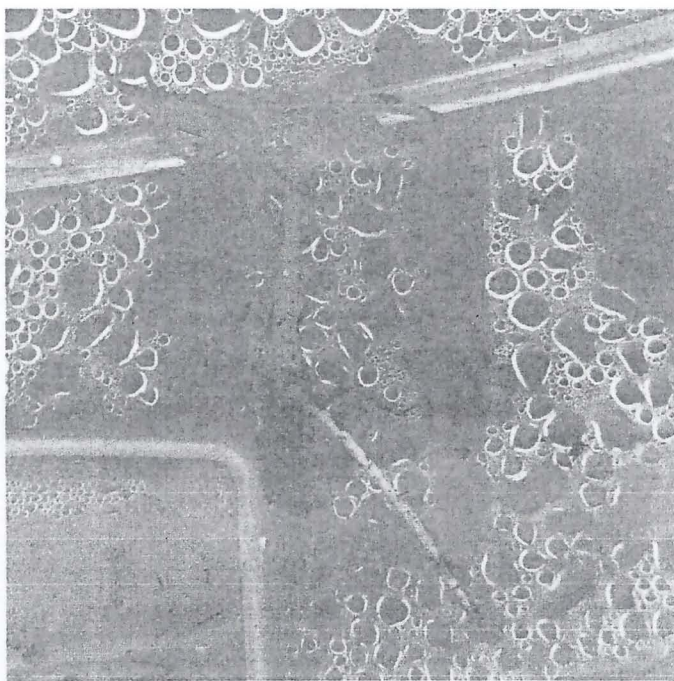
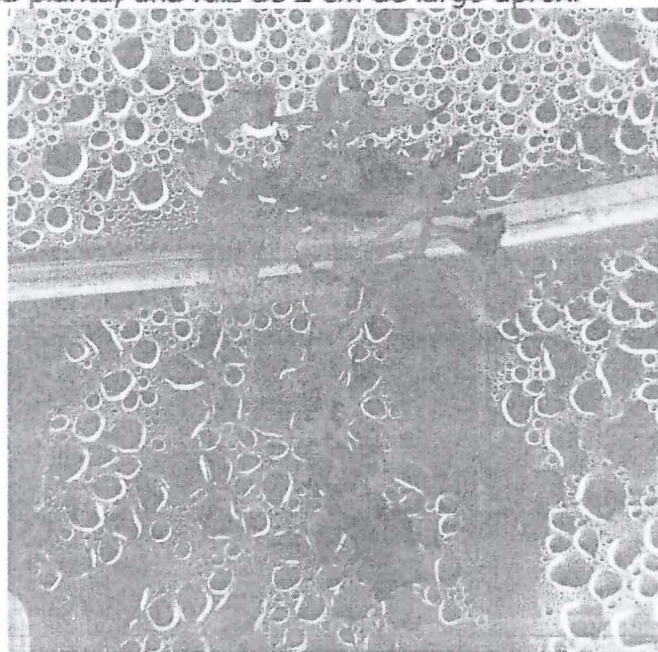


Figura: Dos plantas de nogal VL981 (Vlach) plantados el 26-12-2013 y evaluados el día 14/1/2013. Originarias de una inducción durante 5 días en oscuridad y 20 mg/l de IBA. En la base de la primera planta se observa recién iniciando la emisión de raíz; en la segunda planta, una raíz de 2 cm de largo aprox.



4.4.2. Plantación y enraizamiento in vitro

Las plantas inducidas en dosis de IBA 3, 6 ó 12 mg/L y con 5 días de exposición fueron cosechadas y establecidas en pots vitro con vermiculita + medio de cultivo estéril para que comenzaran el enraizamiento el día 21 de diciembre 2013.

A una semana de haber sido establecidos estos ensayos, la totalidad de ellos mostró la misma necrosis de tejidos basales como aquellos que resultaron en el ensayo de enraizamiento ex vitro.

Figura: Pote en laboratorio con medio de cultivo + vermiculita; se observan las plantas en su interior con necrosis basal o del eje principal de las plantas.

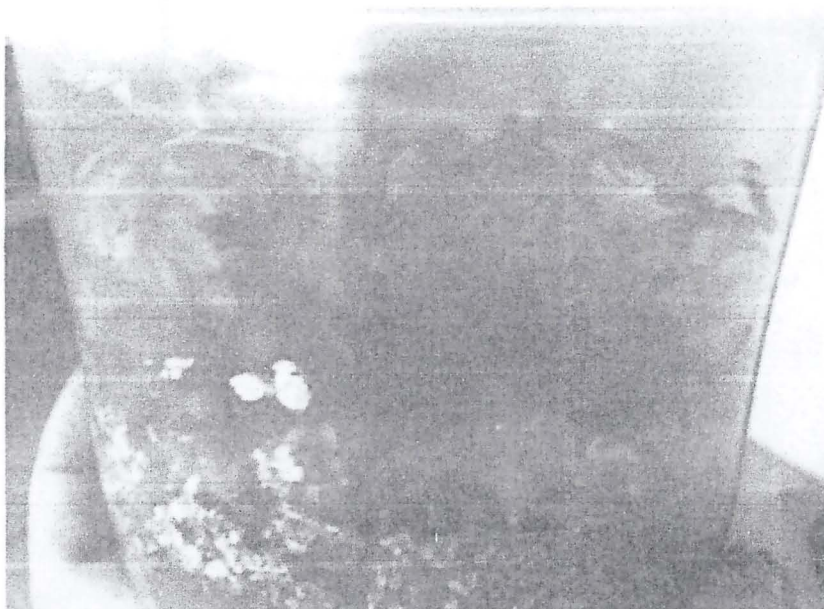
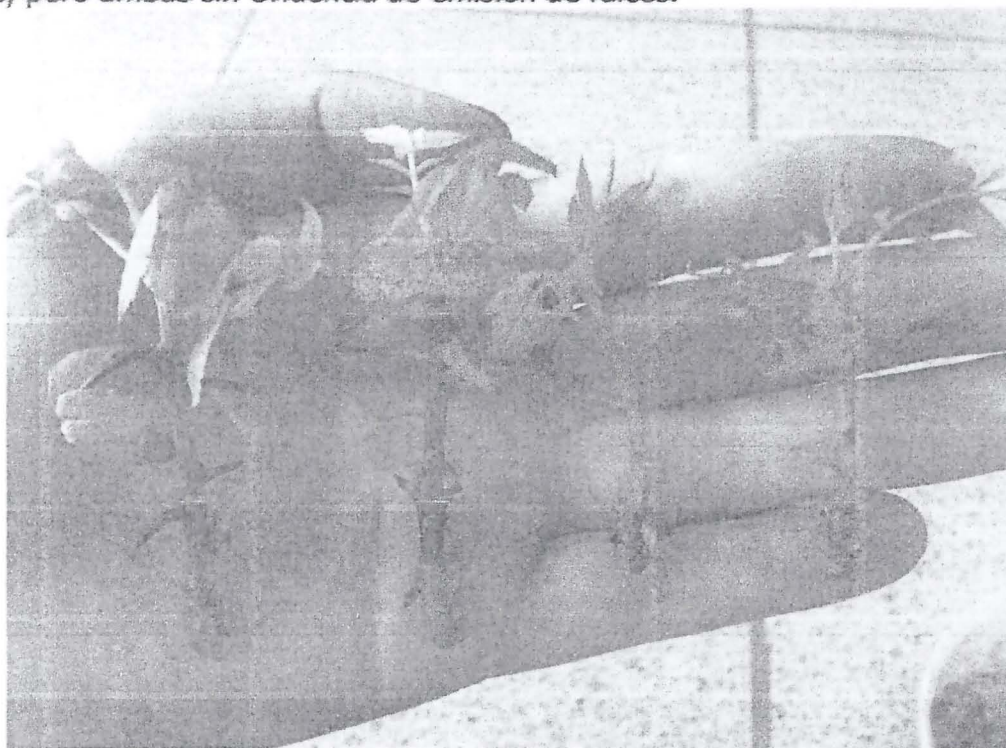


Figura: Detalle de las plantas anteriores. Se observa claramente que dentro de un mismo pote y bajo las mismas condiciones de cultivo inicial y final, pudimos encontrar plantas con necrosis grave de su eje principal y otras plantas totalmente sanas, pero ambas sin evidencia de emisión de raíces.



A diferencia del ensayo de enraizamiento ex vitro, las plantas evaluadas in vitro no enraizaron, resultando en una pérdida total.

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

El cultivo del nogal en los últimos años ha mostrado un crecimiento considerable, especialmente demandado por agricultores que tienden a la producción de otros frutos de nuez como el castaño o la avellana.

Este aumento en la superficie de plantación, incide en que los agricultores deseen establecer sus cultivos en suelos no óptimos para el nogal, cultivo que requiere de suelos con pH tendiente a



6. Impactos y Logros del Proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto
Formación de empresa o unidades de negocio	No existe esta unidad de negocio.	No existe esta unidad de negocio.
Producción de plantas de nogales Vlach a la venta	No existe	Se tiene un protocolo existoso de establecimiento y propagación vitro del material, siendo el enraizamiento el hito crítico que no ha posibilitado la obtención del producto final como planta terminada.
Costos de producción	0	Falta adicionar los gastos por aclimatación una vez se logre establecer el protocolo existoso para esta etapa.
Ventas y/o Ingresos		
Nacional	0	0
Internacional	0	0
Convenios comerciales	-	-

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual	60	100	+ 40
Nuevos empleos generados	0	0	0
Productores o unidades de negocio replicadas	0	1	+ 1

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	0	0	1	Planta de nogal in vitro
Proceso	3	3	3	Introducción de material in vitro, Establecimiento de material de importación, Protocolo de micropropagación de nogal in vitro.
Servicio	0	0	0	



Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	0	
Solicitudes de patente	0	
Intención de patentar	0	
Secreto industrial	0	
Resultado no patentable	1	
Resultado interés público	0	

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	0	
Generación nuevos proyectos	1	Se prevé la continuidad de las actividades de manera privada o con apoyo de fondo público, para finalmente superar el hito crítico no logrado hasta entonces, y obtener las plantas terminadas de nogal comercialmente atractivas para este mercado.

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (Citas, título, descripción)
Publicaciones	0	
Eventos de divulgación científica	1	Participación en el Seminario Internacional del Nogal "Desafíos e Innovación en la Producción del Nogal", realizado el día 21 de junio de 2012 con la charla de "Propagación in vitro" inicialmente programada a ser realizada por don Alejandro Navarro, y finalmente expuesto por don Pablo Riesco, en su representación. Pablo Riesco es Gerente de Multiflora Casablanca, laboratorio con el cual realizamos actividades en conjunto para la ejecución del presente proyecto.
Integración a redes de investigación	0	

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	0	
Tesis postgrado	0	
Pasantías	0	
Cursos de capacitación	0	



7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales: no se presentaron problemas.
- Administrativos: no se presentaron problemas.
- Gestión: no se presentaron problemas.
- Técnicos:
 - Establecimiento de material: los resultados esperados inicialmente para esta etapa no fueron obtenidos para todas las variedades. Sobre todo en la variedad Chandler, las mermas por fenolización del medio fueron importantes. La variedad con mejores resultados fue la Serr. Se recomienda hacer un cambio de medio de las yemas introducidas cada 7 días para lavar los fenoles.
 - Importaciones: en la mayoría de las importaciones realizadas, el material no ingresó en condiciones óptimas, viniendo en contenedores con tapas rotas, o medio licuado, un pobre crecimiento in vitro o con patógenos como hongos y bacterias. Estos inconvenientes se deben enfrentar realizando una meticulosa selección de la calidad de material inicial para dar pie a un programa sano de propagación in vitro y continuar con estas clasificaciones en adelante.
 - Enraizamiento: a pesar de trabajar con material sano y de calidad, los explantes vitro que fueron expuestos a inducción al enraizamiento finalmente no generaron plantas posibles de aclimatar en invernadero. Este por tanto continúa siendo el hito crítico de este proceso de propagación clonal. Se prevé continuar con ensayos de técnicas y dosis de reguladores IBA distintos a los utilizados durante este proyecto, frente a los resultados obtenidos de escaso enraizamiento y posterior pérdida del material.

8. Otros Aspectos de Interés

No se destacan otros aspectos de interés más que los ya mencionados en el desarrollo del informe.

9. Conclusiones y Recomendaciones:

Luego de finalizado este período, y sin obtener las plantas de nogales esperadas dentro del plazo de vigencia del proyecto, hemos de continuar de manera privada con los ensayos y evaluaciones necesarias para superar el hito crítico de esta producción, el enraizamiento de los explantes que fueron exitosamente propagados in vitro.

Se augura con seguridad un futuro para la venta de los portainjertos Vlach clonales que esperamos obtener como producto final, entregando a clientes una planta de calidad y que otorgue a sus huertos uniformidad, productividad, y sobrevivencia en



suelos con riesgo de anegamiento, nematodos y riesgo de patógenos del suelo como phytophthora.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

En Agosto de 2012 se desarrolló la charla sobre Propagación in vitro del nogal, dentro del marco del Seminario "Desafíos e Innovación en la Producción de Nogal". A esta charla fue invitado a participar como expositor don Alejandro Navarro, no obstante y debido a pormenores, no logró estar presente en dicha actividad, por lo que se tomó en común acuerdo con Multiflora Casablanca que la exposición en su representación la realizara don Pablo Riesco, quien es Gerente de este laboratorio y con quienes desarrollamos algunas actividades de propagación de nogales correspondientes a este proyecto.

Invitación a Seminario



Nilo Covacevich Concha, Director Regional del Centro de Investigación Agropecuaria, INIA Rayentué tiene el agrado de invitar a usted al Seminario Internacional, "Desafíos e Innovación en la Producción del Nogal", que se realizará los días 21, 22 y 23 de agosto de 2012, desde las 09.00 horas, en el Club de Golf Los Lirios, ubicado en Rancagua



Rengo, julio 2012



PROGRAMA TENTATIVO DE SEMINARIO INTERNACIONAL DEL NOGAL

20 de junio

08:45 **Inscripciones**

09:00 **Saludo autoridades**

9:15 **Situación de la Industria del nogal en el mundo.** Damiano Avanzato

10:30 **Café**

11:00 **Situación de la Industria en Argentina.** Luís Iannamico

12:00 **Situación de la Industria en Chile.** Arturo Campos

13:00 **Almuerzo**

14:00 **Propagación del nogal.** Visión europea: Neus Aletà

15:00 **Propagación "in vitro" del nogal en Chile.** Alejandro Navarro

16:00 **Café**

16:30 **Por definir**

17:00 **Mesa Redonda**

21 de junio

09:00 **Aspectos de manejo del nogal en Europa.** Neus Aletà; Damiano Avanzato

10:00 **Aspectos de manejo del nogal en Argentina y Chile.** Luís Iannamico; Gamalier Lemus

11:00 **Café**

11:20 **Enfermedades del nogal.** Blacaluz Pinilla

12:20 **Plagas del nogal.** Renato Ripa

13:20 **Almuerzo**

14:30 **Cosecha mecanizada de la nuez.** Leonardo Witting

15:15 **Secado de nueces:** Jaime Espinoza; Ernesto Fuenzalida

16:00 **Café**

16:30 **Por definir**

17:00 **mesa redonda**

22 de Junio

08:30 **Conducción y Poda del nogal.** Charla y práctica en terreno. Neus Aletà, Luís Iannamico; Damiano Avanzato; Gamalier Lemus

12:00 **Clausura.** Autoridades INIA- Rayentué.



Programa Final del seminario.

Desafíos Innovación EN LA Producción DEL Nogal



SEMINARIO INTERNACIONAL

PROGRAMA

MARTES 21 DE AGOSTO 2012

- 08:30 - 09:00 Hrs.: **Inscripciones**
- 09:00 - 09:30 Hrs.: **Saludo autoridades**
- 09:30 - 10:30 Hrs.: **"Situación de la Industria del nogal en el mundo"**
Damiano Avanzato, Senior Researcher Istituto Sperimentale per la Frutticoltura di Roma.
- 10:30 - 11:00 Hrs.: **Café**
- 11:00 - 12:00 Hrs.: **"Situación de la Industria en Argentina"**
Luis Iannamico, Ingeniero Agrónomo, Coordinador del Sub-Programa Frutos Secos, Programa Nacional de Fruticultura del INTA, Argentina.
- 12:00 - 13:00 Hrs.: **"Situación económica de la Industria en Chile"**
Arturo Campos, Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Economía Agraria, Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA.
- 13:00 - 14:00 Hrs.: **Almuerzo**
- 14:00 - 15:00 Hrs.: **"Propagación del nogal". Visión europea**
Neus Aletà, Directora del subprograma agroforestal, IRTA, España
- 15:00 - 16:00 Hrs.: **"Portainjertos clonales de nogal, una alternativa para Chile"**
Pablo Riesco, Ingeniero Agrónomo, Gerente General laboratorio vitro Multiflora - Casablanca.



V. ANEXOS

V.1. Protocolo de desinfección utilizado

Protocolo Viverosur

- a. Cortar el material herbáceo de temporada, prefiriendo el tercio final sin incluir la yema apical.
- b. Trozar el material en yemas individuales, realizar un lavado con lavalozas comercial por 20 minutos, en agitador magnético adicionando 1 ml por lt de hipoclorito de sodio.
- c. Retirar el lavalozas y cloro colocando las yemas en un colador puesto en la llave de agua.
- d. Desinfectar con Phyton (fungicida-bactericida) en agitador magnético por 20 minutos.
- e. Retirar el exceso de Phyton con agua esterilizada.
- f. Llevar las yemas a cámara de flujo laminar y realizar una desinfección con hipoclorito de sodio al 5% en agua esterilizada, por 8 minutos.
- g. Efectuar 2 enjuagues con agua estéril.
- h. Enjuagar con antioxidantes, 400 mg/Lt de ácido cítrico y 400 mg/Lt de ácido ascórbico en agua esterilizada.
- i. Las yemas son plantadas en medio 13 (DKW + 0,1 mg/L de IBA + 1 mg/Lt de BAP).



V.2. Medio de propagación DKW modificado

DKW base

Nitrato de calcio: 1.900 mg/Lt

Sulfato de magnesio: 700 mg/Lt

Quelato de fierro: 100 mg/Lt

BAP: 1 mg/Lt

IBA: 0.1 mg/Lt

EL MATERIAL DE PRUNUS FORMARA PLANTEL DE PLANTAS MADRES DE PPV		NO	☐	SI	☐	indicar si es positivo
ESPECIE						
CLÓN/VARIEDAD						
NOTA: Para este propósito se debe cumplir con la normativa vigente de PPV						