

27 OCT. 2005

3928 14:23

INFORME TECNICO FINAL

EJECUTOR: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS,
INIA CRI QUILAMAPU.

NOMBRE DEL PROYECTO: EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DEL USO DE LA TÉCNICA
DE INMERSIÓN TEMPORAL EN BIOREACTORES PARA
MEJORAR LA EFICIENCIA DE LA MICROPROPAGACIÓN EN
ESPECIES ANUALES, FRUTALES Y VIDES.

CODIGO: BIOT-01-A-17.

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: 2001 - 2005.

**NOMBRE Y FIRMA
COORDINADOR PROYECTO:** OSCAR MARIO PAREDES C.



USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCIÓN	

Participantes

Investigadores

- ❖ Mario Paredes C., Ing. Agrónomo, Ph.D. Coordinador del Proyecto, INIA.
- ❖ Marcela Zúñiga, Ing. Agrónomo, Coordinadora alterna proyecto, Hortifrut.
- ❖ Rodrigo Avilés, Ing. Civil Ind. Coordinador alterno, INIA.
- ❖ Viviana Becerra, Ing. Agrónomo, M.Sc. Investigadora Genética/Biotecnología, INIA
- ❖ Carmen Rojo, Ing. Agrónomo, Biotecnología, INIA

Asesores Internacionales

- ❖ Dagoberto Castro, Ing. Agrónomo, Ph.D. Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Medellín, Colombia.
- ❖ Róduo Rodón, Ing. Electrónico, Ph.D. Empresa BDC Intemacional, Bélgica.

Asesores Nacionales

- ❖ José Santos Rojas, Ing. Agron. Ph.D. Mejoramiento y producción de semilla de papa.
- ❖ Arturo Lavín, Ing. Agron. Mejoramiento y agronomía Vid.
- ❖ Nicole Hewstone, Ing. Agron. Ph.D. Cultivo *in vitro* vid.

Ayudantes de Investigación

- ❖ Uberlinda Luengo, INIA Quilamapu.
- ❖ Conna Rosales, Hortifrut.
- ❖ Excel Orrego, Hortifrut.
- ❖ Patricia Catalán, INIA Remehue, C.E. La Pampa.
- ❖ Claudia Baeza, INIA Remehue, C.E. La Pampa.
- ❖ Isella Escudero, INIA La Platina.
- ❖ Personal Empresa Sone.

Técnico Eléctrico

- ❖ Juan Gatica, INIA Quilamapu.

CONTENIDO

ANTECEDENTES GENERALES	1
A. Identificación del problema a resolver	1
B. Factores que inciden en la multiplicación en el SIT	3
C. Certificación genética-molecular del material micropopagado	5
E. Literatura Citada	7
PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE ARÁNDANO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES.	
I. INTRODUCCION	10
a) Importancia	10
b) Objetivos	12
II. DESARROLLO DEL PROYECTO	12
A. Ubicación de la unidad de trabajo	12
B. Material vegetal	13
C. Micropropagación convencional	13
1. Multiplicación de los brotes	13
a) Establecimiento de los brotes	13
b) Multiplicación de los brotes	13
2. Multiplicación en medios líquidos	13
a) Evaluación de concentraciones de amonio	14
b) Evaluación de volúmenes de medio	15
3. Uso de brotes uni y trinodales	16
D. Multiplicación de brotes en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT)	17
1. Frecuencias y tiempos de inmersión	17
2. Elongación de los brotes	19
a) Uso de giberelina	19
b) Tiempo de inmersión y dosis de AIB	23
3. Volumen de medio y número de explantes	25
4. Enraizamiento y aclimatación	26
5. Escalamiento productivo	27
6. Aplicación de CO ₂	29
E. Conclusiones	30
F. Recomendaciones	31
PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE VID A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES	
I. INTRODUCCION	32
1. Importancia	32
2. Objetivos	33
II. DESARROLLO DEL PROYECTO	34
A. Ubicación de la unidad de trabajo	34
B. Material vegetal	34
C. Micropropagación convencional	34
1. Multiplicación de los brotes	34
a) Establecimiento <i>in vitro</i>	34
b) Establecimiento de plantas madres	36

2. Micropropagación en medios líquidos	36
a) Medio basal	37
b) Concentraciones de amonio	37
c) Volúmenes de medio	38
D. Multiplicación de brotes en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT)	38
1. Frecuencia y tiempo de inmersión	38
2. Volúmenes de medio y número de explantes	43
3. Proliferación	44
a) Efecto del paclobutrazol (PBZ)	44
b) BAP y paclobutrazol (PBZ)	45
c) BAP	46
4. Aplicación de CO ₂	47
5. Enraizamiento y aclimatación	48
E. Conclusiones	49
F. Recomendaciones	49

PRODUCCIÓN DE PLANTAS Y MICROTUBÉRCULOS-SEMILLA DE PAPA A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES.

I. INTRODUCCIÓN	51
1. Importancia de la papa en Chile	51
2. Objetivos	52
II. ETAPAS EN LA PRODUCCIÓN DE TUBÉRCULO-SEMILLA	53
III. DESARROLLO DEL PROYECTO	54
A. Ubicación de las unidades de trabajo	54
B. Material vegetal	54
C. Micropropagación convencional	55
1. Multiplicación de brotes	55
a) Establecimiento <i>in vitro</i>	55
b) Desinfección de las yemas	55
c) Extracción de los meristemas	55
d) Multiplicación de los brotes	55
e) Envío de brotes a INIA Quilmapu	56
2. Multiplicación en medios líquidos	56
a) Concentraciones de amonio	56
b) Volúmenes de medio	58
3. Microtuberización en papas	60
a) Dosis de sacarosa	61
b) Concentraciones de BAP	62
D. Micropropagación en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT)	63
1. Multiplicación de brotes	63
a) Frecuencia y tiempo de inmersión	63
b) Volúmenes de medio y número de explantes	66
c) Aplicación de CO ₂	68
2. Microtuberización	69
a) Variedad, tiempo de multiplicación y volumen de medio	69
b) Variedades, dosis de BAP y tiempo de cosecha	70
i) Tiempo de multiplicación de brotes a 40 días y volumen de medio de 250mL	71
ii) Tiempo de multiplicación de brotes a 40 días y volumen de medio de 500mL	71
iii) Tiempo de multiplicación de brotes a 60 días y volumen de medio de 250mL	72
iv) Tiempo de multiplicación de brotes a 60 días y volumen de medio de 500mL	73

c) Sistemas de producción de microtubérculos por variedad	74
i) Producción de Desirée con 40 días de multiplicación de brotes	74
ii) Producción de Desirée con 60 días de multiplicación de brotes	74
iii) Producción de Shepody con 40 días de multiplicación de brotes	75
iv) Producción de Shepody con 60 días de multiplicación de brotes	76
d) Producción de microtubérculos en invernadero	76
E. Conclusiones	77
F. Recomendaciones	78

IDENTIFICACIÓN VARIETAL Y ESTABILIDAD GENÉTICA EN EL PROCESO DE MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS EN EL SIT A TRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES

I. IDENTIFICACIÓN VARIETAL	69
II. ESTABILIDAD GENÉTICA	80
1. Causas genéticas de la variación somaclonal	80
2. Origen de la variación somaclonal	81
3. Métodos para examinar identidad y estabilidad genética	81
a) Marcadores morfológicos	81
b) Marcadores moleculares	82
c) Amplificación de ADN al azar (RAPD)	82
III. DESARROLLO DEL PROYECTO	83
A. Materiales y métodos	83
1. Materiales	83
2. Métodos	83
a. Extracción de ADN	83
b. Amplificación al azar polimórfico (RAPD)	83
c. Reacción de amplificación	83
d. Condición de amplificación	84
e. Electroforesis	84
B. Resultados	84
1. Identificación de variedades	84
a. Papa	84
b. Vid	86
c. Arándano	86
2. Estabilidad genética	87
a) Papa	87
b) Vid	88
c) Arándano	89
C. Conclusiones	89
D. Bibliografía	90

EVALUACIÓN ECONÓMICA: COMPARACIÓN ENTRE MICROPROPAGACIÓN CONVENCIONAL Y EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

I. INTRODUCCIÓN	91
II. MATERIALES Y MÉTODOS	91
III. RESULTADOS	92
A) Plantas de vid	93
B) Microtubérculos de papa	93
C) Plantas de arándano	94

D) Conclusiones	95
IV. ANÁLISIS POR ESPECIE	95
A. Plantas de vid	95
B. Microtubérculos de papa	95
C. Plantas de arándano	96
D. Conclusiones	96
DIFUSION Y TRANSFERENCIA TECNOLOGICA	98
A. Actividades técnicas y administrativas	98
B. Reuniones de trabajo	98
C. Presentaciones técnicas del proyecto o sus resultados	98
D. Artículos de divulgación	100
E. Seminarios	100
F. Presentaciones varias	101
G. Reuniones de revisiones y discusión del proyecto	101
CONCLUSIONES	101
ANEXOS	
Anexo 1. Diagrama del sistema de inmersión temporal	103
Anexo 2. Formulario de los medios	104
Anexo 3. Estudio económico	107
Anexo 4. Presentaciones técnicas del proyecto o sus resultados (ver material adjunto)	115

RESUMEN

La micropropagación es un sistema adecuado para masificar la producción de plantas en un corto período. Sin embargo, en nuestro país la micropropagación de plantas no ha tenido la importancia que tiene en otros países desarrollados, como por ejemplo, Estados Unidos, Italia, Cuba y Holanda entre otros, debido al alto costo que alcanzan las plantas producidas por este medio. Por lo tanto, esta tecnología se puede utilizar sólo en aquellas especies y/o variedades que se propagan vegetativamente y que tienen un alto retorno económico. De esta forma, es de imperiosa necesidad evaluar nuevas metodologías que permitan una reducción en los costos de producción para masificar su uso y mejorar la rentabilidad de las empresas que se dedican a la producción de plantas introduciendo por primera vez al país la técnica de inmersión temporal en bioreactores.

El uso del sistema de inmersión temporal en varias especies ha demostrado ser un sistema eficiente, puesto que presenta varias ventajas como por ejemplo un aumento importante en los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación de plantas. Ello a su vez permite una reducción importante en el uso de mano de obra, reactivos, material fungible, niveles de contaminación y manipulación de explantes. Por otro lado, se ha obtenido un aumento importante en las tasas de multiplicación, un mejoramiento del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatización, lo que puede implicar una disminución de los costos de producción de hasta un 50% en comparación con el sistema de micropropagación convencional.

El objetivo general de este proyecto fue determinar la factibilidad de implementar comercialmente la producción de plantas mediante el Sistema de Inmersión Temporal en Bioreactores en tres especies y así mejorar la eficiencia y la rentabilidad de esta actividad.

Los objetivos específicos fueron: a) Evaluar la factibilidad de la micropropagación de las especies en estudio en medios líquidos para su desarrollo en los sistemas de inmersión temporal, b) Determinar los factores que influyen sobre la multiplicación y elongación *in vitro* de vid, arándano y papa en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), tales como: frecuencia y tiempo de inmersión, volumen óptimo de medio de cultivo respecto de la cantidad de explantes, duración de etapas y condiciones ambientales (CO₂), c) Determinar las condiciones óptimas para la tuberización de papa en SIT, tales como: concentraciones

hormonales y nutricionales (BAP y Sacarosa), frecuencia y tiempo de inmersión, volumen medio de cultivo y duración etapa, d) Evaluar el enraizamiento *in vitro*, *ex vitro* y aclimatización simultánea en las especies en estudio, e) Determinación de la estabilidad genética, f) Análisis económico de los sistemas evaluados, g) Implementación y evaluación piloto del SIT en forma comercial al menos en papa y arándano, h) Transferencia de la tecnología generada en el proyecto a los usuarios potenciales a través de publicaciones, seminarios, congresos y charlas técnicas.

Para llevar a cabo el proyecto se utilizarán varias especies modelos como son arándano, vid y papa que representan a un amplio espectro de especies leñosas, semi leñosas y de herbáceas.

Como esta tecnología se iba a utilizar por primera vez en el país, se incorporaron al proyecto a dos asesores internacionales para facilitar la transferencia de la tecnología al país. Estos dos expertos internacionales tenían una amplia experiencia en los requerimientos del equipamiento y en las aplicaciones de esta tecnología a diferentes especies. La transferencia de tecnología se realizó a través de estadías de ambos expertos en los laboratorios involucrados, donde el personal técnico del proyecto interactuó con ellos.

El proyecto se desarrolló en forma conjunta entre INIA y HORTIFRUT, con la posterior incorporación de SONE. En forma operacional el proyecto se realizó en dos Centros Regionales de Investigación del INIA, CRI Quilamapu (Chillán) y en la Empresa Hortifrut-Viveros S.A. (Santiago), con la colaboración de personal profesional del CRI La Platina (Santiago), CRI Raihuén (Talca) y CRI Remehue (Osorno). El desarrollo del proyecto se logró con un amplio equipo de profesionales con experiencia en cultivo *in vitro* y en el uso de marcadores moleculares.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que: a) la Inmersión temporal es un sistema adecuado para multiplicar arándano, vid y papa, b) las plantas de arándano y vid son altamente susceptibles a la multiplicación en medio líquido, por lo cual es muy importante trabajar con frecuencia de inmersión largas y tiempos de inmersión cortos, c) Las plantas de papa no presentaron susceptibilidad a la multiplicación en medios líquidos por lo que se pueden usar frecuencias mas cortas y tiempos mas prolongados que

arándano y vid, d) todas las especies evaluadas presentaron un comportamiento diferencial, por lo que la tecnología debe adaptarse a cada caso, e) la aplicación de CO₂ no modificó sustancialmente la multiplicación de plantas en el SIT, f) el proceso de tuberización en papa es posible de realizar en el SIT, aunque se producen tubérculos muy pequeños, por lo que se recomienda realizar un período de engorda en invernadero, g) el proceso de multiplicación en el SIT no produjo cambios en los patrones genéticos de los partidores de RAPD utilizados para detectar posibles cambios somaclonales en las especies y variedades utilizadas, h) las principales ventajas económicas del SIT se presentaron en la reducción de costo relacionada a mano de obra e insumos. Desde el punto de vista técnico, se presentó una excelente tasa de multiplicación en arándano y una escasa pérdida de plantas durante el proceso de aclimatación.

Las actividades de transferencia se realizaron a través de seminarios, charlas técnicas, presentaciones de trabajos a Congresos nacionales e internacionales y presentaciones en Ferias científicas y tecnológicas. El desarrollo de este proyecto incentivó la presentación de nuevos proyectos y la aplicación de esta tecnología a nuevas especies. La empresa SONE está evaluando la posibilidad de multiplicar arándanos, frambuesa, moras y algunas flores de bulbo. Actualmente, la empresa Bioforest S.A., junto al Laboratorio de Biotecnología de INIA Quilamapu está involucrada en un proyecto donde se está evaluando la posibilidad de usar esta tecnología para multiplicar las dos especies de eucalipto más importantes en el país como son *Eucalyptus globulus* y *E. nitens*.

Para facilitar la presentación de los resultados del proyecto, este trabajo se dividió en varios capítulos temáticos.

ANTECEDENTES GENERALES

A. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

A nivel mundial, la utilización de técnicas de micropropagación ha tenido resultados altamente ventajosos en la propagación rápida, y con calidad de diversas especies de plantas económicamente importantes (Escalona y otros, 1999). Sin embargo, en nuestro país esta actividad está poco desarrollada a nivel comercial, comparada con países desarrollados.

La micropropagación de plantas en nuestro país puede tener cinco grandes aplicaciones prácticas: a) multiplicación rápida y masiva de genotipos elites; b) Limpieza de virus y otros patógenos; c) reducción de los tiempos de cuarentena en el proceso de introducción de plantas con limitaciones cuarentenarias; d) embriogénesis somática y producción comercial de semillas artificiales; y e) propagación rápida y masiva de plantas genéticamente modificadas.

Sin embargo, el sistema de micropropagación convencional presentan algunas limitaciones como: proveer bajos coeficientes de multiplicación, un alto uso de mano de obra y una escasa posibilidad de automatización, lo que redundaría en un alto valor de las plantas producidas por este medio, lo que reduce su uso a aquellos cultivos que se propagan vegetativamente y que por condiciones de mercado poseen un alto retorno económico. Por lo tanto, el uso futuro de esta metodología dependerá de la existencia de nuevas tecnologías (Chu, 1995; Kitto, 1997) que puedan mejorar la eficiencia de los sistemas actuales de micropropagación para reducir sus costos, mejorar la rentabilidad, competitividad de esta actividad y mejorar el acceso de los productores a este tipo de plantas en forma directa o través de la producción de plantas madres certificadas y de alta calidad.

Para enfrentar esta situación, se están desarrollando algunos métodos alternativos que incorporan las ventajas del uso del medio líquido y diferentes grados de automatización al proceso de propagación *in vitro* con el objetivo de reducir los costos de producción de plantas (Aitken-Christie, 1995; Aitken-Christie y Davies, Lorenzo y otros, 1998; 1988;

Pieper y Zimmer, 1976; Roche y otros, 1996; Simonton y otros, 1991; Tiesson y Alvarad, 1995; Tisserat y Vandercook, 1985; Weather y otros, 1988; Ziv y otros, 1998). En el sistema tradicional de micropropagación cada brote se mantiene en frascos individuales los cuales deben transferirse manualmente cada 20 o 30 días a medios nutritivos frescos con el objetivo de evitar el agotamiento, alteración de las concentraciones de los nutrientes y el crecimiento excesivo de los brotes en los frascos individuales (Debergh y otros, 1992). Todo ello significa mantener una gran cantidad de frascos (proporcional al número de plantas producidas), y un número importante de personal para la preparación periódica de medios de cultivo y manejo de los brotes en sus diferentes etapas (establecimiento, multiplicación, elongación y enraizamiento) y subcultivos lo que se traduce en un alto costo.

Dentro de Latinoamérica, Cuba es uno de los pocos países que ha estado preocupado en el desarrollo y aplicación de metodologías que permitan mejorar la eficiencia de los métodos convencionales de propagación. Es así como, desde varios años se vienen realizando diferentes investigaciones usando el Sistema de Inmersión Temporal (SIT, Anexo 1) para producir plantas en varias especies como caña de azúcar (Lorenzo y otros, 1998), piña (Escalona y otros, 1999), banano (Daquinta y otros, 1999) y microtubérculos de papa (Akita y Takayam. 1994; Jiménez y otros, 1998). Otros países que han desarrollado y están usando comercialmente esta tecnología para producir plantas son Estados Unidos, Francia, Holanda, Israel entre otros.

Los resultados obtenidos hasta ahora con el SIT han permitido obtener aumentos importantes en las tasas de multiplicación, una disminución de los costos de producción de hasta un 50% en comparación con el sistema de micropropagación convencional, un mejoramiento del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatización, todos aspectos limitantes en la micropropagación de plantas. Es así como, la sobrevivencia de plantas a la aclimatización en la micropropagación convencional, es una de las etapas más difíciles de superar, a nivel comercial constituye importantes pérdidas, lográndose en general una sobrevivencia de plantas que varía entre un 60-80% dependiendo de la especie y variedad. Dentro de este contexto, los resultados obtenidos con el SIT mejoran porcentajes debido a la obtención de plantas de mejor calidad en las etapas previas a la aclimatización de las plantas. A pesar de esta situación se plantea que posibilidad de trabajar con inyecciones permanentes o temporales de CO₂ al cultivo

podría permitir una mayor sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatización. La inyección de CO₂ durante alguna etapa del cultivo *in vitro* aumenta los niveles de fotosíntesis y disminuye el estrés de la planta (Castro, 2001).

B. FACTORES QUE INCIDEN EN LA MULTIPLICACIÓN EN EL SIT

Si bien es cierto que la técnica de Inmersión Temporal ya se utiliza comercialmente en Cuba y otros países la aplicación de esta tecnología necesita de investigación básica y de ajustes pertinentes a especies de nuestro interés ya que todo el sistema de propagación de plantas es especie-específica.

Entre los problemas a investigar en el sistema de inmersión temporal están: posibilidad de la planta a ser cultivada en medios líquidos, la contaminación del tejido, presencia de vitrificación,; problemas en la remoción de tejido muerto contaminado, posibilidad de variación somaclonal de las plántulas (Aitken-Christie y otros, 1995), frecuencia y tiempo de inmersión, volumen óptimo de medio de cultivo en comparación con la cantidad y número de explantes y duración de la etapa, condiciones hormonales, nutricionales (auxinas y nutrientes) y ambientales (Intensidad luminosa, CO₂) para obtener plantas de buena calidad. (Castro, 2001; Desjardins, 1995; Duves y Vidaver, 1992, Figueira y otros, 1991).

Para el desarrollo de una metodología de micropropagación a través del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) es indispensable que las plantas se puedan propagar en medios de cultivo líquidos, sin que se afecte la calidad de los brotes. Uno de los problemas que limitan el empleo de dichos medios es la hiperhidratación de los brotes, esta hiperhidratación se puede deber principalmente a la concentración de nitrato de amonio y/o a las condiciones ambientales, entre otras (Castro, 2001).

La contaminación causada por bacterias, hongos, levaduras e insectos es un problema mayor en la micropropagación de plantas convencional debido a que la pérdida de explantes aumenta el costo de producción. Esta situación podría ser mas grave en sistemas automatizados debido al manejo de un mayor volumen de plantas al mismo tiempo. Entre los factores más frecuentes de contaminación están: a) los materiales de construcción, b) sellado de válvulas, c) errores del operador, d) problemas del

instrumental, e) contaminación pre-cultivo, y f) insuficiente esterilización de los medios de cultivo y envases (Aitken-Christie y otros, 1995). Para disminuir el riesgo de contaminación se recomienda tomar precauciones extremas, tales como una desinfección permanente del material y evaluación exhaustiva previa al ingreso del material al sistema de propagación.

La vitrificación ocurre generalmente con tejidos que crecen en contacto con medio líquido, algunos tipos de tejidos y particularmente algunas especies son más sensibles al medio líquido que otras (Smith y Spoomer, 1995). Para disminuir este problema se han desarrollado diferentes estrategias: a) adición de retardantes de desarrollo y agentes osmóticos al medio; b) modificación del medio ambiente a través de una mayor aireación en el medio, y c) uso de aparatos adecuados para el crecimiento de diferentes tipos de plantas y tejidos (Hdider y Desjardins, 1993; Ziv, 1991; Ziv y Ariel, 1994).

Frecuencia, tiempo y duración de inmersión y la relación volumen de medio de cultivo y número de explantes determinan en gran medida el coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas producidas en el SIT (Castro, 2001).

Dentro de este proceso de producción de plantas, algunas de las características de la fenotípicas recomendadas y utilizadas para evaluar los factores anteriormente mencionados son: peso fresco, peso seco, relación peso seco/peso fresco, altura o largo de los brotes, contenido de humedad, de clorofila, carotenos, contenido total y libre de fructuosa, dependiendo del tipo de planta (Castro, 2001; Kim et al, 2003; Damiano et al, 2003).

Finalmente, tenemos que considerar que la producción de plantas en un Sistema de Inmersión Temporal debe ser tan buena como aquellas producidas por métodos de micro o macro propagación convencional. Por lo tanto, este proceso de producción de plantas debe contemplar la certificación genética y sanitaria de la calidad de las plantas a nivel de laboratorio e invernadero.

C. CERTIFICACIÓN GENÉTICA-MOLECULAR DEL MATERIAL MICROPROPAGADO.

Una etapa importante durante el proceso de propagación es la necesidad de identificar el material que se desea micropropagar antes y después del proceso. La identificación y estabilidad genética del material propagado se realiza convencionalmente a través del fenotipo, el cual tiene un fuerte componente ambiental y no es efectivo con características que son evaluadas al estado adulto de las plantas.

El SIT es un sistema de micropropagación masivo donde se obtienen altas tasas de multiplicación y donde no se conoce los efectos genéticos que podría este sistema en la producción de plantas de vid, arándano y papa, por lo cual es altamente recomendable incorporar un control de calidad para garantizar la estabilidad e identificación genética del material sometido al SIT.

La inclusión del uso de marcadores moleculares se basa como una medida importante y necesaria para la certificación de la calidad del material micropropagado a través del SIT. Es reconocido en la literatura nacional y mundial que en algunas especies se presente el fenómeno conocido como "variación somaclonal" durante el proceso de micropropagación convencional. Para evitar este problema en muchas especies sometidas a micropropagación se controla el número de subcultivos, medios de cultivo, y otras condiciones para mantener la estabilidad genética del material propagado. La importancia de esta "variación somaclonal" es que puede afectar la integridad genética del material propagado. Otro uso potencial de los marcadores moleculares en la calidad es su uso en la identificación genética del material propagado, especialmente cuando se trabaja con una serie de variedades o clones. Es ampliamente conocido que durante el proceso de micropropagación, por error humano, se pueden cometer errores en el etiquetado e identificación del material. Cualquiera de los problemas mencionados puede ser detectado sólo a nivel molecular.

Actualmente, las metodologías más eficaces para detectar variación somaclonal en leñosas son los marcadores moleculares, ya que ellos detectarían variaciones genéticas a nivel de genotipo. En *Picea mariana* y *P. abies*, se analizaron plantas producidas mediante cultivo *in vitro* con RAPDs, no detectándose ningún tipo de variación (Isabel y

otros, 1993; Fourre y otros, 1997). Sin embargo, en *Populus deltoides* detectaron variación genética en plantas micropropagadas (Rani y otros, 1995).

En Chile la investigación, desarrollo y uso de esta tecnología no existe, en este sentido este es un primer esfuerzo tendiente a explorar su utilización en el país. En esta oportunidad este proyecto aunó los esfuerzos de un grupo de investigadores del INIA y de la empresa privada Hortifrut para aplicar esta tecnología en una serie de especies que fueron seleccionadas como modelos y que pueden servir de base para ampliar el uso de esta tecnología a otras especies de interés agrícola.

La decisión de incluir diversas especies fue un tema discutido ampliamente dentro del equipo de trabajo que participó en el proyecto en conjunto con la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), ya que existía una gran cantidad de posibilidades dada la diversidad de productos que se producen el país. Dentro de este contexto, es conocido también que la micropropagación de plantas es especie - específica y en muchas casos variedad y/o clon- específica, lo que obligó a incluir un reducido número de cultivos. Si bien es cierto el número es reducido, ellos tienen una gran importancia económica para el país como son la vid (especie leñosa), el arándano (arbusto semileñoso) y la papa (anual). Una vez elegidos los cultivos nos enfrentamos a la nula información existente en la literatura acerca del uso del SIT en vid y arándano, pero con alguna información en papa.

A. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

El objetivo general del proyecto fue determinar la factibilidad de implementar a nivel comercial la producción de plantas mediante el uso del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en bioreactores para mejorar la eficiencia y rentabilidad de esta actividad.

E. LITERATURA CITADA

- Aitken-Christie, J.; Kosai, T.; Takayama, Y.S. 1995. Automation in plant tissue culture General introduction and overview. In: J. Aitken-Christie, J.; T. Kosai, M.A.L. Smith (eds). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer. Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands pp. 1-18.
- Akita, M.; Takayam; S. 1994. Simulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semi-continuous liquid medium surface level control. Plant Cell Reports 13: 184-187.
- Castro, D. 2001. Propagación mixotrófica de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en el sistema de inmersión temporal. Tesis Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Avila, Centro de Bioplasmas, Cuba. 31p.
- Chu, I. 1995. Economic analysis of automated micropropagation. In : J. Aitken-Christie, J.; T. Kosai, M.A.L. Smith (eds). Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 19-27.
- Daquinta, M.; Barrera, L.; Lezcano, Y.; Mosqueda, O.; Escalona, M.; Borroto, C.G.1999. Efecto de la oscuridad en la multiplicación *in vitro* de banano FHIA-18 en los sistemas de inmersión temporal. Libro de Reportes Cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. Pp. 185-187.
- Damiano, C.; Monticelli, S., La Starza, S.R. 2003. Temperate fruti propagation through temporary immersion. Proc. XXVI IHC-Biotechnology in Hort. Crop Improvement. In: (eds). F.A. Hammerschlag ; P. Saxena. Acta Hort. 625: 193-200.
- .Debergh, P.C.; Meester, J, De Rieck, J.; Gillis, S.; Van Huylenbroeck, J.M.; Debergh, P.C.; Vanderschaeghe, A. 1996. Mass propagation of *in vitro* plantlets. Chronica Hort. 30: 1-2.
- Desjardin, Y. 1995. Factors affecting CO₂ fixation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology 1:13-25.
- Duves, S.; Vidaver, W. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown *in vitro*. An automated system for measurement of photosynthesis *in vitro*. Physiol. Plant. 84:409-416.
- Escalona, M. Lorenzo, JC.; González, B.; Daquinta, M.; González, JL; Desjardins, Y. y Borroto, CG. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L.Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Rep. 18 (9): 743-7438.
- Figueira, A.; Whipkey, A.; Janick, J. 1991. Increases CO₂ and light promote *in vitro* shoot growth and development of *Theobroma cacao*. J.Amer. Hort. Sci. 116: 585-589.

- Fourre, J; Berger, P.; Niquet, L.; Andre, P. 1997. Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.* 94:159-169.
- Jimenez, E.; Pérez, N.; De Fera, M.; Balboa, R.; Chavez, M.; Capote, A.; Quiala, E.; Barbón, R.; Pérez, J.C. 1998. Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) vars. Desiree y Atlantic) en sistemas de inmersión temporal. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO (Libro de Resúmenes).pp. 108-109.
- Hdider, CH.; Desjardins, Y. 1993. Prevention of shoot vitrification of strawberry micropropagated shoots proliferated on liquid media by new antivitrifying agents. *Can. J. Plant Sci.* 73: 231-235.
- Isabel, N; Tremblay, L.; Michaud, M.; Tremblay, F.; Bousquet, J. 1993. RAPDs as an aid to evaluate the genetic integrity of somatic embryogenesis derived populations of *Picea mariana* (Mill.) B.S.P. *Theor. Appl. Genet.* 86:81-87.
- Kim, S.J., Hahn, E.J.; Peak, K.Y.; Murphy, H.N. 2003. Application of bioreactor culture for large scale production of *chrysantemun* transplants. Proc. XXVI IHC-Biotechnology in Hort. Crop Improvement. In: (eds). F.A. Hammerschlag ; P. Saxena. *Acta Hort.* 625: 187-191.
- Kitto, S. 1997. Commercial micropropagation. *HortScience* 32: 1012-1014
- Lorenzo, J.C.; González, B.; Escalona, M.; Tiesson, C.; Espina, P.; Borroto, C.G. 1998. Sugar cane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 54: 197-200.
- Pieper, W.; Zimmer, K. 1976. A simple, inexpensive apparatus for *in vitro* propagation of tissues. *Gartenbauwissenschaft* 41: 221-224.
- Rani, V.; Parida, A.; Saina, S. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* marsh. *Plant. Cell. Rep.* 14:459-462.
- Roche, T.D.; Long, R.D.; Sayegh, A.J.; Hennerty, M.J. 1996. Commercial-scale photo-autotrophic micropropagation in Irish Agriculture, horticulture and forestry. *Acta Hort* 440: 515-520.
- Simmonton, W.; Robacker, C.; Krueger, S. 1991. A programmable micropropagation apparatus using cycled liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: 211-218.
- Smith, M.A.L.; Spoomer, L.S. 1995. Vessels, gels, liquid media and support systems. In: J. Aitken-Chriestie, T. Kozai.; M.A.L. Smith (Eds.). *Automation and environmental control in plant tissue culture.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Tiesson, C.; Alvarad, D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna (eds) Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 105-109.
- Tisserat, B.; Vandercook, C.E. 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 107-117.
- Weather, P.; Cheetham, R.D.; Giles, K.L. 1988. Dramatic increases in shoot number and length for *Musa*, *Cordyline* and *Nephrolepis* using nutrient mist. *Acta Hort.* 230:19-44.
- Ziv, M. 1991. Quality of micropropagated plants- vitrification. *In vitro Cell. Dev. Biol. -Plant* 27: 64-69
- Ziv, M.; Ariel, T. 1994. Vitrification in relation to stomatal deformation and malfunction in carnation leaves *in vitro*. In: P.J. Lumsden.; J.R. Nicholas, W.J. Davies (eds) Physiology, growth and development of plant in culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp.143-154.
- Ziv, M.; Ronen, G.; Raviv, M. 1998. Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant.* 34:152-158.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE ARÁNDANO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES

I. INTRODUCCIÓN

Entre los berries, el arándano es uno de los principales cultivos. La producción mundial del año 2000 alcanzó las 200.000 tons. Estados Unidos y Canadá representan el mayor centro productor y comercializador en el hemisferio norte.

En Chile el cultivo comercial se inició a mediados de la década de los 80, alcanzando un mayor grado de expansión sólo a partir de los años 90. Otros países productores de arándano en el hemisferio sur son: Argentina, Nueva Zelanda, Australia y Sudáfrica.

Por sus requerimientos climáticos, el cultivo del arándano se ha desarrollado principalmente en las regiones del sur, sin embargo, la búsqueda de cosechas tempranas ha llevado a realizar plantaciones en la zona central y norte del país.

En el país se ha introducido un amplio número de variedades entre las de tipo "Highbush" destacan Elliot, Blue Crop y O'Neal y en Rabbit eye: Premier, Brightwell, Bonitablue. Entre las variedades tempranas de "highbush" adaptadas a las localidades del centro norte del país están O'Neal, Georgia Gem, Early Blue, Patriot, Spartan y Duke.

Según un estudio de la Fundación Chile, los principales costos en el establecimiento del cultivo arándano están las plantas (48%), seguido por el riego (27%), mano de obra (6%), preparación de suelo, fertilizantes y pesticidas (12%) y fletes e imprevistos (7%).

Hortifrut S.A, Empresa exportadora de berries frescos en Chile posee desde 1995 un vivero y un laboratorio de Micropropagación comercial de plantas de berries que incluye: arándano, frambuesa, mora, grosella y zarzaparrilla.

Desde el año 2004 Hortifrut se asoció con Viveros Hijuelas del grupo SONE formando la empresa Viveros Hortifrut Chile S.A que en la actualidad produce un total de 2.500.000 de plantas/año, de las cuales el 50% se producen mediante micropropagación convencional.

En el caso del arándano la planta que se comercializa se produce *in vitro*, se deja crecer un año para luego ser entregada a los productores. En esta especie una planta micropropagada tiene un precio de (US\$ 1,4 -1,5) lo que permite vender plantas producidas *in vitro* a un buen precio. En el caso de la frambuesa y mora, el laboratorio produce mediante micropropagación convencional sólo las plantas madres, éstas son después macropropagadas por brote etiolado, para luego ser vendidas a los productores.

La principal limitante en la producción de plantas, para estas especies es el alto costo de la planta producida a través del sistema de micropropagación convencional, comparado con el menor valor de venta (US\$ 0,15-0,2/planta) y comercialización que tienen estas plantas producidas, por otros medios de propagación. En estas especies, como en otras, la gran ventaja del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) está basado en la reducción de los costos de la planta producida al disminuir fuertemente el gasto en personal, aumentar las tasas de multiplicación y una mejor sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación.

El vivero de esta empresa es el único en nuestro país que esta iniciando un Programa de Certificación de Plantas de Berries supervisado por el Departamento de Semillas del SAG, que incluye la certificación fitosanitaria y varietal. La implementación del Sistema de Inmersión Temporal, además de reducir el costo de producción de plantas mejoraría la eficiencia del programa de Certificación de Plantas, ya que al certificar plantas producidas directamente desde cultivo *in vitro* constituye una gran ventaja comparativa al tener que pasar por una etapa de propagación tradicional. En forma adicional, la producción masiva de plantas certificadas podría incrementar el potencial productivo de las especies lo que redundaría en una mayor competitividad del sector.

La implementación del Sistema de Inmersión Temporal como nueva técnica de micropropagación masiva en berries y como reemplazo al cultivo *in vitro* convencional puede constituir una alternativa viable a la propagación de plantas de alta calidad, asegurar la viabilidad comercial del laboratorio de la empresa en el mediano y largo plazo y asegurar la continuidad del programa de certificación de plantas.

Hortfrut S.A mantiene acuerdos de prueba de nuevas selecciones y variedades de berries con numerosos centros de investigación y universidades a nivel mundial y todas las

nuevas variedades ingresan al país vía cultivo *in vitro* por lo que el contar con el SIT permitirá masificar su uso en forma mas rápida y eficiente.

En el proyecto se eligió la especie *Vaccinium corymbosum* por la importancia que representa el cultivo del arándano en Chile y por la necesidad creciente de reemplazar las variedades cuyas plantas están siendo producidas bajo cultivo *in vitro*.

Objetivo general

Determinar la factibilidad de implementar la producción de plantas de arándano utilizando el Sistema de Inmersión temporal (SIT) en bioreactores para mejorar la eficiencia y disminuir los costos de producción de plantas micropropagadas.

Objetivos específicos

1. Evaluar la multiplicación de plantas en medios líquidos
2. Determinar los factores que afectan la producción de plantas en el SIT
3. Determinar estabilidad genética material propagado en el SIT
4. Realizar un análisis económico del SIT y sistema convencional
5. Difundir y transferir la tecnología a los usuarios

II. DESARROLLO DEL PROYECTO

A. Ubicación de la unidad de trabajo

La masificación de brotes de arándanos y el desarrollo del proyecto se realizó en el Laboratorio de Micropropagación de Hortifrut. Debido a una asociación comercial entre la empresa Hortifrut y Viveros Hijuelas del grupo Sone, Hortifrut dejó de producir las plantas arándano, tarea que se empezó a realizar en el laboratorio Sone desde mediados del 2004. Para este efecto se trasladaron todas las instalaciones desde el laboratorio de Hortifrut (Santiago) a SONE (Hijuelas) siendo la última etapa del proyecto realizada en este laboratorio. Después del traslado de los equipos, personal de INIA Quilamapu supervisó y verificó el funcionamiento del equipo en Sone.

El material producido por ambas empresas sirvió de base para desarrollar las actividades de investigación planteadas en el proyecto.

B. Material Vegetal

En una primera etapa del proyecto se seleccionaron tres variedades de arándano en base a la importancia comercial de ellas en el país. La primera fue la variedad O'Neal, variedad temprana de mayor importancia comercial en la zona centro norte. La segunda fue la variedad Duke de buena adaptación a la zona centro-sur y la variedad Elliot, de cosecha tardía y de gran relevancia en la zona sur. En la etapa final del proyecto, se trabajó también con Aurora, variedad de reciente introducción desde la Universidad del Estado de Michigan, EE.UU., que reemplazará en el futuro a la variedad Elliot.

C. Micropropagación convencional

1. Multiplicación de brotes

a) Establecimiento de los brotes

El laboratorio de Hortifrut seleccionó y masificó el material a partir de variedades comerciales y cuyos protocolos de desinfección e introducción de meristemas estaban definidos (Anexo 2).

b) Multiplicación de los brotes

Para la multiplicación de los brotes se utilizó el medio WPM (Woody Plant Médium, Anexo 1) con subcultivos cada 60 días. Las tasas de multiplicación del laboratorio fueron de 3 a 4 cada 60 días para las tres variedades utilizadas.

2. Multiplicación de brotes en medios líquidos

El primer desafío que presentó el proyecto fue evaluar la factibilidad de realizar la multiplicación de brotes de arándano en medios de cultivos líquidos, ya que el sistema de inmersión temporal utiliza este sistema de cultivo.

La revisión de la literatura y la recomendación del asesor internacional Dr. Dagoberto Castro fue iniciar este trabajo con algunos ensayos preliminares para evaluar la susceptibilidad del arándano al medio líquido, para lo cual se planificaron dos tipos de ensayos:

- a) Evaluación de diferentes concentraciones de amonio
- b) Evaluación de diferentes volúmenes de medio de cultivo

a) Evaluación de diferentes concentraciones de amonio.

La literatura indica que la concentración de amonio en el medio puede influir en el grado de hiperhidricidad del tejido en medios líquidos. Por tal motivo, se establecieron ensayos tendientes a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de nitrato de amonio, tomando como base un porcentaje de la concentración normalmente usada en el medio basal y sin utilización de agentes gelificantes. Es así como se seleccionaron tres tratamientos en medio líquido con dosis de nitrato de amonio, equivalentes a: 0% (sin nitrato de amonio), 50% del medio basal (200mg/L) y 100% del medio basal (400mg/L) en tres variedades de arándano (O'Neal, Duke y Elliot). El medio basal utilizado fue el WPM, en tres subcultivos.

El primer subcultivo se evaluó a los 35 días. Se incluyeron 30 explantes por repetición.

En el primer subcultivo se evaluó el número de explantes sanos, número de explantes vivos, tasa de multiplicación y número de brotes por explantes. En el primer subcultivo de este ensayo se utilizaron explantes nodales (1 nudo), pues es la unidad de subcultivo que el laboratorio utiliza en forma tradicional. El segundo subcultivo se evaluó a los 20 días a fin de tener una comparación con los otros cultivos (vid y papa) evaluados en el proyecto, que se subcultivan normalmente cada 21 días.

Resultados

Los brotes de arándano presentaron una alta susceptibilidad al medio líquido, lo que implicó que prácticamente un 100% de las hojas y brotes que estuvieron en contacto con

el medio líquido por un período largo se oxidaron completamente, comportamiento similar a los obtenidos en los otros ensayos realizados en medios líquidos.

b) Evaluación de diferentes volúmenes de medio

La información disponible indicó que el volumen del medio de cultivo podría influir directamente en el crecimiento y desarrollo de los brotes. Para abordar este factor se realizó un ensayo con tres tratamientos: 10cc, 20cc y 30cc de medio por frasco en 3 variedades de arándano (O'Neal, Duke y Elliot) en tres subcultivos. El medio basal de cultivo fue el WPM, sin agar y con el 100% de concentración de Nitrato de Amonio ya que la oxidación del tejido fue generalizada en el ensayo de evaluación de concentraciones de amonio. La unidad experimental fue un frasco con 10 explantes trinodales. Se utilizaron 10 repeticiones y 30 explantes/repetición.

En este ensayo, el primer subcultivo se realizó a los 20 días, pero el segundo y tercer subcultivo se evaluó a los 35 días, ya que se demostró que en esta especie es más conveniente subcultivar cada 35 días por su menor velocidad de crecimiento en relación con los otros cultivos utilizados en el proyecto.

El tamaño de frasco utilizado fue de 5,3 cm de diámetro y 11cm de alto. De acuerdo a este tamaño de frasco los explantes estuvieron semi- sumergidos en el tratamiento de 10 mL (7 mm de altura de líquido) y sumergidos con los volúmenes de 20mL (12 mm de altura de medio) y 30 mL (16 mm de altura), respectivamente.

En este ensayo se evaluó: número de brotes sanos e hiperhidratados, longitud de brotes y relación entre peso verde y peso seco en los 3 subcutivos.

Resultados

Los resultados de los ensayos de diferentes volúmenes de medio confirmaron los resultados anteriores, (diferentes concentraciones de amonio) es decir, el arándano presenta una alta susceptibilidad al contacto directo con el medio líquido por un período largo, independiente del volumen de medio utilizado., lo que implicó una fuerte oxidación y necrosis (muerte) del tejido. Prácticamente el 100% de los brotes se oxidaron al estar en contacto directo con el medio líquido.

3. Uso de brotes uninodales y trinodales

Antecedentes obtenidos en otras especies indican que el uso de explantes de mayor tamaño permite acortar y facilitar el trabajo de multiplicación en el SIT. Basado en esta información se planificó un ensayo tendiente a evaluar el efecto del tamaño de los brotes en arándano en su crecimiento y desarrollo, utilizando medio líquido. Para realizar esta evaluación se seleccionaron explantes uninodales y trinodales en las tres variedades de arándano.

Resultados

El porcentaje de brotes sanos, hiperhidratados, longitud de los brotes en el segundo y tercer subcultivo utilizando explantes uninodales fue similar a los obtenidos cuando se utilizó explantes trinodales, aunque se presentó un problema práctico con los brotes uninodales por su reducido tamaño. Este problema consistió en que los brotes uninodales pasaban a través de las maderas junto con el medio líquido de un contenedor a otro, lo que implicaba un contacto permanente con el medio líquido y no una inmersión temporal de los brotes. Esta situación fue solucionada colocando al final de las maderas del contenedor con brotes un género (gasa) que permitiera solo el paso del medio líquido de un contenedor a otro y no de los brotes. Sin embargo, el uso de brotes uninodales podría ser una alternativa de multiplicación cuando exista la necesidad de multiplicar una determinada variedad en forma más rápida, al contar con un mayor número de brotes al iniciar el proceso de multiplicación.

Los resultados obtenidos en este ensayo indicaron también que se presentó un alto porcentaje de oxidación en el tejido que estaba en contacto directo con el medio líquido, como sucedió en los ensayos anteriores.

Los resultados obtenidos en los tres tipos de ensayos evaluados en medios líquidos indicaron que: a) los brotes de arándanos son muy susceptibles al contacto con el medio líquido; y b) se observó también que el nuevo crecimiento de las yemas, que no estuvo en contacto directo con el medio líquido, presentó un color verde, aparentemente normal. Esta situación indicó que el arándano podría multiplicarse en el SIT siempre y cuando el medio líquido estuviera en contacto con los brotes por un período muy corto de tiempo, lo que obligará en los ensayos posteriores a regular adecuadamente la frecuencia, tiempo y duración de inmersión de los brotes al medio líquido.

D. Multiplicación de brotes en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

De acuerdo a la información obtenida en los experimentos de multiplicación en medios líquidos mencionados anteriormente y en el sistema de inmersión temporal en vid realizado en INIA Quilmapu, se recomendó a HORTIFRUT realizar los ensayos en SIT de arándano utilizando las frecuencias de 18 y 24 horas y el tiempo de inmersión de 1 y 3 min para evitar los problemas de oxidación del tejido al estar en contacto directo con el medio líquido por un período más largo.

El tipo de explante utilizado en estos experimentos fue trinodal, para evitar los problemas prácticos mencionados anteriormente. Como los brotes obtenidos en SIT hasta este momento no habían logrado también una longitud adecuada para salir a la etapa de aclimatación, durante este período se establecieron también varios ensayos preliminares cuyo objetivo principal fue evaluar el efecto de diferentes dosis de giberelina (GA_3) y auxinas en la elongación de los brotes de arándano y su relación con las frecuencias y tiempos de inmersión utilizadas.

1. Frecuencias y tiempos de inmersión

En una primera etapa, se evaluó la frecuencia de inmersión de 18 y 24 horas y con un tiempo de inmersión de 3 min. El medio utilizado fue el WPM, sin agar y el volumen del

medio fue de 250 mL con 40 explantes trinodales por repetición y tres repeticiones. El período de evaluación fue de 42 días con un cambio de medio (subcultivo) a los 21 días.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes y hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

Los resultados obtenidos en SIT indicaron que las tres variedades evaluadas presentaron un comportamiento diferente: a) La variedad Elliot presentó en promedio sólo 17% de los brotes originales sanos, sin oxidación; la variedad Duke tuvo un buen desarrollo, pero presentó una coloración rojiza; y la variedad O'Neal mantuvo sus características normales de desarrollo; b) Las tasas de multiplicación obtenidas en la variedad O'Neal fueron altísimas en comparación con la micropropagación convencional. Considerando los 40 explantes trinodales iniciales, en 42 días de cultivo se desarrollaron 1722 brotes (Cuadro 1), vale decir, se tuvo una tasa de multiplicación de 43 en comparación con la tasa de multiplicación en la micropropagación convencional, donde obtiene, normalmente, una tasa de multiplicación de 4-5 cada 60 días.

Cuadro 1. Efecto de la frecuencia de inmersión en la producción, largo y peso de los brotes. Tiempo de Inmersión 3 minutos. 250mL de medio. 40 explantes trinodales iniciales.

Variedad	Frecuencia (hr)	Brote		
		Total	Largo (mm)	P. seco (gr)
Elliot	18	208	9,34	0,69
	24	220	3,56	0,67
O'Neal	18	1.940	4,64	1,67
	24	1.722	6,67	1,42
Duke	18	1.720	3,39	2,15
	24	1.495	3,73	2,59

Los resultados obtenidos indican que las tasas de multiplicación obtenidas fueron extraordinariamente altas, siendo en algunos casos 10 veces superior a las obtenidas en el sistema convencional. Se observó también una respuesta diferencial de las variedades.

Con ambas frecuencias (18 y 24 horas), las variedades Duke y O'Neal produjeron el mayor número de brotes en comparación a Elliot.

La alta tasa de multiplicación obtenida en las variedades O'Neal y Elliot contrastó con la baja longitud de los brotes desarrollados. La altura mínima de una planta para pasar a la etapa de enraizamiento y aclimatación debe ser de 20 mm y en el cuadro 1 se observa que el 100% de las brotes obtenidas en el SIT no llegaron a la altura mínima requerida para pasar a la etapa de enraizamiento, Este tamaño de brote indicó que era necesario incluir una etapa de elongación para alcanzar el tamaño mínimo requerido para el enraizamiento de los brotes.

2.- Elongación de los brotes

a) Uso de giberelina

La primera aproximación para solucionar el problema del tamaño reducido de los brotes fue evaluar el efecto de la giberelina en sistema *in vitro* convencional. Lo anterior se realizó adicionando a brotes que estaban en cultivo *in vitro* convencional 2 mL de giberelina a cada frasco. Los frascos utilizados fueron de 150 cc y contenían 30cc medio gelificado.

Se evaluaron 3 dosis 0,1; 0,5 y 1 mg/L de GA3 y en las 3 variedades y al término del ensayo se evaluó el largo de los brotes.

Resultados

Los resultados obtenidos indicaron un efecto positivo pero no significativo a la adición de giberelina al medio sólo en las variedades O'Neal y Duke, las cuales se adaptan mejor al proceso de multiplicación en el SIT. En estas variedades la dosis de giberelina de 0.5 mg/L aumentó sólo levemente la longitud de los brotes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del uso de giberelina en la elongación de explantes de arándano en micropropagación convencional.

Variedad	Dosis GA ₃ (mg/L)	Largo de brotes (mm)
Elliot	0,1	5,8
	0,5	6,7
	1	7,1
Testigo	0	9,0
O' Neal	0,1	12,5
	0,5	15,7
	1	13,2
Testigo	0	13,4
Duke	0,1	7,9
	0,5	10,1
	1	7,9
Testigo	0	8,4

Aparentemente, las dosis estudiadas de GA₃ fueron insuficientes para producir brotes de un tamaño superior a 2 cm, considerado el tamaño adecuado, para la multiplicación de arándanos (Cuadro 2).

Como la dosis que tuvo mejor efecto en este ensayo preliminar fue la de 0,5 mg/L de GA₃ se decidió estudiar el efecto de esta dosis de giberelina en el SIT. En este caso, se estudiaron 2 frecuencias de inmersión, 18 y 24 horas, con un tiempo de inmersión de 3 minutos. El ensayo tuvo una duración total de 63 días. Los explantes permanecieron 42 días en el medio WPM con un cambio de medio a los 21 días y luego fueron sometidos a 21 días de tratamiento con 0,5mg/L de giberelina (Cuadro 3).

Cuadro 3. Longitud de los brotes (cm), proliferación, peso seco y relación peso seco/peso verde en tres variedades de arándano y dos frecuencias de inmersión y una aplicación de 0,5mg/l de GA₃.

Variedad	Brote			
	Long (cm)	Prol (N°)	P seco (g)	Ps/Pv
Frec (24 hrs)				
Elliot	0.7	101.0	0.63	0.11
O' Neal	1.8	1378.0	3.32	0.12
Duke	0.9	2590.0	3.54	0.10
Frec (18 hrs)				
Elliot	0.7	42.0	1.04	0.27
O' Neal	1.9	1866.0	5.41	0.14
Duke	1.4	1386.0	4.89	0.12

Los resultados de estos ensayos indicaron que el mayor porcentaje de brotes con altura superior a 2 cm se obtuvo en la variedad O'Neal en las frecuencias de 18 y 24 horas. La utilización de 0,5mg/L de GA₃ mejoró el porcentaje de brotes con altura superior a 2 cm de 20,1% a 39,0% y a 36,8% en la variedad O'Neal, con una frecuencia de 18 y 24 horas. Se consideró que dicho porcentaje aún es bajo para pasar a la etapa de enraizamiento y aclimatación desde el punto de vista operacional. En las variedades Duke y Elliot los porcentajes superiores a 2.0cm de longitud fueron aún menores (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de la longitud de brotes en SIT en tres variedades de arándano evaluados en frecuencia 18 y 24 horas con 3 minutos de inmersión con tratamiento de GA₃ 0,5mg/L.

Rango largo de brotes (cm)	Variedades (% de brotes por rango)					
	Duke		Elliot		O Neal	
	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs
0,1-2,0	81,5	95,0	93,0	96,0 %	61,0	63,2
2,1-7,0	18,5	5,0	7,0	4,0	39,0	36,8

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores se estableció un nuevo ensayo donde se evaluaron dosis mayores de GA₃ en diferentes frecuencias y tiempos de inmersión utilizando, en esta oportunidad, sólo la variedad O'Neal. Los resultados obtenidos indicaron que las mayores dosis de GA₃ no lograron aumentar el tamaño de los brotes sobre los 2 cm en ninguna de las frecuencias y tiempos de inmersión (Cuadro 5).

Cuadro 5. Longitud de los brotes (cm), proliferación, peso seco y relación peso seco/peso verde en la variedad O'Neal en dos frecuencias y tiempos de inmersión y dos dosis de GA₃.

Tratamientos		Brote			
Frec/tiempo	GA3 (mg/L)	Long (cm)	Prol (N°)	P seco (g)	Ps/Pv
24 H-5min	3	1.4	3871	6.25	0.14
24 H-5min	2	1.4	3021	4.16	0.07
18 H-1min	3	1.2	1589	4.84	0.13
18 H-1min	2	1.2	233	8.05	0.16

La evaluación de las dos frecuencias y tiempos de inmersión indicó que si bien durante los ensayos se lograron tasas de multiplicación altísimas (40 y 43) para variedades Duke y O'Neal en 18 horas 3 minutos el largo de brotes obtenido sigue siendo bajo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Distribución de la longitud de brotes en SIT en la variedad Duke evaluados en frecuencia 18 horas 1 minuto y 24 horas 5 minutos con diferentes dosis de GA₃.

Rango largo de brotes (cm)	Brotos promedio (%)			
	18 hrs, 1 min		24 hrs, 5 min	
	3 mg/L	2 mg/L	3 mg/L	2 mg/L
0,1-2,0	89,4	88,7	79,8	85,1
2,1-7,0	10,6	11,3	20,2	14,9

Los datos obtenidos indican que la utilización de 3 mg/L de GA₃ mejoró el porcentaje de brotes con altura superior a 2 cm de 9,6 % a 20,2% en la variedad Duke dicho porcentaje sigue siendo considerado bajo para tener una etapa de enraizamiento y aclimatación operacional adecuada.

Al analizar el efecto de la frecuencia de inmersión de 24 y 18 horas en el largo de los brotes indicó que la altura de los brotes sigue siendo un problema a superar. Aunque la variedad Duke presentó un promedio de 4.3 cm y la variedad O Neal un promedio de 2.2 cm, no se presentaron diferencias significativas entre 18 y 24 horas en el largo de los brotes. A pesar de esta situación, los coeficientes de multiplicación obtenidos siguen siendo altos en las tres variedades (Cuadro 7).

Cuadro 7. Longitud de los brotes (cm), proliferación, peso seco y relación peso seco/peso verde en tres variedades de arándano en dos frecuencias y tiempos de inmersión.

Tratamiento	Brote			
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
Variedad				
Elliot	1.3b	198.5c	1.47b	0.16a
O' Neal	2.2b	351.4b	1.74b	0.14b
Duke	4.3a	791.4a	2.39a	0.12c
Frecuencia (Hrs)				
18-5	3.1a	498.2a	1.48b	0.15a
18-1	1.9a	392.8a	2.26a	0.12b
24-5	2.4a	365.8a	2.22a	0.13b
24-1	3.0a	531.5a	1.62ab	0.17a

El análisis del porcentaje del largo de brotes obtenidos en el ensayo indicó que el mayor porcentaje de brotes que cumplen con la altura mínima requerida se obtuvo en la variedad O'Neal y con una frecuencia de 24 horas. Este porcentaje fue de un 20,1% del total de los brotes producidos (Cuadro 8). Este porcentaje fue considerado bajo, por lo que fue necesario incluir una etapa de elongación de los brotes para poder ver la posibilidad de aumentar el tamaño de los brotes.

Cuadro 8. Rango del largo de los brotes (cm) en tres variedades de arándano en dos frecuencias de inmersión en SIT.

Rango largo de brotes (cm)	Variedades (% de brotes por rango)					
	Duke		Elliot		O' Neal	
	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs
0,1-2,0	90,4	99	93,0	96,0	86,2	79,9
2,1-4,0	9,6	1,0	7,0	4,0	13,8	20,1

2. Tiempo de inmersión y dosis de AIB

Como el uso de giberelina no logró producir un alto porcentaje de brotes con una altura adecuada para pasar a la etapa de aclimatación, se iniciaron ensayos para evaluar el efecto de la auxina Acido Indol Butírico (IBA) en SIT en la longitud de los brotes.

En esta oportunidad, se consideró necesario evaluar la frecuencia de 24 horas con 5, 3 y 1 min de inmersión en la variedad O'Neal en presencia de AIB (0, 0.5 y 1 mg/L). El medio de cultivo fue igual al utilizado en los ensayos anteriores.

El período de evaluación fue de 63 días, período utilizado en los sistemas convencionales de micropropagación. A los 21 días se realizó cambio de medio y a los 21 días siguientes se cambió el medio usando las diferentes concentraciones de AIB, el ensayo se evaluó a los 21 días siguientes. Se midió la longitud de brotes, proliferación y relación peso seco y verde de los brotes.

Resultados

Los resultados del ensayo indicaron que el tiempo de inmersión influyó en algunas de las variables evaluadas. Por ejemplo, el tiempo de inmersión de 1 min aumentó el largo y peso seco de los brotes. Sin embargo, el tiempo de inmersión de 5 min produjo un peso similar de brotes al tiempo de inmersión de 1 min (Cuadro 9).

Las dosis de IBA no tuvieron un efecto significativo en la longitud de los brotes ni en el peso seco, pero sí en la relación peso seco/peso verde, donde el mayor valor se obtuvo sin la aplicación de IBA (Cuadro 9).

Cuadro 9. Longitud de los brotes (cm), Peso seco (g) y relación peso seco/peso verde de arándanos variedad O'Neal en diferentes tiempos de inmersión (min) y dosis de IBA 0, 0,5 y 1 (mg/L).

Tiempo (min)	Long (cm)	Brote	
		P. seco (g)	Ps/Pv
1	6.4a	0.30a	0.29a
3	4.7b	0.18b	0.27a
5	4.9b	0.29a	0.28a
Dosis IBA (mg/L)			
0	5.4a	0.26a	0.35a
0.5	5.4a	0.22a	0.25b
1	5.4a	0.27a	0.24b

En resumen, la aplicación de giberelina (GA₃) y la auxina (IBA) en forma separada y en combinación con diferentes frecuencias y tiempo de inmersión no tuvieron un efecto significativo en el aumento del largo de los brotes de arándano (mayor a 2 cm),

considerado necesario para un adecuado enraizamiento y aclimatización en forma operacional.

3. Volúmenes de medio y número de explantes

Para evaluar estas variables, se estableció un ensayo con un diseño experimental Completamente al azar en arreglo factorial con 3 volúmenes x 3 números de explantes y 3 repeticiones. El ensayo se realizó con la variedad O'Neal que fue la variedad con una mejor respuesta al SIT. Los tres volúmenes de medio evaluados fueron: 250, 500 y 750mL y los tres números de explantes: 40, 60 y 80. Se utilizaron explantes trinodales.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes, hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

La evaluación del volumen y el número de explantes indicó que el tamaño de los brotes producidos sigue siendo el factor limitante en la micropropagación de arándanos en SIT. En este sentido, ni el volumen, ni el número de explantes influyeron positiva y significativamente sobre el tamaño de éstos. La proliferación en SIT sigue siendo alta en comparación al sistema convencional. La calidad de los brotes medida, con la relación peso seco/peso verde, fue superior con 250 y 500mL y no se vio afectada significativamente por el número de explantes (Cuadro 10).

Cuadro 10. Longitud de los brotes (cm), proliferación, peso seco y relación peso seco/peso verde en la variedad O'Neal en tres volúmenes de medio y tres número de explantes.

Tratamiento	Brote			
	Long (cm)	Prol (N°)	Peso seco (g)	Ps/Pv
Volumen				
250	1.7a	400.4b	1.5b	0.17a
500	1.6a	450.4b	1.6b	0.16ab
750	1.5a	644.3a	2.0a	0.14b
N° explantes				
40	1.6a	415.6b	1.4b	0.15a
60	1.6a	497.4ab	1.6b	0.15a
80	1.6a	631.0a	2.2a	0.16a

El análisis de los datos indicó también que el volumen del medio de 250 mL afectó positivamente a la relación peso seco/peso verde, produciéndose un mayor valor en comparación con 500 y 750 mL (Cuadro 10). Todas las otras variables evaluadas, longitud de brotes, proliferación, peso verde y seco, no fueron afectadas por ninguno de los volúmenes estudiados. Los resultados del número de explantes evaluados indicaron que todos presentaron un comportamiento similar y ninguno de ellos influyó positiva o negativamente las variables evaluadas (Cuadro 10).

Basado en los datos obtenidos anteriormente, la recomendación es utilizar el menor número de explantes evaluados (40) y el menor volumen (250 mL) de medio para multiplicar arándanos.

4.-Enraizamiento y aclimatación

Posterior a cada evaluación los brotes de arándano con altura sobre los 2 cm se fueron traspasando a la etapa de enraizamiento y aclimatación.

Los resultados obtenidos indican que las plantas producidas en Sistema de Inmersión Temporal no presentaron diferencias en el porcentaje enraizamiento y de sobrevivencia en la etapa de aclimatación, independientemente de su procedencia, es decir, del ensayo que provenía. Además, las plantas producidas en SIT presentaron la misma capacidad de enraizamiento y sobrevivencia a la aclimatación que plantas micropropagadas en forma convencional. Sin embargo, las plantas producidas en Sistemas de Inmersión Temporal presentaron en la mayoría de los casos un tallo curvo debido a que los explantes emiten un número alto de plantas desde un mismo nudo. Este crecimiento curvo de las plantas producidas en SIT hace que la plantación y manipulación del material sea más lenta que las plantas producidas en forma convencional que tienen un tallo más recto y son más fáciles de manipular y plantar. La curvatura del tallo en plantas producidas en SIT no representa un problema en el enraizamiento y aclimatación ya que la planta una vez que se aclimata sigue creciendo y desarrollándose en forma normal.

5. Escalamiento productivo

Una vez definida la frecuencia, tiempo de inmersión, la mejor relación número de explantes/volumen de medio, se estableció un ensayo de escalamiento productivo de multiplicación de arándano, variedad O'Neal bajo el SIT, utilizando explantes provenientes de plantas producidas en el SIT.

Para el establecimiento del ensayo se utilizó la frecuencia de inmersión de 24 horas con 80 explantes y 300 mL de medio. En este ensayo se decidió verificar nuevamente el mejor tiempo de inmersión 1, 3 y 5 minutos y la mejor concentración de auxina en el medio WP.

Dado que se habían adquirido nuevos SIT y que se pretendía aplicar la técnica a nivel comercial se montaron 3 experimentos con 12 SIT cada uno, vale decir un total 36 SIT. Este ensayo de escalamiento productivo era el más grande realizado en arándano hasta el momento y para su montaje se emplearon 6 personas.

Lamentablemente, a los 7 días el medio de cultivo comenzó a presentar turbidez, lo que se había estado observando anteriormente, aunque con menor intensidad. Al décimo día los medios estaban completamente turbios y oscuros, lo que significó la pérdida del ensayo. Al ser consultado el asesor internacional del proyecto, éste indicó que la turbidez de los medios es normal en algunos cultivos que se multiplican en el Sistema de Inmersión Temporal, que no era dañino para el crecimiento de los brotes, y solo constituía una acumulación de pigmentos. Esta mayor acumulación de pigmentos en el medio de cultivo se debió a la utilización sucesiva de brotes provenientes del SIT y no del proceso de micropropagación convencional.

Por esta razón, se prefirió introducir nuevamente material a *in vitro* en forma convencional y realizar el ensayo de escalamiento productivo con material nuevo, proveniente de cultivo *in vitro* convencional y no con material proveniente de los SIT.

Mientras se esperaba tener disponible brotes provenientes del cultivo *in vitro* convencional de la variedad O'Neal se establecieron dos ensayos de escalamiento productivo con la

variedad Aurora. Esta variedad de arándano fue producida y liberada recientemente en la Universidad del Estado de Michigan, (EE.UU) e introducida al país por Hortifut. En esta oportunidad se estudió también el efecto de diferentes dosis de la auxina (IBA) en la elongación de los brotes.

Resultado

Los resultados obtenidos indicaron que no existió diferencia significativa entre los tiempos de inmersión (1, 3 y 5min) ni en las dosis de IBA evaluadas en la cinco características evaluadas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Longitud de los brotes (cm), proliferación (N°), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en arándano variedad Aurora con diferentes tiempos de inmersión y dosis de IBA

Tiempo (min)	Brote			
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
1	3.3a	111a	0.78a	0.10a
3	3.4a	107a	0.92a	0.11a
5	3.5a	109a	0.95a	0.11a
IBA (mg/L)				
0	3.2a	98a	0.83a	0.10a
0.5	3.7a	121a	1.10a	0.11a
1	3.2a	95a	0.73a	0.10a

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes al 5%

A pesar de esta situación es importante señalar que con esta variedad y con la dosis de 0,5 mg/l de IBA, aplicado luego de 42 días multiplicación en el SIT y evaluado a los 21 días de su aplicación, se obtuvo un 95% de los brotes sobre 3 cm. En esta oportunidad, la mayor tasa de multiplicación fue de solo 3-4 y los brotes producidos en el SIT presentaron una coloración rojiza.

En resumen, los resultados de este ensayo indicaron que: a) el uso de brotes provenientes del cultivo *in vitro* convencional, permiten obtener un porcentaje mayor de brotes mas largos, aptos para el enraizamiento y aclimatización; b) no hubo una diferencia significativa de los diferentes tiempos de inmersión (1,3, 5min) en el largo de los brotes; c) las dosis de auxina (IBA) no influyó significativamente en el largo de los brotes; y d) las

variedades de arándano presentan un comportamiento diferente al ser cultivadas en el SIT.

6. Escalamiento productivo y aplicación de CO₂

Una vez que se tuvo el material nuevo de la variedad O'Neal introducido a *in vitro* se estableció nuevamente el ensayo de escalamiento productivo con esta variedad. Se utilizó una frecuencia y tiempo de inmersión de 24 horas y 3min con 80 explantes por repetición y 300 mL de medio WP. A los 21 días se realizó un cambio de medio donde los brotes en crecimiento recibieron una inyección de CO₂ durante 1 minuto cada 6 horas y un suplemento de una dosis de 0,5mg/L de IBA al medio. La evaluación se realizó a los 22 días después de la instalación del ensayo. Los datos obtenidos en este ensayo fueron comparados con el tratamiento de 250 mL de volumen de medio y 80 explantes/repetición en el ensayo de volumen de medio, que representó el tratamiento sin inyección de CO₂ (Cuadro 12).

Se evaluó proliferación, peso verde y seco de los brotes y la relación peso seco/peso verde a los 42 días.

Resultados

La comparación de los resultados con y sin CO₂ indicó que la inyección de CO₂ mejoró solo el peso seco y la relación peso seco/peso verde, lo que podría indicar un mejoramiento de la calidad del brote producido. Por otro lado, la inyección del CO₂ no afectó la proliferación ni el peso fresco (Cuadro 12).

Cuadro 12. Proliferación (N°), peso seco, relación peso seco/peso verde de brotes de la variedad O'Neal con y sin inyección de CO₂.

Tratamientos	Brotes		
	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
Con CO2	583.3a	12.5a	0.49a
Sin CO2	473.5a	2.4b	0.18b

Al analizar la distribución del largo de los brotes producidos se puede indicar que aproximadamente el 53,4% de los brotes producidos, es decir, aquellos de tamaño

superior a 2 cm, están en condiciones de pasar a la etapa de enraizamiento al invernadero (Cuadro 13). La diferencia, o sea, el 46,6% de los brotes podrían volver al sistema de inmersión para poder aumentar su tamaño, aumentando la eficiencia del sistema. Al considerar solo el 53,4% de los brotes de tamaño superior a 2 cm, la tasa de multiplicación del ensayo fue de 4. Sin embargo, si se considera la producción total de brotes la tasa de multiplicación es de 7.3. La posibilidad de la utilización de los brotes pequeños en una segunda inmersión temporal debiera ser evaluada próximamente.

Cuadro 13. Distribución del largo de los brotes de la variedad O'Neal con inyección de CO₂.

Total	Distribución largo de brotes (cm)			
	0,1-2,0	2,1-4,0	4,1-6.0	6,1-8.0
584 (N°)	272	164	142	6
100 (%)	46,6	28,1	24,3	1,0

En la variedad O'Neal al combinar el uso de la auxina AIB (0,5mg/lit) y aplicación de CO₂ por 21 días se logra subir el porcentaje de brotes superiores a 2 cm hasta un 54%.

Pese a que se terminó el proyecto el laboratorio seguirá haciendo ensayos combinados con CO₂ y aplicaciones de auxina con la finalidad de aumentar aún más el porcentaje de brotes superiores a 2 cm.

E. Conclusiones

Las variedades de arándano presentan un comportamiento diferente a la multiplicación en el SIT. Las dos variedades que presentaron los mejores resultados son O'Neal y la nueva variedad Aurora

En la variedad O'Neal es factible el uso del SIT en forma comercial obteniendo tasa de multiplicación 5 cada 63 días con plantas de buena calidad para salir a invernadero.

En esta variedad la mejor frecuencia obtenida es de 24 horas y 3 minutos de tiempo de inmersión, trabajando con 80 explantes y 300mL de medio en botellas de 2 litros.

En el SIT la variedad O'Neal debe pasar por una etapa de elongación con auxinas previo a la aclimatación.

Aparentemente, el uso de brotes provenientes del SIT no es el más recomendado para obtener un largo adecuado de brotes para el enraizamiento y aclimatización. Por lo que se recomienda utilizar brotes producidos en el sistema convencional. Este punto necesita de mayores estudios para obtener una mayor seguridad en los resultados.

El porcentaje de enraizamiento y de la aclimatación en esta variedad fue comparable a la de plantas producidas en el sistema de *in vitro* convencional.

La variedad Aurora, presenta también un comportamiento aceptable al ser multiplicada en el SIT, produciéndose un porcentaje alto de brotes aptos para un buen enraizamiento y aclimatación.

Los pasos a seguir en el sistema de multiplicación de arándanos en el SIT son los siguientes:

- a) Producir brotes en medio WP, sistema convencional
- b) Obtener e introducir brotes trinodales al SIT por 42 días, con una frecuencia de 24 horas y un tiempo de 3 min, se incluye un subcultivo a los 21 días.
- c) Cosechar y clasificar los brotes mayores a 2cm.
- a) Enraizar y aclimatizar los brotes mayores a 2 cm.
- b) La necesidad de contar con un período de elongación posterior al período de multiplicación de los brotes pequeños es recomendable en O'Neal, pero no está claro en la variedad Aurora. Este punto necesita mayores estudios.

F. Recomendaciones

1. Evaluar el comportamiento de nuevas variedades para tener un protocolo general
2. Mejorar el protocolo para multiplicar Elliot y Duke
3. Estudiar el origen del oscurecimiento o enturbiamiento de los medios de cultivo
4. Estudiar las causas de la alta variabilidad en la longitud de los brotes obtenidos.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE VID A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES

I. INTRODUCCIÓN

1. Importancia

En las especies leñosas se incluyó la vid por la importancia que tiene en el país y por el mayor desarrollo de las técnicas de micropropagación en esta especie. Por estas razones resultaba interesante evaluar la posibilidad de mejorar su sistema de micropropagación a través del SIT.

El cultivo de la vid se ha basado en el uso de cultivares desarrollados en el extranjero y adaptados a las condiciones nacionales. Sin embargo, desde 1988 se han hecho esfuerzos por desarrollar un programa de mejoramiento genético para la obtención de variedades chilenas. Si bien se han obtenido selecciones promisorias, la introducción de variedades desde el extranjero sigue siendo la principal fuente de germoplasma adaptados a los cambios en el mercado.

Por otro lado, en Chile existe gran preocupación por el mejoramiento de la calidad del material de propagación con proyectos orientados a la venta de plantas libres de virus y con identidad genómica varietal, uso de plantas clonales de material importado, certificación chilena de las plantas de vid, uso de portainjertos y selección masal y clonal del viñedo chileno. Por esto, se ha ido intensificando el interés por el uso de portainjertos, los que presentan varias ventajas en el cultivo, especialmente resistencia a nemátodos y adaptación a diferentes tipos de suelos. Los portainjertos, desarrollados a partir de especies diferentes a las cultivadas, han sido introducidos también desde el extranjero, donde su uso se remonta a principios del siglo pasado por necesidades agronómicas y sanitarias.

La multiplicación por estacas leñosas ha sido el método más empleado para la producción de nuevas plantas de vid, para lo cual es indispensable una buena selección masal y clonal del material inicial. La introducción al país de nuevo germoplasma de vid, cultivares o portainjertos, se ha realizado tradicionalmente mediante la introducción de estacas, las que permanecen por un período de dos años en cuarentena en lugares supervisados por

el SAG, donde la multiplicación del material original es escasa o nula, con los inminentes peligros de introducir en el país enfermedades o plagas asociadas a estas estacas.

La introducción de material vegetal *in vitro* ofrece una tremenda ventaja comparativa a la introducción de estacas leñosas. En primer lugar, el espacio usado por el material vegetal es mínimo. Las condiciones fitosanitarias del material introducido son superiores, ya que por ser cultivo de tejidos hay ausencia de hongos y bacterias (los que se desarrollan rápidamente sobre los medios nutritivos, por lo tanto son rápidamente identificables a simple vista). El material vegetal puede ser multiplicado rápidamente y mantenido *in vitro* hasta su liberación por el SAG. El cultivo de ápices meristemáticos *in vitro* asegura la limpieza de virus del material original, si este tuviera alguna infestación. El análisis fitosanitario solicitado por el SAG se limita a la verificación de la ausencia de virus cuarentenarios y de fitoplasma, estos análisis son rápidos y la liberación de material puede ser realizada en un tiempo cercano a los dos meses. El Laboratorio de Cultivo de Tejidos del INIA-CRI La Platina, es un laboratorio cuarentenario para la introducción de material *in vitro*, siendo usado rutinariamente por viveristas y productores, con el interés de masificar rápidamente sus plantas y ha contribuido a la introducción de especies nuevas y variedades de interés para el país.

Para la multiplicación de selecciones provenientes de cruzamientos o de plantas transgénicas que contengan genes de interés es esencial contar con tecnologías de propagación masiva y que aseguren la multiplicación de plantas individuales en un corto período. Sin embargo, la micropropagación de las plantas, tanto de nuevas variedades de uva de mesa como de portainjertos introducidos, se ha realizado en forma tradicional. Es decir, de un frasco que contiene una planta, por división de la misma se obtienen 3 o 4 frascos nuevos con el explante micropropagado, el cual al cabo de un mes aproximadamente y dependiendo del vigor de la variedad y de la especie, se encuentra en condiciones de ser propagado nuevamente. Esto constituye una limitación en la propagación masiva del cultivo en forma rápida, con un alto requerimiento de mano de obra especializada.

Los objetivos de adaptación de una técnica que permitirá masificar la obtención de plantas seleccionadas permitirían reducir el tiempo de multiplicación del cultivo, reducir los costos de cultivo en cuanto a mano de obra y acelerar la llegada al productor y su entrada en

producción de las variedades mejoradas e introducidas. En este sentido, el uso de bioreactores constituiría una solución a este problema, ya que permiten la obtención de un gran número de plantas.

II. DESARROLLO DEL PROYECTO

A. Ubicación de la unidad de trabajo

La producción masiva de brotes de vides se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del INIA Quilamapu. Este material sirvió de base para realizar los ensayos en medios de cultivo líquidos y en el Sistema de Inmersión temporal comprometidos en el proyecto.

B. Material Vegetal

Se seleccionaron dos variedades de vid en base a su importancia económica y uso comercial: a) Cabernet Sauvignon, variedad vinífera, y b) Sultanina, variedad de uva de mesa, ambas variedades plantadas en el Centro Experimental Cauquenes (INIA).

C. Micropropagación convencional

1. Multiplicación de los brotes

a. Establecimiento *in vitro*

La cosecha de sarmientos de las variedades seleccionadas se realizó cuando las plantas estaban en el período activo de crecimiento. Los sarmientos una vez cosechados fueron transportados en condiciones de alta humedad y baja temperatura (Cooler con hielo seco) hasta el laboratorio de Biotecnología del INIA Quilamapu donde fueron cortados y almacenados a 4°C hasta su establecimiento.

De los trozos de sarmientos almacenados se seleccionaron segmentos nodales con yemas semi lignificadas. Estos segmentos nodales se deshojaron y lavaron en agua potable corriente durante 30 a 60 min. para eliminar impurezas gruesas. Posteriormente, estos segmentos fueron sometidos a un proceso de desinfección en la cámara de flujo laminar.

La desinfección realizada a los segmentos fue la siguiente: 1) Inmersión en una solución de etanol al 70% durante 30 seg; 2) un enjuague con destilada estéril; 3) inmersión de los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 2% y adición de unas gotas de Tween, durante 15 minutos y; 4) cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

Realizada la desinfección se extrajeron yemas de un tamaño aproximado de 1 a 2 mm, bajo la lupa y en cámara de flujo laminar. Estas yemas fueron sembradas en el medio Murashige and Skoog (medio basal) modificado, en una disminución de la concentración del amonio y adición de biotina, cisteína y pantotenato de calcio. Esta actividad inicial se realizó con el apoyo del personal técnico del CRI La Platina a cargo de la Sra. Nicole Hewstone, asesora del proyecto en aspectos relacionados con micropropagación convencional de vid.

Durante los meses de enero y febrero se establecieron un total de 1.382 yemas, 615 de la variedad Cabernet Sauvignon y 767 de la variedad Sultanina. De este material *in vitro* se seleccionaron 400 brotes de Cabernet Sauvignon y 190 brotes de Sultanina con un crecimiento adecuado para iniciar los ensayos de la siguiente etapa (Figura 1), la micropropagación de los brotes en medios líquidos y bajo distintas concentraciones de amonio en el medio. El material de menor desarrollo será usado posteriormente cuando alcance la altura y vigor adecuada para las etapas siguientes.

Respecto de los resultados de la desinfección, se logró una alta eficiencia del método utilizado, considerando que el material que se introdujo al cultivo *in vitro* fue colectado directamente desde el campo. Comparativamente, en la variedad Cabernet Sauvignon se obtuvo el menor nivel de contaminación un 2%, mientras que para la variedad Sultanina se obtuvo un 11%.

En cuanto a la respuesta de las yemas a la brotación en el medio de cultivo seleccionado, se obtuvo un 96% de brotación en la variedad Cabernet Sauvignon y un 98% en la variedad Sultanina, dentro de un periodo de 30 a 60 días.

b. Establecimiento de plantas madres

Paralelo al establecimiento *in vitro* se procedió a macropropagar material de las dos variedades de vides en condiciones de invernadero. El objetivo de este trabajo fue contar con plantas madres para dar continuidad al establecimiento de brotes en cultivo *in vitro*. La ventaja de mantener este material en invernadero fue realizar un mejor control fitosanitario, además de hacer un uso eficiente del tiempo y recursos en la obtención de los brotes, por su cercanía al Laboratorio.

Se establecieron 57 estacas de Cabernet Sauvignon y 65 de Sultanina, las cuales fueron plantadas en arena, en camas calientes y con un riego de nebulización frecuente, estas condiciones se mantuvieron por un período de 30 días. Posteriormente, las estacas que presentaron un buen desarrollo radicular fueron trasplantadas a macetas para favorecer su desarrollo.

Resultados

En la macropropagación se obtuvo un 71% de enraizamiento en las estacas de la variedad Cabernet Sauvignon y un 32% en la variedad Sultanina (Figura 2). Durante el inicio del proyecto no se presentaron problemas en el proceso de masificación del cultivo *in vitro* convencional, con excepción de la variedad Sultanina. En esta variedad de vid se detectó un porcentaje de contaminación endógena bacteriana, difícil de controlar por medios convencionales, ello llevó a realizar una selección rigurosa del material a utilizar en los ensayos. Cabe destacar, que la Empresa Hortifrut aportó nuevo material de Sultanina, con un menor grado de contaminación. Las actividades de masificación de vid se realizaron durante todo el desarrollo del proyecto.

2. Micropropagación en medios líquidos

En el proyecto se consideraron dos actividades generales: 1) micropropagación de vid, arándano y papa en medios líquidos e inmersión temporal (SIT) y 2) microtuberización o formación de tubérculos *in vitro* en SIT.

a. Medio basal

Para el primer caso y para determinar las mejores condiciones de cultivo de vid en medio líquido, se consideró como medio basal, el medio de micropropagación utilizado convencionalmente, que es el medio MS (Anexo 2), con algunas modificaciones en las vitaminas y suplementado con GA3 y obviamente, sin agar. A este medio basal se le disminuye la concentración de amonio.

La micropropagación en medios líquidos incluyó dos tipos de ensayos: a) Evaluación de diferentes concentraciones de amonio; y b) Evaluación de diferentes volúmenes de medio de cultivo.

b. Concentraciones de amonio

El establecimiento del ensayo con la variedad Sultanina y Cabernet Sauvignon en el medio basal MS (Anexo 2). Para cada variedad se estableció un ensayo donde se evaluaron tres dosis de nitrato de amonio: 0% (sin nitrato de amonio), 50% del medio basal (200mg/L) y 100% del medio basal (400mg/L) en un diseño completamente al azar con 10 repeticiones y cuatro brotes/repeticion. Se utilizaron brotes de 3 a 5 cm de largo, con 3 a 4 nudos por cada brote. Los tratamientos se incubaron a 25°C y con un fotoperíodo de 16 hrs de luz y 8 horas de oscuridad en agitación constante a 100 rpm. Se realizaron subcultivos cada 20 días.

Las evaluaciones fueron las siguientes: número de brotes sanos, hiperhidratados u oxidados, longitud de los brotes, peso verde, peso seco y relación peso seco/peso verde.

Resultados

En los ensayos de vid no se detectaron brotes muertos producto de los tratamientos aplicados. En cambio, se observó un alto porcentaje (80%) de brotes y hojas oxidadas por el contacto con el medio líquido (falta de oxigenación), aunque ello no estuvo relacionado con la concentración de amonio. La oxidación del tejido no afectó la viabilidad de los brotes ya que las yemas que no estaban en contacto directo con el medio líquido empezaron a brotar con una coloración normal.

c. Volúmenes de medio de cultivo.

Se establecieron dos ensayos con la variedad Cabernet Sauvignon y Sultanina en el medio basal MS. El Diseño Experimental fue un Completo al Azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Los tratamientos consistieron en tres volúmenes de medio de cultivo líquido (5,10, 20 mL/explante). Cada repetición estuvo constituida por cuatro brotes. El tamaño de los brotes fue de 3 a 5cm de largo y con 3 a 4 nudos.

Las condiciones de incubación, subcultivos y evaluaciones fueron similares a las descritas en los ensayos de concentraciones de amonio.

Resultados

El principal problema que se presentó en los ensayos con vides fue la alta incidencia (80%) de material oxidado, sin embargo, este material no afectó la viabilidad de los explantes, pues a partir de ellos crecieron y se desarrollaron las yemas axilares. El problema de oxidación estuvo directamente asociado al volumen de medio líquido empleado en el ensayo, es decir, a mayor volumen de medio de cultivo líquido, mayor oxidación. En estos ensayos no se presentó hiperhidratación.

Para continuar con la multiplicación de vid en medio líquido es indispensable manejar adecuadamente la frecuencia de inmersión en el SIT ya que en los ensayos actuales, los explantes estuvieron sumergidos constantemente en el medio líquido. Por otro lado, en los bioreactores el contacto de los explantes con el medio de cultivo líquido es temporal, lo que puede cambiar radicalmente este problema.

D. Multiplicación de los brotes en el Sistema de inmersión temporal (SIT)

1. Frecuencia y tiempo de inmersión

De acuerdo a la información obtenida en los experimentos de multiplicación en medios líquidos se realizaron algunas modificaciones a las frecuencias de inmersión establecidas previamente el proyecto. En el caso de vid se establecieron las frecuencias de 18 y 24 horas y los tiempos de inmersión de 1, 3, 5 min. El volumen del medio fue de 250 mL con 9 explantes por repetición y seis repeticiones. El período de evaluación fue de 42 días con

un cambio de medio líquido a los 21 días. El medio de cultivo utilizado fue el descrito anteriormente.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes y hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

Basados en los resultados de la evaluación de tres frecuencias (6 y 12 horas) y un tiempo de inmersión (3 min). y una menor necrosis de los tejidos, se decidió evaluar la frecuencia de 18 horas con dos tiempos de inmersión (3 y 5 min).

La evaluación de las diferentes frecuencias y tiempos de inmersión en forma separada indicó que en general la variedad Sultanina presentó un mejor comportamiento que Cabernet Sauvignon en el SIT. Este mejor comportamiento se expresó en los mayores valores obtenidos en algunas de las variables evaluadas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°) peso seco (gr) y relación peso seco/ verde en dos variedades de vid.

Variedades*	Frecuencia (horas)	Tiempo (min)	Brotos			
			Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Cabernet	6	3	2.2a	8.0a	0.05a	0.18a
Sultanina	6	3	3.8b	7.8a	0.11a	0.20a
Cabernet	12	3	3.3a	7.8a	0.10a	0.19a
Sultanina	12	3	5.0b	10.4b	0.19b	0.20a
Cabernet	18	3	4.3a	1.3a	0.07a	0.18a
Sultanina	18	3	4.5a	4.6b	0.14b	0.20a
Cabernet	18	5	4.1a	1.3a	0.20a	0.20a
Sultanina	18	5	6.2b	1.7b	0.30a	0.17a

- Comparaciones entre variedades dentro de cada frecuencia y tiempo

El análisis de los datos de las tres frecuencias de inmersión (6, 12 y 18 horas) con un tiempo similar de inmersión (3 min) indica que los mejores índices se obtuvieron con frecuencias de 12 y 18 horas (Cuadro 2). Sin embargo, en la frecuencia de 18 horas se observó un menor porcentaje de necrosis en las plantas.

Cuadro 2. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°) peso seco (gr) y relación peso seco/verde en dos variedades de vid.

Variedades	Frecuencia (horas)	Tiempo (min)	Brotos			
			Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Cabemet	6	3	2.2	8.0	0.05	0.18
	12	3	3.3	7.8	0.10	0.19
	18	3	4.3	1.3	0.07	0.18
Sultanina	6	3	3.8	7.8	0.11	0.20
	12	3	5.0	10.4	0.19	0.20
	18	3	4.5	4.6	0.14	0.20
Variedades						
Cabemet			4.4a	5.7a	0.49a	0.46a
Sultanina			3.3b	7.9b	0.15a	0.20a
Frecuencias						
6			3.0b	8.2a	0.08a	0.43a
12			4.1ab	9.3a	0.77a	0.89a
18			4.4a	2.7 b	0.10a	0.19a

El análisis de los datos de los dos tiempos de inmersión con la frecuencia de 18 horas indica que con 3 y 5 min se obtiene un patrón de comportamiento muy similar en vid (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°) peso seco (gr) y relación peso seco/verde en dos variedades de vid.

Variedades	Frecuencia (horas)	Tiempo (min)	Brote			
			Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Cabernet	18	3	4.3	1.3	0.07	0.18
Sultanina	18	3	4.5	4.6	0.14	0.20
Cabernet	18	5	4.1	1.3	0.20	0.20
Sultanina	18	5	6.2	1.7	0.30	0.17
Variedad						
Cabernet			4.2a	1.3a	0.08a	0.18a
Sultanina			5.4a	2.9b	0.22b	0.19a
Tiempo						
	18	3	5.1a	2.7a	0.10a	0.19a
		5	4.4a	1.5b	0.19b	0.18a

A pesar de los resultados obtenidos, es importante evaluar la frecuencia de 24 horas y el tiempo de inmersión de 1 min. para tener un rango completo de las posibles alternativas de frecuencias y tiempos de inmersión en esta especie que es tan susceptible a la multiplicación en medio líquido.

En este informe se presenta la comparación de las frecuencias de 18 y 24 horas y los tiempos de inmersión de 1, 3 y 5 min (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°) peso seco (gr) y relación peso seco/verde en dos variedades de vid.

Tratamiento	Brotos				
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv	Yemas (N°)
Variedad					
Sultanina	6.2 ^a	2.0a	0.21a	0.24a	12.1a
Cabernet	3.7b	1.3b	0.09b	0.19a	7.8b
Frecuencia (hrs)					
18	5.0a	1.9a	0.17a	0.12a	12.0a
24	4.9 ^a	1.3b	0.13b	0.20a	8.5b
Tiempo (min)					
1	5.0a	2.1a	0.17a	0.19a	10.2a
3	5.0a	1.5b	0.13b	0.19a	9.7a
5	4.9 ^a	1.3b	0.15ab	0.10b	10.1a

La evaluación de las diferentes frecuencias y tiempos de inmersión en forma conjunta indicó que, en general, la variedad Sultanina presentó un mejor comportamiento que Cabemet Sauvignon en el SIT. Este mejor comportamiento se expresó en los mayores valores obtenidos en todas las variables evaluadas (Cuadro 4) y en la apariencia de las plantas.

Al comparar estas dos frecuencias, se observa que la de 18 horas es superior a la de 24 horas al considerar las siguientes variables, el número de brotes por explante (proliferación), peso seco, y número de yemas. Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre 18 y 24 horas en la longitud de brotes, peso verde y relación peso seco/peso verde (Cuadro 4).

El análisis de los datos de los tres tiempos de inmersión (1, 3 y 5 min.) indicó que no hubo diferencias significativas entre los tiempos al considerar la longitud de los brotes, peso verde, relación Ps/Pv y número de yemas. En el número de brotes en los tiempos de inmersión de 3 y 5 min fueron superiores a 1 min. , sin embargo, la menor relación peso seco/ peso verde se obtuvo con un tiempo de inmersión de 5 min, siendo similar en las frecuencias de 1 y 5 min.

Ahora si comparamos el comportamiento de las dos variedades de vid en relación a las cuatro frecuencias evaluadas (6, 12, 18 y 24 hrs.) y un tiempo de 3 min, se puede indicar que, la variedad Sultanina sigue teniendo un comportamiento superior a Cabemet Sauvignon al considerar cuatro de las cinco variables consideradas (Cuadro 5). Ahora, al considerar el efecto de las cuatro frecuencias se observa que el número de brotes/por explantes es muy superior con la frecuencia de 6 y 12 horas comparada con las frecuencias de 18 y 24 horas (Cuadro 5). Sin embargo, en la frecuencia de 6 y 12 hrs. se observa un porcentaje mayor de necrosis en los explantes iniciales (madres), aunque este efecto disminuye en los brotes nuevos. La relación Ps/Pv que se podría considerar como un índice de calidad de los brotes indica que no existen diferencias significativas entre las cuatro frecuencias evaluadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Longitud de los brotes (cm), número de brotes/explante, peso seco y relación peso seco/peso verde en dos variedades de vid y cuatro frecuencias de inmersión.

Variedad	Brote			
	Longitud (cm)	Brote/ expl (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Variedad				
Sultanina	5.1 a	6.3 a	0.15a	0.20a
Cabernet	3.5b	4.6 b	0.08b	0.18a
Frecuencia (hrs)				
6	3.0c	8.2 a	0.08c	0.20a
12	4.2bc	9.3 a	0.13ab	0.20a
18	4.4ab	2.7b	0.10bc	0.18a
24	5.6 a	1.5b	0.16a	0.21a

Tiempo: 3 min

2. Volúmenes de medio y número de explantes

Se estableció un ensayo en un Diseño Completamente al azar con arreglo factorial 2 variedades x 3 volúmenes x 3 números de explantes x 3 repeticiones. Las variedades utilizadas fueron Sultanina y Cabernet Sauvignon, los volúmenes de medio 250, 500 y 750mL y el número de explantes de 6, 9 y 12.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes, hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

Los resultados indicaron que la variedad Sultanina presentó una mayor longitud de los brotes, peso verde y seco (Cuadro 6). La evaluación de la proliferación, relación peso seco/peso verde y número de yemas presentaron un comportamiento similar en ambas variedades. En el análisis del volumen de los medios se estableció que 500 mL presentó solo un mayor peso de los explantes y un mayor número de yemas /planta. En cuanto al número de explantes podemos decir que 6 explantes presentaron un mayor peso verde, seco y número de yemas/planta (Cuadro 6).

Cuadro 6. Longitud de los brotes (cm), proliferación (N°), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en vid con diferentes volúmenes y número de explantes.

Variedad	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco	Ps/Pv	Yemas (N°)
Sultanina	4.5 ^a	2.2a	0.23a	0.54a	10.4a
Cabernet	2.8 ^a	2.2a	0.07b	0.57a	10.7a
Volumen					
250	3.7 ^a	2.2a	0.15b	0.57a	11.2ab
500	3.9 ^a	2.2a	0.19a	0.56a	11.5a
750	3.4 ^a	2.2a	0.12b	0.56a	9.2b
N° explantes					
6	3.7 ^a	2.3a	0.18a	0.56a	11.7a
9	3.6 ^a	2.1a	0.14b	0.55a	10.5ab
12	3.5 ^a	2.2a	0.13b	0.54a	9.3b

3. Proliferación

a. Efecto del paclobutrazol

La tasa de multiplicación de la vid está negativamente asociada a la frecuencia de inmersión, es decir, a medida que se aumenta la frecuencia de inmersión se reduce la tasa de multiplicación. Lamentablemente, con frecuencia de inmersión inferiores de 18 horas el porcentaje de oxidación de los brotes aumenta exponencialmente. Por este motivo se propuso la alternativa de usar el Paclobutrazol (PBZ) para mejorar la tasa de multiplicación de vid en frecuencias de 18 y 24 horas.

El diseño experimental fue un Completamente al azar con tres tratamientos (dosis de PBZ de 0, 0.5 y 1 mL/L) con 6 repeticiones en la variedad Sultanina y Cabernet Sauvignon. Los explantes seleccionados fueron de tres nudos y con un buen vigor y desarrollo.

Las evaluaciones fueron el número de brotes y longitud de ellos a los 20 y 30 días del establecimiento.

Resultados

Los resultados obtenidos a los 20 días indican que las dosis mayores indujeron un mayor porcentaje de raíces, en cambio las dosis bajas promovieron la formación de callo. El PBZ no estimuló una mayor brotación en la vid (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de paclobutrazol en la brotación y formación de raíces en brotes de dos variedades de vid (20 días).

Dosis (mg/L)	Nº nudos	Nº raíces	Observaciones
Sultanina			
0	4.1	0.66	Callo en la base del explante (83%)
0,5	3.1	4.1	Mínimo 2 raíces por explante
1	3.2	1.4	40% formó raíces
Cabemet Sauvignon			
0	4.5	0	Callo en la base del explante (100%)
0,5	3.3	4.0	1 explante presentó hojas rojas (sin raíz)
1	3.5	3.1	50% presenta raíz.

Al observar el efecto del PBZ a los 30 días se observó que el porcentaje de raicillas y el número de nudos aumentó en comparación que a los 30 días. Las diferentes dosis de PBZ no estimularon la brotación en vid (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de paclobutrazol en la brotación y formación de raíces en brotes de dos variedades de vid (30 días).

Dosis (mg/L)	Nº nudos	Nº raíces	Observaciones
Sultanina			
0	5.1	0.6	Plántula alongada
0,5	5.1	7.8	Formación de raicillas secundarias.
1	3.4	2	Formación de raicillas secundarias
Cabemet Sauvignon			
0	5.6	1	Plántula alongada
0,5	4.0	13.8	Formación de raicillas secundarias.
1	4.1	10	Formación de raicillas secundarias

b. Efecto de BAP y PBZ

En forma paralela al ensayo anterior se estableció un ensayo complementario para evaluar el efecto combinado del BAP y PBZ: 0.1 mg/l BAP; 0.1 mg/l BAP + 0.5mg/l PBZ; 0.1 mg/l BAP + 1 mg/l PBZ.

Resultados

Los resultados obtenidos en la evaluación a los 20 días, indicaron una reducción en la formación de raíces y un nulo efecto en la brotación comparado con el testigo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de dosis de BAP y PBZ en brotación y enraizamiento de vid (20 días)

Dosis (mg/L)	Nº nudos	Nº raíces	Observaciones
Sultanina			
0.1 BAP (testigo)	4.1	0.6	Formación de callo en la base (83%)
0.1 BAP+0.5 PBZ	3.3	0	Formación de callo en la base (83%)
0.1 BAP+1 PBZ	3.3	0	Formación de callo en la base (100%)
Cabernet Sauvignon			
0.1 BAP	4.5	0	Callo en la base del explante (100%)
0.1 BAP+0.5 PBZ	3.0	0.5	Formación de callo en la base (83%)
0.1 BAP+1 PBZ	3.0	0.7	Formación de callo en la base (83%)

La evaluación a los 30 días (Cuadro 10) y 40 días se mantuvo la misma tendencia observada a los 20 días, (Cuadro 9).

Cuadro 10. Efecto de dosis de BAP y PBZ en brotación y enraizamiento de Sultanina (30 días).

Medio	Nº nudos	Nº raíces	Observaciones
Sultanina			
0.1 BAP	5.2	0.7	Formación de callo en la base (83%)
0.1 BAP+0.5 PBZ	3.8	0.2	Formación de callo en la base (83%)
0.1 BAP+1 PBZ	3.5	0	Formación de callo en la base (100%) y un 66% presenta hojas de color café
Cabernet Sauvignon			
0.1 BAP	5.7	1	Formación de callo en la base 50%.
0.1 BAP+0.5 PBZ	3.8	5.8	Formación de callo en la base (83%) y las raíces presentan raicillas secundarias.
0.1 BAP+1 PBZ	3.3	7.2	Formación de callo en la base (100%) y un 50% presenta hojas café y rojas

c. BAP

En esta oportunidad se evaluaron los siguientes tratamientos: 0.1 mg/l BAP; 0.3 mg/l BAP; 0.5 mg/l BAP; MV4: 1 mg/l BAP.

Resultados

Los resultados obtenidos indicaron que los tratamientos evaluados no aumentaron la brotación de la vid, sin embargo redujeron el enraizamiento.(Cuadro 11). Esta tendencia se mantuvo en las evaluaciones a los 30 días y en las evaluaciones de dosis mayores de BAP (1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/L)

Cuadro 11. Efecto de dosis BAP en la brotación y enraizamiento en dos variedades de Vid a los 20 días.

Dosis (mg/L)	Nº Brotes	Nº nudos	Nº raíces	Observaciones
Sultanina				
0.1 (Testigo)	1	4.83	0.16	50% de los explantes callo en la base.
0.3	1.3	4.5	0	33% callo en la base, algunos explantes hojas rojas(33%).
0.5	1.3	5.33	0	67% formación callo en la base.
1	1.8	5.66	0	67% formación callo en la base, siendo este más grande.
Cabemet Sauvignon				
0.1	1.33	5.16	1.66	50% formación callo, 33% explantes hojas borde rojo
0.3	*1.8	*6	*0	100% formación callo en la base.
0.5	2.5	8	0	83% formación callo en la base.
1	*3.3	*9	*0	67% formación callo en la base, siendo estos más grandes. 1 expl presentó hojas repolladas.

4. Aplicación de CO₂

Los antecedentes bibliográficos disponibles sugieren que la aplicación de CO₂ en el Sistema de inmersión temporal en algunos cultivos ha mejorado la calidad de los brotes producidos. Por este motivo se planificó un ensayo tendiente a evaluar el efecto de la aplicación de CO₂ durante el proceso de multiplicación de los brotes en vid. En este ensayo se utilizaron las variedades Sultanina y Cabemet Sauvignon en presencia y ausencia de CO₂ durante toda la fase de multiplicación es decir, durante 42 días. La inyección de CO₂ fue de 1litro/min con una frecuencia de 6 horas. Las condiciones del ensayo fueron similares a las descritas anteriormente.

Resultados

Los resultados obtenidos indicaron que las dos variedades presentaron un comportamiento diferencial. La variedad Sultanina presentó un mejor comportamiento en prácticamente todas las características evaluadas que la variedad Cabernet Sauvignon, con excepción de la relación peso seco/peso verde, donde las dos variedades presentaron un comportamiento similar (Cuadro 12).

Al analizar los resultados del efecto promedio de la aplicación de CO₂ en las dos variedades, se pudo observar que este tratamiento no afectó significativamente a los parámetros evaluados, con excepción a la proliferación, donde la inyección de CO₂ redujo el número de brotes producidos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Longitud (cm), proliferación N°, peso seco (g) y relación peso seco/peso verde de dos variedades de vid en presencia y ausencia de CO₂.

Tratamiento	Brotes			
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
Variedades				
Sultanina	7.2a	2.0a	0.18 ^a	0.21a
Cabernet Sauvignon	5.4b	1.3b	0.10b	0.20a
Inyección de CO ₂				
Con	7.3a	1.1b	0.15 ^a	0.20a
Sin	5.3a	2.1a	0.13 ^a	0.21a

5. Enraizamiento y aclimatación

El medio de cultivo utilizado durante el proceso de multiplicación de la vid en el SIT promovió el desarrollo de las raíces en los bioreactores, produciéndose plántulas de buen tamaño y con sistema radicular bien desarrollado, por lo tanto no fue necesario realizar este proceso en el invernadero.

Debido al buen desarrollo de las plantas y a su sistema radicular las plantas producidas en el SIT presentaron un buen comportamiento durante el proceso de aclimatación, produciéndose un bajo porcentaje de pérdidas de plantas, menor al 5%. El sistema de aclimatación se realizó en primavera-verano y usando como sustrato vermiculita y vasos plásticos.

E. Conclusiones

Resultados en medios líquidos

Alta susceptibilidad de la vid al medio líquido.

Resultados en el SIT

Respuesta diferencial de las variedades de vid

Cv. Sultanina mejor respuesta que C. Sauvignon

Frecuencia y tiempo de inmersión

18 Hrs y 3 min

Volumen de medio y número de explantes

250 mL y 9 explantes

Buena aclimatación de las plantas

Buen crecimiento parte aérea

Buen crecimiento y tamaño de las raíces

Bajo porcentaje de pérdidas de plántulas

El sistema de multiplicación de plantas de vid en el SIT incluye las siguientes etapas:

- a) Producción de brotes en el sistema de micropropagación convencional
- b) Multiplicación de los brotes de tres nudos en el SIT por 42 días, con un subcultivo a los 21 días. Frecuencia cada 18 horas y tiempo de inmersión cada 3 min, volumen de medio 250 mL y 9 brotes por contenedor.
- c) Enraizamiento en el medio de multiplicación de multiplicación en el SIT a los 42 días.
- d) Aclimatización de las plantas enraizadas en el SIT, en invernadero

F. Recomendaciones

1. Es importante continuar trabajando con el objetivo de:
 - a) Incorporar nuevas variedades para ampliar el conocimiento de su comportamiento en el SIT
 - b) Mejorar la tasa de multiplicación de la vid ya que en frecuencias inferiores a 18 horas se observa una tasa de multiplicación entre 7-8, lo cual lo hace muy atractivo, sin embargo, a estas frecuencias se produce un alto porcentaje de oxidación de las plántulas.

- c) Explorar la posibilidad de mejorar el comportamiento de Cabernet Sauvignon ya que bajo las condiciones evaluadas tuvo un mal desarrollo
 - d) Evaluar las plantas producidas en el SIT en el campo para evaluar su producción y calidad de la fruta
2. Utilizar esta tecnología para multiplicar nuevas variedades introducidas al país y reducir el tiempo de cuarentena
 3. Utilizar esta tecnología para producir plantas madres, las que luego pueden ser utilizadas como fuente de material genético para la propagación vegetativa.

PRODUCCIÓN DE PLANTAS Y MICROTÉRCULOS-SEMILLA DE PAPA A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES.

I. INTRODUCCIÓN

La superficie plantada de papas (*Solanum tuberosum* L) en el país ha fluctuado entre 56 y 59.500 has en los últimos tres años, con una producción de 1 a 1,1 millón de toneladas métricas y un rendimiento entre 19 y 21 ton métricas por hectárea.

El cultivo de la papa se desarrolla principalmente desde la IV hasta la X región, concentrándose un 60% de la producción nacional entre las regiones VIII, IX y X. Parte importante de la superficie plantada (70 a 80%) se destina a la producción de primores, principalmente entre la IV y la VII regiones con diferentes énfasis. Es así como toda la producción de la IV corresponde a primores y solo parte de ella en la zona central del país.

El mercado interno de la papa se caracteriza por ciclos de alta oferta precedidos por periodos de baja, asociados a precios bajos y altos. Esta situación tiene una gran importancia ya que un 48% de la cosecha de este tubérculo se comercializa como producto para consumo fresco en los principales centros mayoristas del país, mientras que un 17% se destina al procesamiento industrial, un 14% a papa-semilla, un 15% se pierde durante el almacenaje y la diferencia en autoconsumo.

Las variedades de papa se definen según: el destino de su producción, consumo fresco e industria (primor, guarda, procesamiento), color de la piel, calidad culinaria, potencial de rendimiento, adaptación agronómica y su resistencia o tolerancia a enfermedades y plagas.

En el año -2004 se observó un leve incremento de las exportaciones de papa. Los principales productos exportados son: copos (puré), papa semilla, papas preparadas y para consumo fresco, congeladas y sin congelar. Durante el año 2004 se exportó un total de 2.793 tons de papas por un valor de US\$ 2 millones.

Durante el mismo período se importaron un total de 12.500 ton repartidas en puré, papas preparadas u y sin preparar, congeladas y frescas, sémola y almidón por un valor de US\$9,4 millones.

Uno de los principales problemas en el cultivo de la papa es el uso de semilla- tubérculos de baja calidad, siendo el uso de semilla certificada o mejorada muy bajo. Es así como durante la temporada 2003/2004 se registraron solo 419 has de semilleros papa para abastecer la demanda nacional, superior en un 3,9% a la temporada anterior. Esta situación se produce a pesar de existir una amplia oferta de variedades en el mercado, de alto potencial de rendimiento y para varios usos.

Un tubérculo-semilla de buena calidad asegura un alto rendimiento, pureza varietal y un excelente estado sanitario, lo que redundará finalmente en la expresión del máximo potencial productivo de la variedad.

En el país existen tres tipos de tubérculos-semillas, aquellas provenientes del programa de certificación, la semilla corriente, semilla propia. La semilla certificada es aquella que ha sido sometida a un proceso de producción supervisado por el Servicio Agrícola y Ganadero que garantiza la mantención de la identidad, pureza y sanidad. En el aspecto sanitario la papa es atacada por varios hongos, bacterias y virus que afectan considerablemente la producción y calidad de los tubérculos. Las plagas cuarentenarias son: nemátodo del quiste (*Globodera rostochensis* y *G. pallida*), marchitez bacteriana de la papa (*Ralstonia solanacearum*) y el carbón de la papa (*Angiosorus solani*).

Esta situación hace que la producción tubérculos-semillas certificada sea un proceso complejo y que toma alrededor de siete años, donde se combinan trabajos de selección de plantas sanas, micropropagación, multiplicación en invernadero y campo.

Objetivo general - - - - -

Determinar la factibilidad de implementar la producción de microtubérculos-semilla utilizando el Sistema de Inmersión temporal (SIT) en bioreactores para mejorar la eficiencia y rentabilidad de esta actividad.

Objetivos específicos

1. Evaluar la multiplicación de plantas de papas en medios líquidos
2. Determinar los factores que afectan la producción de plantas y tubérculos-semillas, en el SIT
3. Determinar estabilidad genética material propagado en el SIT
4. Analizar económicamente los sistemas evaluados
5. Difundir y transferir la tecnología a los usuarios

II. ETAPAS EN LA PRODUCCIÓN DE TUBÉRCULO-SEMILLA

Para facilitar la comprensión del trabajo realizado en el proyecto y su inserción en la producción de tubérculos-semilla se describirá brevemente el proceso de producción de las etapas de semilla prebásica, básicas y certificada o corriente.

A. Tubérculo-semilla prebásica. Esta etapa dura 2 años y cuenta con cuatro actividades durante el primer año y una plantación de campo el segundo año. El objetivo del proyecto es impactar en las actividades dos, tres y cuatro del primer año: micropropagación convencional.

Año 1.

1. Selección de plantas sanas de variedades en multiplicación (G0). En esta etapa se realizan una serie de pruebas serológicas para descartar el material con problemas fitosanitarios (laboratorio)
2. Micropropagación de plántulas sanas. Las plantas sanas son micropropagadas por el sistema convencional, es decir a través de subcultivos sucesivos hasta obtener el número de plantas necesarios para obtener los microtubérculos (laboratorio).
3. Corte de esquejes de tallos jóvenes de las plántulas micropropagadas y enraizamiento en arena. (invernadero)
4. Transplante de plántulas a camas de producción de minitubérculos.

Año 2. Multiplicación de minitubérculos para producción de tubérculos semilla prebásica (G-1), en el campo

A. Tubérculo-semilla básica (G-2)

Año 3. Multiplicación de semilla prebásica para semilla básica (G-2) en el campo

C. Tubérculo semilla certificado (C-)

Año 4. Multiplicación de semilla básica para producción de semilla certificada (C-1), en el campo.

Año 5. Multiplicación de tubérculo-semilla certificada para producción de semilla certificada C-2.

Año 6. Multiplicación de tubérculo-semilla certificada C-2 para la producción de semilla certificada C-3.

Año 7. Multiplicación del tubérculo-semilla certificada C-3 para la producción de semilla corriente.

Las etapas de multiplicación de tubérculo-semilla certificada C-2, C-3 y corriente se realizan en empresas de tubérculo-semillas o productores de tubérculo-semillas.

III. DESARROLLO DEL PROYECTO

A. Ubicación geográfica de las unidades de trabajo

La producción de brotes sanos a través de micropropagación convencional se realizó en el laboratorio de cultivo *in vitro* del Campo Experimental La Pampa, perteneciente al INIA Remehue y ubicando en Purranque. La producción de brotes y microtubérculos-semilla en el SIT se realizó en el laboratorio del cultivo *in vitro* del INIA Quilamapu, ubicado en Chillán.

B. Material Vegetal.

Para la producción de microtubérculo-semillas se seleccionaron dos variedades de papa, considerando la importancia comercial y destino de la producción: a) Shepody, variedad apta para el procesamiento industrial como papas fritas y; b) Desireé, variedad recomendada para consumo en fresco.

C. MICROPROPAGACIÓN CONVENCIONAL

1. Multiplicación de brotes

a. Establecimiento *in vitro*

El establecimiento *in vitro* de papas se realizó por medio del cultivo de meristemas de plantas. A partir de plantas cultivadas en invernadero se colectaron porciones apicales de las mismas, las cuales fueron transportadas al laboratorio para la desinfección de las yemas.

b. Desinfección de yemas

El procedimiento de desinfección de las yemas fue el siguiente: 1) Inmersión de las yemas en una solución de fungicidas: Benlate (i.a. Benomil) y Rovral (i.a. iprodione), ambos al 1%, durante 25 minutos y en agitación; 2) inmersión en etanol al 96% durante 30seg; 3) un enjuague con destilada estéril; 4) inmersión de los explantes en una solución de hipoclorito de sodio al 0,25% durante 20 a 25 minutos y; 5) cuatro enjuagues con agua destilada estéril.

c. Extracción de los meristemas

A partir de las yemas desinfectadas se extrajeron, bajo la lupa y en cámara de flujo laminar, los meristemas que fueron sembrados en el medio basal, Murashige and Skoog (MS, Anexo 2) líquido, suplementado con ácido giberélico. Los meristemas fueron incubados en agitación a 25°C y bajo una intensidad luminosa de 2500 lux, durante 30 a 35 días.

d. Multiplicación de los brotes

Para la etapa de proliferación de los brotes, se utilizó el mismo medio basal MS, con algunas modificaciones: aumento en la concentración de vitaminas y la adición de pantotenato de calcio (Anexo 2).

e. Envío de brotes a INIA Quilamapu

Los brotes de papas producidos en La Pampa fueron enviados al INIA Quilamapu, donde se utilizaron para establecer los ensayos en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

2. Multiplicación de brotes en medios líquidos (INIA Quilamapu)

La micropropagación en medios líquidos es una etapa importante que debe ser considerada antes de iniciar los trabajos en el sistema de inmersión temporal. De esta manera se conoce la aptitud del cultivo a crecer y desarrollarse en medio líquido.

Este trabajo incluyó la evaluación de los brotes en diferentes:

- a) Concentraciones de amonio.
- b) Volúmenes de medio de cultivo

a. Concentraciones de amonio

La literatura indica que el amonio puede afectar la hiperhidricidad de los tejidos de la planta. Por este motivo, se planteó la evaluación de dosis decrecientes de nitrato de amonio en el medio líquido, como una manera de reducir este fenómeno en las plantas de papa.

Se establecieron dos ensayos, uno con la variedad Shepody y otro con la variedad Desirée en el medio basal anteriormente señalado. El diseño experimental fue completamente al azar con tres tratamientos: 0% (sin nitrato de amonio), 50% del medio basal (850mg/L) y 100% del medio basal (1.650mg/L de nitrato de amonio) y 10 repeticiones con 4 brotes por repetición. Se utilizaron brotes de 5-7cm de largo, con 3 a 4 nudos/brote.

Los tratamientos se incubaron a 25°C y con un fotoperíodo de 16hrs de luz y 8 horas de oscuridad en agitación constante a 100rpm. Se realizaron subcultivos cada 20 días.

Las evaluaciones fueron las siguientes: número de brotes sanos, hiperhidratados u oxidados, longitud de los brotes, peso verde, peso seco y relación peso seco/peso verde.

Resultados

En los ensayos de papa con la variedad Shepody y Desirée se obtuvo un 100% de brotes sanos y sin problemas de hiperhidratación, observándose un efecto de la variedad y el tratamiento aplicado en las variables evaluadas (Cuadro 1 y 2).

Durante el desarrollo de este ensayo se realizaron cuatro evaluaciones, a los 20, 40, 60 y 80 días después del establecimiento. En esta oportunidad, se presentan solo la primera y cuarta evaluación que refleja el efecto del amonio en el crecimiento y desarrollo de los brotes (Cuadro 1 y 2).

En la primera evaluación después de 20 días después del establecimiento, la variedad Shepody presentó un mayor valor de proliferación y relación peso/peso fresco en comparación a la variedad Desirée (Cuadro 1).

Las dosis de amonio no afectó a la proliferación de los brotes, pero sí al crecimiento de ellos, lo que se vio reflejado en el peso seco y la relación peso seco/peso verde. Ahora si consideramos a la relación peso seco/peso verde como un índice de calidad de los brotes producidos, los mejores tratamientos fueron aquellos que no incluyeron amonio o el 50% de la dosis normalmente aplicada (Cuadro 1).

Cuadro 1. Longitud de los brotes, número total de brotes, peso verde (g), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en la primera evaluación al establecimiento.

Tratamiento	Brotes		
	Prol (Nº)	P. seco (g)	Ps/Pv
Variedad			
Desirée	15.0b	0.05a	0.08b
Shepody	22.2a	0.05a	0.09 ^a
Dosis (% , mg/L)			
0 (0)	15.4a	0.04b	0.09a
50 (850)	17.5a	0.05a	0.09a
100 (1650)	17.7a	0.05a	0.07b

En la cuarta evaluación, 80 días después del establecimiento, la variedad Shepody fue superior a la Desirée sólo en la longitud de los brotes, siendo similar a Desirée en los demás parámetros evaluados (Cuadro 2).

La dosis de amonio afectó solo al largo de los brotes y a la proliferación, observándose un efecto diferente, dependiendo de la característica evaluada (Cuadro 2).

Cuadro 2. Longitud de los brotes, número total de brotes, peso verde (g), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en la cuarta evaluación, tercer subcultivo.

Tratamiento	Brotes			
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	P.S/PV
Variedad				
Desirée	10.7b	21.1a	0.07 ^a	0.12a
Shepody	17.9a	21.2a	0.05 ^a	0.11a
Dosis (% , mg/L)				
0 (0)	13.9ab	18.8b	0.05 ^a	0.12a
50 (850)	13.4b	26.0a	0.08 ^a	0.12a
100 (1650)	15.5a	19.0b	0.06 ^a	0.11a

b. Volúmenes de medio

Se establecieron dos ensayos con la variedad Shepody y Desiree en el medio basal MS. El Diseño Experimental fue un Completo al Azar con tres tratamientos y 10 repeticiones. Los tratamientos consistieron en tres volúmenes de medio de cultivo líquido (5,10, 20 mL/explante). Cada repetición estuvo constituida por cuatro brotes. El tamaño de los brotes fue de 3 a 5cm de largo y con 3 a 4 nudos.

Las dimensiones de los frascos utilizados para evaluar el volumen de los medios líquidos fue de 65 mm de diámetro y 110 mm de alto. Esta situación determinó la siguiente situación: a) en el tratamiento de 5mL medio por explante, 10 mm aproximadamente de los explantes estuvieran semisumergidos; b) en el tratamiento de 10 mL de medio/explante 17 mm aproximadamente de los explantes de papa permanecieran semi-sumergidos y; c) en el tratamiento de 20 mL de medio/explante, 29 mm aproximadamente de los explantes de papa permanecieran sumergidos durante el ensayo. Todos los tratamientos se incubaron a 25°C y con un fotoperíodo de 16hrs de luz y 8 horas de oscuridad en agitación constante a 100rpm. Se realizaron subcultivos cada 20 días.

Durante el desarrollo del ensayo se realizaron cuatro evaluaciones. A manera de resumen se presentan solo la primera y cuarta evaluación (Cuadro 3 y 4).

Las evaluaciones fueron las siguientes: número de brotes sanos, hiperhidratados u oxidados, longitud de los brotes, peso verde, peso seco y relación peso seco/peso verde.

Resultados

En todos los tratamientos de volumen y en las dos variedades evaluadas se observó un 100% de brotes sanos y sin síntomas de hiperhidratación.

En el establecimiento de los explantes, las variedades presentaron un comportamiento diferente en las variables evaluadas. Desirée presentó un mejor comportamiento en el peso verde y la relación peso seco/peso verde en comparación con la variedad Shepody (Cuadro 3).

El mejor volumen de medio fue 30 mL/explante, lo que se vió reflejado en un mayor peso verde y seco no así en la relación peso seco/peso verde, donde el valor mayor se obtuvo con 10mL/explante (Cuadro 3)

Cuadro 3. Peso verde (g), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en la primera evaluación al establecimiento.

Tratamiento	Brote		
	P. verde (g)	P. seco (g)	P.S/PV
Variedad			
Desirée	1.50a	0.11a	0.09a
Shepody	0.96b	0.08a	0.07b
Volumen/explante (mL)			
5	0.60b	0.06b	0.09a
10	0.83b	0.06b	0.08b
20	2.27a	0.17a	0.08b

En la cuarta evaluación, la variedad Desirée presentó valores superiores a la Variedad Shepody solo en la longitud de los brotes, siendo similares en las demás características (Cuadro 4).

En el volumen de medio, 30mL/explante fue superior en la longitud de los brotes producidos, proliferación, pero inferior en la relación peso seco/peso verde (Cuadro 4).

Cuadro 4. Longitud de los brotes, número total de brotes, peso verde (g), peso seco (g) y relación peso seco/peso verde en la cuarta evaluación, tercer subcultivo.

Tratamiento	Brote			
	Long. (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
Variedad				
Desirée	12.2b	23.8a	0.11 ^a	0.11a
Shepody	17.4a	24.3a	0.08 ^a	0.10a
Volumen (mL)				
5	13.4b	26.0a	0.08 ^a	0.12a
10	14.3b	22.4b	0.08 ^a	0.09b
20	17.0a	24.0ab	0.12 ^a	0.10b

En resumen, los resultados de los ensayos no mostraron un efecto positivo al disminuir la dosis de amonio en la hiperhidricidad, principal objetivo de estos ensayos. Por otro lado, como el objetivo es comparar el SIT y el Sistema convencional de micropropagación se decidió mantener el nivel de amonio usado en el medio de cultivo convencional para trabajar en el SIT y facilitar la comparación posterior.

En relación al volumen del medio por explante, se decidió utilizar 20mL/explante, que por razones prácticas se dejó en 250mL/bioreactor para trabajar con 9 explantes en el SIT.

2. Microtuberización en papas

La literatura indica que la concentración de sacarosa y de BAP induce o promueve la microtuberización. En este sentido, es importante aclarar que el medio basal del micropropagación de papa incluye entre un 2 a un 3% de sacarosa (20 a 30gr/litro) y la concentración de sacarosa en los medios de inducción de microtuberización varía entre un 6-8% (60 y 80gr/l). En el caso de BAP se recomienda incluir en el medio un porcentaje superior al 0,3%. Por lo tanto, se planificaron ensayos endientes a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa y de BAP en la microtuberización.

a. Concentraciones de sacarosa

Se estableció un ensayo con la variedad Shepody y otro con la variedad Desirée. El diseño experimental fue un Completamente al Azar con 50 repeticiones y un brote por repetición. El tamaño de los brotes fue de 10 a 12cm de largo, con 4 a 6 nudos/brote.

Los tratamientos fueron seis, que correspondieron a concentraciones de sacarosa de 0, 40, 60, 80 y 100gr/l de sacarosa lo que equivale a un 0, 4, 6, 8 y 10%. Por lo tanto, en este ensayo se evaluó la dosis recomendada (60 y 80gr/l), dosis inferiores (0, 30 y 40gr/l) y dosis superiores (100gr/l) debido que la información de la literatura ha sido obtenida en otras condiciones tecnológicas y con distintas variedades.

La incubación de los tratamientos fue a 25°C bajo oscuridad y con subcultivos cada 20 días. Las evaluaciones fueron los siguientes: número de microtubérculos, calibre, peso fresco y seco.

Resultados

La sacarosa es un componente necesario para producir el proceso de tuberización en papa en ambas variedades, siendo el porcentaje mínimo para inducir este proceso un 6%. Aparentemente, el porcentaje óptimo está entre 8 y 10% (Cuadro 5). Con el 8 o 10% de sacarosa se produce el mayor número de tubérculos, el mayor peso verde y seco, la relación peso seco/verde y calibre de los tubérculos producidos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tuberización, número de tubérculos/brote y total, peso verde, calibre y tamaño de tubérculos de papas promedio con diferentes concentraciones de sacarosa.

Tratamiento (g/L)	Tuberización	Nº Tubér/Brote	Total Tubérculos	P. verde tubérculo	Calibre (mm)	Largo (mm)
Shepody						
0	NO	-	-	-	-	-
30	NO	-	-	-	-	-
40	NO	-	-	-	-	-
60	SI	1	13	0.12	4	8
80	SI	1	38	0.10	4	7
100	SI	1	39	0.11	4	7
Desirée						

0	NO	-	-	-	-	-
30	NO	-	-	-	-	-
40	NO	-	-	-	-	-
60	SI	1	19	0.14	3	7
80	SI	1	34	0.10	5	9
100	SI	1	33	0.15	4	6

- Medio basal sin sacarosa (0%), Medio basal sin sacarosa con 3, 4, 6, 8 y 10%

Concentraciones de BAP

Se establecieron dos ensayos, uno con la variedad Shepody y otro con la variedad Desirée. Los tratamientos fueron cuatro y correspondieron a las dosis de BAP (0; 0.5; 3.0; 5.0mg/L). La metodología experimental fue similar a la descrita en los ensayos de evaluación de niveles de sacarosa.

Resultados

Los resultados obtenidos indicaron que es importante incluir BAP en el medio de cultivo líquido para inducir la tuberización en las dos variedades de papa evaluadas (Cuadro 6). La dosis de 0,5mg/L de BAP produce un efecto positivo en el número total de tubérculos producidos en Shepody y Desirée. Sin embargo, las dosis de 3 y 5mg/L producen un mayor peso verde, peso seco relación peso seco/verde y calibre de los tubérculos producidos en ambas variedades (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tuberización, número de tubérculos/brote y total, peso fresco, calibre y tamaño de tubérculos de papas promedio con diferentes concentraciones de BAP.

Trat (mg/L)	Tuberización	NºTubér/brote	Total Tubérculos	P. verde tubérculos	Calibre (mm)	Largo (mm)
Shepody						
0	NO	-	-	-	-	-
0,5	SI	1	39	0.10	4	7
3	SI	1	24	0.10	4	8
5	SI	1	24	0.08	4	7
Desirée						
0	NO	-	-	-	-	-
0,5	SI	1	41	0.07	4	6
3	SI	1	27	0.10	3	7
5	SI	1	27	0.08	4	7

En resumen, la multiplicación y el despacho de los brotes desde el Centro Experimental La pampa resultó bastante eficiente para el desarrollo del proyecto. Los resultados obtenidos indicaron que los brotes de papa pueden crecer y desarrollarse sin mayores problemas en medio líquido. Por otra parte, la concentración de sacarosa y BAP son indispensables para promover la tuberización. La dosis de sacarosa recomendada fluctuó entre 80 y 100g/L y la dosis de BAP estuvo entre 3 y 5mg/L. Esta información fue muy importante para iniciar los trabajos en el sistema de inmersión temporal.

D. PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS- SEMILLA EN EL SIT

1. Multiplicación de brotes

La multiplicación de los brotes en el sistema de inmersión temporal está determinada principalmente por la frecuencia y tiempo de inmersión, volumen de medio y número de explantes.

a) Frecuencia y tiempo de inmersión

En esta etapa del trabajo se continuó con la evaluación de las dos variedades seleccionadas: Desirée y Shepody. Las frecuencias de inmersión evaluadas fueron 3, 6, y 12 horas y los tiempos de inmersión de 1, 3 y 5min. El volumen del medio fue de 250mL con 9 explantes por repetición. El número de repeticiones varió entre tres y seis, dependiendo del ensayo. El periodo de evaluación fue de 42 días con un cambio de medio líquido a los 21 días. Los medios de cultivo utilizados en cada especie fueron los descritos anteriormente.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes y hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

El análisis de la frecuencia de inmersión de 3 hrs. con dos tiempos de inmersión indicó que el mejor tiempo de inmersión fue 5 min ya que produjo un mayor número de brotes

por explante, sin embargo la calidad de los brotes medida en la relación peso seco/peso verde fue inferior (Cuadro 7).

Cuadro 7. Longitud de brote (cm), número de brotes/explante, peso seco y relación peso seco/peso verde de dos variedades de papa y dos tiempos de inmersión.

Tratamiento	Brotos			
	Long (cm)	Brotos/exp (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Variedad				
Desirée	12.8a	4.7a	0.18 ^a	0.10a
Shepody	11.8a	2.8b	0.14b	0.09a
Tiempo				
3	13.3a	2.8b	0.15b	0.12a
5	11.3b	4.7a	0.18 ^a	0.09b

Frecuencia 3 horas; *N° brotes/explantes con mas de 3 yemas.

Esta situación nos indujo a evaluar otras frecuencias de inmersión como 6 y 12 hrs. El análisis de estas frecuencias de inmersión con un tiempo de inmersión de 3 min indicó que la frecuencia de 12 horas podría ser la mejor para la multiplicación de brotes de papas, si se consideran los valores de proliferación y calidad de los brotes como criterio de discriminación entre las diferentes frecuencias de inmersión (Cuadro 8).

Cuadro 8. Longitud de brote (cm), número de brotes/explante, peso seco y relación peso seco/peso verde de dos variedades de papa y tres frecuencias de inmersión.

Tratamiento	Brote			
	Long (cm)	Brotos/exp (N°)*	P. seco (gr)	Ps/Pv
Variedad				
Desirée	13.5a	24.0a	0.11a	0.11a
Shepody	11.9b	13.4b	0.11a	0.17a
Frecuencia				
3	13.2b	2.7b	0.14a	0.10a
6	9.8c	4.5a	0.12b	0.12a
12	15.1a	4.9a	0.09b	0.12a

Tiempo: 3 min; *N° brotes/explantes con mas de 3 yemas.

Un análisis en conjunto de los datos obtenidos en los diferentes experimentos de frecuencia y tiempos de inmersión indicaron que, en general, la variedad Desirée tuvo un mejor comportamiento que la variedad Shepody en el SIT. Esta situación se vió reflejada por los mejores índices de proliferación, peso verde y seco en varias frecuencias y tiempos de inmersión. Sin embargo, esta situación no se presentó al analizar la longitud

del brote y la relación peso seco y peso verde (Cuadro 9). Por ejemplo, solo en la frecuencia de 6 horas y tiempo de inmersión de 3min se observó una mayor longitud de brotes en la variedad Desiree.

Cuadro 9. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°), peso seco (gr) y relación peso seco y verde en dos variedades de papa.

Variedades*	Frecuencia (hrs)	Tiempo (min)	Brotos			
			Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Desiree	3	3	14.0a	4.1a	0.19a	0.12a
Shepody	3	3	12.4a	1.8b	0.10b	0.11a
Desiree	6	3	11.9a	34.7a	0.09a	0.13a
Shepody	6	3	7.7b	18.4b	0.06b	0.11a
Desiree	12	3	14.5a	34.8a	0.05a	0.11a
Shepody	12	3	15.7a	21.2b	0.06a	0.11a
Desiree	3	5	11.7a	5.7a	0.17 ^a	0.10a
Shepody	3	5	11.0a	4.0b	0.19 ^a	0.10a

*Comparación de variedades dentro de cada frecuencia y tiempo de inmersión

El análisis de las diferentes frecuencias con un tiempo de inmersión de 3 min indica aparentemente la frecuencia de 12 horas sería la mejor frecuencia, si se consideran los valores de proliferación como un criterio importante de discriminación entre las diferencias frecuencia de inmersión (Cuadro 10). Al considerar el comportamiento general del ensayo las frecuencias de 6 y 12 horas presentaron un comportamiento bastante similar entre ellas.

Cuadro 10. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°), peso seco (gr) y relación peso seco y verde en dos variedades de papa.

Variedades	Frecuencia (horas)	Tiempo (min)	Brotos			
			Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (gr)	Ps/Pv
Desree	3	3	14.0	4.1	0.19	0.12
	6	3	11.9	34.7	0.09	0.13
	12	3	14.5	34.8	0.05	0.11
Shepody	3	3	12.4	1.8	0.10	0.11
	6	3	7.7	18.4	0.06	0.11

	12	3	15.7	21.2	0.06	0.11
Variedad						
Desirée			13.5a	24.0a	0.11 ^a	0.11a
Shepody			11.9b	13.4b	0.11 ^a	0.17a
Frecuencia						
3			13.2b	2.7b	0.14a	0.20a
6			9.8c	25.5a	0.12b	0.12a
12			15.1a	27.9a	0.06b	0.12a

En la frecuencia de 3 horas no se logra un mejoramiento consistente en todas las características evaluadas al aumentar el tiempo de inmersión (Cuadro 11)

Cuadro 11. Efecto de la frecuencia (horas) y tiempo de inmersión (min) en la longitud de los brotes (cm), proliferación (N°), peso seco (gr) y relación peso seco y verde en dos variedades de papa

Variedades	Frecuencia (horas)	Tiempo (min)	Long (cm)	Prol (N°)	.P. seco (gr)	Ps/Pv
Desree	3	3	14.0	4.1	0.19	0.12
	3	5	11.7	5.7	0.17	0.10
Shepody	3	3	12.4	1.8	0.10	0.11
	3	5	11.0	4	0.19	0.10
Variedad						
Desirée			12.8a	4.7a	0.18a	0.10a
Shepody			11.8a	2.8b	0.14b	0.10a
Tiempo						
		3	13.3a	2.8b	0.15b	0.11a
		5	11.3b	4.7a	0.18a	0.09b

b. Volúmenes de medio y número de explantes

Se estableció un ensayo en un Diseño Completamente al azar con arreglo factorial con las dos variedades, tres volúmenes, tres números de explantes y tres repeticiones. Las variedades utilizadas fueron Desirée y Shepody. Los volúmenes del medio cultivo fueron 250, 500 y 750mL y el número de explantes de 6, 9 y 12.

Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco y verde de los brotes, hiperhidricidad y relación peso seco/peso verde de los brotes.

Resultados

La evaluación de las dos variedades de papa con diferentes volúmenes de medio y número de explantes indicó que la variedad Shepody tuvo un mejor comportamiento que la variedad Desirée, si consideramos el número de brotes/explante (proliferación). La calidad de los brotes de ambas variedades fue similar al igual que el largo de ellos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Longitud de brote (cm), número de brotes/explante, peso seco y relación peso seco/peso verde de dos variedades de papa en tres volúmenes de medio y tres número de explantes.

Tratamiento	Brotes				
	Long (cm)	Prol (N°)*	P. seco (g)	Ps/Pv	Yemas (N°)
Variedad					
Desirée	15.2a	4.0b	0.21b	0.09 ^a	90.8a
Shepody	11.8a	4.7a	0.36a	0.09 ^a	77.9b
Volumen (mL)					
250	14.4a	4.4a	0.22b	0.10 ^a	72.3c
500	12.8a	4.3a	0.32a	0.08b	83.2b
750	13.4a	4.4a	0.32a	0.09ab	97.7a
N° brotes					
6	17.4a	4.6a	0.32a	0.09 ^a	96.5a
9	12.0a	4.5ab	0.26b	0.09 ^a	83.5b
12	11.2a	4.1b	0.28ab	0.08b	73.3c

Frecuencia 12 Hrs; tiempo 3 min; *N° brotes con mas de 3 yemas.

En relación al volumen de medio líquido evaluado en el ensayo no se observaron diferencias significativas en el largo de los brotes, ni en el número de brotes/explante. Con 500 y 750 mL se obtuvo el mayor peso seco de los brotes, pero con 250mL se obtuvo una mejor calidad de éstos (Cuadro 12). El largo de los brotes no fue afectado significativamente por el número de explantes, sin embargo se observó un mayor número de brotes por explantes y una mejor calidad al utilizar 6 y 9 brotes (Cuadro 12).

En este experimento se evaluó el número de yemas producidas en cada tratamiento, variable muy importante si se considera un aumento en la duración del proceso de multiplicación para mejorar el coeficiente de multiplicación. El número de yemas y de brotes con menos de tres yemas tendrán una excelente oportunidad de mejorar su

condición al aumentar el tiempo de multiplicación en los futuros experimentos (Cuadro 12).

c. Aplicación de CO₂

Estudios realizados en otras especies indican que la aplicación de CO₂ puede mejorar el crecimiento calidad de los brotes producidos en el SIT.

Se estableció un ensayo para evaluar el efecto de aplicación de CO₂ en el crecimiento de los brotes en el SIT. La dosis de CO₂ fue de 1L/min inyectado a la botella que contenía los brotes con una frecuencia de 6 horas. El CO₂ inyectado forma parte de una mezcla con aire y nitrógeno en una dosis de 1200ppm. La frecuencia y tiempo de inmersión fue de 12hrs y 3 min.

Resultados

Las dos variedades presentaron un comportamiento diferentes a la inyección de CO₂. La inyección de CO₂ favoreció a la variedad Desirée en la longitud, proliferación y relación peso seco/peso verde, sin embargo tuvo un efecto positivo en el peso verde y seco en la variedad Shepody. Al analizar los resultados en promedio se observa que la inyección de CO₂ no tuvo un efecto significativo en ninguna de las características evaluadas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Longitud (cm), proliferación (N°), peso seco (g) y relación de peso seco/peso verde en dos variedades con y sin inyección de CO₂

Tratamientos	Brotos			
	Long (cm)	Prol (N°)	P. seco (g)	Ps/Pv
Variedades				
Desirée	12.8a	6.8a	0.05b	0.20a
Shepody	13.8a	5.5b	0.10a	0.13b
Inyección				
Con CO ₂	12.1a	6.3a	0.08a	0.15a
Sin CO ₂	14.6a	5.9a	0.07a	0.17a

2. Microtuberización

Para evaluar el proceso de microtuberización de papa se realizó una serie de ensayos que implicó la evaluación de diversas variables como: tiempo de multiplicación de los brotes (40 y 60 días), volumen de medio (250 y 500mL/L), dosis de BAP (1, 3, 5mg/L) y fechas de cosecha (30 y 60 días), utilizando las variedades seleccionadas anteriormente: Desirée y Shepody.

Los antecedentes obtenidos en las etapas anteriores determinaron que es indispensable incluir una concentración de sacarosa de 80-100g/L y de BAP de 3 a 5mg/L para inducir la tuberización, por lo cual estos factores fueron incorporados en el proceso de microtuberización en el SIT. Como esta etapa se realiza en oscuridad, los frascos fueron cubiertos con papel aluminio.

Para todos estos ensayos se utilizó la frecuencia y tiempo de inmersión de 12 horas y 3 min. El diseño experimental fue un Completamente al azar en arreglo factorial con un número variable de factores y repeticiones, dependiendo de los ensayos.

Las evaluaciones fueron: número, peso verde, longitud y ancho de los mini tubérculos.

a. Variedad, tiempo de multiplicación y volumen de medio

Los datos obtenidos en los ensayos multiplicación de brotes, evaluados a los 40 días, indicaron que los brotes poseían un importante número de yemas que potencialmente podrían dar origen a nuevos brotes si se amplía el período de multiplicación. Este mayor número de brotes potenciales podría dar un mayor número de microtubérculos, los que podrían necesitar un mayor volumen de medio para su crecimiento. Basado en esta hipótesis se planificó un ensayo cuyo objetivo fue evaluar el efecto de la duración de este proceso en la multiplicación de los brotes y dos volúmenes de medio. En este ensayo se evaluaron las dos variedades con un período de multiplicación de brotes 40 y 60 días, previo al proceso de tuberización, en 250 y 500mL en el proceso de tuberización.

Resultados

Los resultados indicaron que las dos variedades presentaron un comportamiento diferente en algunas de las variables evaluadas. Es así como, la variedad Shepody tuvo un mejor comportamiento que Desirée en el peso y largo de los microtubérculos cosechados. A pesar de esta situación las dos variedades presentaron un ancho y número de microtubérculos estadísticamente no significativo (Cuadro 14).

El mayor tiempo de multiplicación de los brotes previo a la tuberización no tuvo un efecto significativo en ninguna de las características evaluadas (Cuadro 14).

El volumen de medio durante el proceso de microtuberización afectó significativamente solo el número de microtubérculos producidos, siendo recomendable realizar este proceso con 500mL, bajo las condiciones del ensayo (Cuadro 14).

Cuadro 14. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en dos tiempos de multiplicación de brotes (días) y dos volúmenes de medio.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Variedades				
Desirée	0.7b	11.1b	7.0a	58.7a
Shepody	1.0a	15.3a	6.9 ^a	48.7a
T. multiplicación (días)				
40	0.8a	12.8a	6.8 ^a	57.5a
60	0.9a	13.6a	7.1 ^a	50.8a
Volumen de medio (mL)				
250	0.8a	13.2a	6.8 ^a	41.6b
500	0.9a	13.2a	7.1 ^a	67.3a

b. Variedades, dosis de BAP y tiempo de cosechas

Para evaluar las dosis de BAP y tiempo de cosecha se realizó con un tiempo de multiplicación de los brotes de 40 y 60 días y un volumen de 250 y 500 mL de medio de tuberización.

i. Tiempo de multiplicación de brotes 40 días y volumen de medio 250 mL.

Las dos variedades tuvieron un comportamiento similar en las cuatro características evaluadas, salvo en la longitud de los microtubérculos, la variedad Shepody presentó un mayor valor estadísticamente significativo (Cuadro 15).

Al evaluar las tres dosis de BAP, se detectó solo diferencias significativas en el número de microtubérculos producidos, siendo el mejor tratamiento la aplicación de 5 mg/L de BAP al medio (Cuadro 15).

El mejor tiempo de cosecha fue el que se realizó a los 60 días, o sea tuvo dos cambios de medio, ya que se produjo el mayor número de microtubérculos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en dos variedades de papa, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Variedades				
Desirée	0.78a	12.1b	7.4 ^a	31.6a
Shepody	0.93a	15.0a	7.0a	36.4a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	0.89a	13.8a	7.3 ^a	23.1b
3	0.98a	14.1a	7.6 ^a	23.9b
5	0.63a	11.7a	6.7 ^a	55.4a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.70a	12.9a	7.2 ^a	16.1b
2	0.95a	13.5a	7.3 ^a	46.6a

ii. Tiempo de multiplicación de brotes 40 días y volumen de medio 500mL.

El análisis de los datos con brotes multiplicados por un período de 40 días establecidos en un medio de tuberización de 500 mL indicó un comportamiento diferente entre las variedades, dosis de BAP y tiempo de cosecha.

La variedad Desirée presentó un mayor número de microtubérculos, los cuales fueron también mas anchos al ser comparados con los producidos por la variedad Shepody. Sin

embargo, la variedad Shepody fue superior a Desirée en el peso y longitud de los microtubérculos (Cuadro 16).

Las dosis de BAP solo afectaron la producción del número de microtubérculos, observándose que con la aplicación de 3 y 5 mg/L de BAP se obtuvo los mejores rendimientos (Cuadro 16).

El largo del proceso de tuberización, expresado en el tiempo de cosecha, afectó solo a la producción de microtubérculos, obteniéndose un mayor rendimiento con un período de tuberización de 60 días (Cuadro 16).

Cuadro 16. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en dos variedades de papa, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Variedades				
Desirée	0.56b	10.2b	6.5 ^a	105.3a
Shepody	0.98a	14.5a	6.6 ^a	52.7b
Dosis de BAP (mg/L)				
1	1.1a	14.9a	7.2 ^a	49.1b
3	0.6a	10.8a	5.9 ^a	85.0a
5	0.6a	11.0a	6.4 ^a	104.1a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.64a	11.7a	6.6 ^a	44.6b
2	0.90a	12.9a	6.5 ^a	113.6a

iii. Tiempo de multiplicación de brotes 60 días y volumen de medio 250mL.

Las dos variedades presentaron diferencias significativas en peso y longitud de los microtubérculos, siendo superior en estos parámetros la variedad Shepody (Cuadro 17).

Las tres dosis de BAP no presentaron diferencias significativas en las variables evaluadas (Cuadro 17).

El tiempo de cosecha a los 62 días dió microtubérculos de mayor peso y longitud (Cuadro 17).

Cuadro 17. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en dos variedades de papa, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Variedades				
Desirée	0.58b	10.8b	6.5 ^a	42.4a
Shepody	0.90a	15.1a	6.5 ^a	47.6a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	0.69a	12.5a	6.5 ^a	47.3a
3	0.68a	12.6a	6.4 ^a	45.6a
5	0.70a	11.8a	6.6 ^a	45.6a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.57b	11.4a	6.3 ^a	39.9a
2	0.82a	13.2a	6.7 ^a	48.7a

iv. Tiempo de multiplicación de brotes 60 días y volumen de medio 500mL.

La evaluación a los 60 días indicó que las dos variedades tuvieron un comportamiento diferente. La variedad Shepody presentó un mayor peso y longitud de microtubérculos, en cambio las dos variedades no se diferenciaron significativamente en el ancho y número de microtubérculos producidos (Cuadro 18).

Las dosis de BAP y el tiempo de cosecha no influyeron en los parámetros evaluados, con excepción a la longitud de los microtubérculos, siendo el mejor tratamiento la dosis de 3 mg/L y la segunda cosecha, respectivamente (Cuadro 18).

Cuadro 18. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en dos variedades de papa, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Variedades				
Desirée	0.66b	11.0b	7.5 ^a	58.2a
Shepody	1.35a	17.4a	7.8 ^a	51.4a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	0.97a	13.9b	7.8 ^a	52.9a
3	1.10a	15.7a	7.6 ^a	58.3a
5	0.96a	13.2b	7.7 ^a	53.6a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.91a	13.5b	7.5 ^a	50.1a
2	1.13a	15.2a	8.0a	61.9a

c. Sistemas de producción de microtubérculos por variedad

La producción de microtubérculos en la variedad Desirée y Shepody se evaluará en forma separada bajo dos situaciones: con tiempos de multiplicación de brotes de 40 y 60 días

i. Producción de Desirée con 40 días de multiplicación de brotes

El volumen de medio utilizado en el proceso de microtuberización favoreció la formación de microtubérculos de mayor peso, longitud y ancho, pero no el número de microtubérculos. El mayor número de microtubérculos se obtuvo con 500 mL de medio en el bioreactor (Cuadro 19).

La mejor dosis de BAP fue de 1 mg/L ya que favoreció un mayor peso y longitud de los microtubérculos, sin embargo, las mejores dosis para estimular un mayor número de microtubérculos fué de 3 y 5 mg/L (Cuadro 19).

En la primera cosecha se produjo el mayor número de microtubérculos (Cuadro 19).

Cuadro 19. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en variedad Desirée en dos volúmenes, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Volumen de medio (mL)				
250	0.78a	12.1a	7.4a	31.6b
500	0.56b	10.2b	6.5b	105.3a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	0.95a	13.7a	7.7a	38.6b
3	0.62b	10.6b	6.8b	61.0a
5	0.57b	10.2b	6.7b	78.5a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.63a	11.3a	7.2a	89.1a
2	0.75a	11.4a	6.9a	31.5b

ii. Producción de Desirée con 60 días de multiplicación de brotes

El volumen de 500mL favoreció la producción de un mayor número de microtubérculos, los que presentaron un mayor diámetro (Cuadro 20).

Las tres dosis de BAP no afectaron significativamente a ninguna de las características evaluadas (Cuadro 20)

La mayor cantidad de microtubérculos se obtuvo en la primera cosecha (Cuadro 20).

Cuadro 20. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en variedad Desirée en dos volúmenes, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Volumen de medio (mL)				
250	0.58a	10.8a	6.5b	42.4b
500	0.66a	11.0a	7.5a	58.2a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	0.64a	11.5a	7.2a	46.7a
3	0.67a	11.2a	6.8a	50.4a
5	0.55a	10.0a	6.9a	49.1a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.63a	11.3a	7.2a	89.1a
2	0.75a	11.4a	6.9a	31.5b

iii. Producción de Shepody con 40 días de multiplicación de brotes

El volumen de medio de cultivo, de 250 o 500 mL usado para microtuberizar no afectó las variables analizadas (Cuadro 21).

La dosis de BAP solo afectó el número de microtubérculos producidos, siendo el mejor tratamiento aquel que contuvo 5mg/L de BAP (Cuadro 21).

En la segunda cosecha se produjo un mayor número de microtubérculos en comparación con la primera cosecha (Cuadro 21).

Cuadro 21. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en variedad Desirée en dos volúmenes, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	N°
Volumen de medio (mL)				
250	0.93a	15.0a	7.0a	36.4a
500	0.98a	14.5a	6.6a	52.7a

Dosis de BAP (mg/L)				
1	1.07a	14.9a	6.8a	33.6b
3	1.08a	7.2a	7.2a	28.2b
5	0.67a	6.2a	6.2a	78.8a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.72a	13.8a	6.5a	27.6b
2	1.12a	15.4a	7.0a	57.3a

iv. Producción de Shepody con 60 días de multiplicación de brotes

El peso, longitud y ancho de los microtubérculos en Shepody se vió favorecido al realizarse en un volumen de 500mL, sin embargo el número de microtubérculos no se vió afectado por el volumen del medio donde crecieron y se desarrollaron (Cuadro 22).

La dosis de BAP no afectó a ninguno de los parámetros evaluados (Cuadro 22).

El tiempo de cosecha fue favorable en el peso y longitud de los microtubérculos y no afectó el ancho ni el número de ellos (Cuadro 22).

Cuadro 22. Peso (g), longitud (cm), ancho (cm) y número de microtubérculos en variedad Desirée en dos volúmenes, tres dosis de BAP y dos tiempos de cosecha.

Tratamientos	Microtubérculos			
	Peso (g)	Long (cm)	Ancho (cm)	Nº
Volumen de medio (mL)				
250	0.90b	15.1b	6.5b	47.6a
500	1.35a	17.4a	7.9 ^a	51.4a
Dosis de BAP (mg/L)				
1	1.09a	15.4a	7.0a	44.6a
3	1.11a	17.4a	7.3 ^a	54.6a
5	1.25a	16.4a	7.5 ^a	54.6a
Tiempo de cosecha (meses)				
1	0.98b	15.0b	7.0a	51.3a
2	1.36a	18.2a	7.6 ^a	47.6a

d. Producción de microtuberculos en invernadero

Se utilizaron 100 microtubérculos de las variedades Desirée y Shepody producidas en los diferentes sistemas de producción. Los microtubérculos utilizados fueron aquellos que

tenían tres meses de almacenaje para asegurarse la ruptura de su latencia, considerada en promedio de tres meses para ambas variedades. El calibre utilizado en la plantación de microtubérculos fue de 2,6 grs. La fecha de plantación de los microtubérculos fue el 12 de enero y la fecha de cosecha el 13 de abril. Los microtubérculos fueron plantados en arena, y recibieron una fertilización y una frecuencia de riego adecuada.

Resultados

La evaluación de la producción de microtubérculos fue de tres meses. En la variedad Desirée, todos los microtubérculos lograron brotar, producir plántulas de buena calidad y producir mini y microtubérculos de diferentes calibres (Cuadro 23), sin embargo, en la variedad Shepody se observó una pérdida de 8% de los microtubérculos plantados y un porcentaje levemente inferior de minitubérculos calibre 1, comparado con la variedad Desirée (Cuadro 23).

Cuadro 23. Número y calibre de microtubérculos de papa cosechados en invernadero, utilizando microtubérculos producidos en el SIT

Variedad	N° de micro tubérculos	Calibre *(%)		
		Calibre 1	Calibre 2	Calibre 3
Shepody	82	48.7	29.3	22.0
Desirée	128	36.7	39.0	24.3

* Calibre 1= 41.6 g; calibre 2=12.3 g; calibre 3= 2.6 g

E. Conclusiones

2. Resultado general: multiplicación adecuada de las plantas de papa en medios líquidos, sin presencia de hiperhidratación.
3. El sistema de producción de microtuberculos en SIT incluye cuatro etapas
 - a) Producción de brotes en el sistema de micropropagación convencional
 - b) Multiplicación de brotes de papa, bajo las siguientes condiciones
 - Frecuencia y tiempo de inmersión de 12 hrs y 3 min
 - Volumen de medio: 250 mL
 - Número de explantes: 9
 - Duración del período de multiplicación: 40 días

Aplicación de CO₂: sin aplicación de CO₂

c) Tubernización en oscuridad, bajo las siguientes condiciones

Dosis de sacarosa: 80-100 g/L

Dosis de BAP: 3-5mg/L

Volumen de medio: 500mL

Período de cosecha de microtubérculos: 60 días

d) Producción de microtubérculos en invernadero ("engorda")

Sustrato: arena, turba o vermiculita

Producción de plantas: normales

Producción de microtubérculos: de varios calibres

F. Recomendaciones

Para mejorar el calibre de los microtubérculos producidos en el SIT se recomienda pasar por un período de "engorda" de los microtubérculos en el invernadero que dura tres meses.

IDENTIFICACIÓN VARIETAL Y ESTABILIDAD GENÉTICA EN EL PROCESO DE MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS EN EL SIT ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES

I. IDENTIFICACIÓN VARIETAL

La identificación de variedades es una actividad esencial en el sector agrícola y frutícola, especialmente para los productores, empresas vendedoras de plantas y consumidores. Las empresas productoras de plantas necesitan describir sus productos mejorados genéticamente para distinguirlos de otras plantas disponibles en el mercado, para poder comercializarlos y recuperar la inversión realizada. Desde el punto de vista de los consumidores la identificación legal de un producto permite la elección de aquel que sea el más adecuado a sus condiciones y exigir la garantía de calidad del producto comprado. Actualmente, la mejor forma de identificar una variedad podría resolverse realizando un análisis de ADN comparativo entre el material registrado y el vendido.

El error de identificación de variedades implica una pérdida en la ganancia genética y económica. Existe un creciente número de especies en las cuales los marcadores moleculares han sido utilizados con propósitos de identificación genotípica, puesto que los errores de identificación durante la operación de un programa de multiplicación son relativamente frecuentes.

En especies leñosas, como es el caso de *Picea abies* mediante RAPDs se generó un catálogo molecular de clones seleccionados y se detectó problemas de clasificación en 4 de los 22 clones analizados (Scheepers y otros, 1997). En las especies *Picea glauca* y *P. engelmannii* e híbridos naturales, los RAPDs permitieron generar protocolos de rápida identificación clonal (Khasa y Dancik, 1996). En el caso de *P. sitchensis* esta misma técnica permitió la identificación de 57 árboles *plus* pertenecientes a un programa de mejoramiento genético, lo que facilita su manejo operativo y la identificación de clones (o rametos) mal identificados (Van de Ven y McNicol, 1995). Resultados similares se observaron en *P. thunbergii* (Goto, 1998), y en *Eucalyptus globulus*, Keil and Griffin (1994) reportan la identificación de errores de identificación en la totalidad de los programas de mejoramiento genético evaluados.

Un método común y económico de propagación de muchas especies es la propagación vegetativa, por macroestacas y en menor grado a través de micropropagación para producir las plantas madres que son la fuente para obtener plantas.

La certificación de calidad de las plantas se basa en la comparación de los patrones genéticos producidos por los marcadores moleculares de la planta madre y las plantas multiplicadas a partir de ella. De esta manera es posible detectar posibles errores y su origen, si es que los hubiera. En esta etapa de desarrollo de los programas de multiplicación de plantas se necesita mantener un alto nivel de pureza genética en la propagación de los materiales seleccionados. De esta forma, las ganancias genéticas estimadas se puedan reflejar a nivel operacional.

II. ESTABILIDAD GENÉTICA

La micropropagación de plantas es una reproducción asexuada que se basa en la multiplicación celular a través de la mitosis, por lo cual las plantas producidas por este método debieran ser genéticamente uniformes.

La posible variación genética puede entonces estar influenciada en mayor grado si el sistema de regeneración es realizada a través del paso por la fase de callo. En el caso de plantas producidas mediante meristemas o segmentos nodales tienen un mayor grado de uniformidad y los mutantes pueden ser atribuidos a mutaciones al azar. En de las tres especies utilizadas en este proyecto, papa, vid y arándano la posibilidad de variación somaclonal debiera ser menor, pues este método fue usado para micropropagar el material.

Las variaciones somaclonales son importantes como fuente de variación genética para el mejoramiento de plantas, sobre todo cuando estas son heredables. Sin embargo, al micropropagar una variedad con características de agronómicas y de calidad deseable el propósito es obtener absoluta uniformidad genética.

1. Causas genéticas de variación somaclonal

Las especies tienen un número y estructura de cromosomas definido, sin embargo éste puede verse afectado en ápices con un alto índice mitótico. El mayor efecto sobre la

variación somaclonal lo produce un cambio dentro de un set de cromosomas (aneuploidía), ello debido al desbalance genético que se produce. Por otro lado, un aumento del set completo de cromosomas (euploidía) puede resultar en cambios sobre el tamaño medio celular, lo que además aumenta la dosis génica.

La variación somaclonal también puede ser producida por la pérdida, duplicación, y translocación de segmentos cromosomales, lo que incide en variar los contenidos de ADN y en algunos casos la interrupción de la expresión génica.

Otra causa de la variación ha sido causada por cambios en el citoplasma, especialmente a nivel mitocondrial, pero este tipo de variación se ha detectado con mayor frecuencia cuando la multiplicación y regeneración de plantas se ha realizado desde células en suspensión.

Cuando los cambios somaclonales no son heredados han sido clasificados como cambios epigenéticos. Ellos son cambios en la expresión genética más que cambios en el genoma mismo.

2. Origen de la variación somaclonal

Existen tres principales orígenes a las posibles variaciones somaclonales, la primera es debido a que puede estar en forma pre-existente en los tejidos celulares. En segundo lugar, a que algunos de los componentes del medio de cultivo son mutagénicos, dentro de ellos las hormonas han sido las principales causantes de la variación detectada. En tercer lugar, la inducción a la variación somaclonal puede ser causada en conjunto por el ambiente, altas tasas de multiplicación, cambios nutricionales y a los sucesivos ciclos de subcultivos que se realizan.

3. Métodos para examinar identidad y estabilidad genética

a. Marcadores morfológicos

En forma convencional la identificación y determinación de pureza del material genético se ha realizado por observación del fenotipo (marcadores morfo-fenológicos) en

invernadero, o en ensayos de campo y por test de progenies. Aun cuando estos marcadores tienen algunas desventajas, como por ejemplo: la escasa capacidad discriminadora, especialmente cuando se tienen que describir materiales estrechamente relacionados (dentro de una especie); subjetividad en la descripción de algunas características; e influencia ambiental. Estas desventajas pueden ser subsanadas a través del uso de otras tecnologías que puedan complementar la descripción fenotípica del material genético, como son el uso de los marcadores moleculares.

b. Marcadores moleculares (ADN)

Los marcadores moleculares permiten detectar variabilidad genética directamente al nivel del ADN, por lo cual tienen un nivel de resolución genética superior al análisis fenotípico convencional. Por ejemplo, los análisis convencionales (fenotípicos) analizan aproximadamente <5% del total de información genética existente en una especie leñosa, que es lo que se expresa en el fenotipo (Kinlaw y Neale, 1997), en comparación con los marcadores moleculares donde los análisis se realizan sobre el genoma al azar, por lo cual tiene un mayor grado de resolución.

c. Amplificación de ADN al azar (RAPD)

Los RAPD en plantas presentan una herencia dominante, detectan regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por partidor), tienen una alta potencialidad en la construcción de mapas de ligamiento genético, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas. Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y bajos requerimientos de ADN (Welsh y otros, 1990; Williams y otros, 1990).

Esta técnica ha sido usada con éxito en eucalipto en la identificación de genotipos (De Lange y otros, 1993), en un estudio de la distribución de la diversidad genética (Nesbitt, y otros, 1995), como también en la elaboración de mapas de ligamiento genómico genómico (Grattapaglia y Sederoff, 1994).

Los objetivos específicos de este trabajo fueron: 1) realizar una identificación genética-molecular de las variedades en estudio para las tres especies: papa, vid y arándano; 2) realizar un control de calidad de las plantas micropropagados en inmersión temporal mediante un análisis de RAPD.

III. DESARROLLO DEL PROYECTO

A. Materiales y Métodos

1. Materiales

En el estudio se incluyeron dos variedades de vid (Cabernet Sauvignon y Sultanina) y papa (Desirée y Shepody) y O'Neal de arándano.

2. Métodos

a. Extracción de ADN

El ADN genómico de cada clon fue aislado a partir de hojas sanas y jóvenes, desde las plantas madres. El material usado para verificar la estabilidad genética en vid y arándano después del SIT fueron hojas verdes, mientras que en papas fueron tallos y hojas amarillentas de las plantas después de finalizado el proceso de microtuberización y bajo distintos dosis de hormonas..

b. Amplificación al azar de ADN polimorfo (RAPD)

Durante el desarrollo del trabajo de identificación y estabilidad genética de las variedades usadas en el proyecto se evaluaron 48 partidores de 10 mers provenientes de los grupos A, B, C, y D (OPERON Technologies, CA).

c. Reacción de Amplificación. -La amplificación se realizó en un termociclador, MJ Research. La reacción de amplificación usada fue la siguiente: 2 μ L dNTPs (200 μ M), 1 μ L de partidor (5 μ M), 2.5 μ l tampón de amplificación (10 X), 0,75 μ L de MgCl₂ (10 mM), 1 μ L de Tritón (X-100; 0,01%), 0,2 μ l de *Taq* Polimerasa (5 U μ L⁻¹), 5 μ l de ADN (5 η g μ L⁻¹) y 12,25 μ L de agua estéril. Esta reacción de amplificación fue seleccionada por su

consistencia y reproducibilidad en las tres especies y para ser usada en forma operacional.

d. Condiciones de Amplificación. La condición de amplificación fue la siguiente: a) 3 ciclos de 95°C por 1 min, 37°C por 1 min y 72°C por 1,2 min y; b) 37 ciclos de 94°C por 35 seg, 42°C por 40 seg, 72°C por 1 min; terminando con un período de extensión de 72°C por 10 min., y un período de mantención a 4°C.

e. Electroforesis. Los productos de la reacción amplificada fueron separados en geles de agarosa (1,5%; 1 X TAE) a 100 Volts y con un tiempo de corrida aproximado de 3 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para visualizar, fotografiar y evaluar las bandas.

B. Resultados.

1. Identificación de variedades.

a. Papa

Las variedades de papa fueron identificadas entre ellas genéticamente mediante RAPDs. Se realizó un screening de las plantas originales, recién ingresadas al sistema de cultivo *in vitro* convencional. Para los 48 partidores evaluados se obtuvo 20 partidores con una buena resolución para discriminar entre las variedades. Como ejemplo, en la Foto 1 se observan los patrones obtenidos con 10 partidores para Shepody (S) y Desirée (D), existen patrones mediante los cuales es fácil distinguir entre ambas variedades, como son los partidores 2, 3, 4, 7 y 9. Las bandas de estos partidores presentan una mayor diferencia en su tamaño molecular entre las variedades. Existen otros de partidores de tipo monomórfico, donde no se presentaron, al menos en el tamaño molecular de la banda, diferencias entre las variedades, por ejemplo, el partidador 8 y 10 (Foto1).

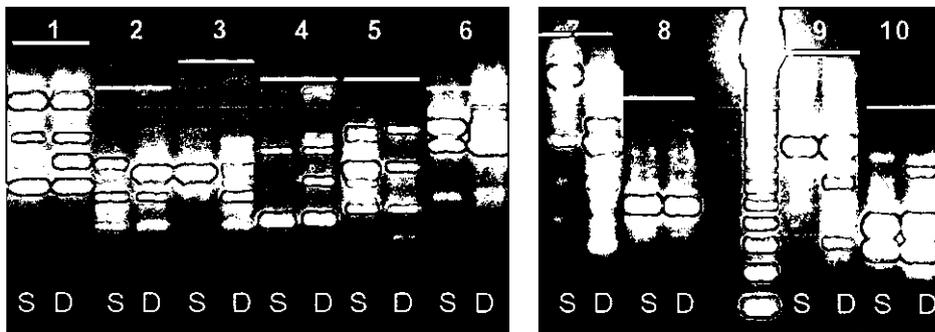


Foto 1. Identificación varietal en papas mediante RAPD.

b. Vid

Las variedades de vid también fueron identificadas entre ellas genéticamente mediante RAPDs. Se utilizaron plantas originales, recién ingresadas al sistema de cultivo *in vitro* convencional para hacer el screening con 48 partidores. Para los 48 partidores evaluados 40 de los partidores presentaron bandas polimórficas que diferenciaron entre Sultanina y Cabemet Sauvignon. Las bandas analizadas fueron las de mayor nitidez y reproducibilidad. En la foto 2 se observan los patrones obtenidos con 8 partidores para Sultanina (S) y Cabemet Sauvignon (CS), existen patrones mediante los cuales es fácil distinguir entre ambas variedades, como son los partidores 2, 3, 5, 7 y 8. Aunque los otros también discriminan entre las variedades, es preferible usar partidores que generen loci con una mayor diferencia en su tamaño molecular. Se detectaron también partidores no informativos, los cuales generaron bandas de idéntico peso molecular (4).

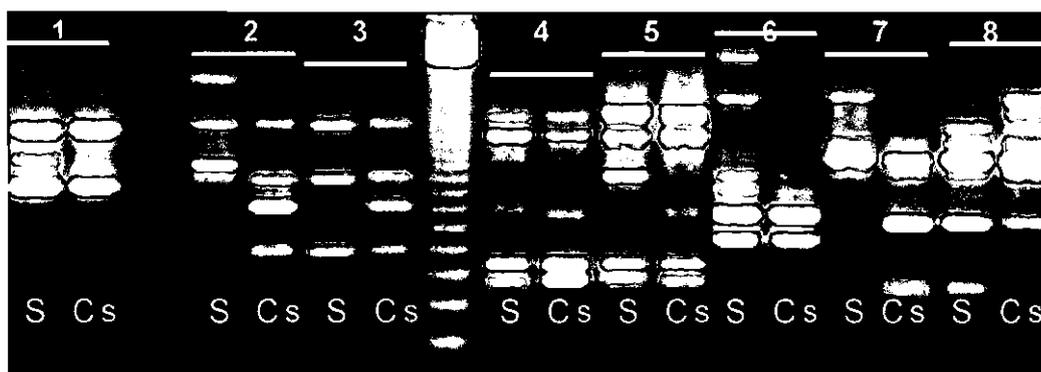


Foto 2. Identificación varietal en vid mediante RAPD.

c. Arándano

De las tres variedades de arándano usadas en la micropropagación en el SIT, sólo la variedad O'Neil fue la única evaluada molecularmente, mediante RAPD. Como primera actividad, la Empresa Hortifrut, colectó las muestras y entre ellas introdujo una proveniente de un predio (sólo identificado por ellos) donde se sospechaba de la existencia de una "mezcla de variedades". En la foto 3 la muestra identificada como (O) tiene patrones genéticos diferentes a los otros dos individuos (O'Neil), uno proveniente del huerto y el segundo proveniente del SIT, analizados con dos partidores. Lo mismo se observó en la amplificación con 20 partidores adicionales.

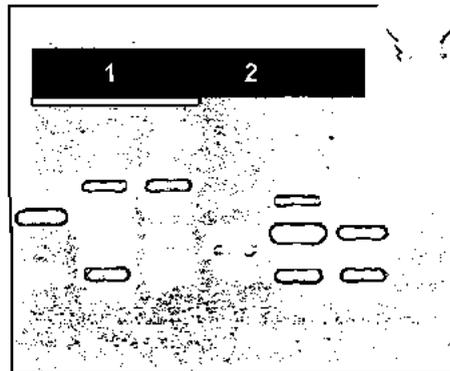


Foto 3. Variedad O'Neil proveniente de un huerto (O), de un huerto de Curacaví (CU) y genotipo proveniente del Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

2. Estabilidad genética

a. Papa

Se evaluó la estabilidad genética sobre plantas de papa que estuvieron el mayor tiempo micropropagadas en el SIT, vale decir, 120 días. Estas plantas estuvieron bajo las etapas de multiplicación, elongación y tuberización. Ello involucró cambios de medios (subcultivos) cada 21 días, cambios de hormonas y condiciones ambientales de luz a oscuridad, para el caso de la tuberización. De acuerdo a lo observado en los 48 partidores analizados no se presentó variación genética entre los individuos analizados. La Foto 4 muestra idénticos patrones de bandas para tres de los 48 partidores analizados en plantas de Shepody y Desirée originales (o) y aquellas derivadas de tratamientos de tuberización donde las dosis de BAP fueron 3 y 5 mg/l.

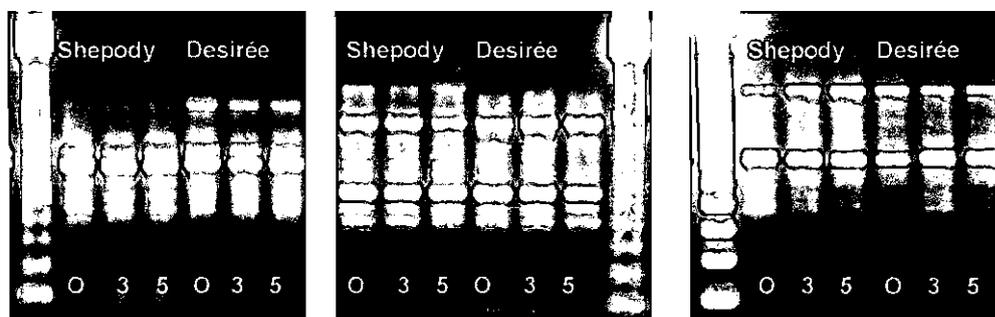


Foto 4. Estabilidad genética de Shepody y Desirée después de finalizada la etapa de tuberización con dos dosis de BAP.

b. Vid

Para las vides micropagadas en el SIT, el período involucró un período total de 40 días. El medio de cultivo de iniciación contuvo 0,1 mg/l de BAP y 30 gr/l de sacarosa, y a los 21 días se subcultivó, pasando a la etapa de elongación, y al medio de cultivo se le agregó 0,5 mg/l de GA₃ y 30 gr/l de sacarosa, al cabo de esta etapa se evaluó la estabilidad genética en plantas de vid. De acuerdo a los 48 partidores analizados no se observó variación genética en ninguna de las dos variedades. La Foto 5 muestra idénticos patrones de bandas entre plantas de Sultanina y Cabernet Sauvignon recién introducidas en cultivo *in vitro* convencional (INCV) y aquellas producidas mediante el Sistema de Inmersión Temporal.

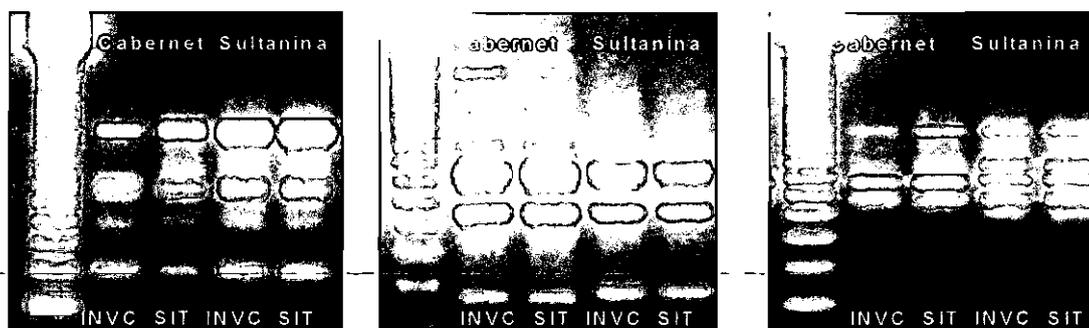


Foto 5. Estabilidad genética de Sultanina y Cabernet Sauvignon después de finalizada la etapa multiplicación y elongación en el sistema de inmersión temporal.

c. Arándano

Para la variedad O'Neil, micropagada en el SIT, el período involucró un período total de 60 días. El medio de cultivo de explicado en la sección de multiplicación en el, fue mas prolongado que el de las vides, y los subcultivos se realizaron cada..... 21 días se subcultivó, pasando a la etapa de elongación, y al medio de cultivo se le agregó 0,5 mg/l de GA₃ y 30 gr/l de sacarosa, al cabo de estas etapas se evaluó la estabilidad genética en plantas de arándano. De acuerdo a los 48 partidores analizados no se observó variación genética en O'Neil. La Foto 6 muestra idénticos patrones de bandas, para cuatro partidores de los 48 analizados, entre plantas muestreadas en el huerto (O), en condiciones de cultivo *in vitro* convencional (CIV) y de plantas provenientes del Sistema de inmersión temporal (SIT).

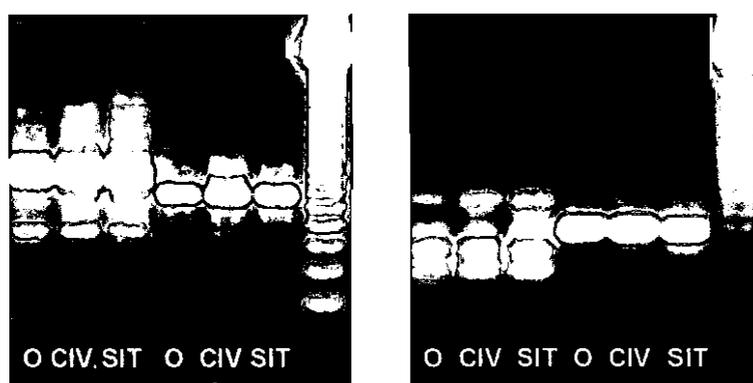


Foto 6. Estabilidad genética de Sultanina y Cabernet Sauvignon después de finalizada la etapa multiplicación y elongación en el sistema de inmersión temporal.

C. CONCLUSIONES

Mediante RAPDs se logró diferenciar entre las variedades de papa y vid, en el caso de arándano, se determinó la existencia de un genotipo no deseado.

La estabilidad genética de las tres especies micropagadas a través del SIT no se vió afectada, vale decir, la identidad genética no se alteró con este sistema de propagación propuesto.

Ambos aspectos tienen una gran relevancia en un proceso de certificación del genotipo y a su vez un control de calidad del proceso de producción de plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- De Lange, W.J.; Wingfield, B.D.; Viljoen, C.D. Wingfield, M.J. 1993. RAPD-fingerprinting to identify *Eucalyptus grandis* clones. South African Forestry J. 167:47-50
- Goto S. 1998. Genetic fingerprinting of nematode-resistant clones of Japanese black pine (*Pinus thunbergii* Parl) using RAPD markers. J. For. Res. 3:127-130.
- Grattapaglia, D.; Sederoff, R. 1994. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. Genetics 137:1121-1137
- Keil, M.; Griffin, A.R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. Theor. Appl. Genet. 89: 442-450
- Khasa, P. and B. Dancik.: Rapid identification of white-Engelmann spruce species by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 92 :46-52. (1996).
- Scheepers, D.; M-C Eloy and M Briquet. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). Theor. Appl. Genet. 94 :480-485.
- Van den ven, W y R Mcnicol. 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. Heredity. 75 :126-132.
- Welsh, J. McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Res. 18: 7213-7218
- Williams, J.G.K.; Kubelik.A.R.; Livak, K.J.; Rafalki, J.A.; Tingy, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res. 18:6531-6535

EVALUACIÓN ECONÓMICA: COMPARACIÓN ENTRE MICROPROPAGACIÓN CONVENCIONAL Y EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Sistema de Producción.

Sobre la base del esquema de propagación para cada una de las especies del proyecto; vid, arándano y papas, se evaluó en forma económica el proceso de inmersión temporal (SIT) y se comparó con el sistema convencional de micropropagación.

El estudio económico sólo considera el proceso productivo en la etapa de laboratorio, se descarta el trabajo de obtención de material genético y la etapa de vivero, ya que son etapas que no son afectadas por la tecnología desarrollada por el proyecto.

Materiales y métodos.

Para evaluar en forma económica el sistema productivo, se diseñó una ficha técnica-económica para cada cultivo. La matriz de esta ficha es la que se presenta en la figura 1.

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			
Equipos			
Materiales			
Insumos			
Servicios Generales			
Administración			
Total Laboratorio			

La información que se recolecta, según Figura 1, se complementaba con:

- ✓ Tiempo de Trabajo.
- ✓ Tasa de Multiplicación.
- ✓ Cantidad de material ingresado a propagación.
- ✓ Plantas o tubérculos producidos.
- ✓ Pérdidas.

Los ítems se valoraban por unidad requerida para el esquema de producción de acuerdo a la experiencia del trabajo en el laboratorio, vale decir se cuantificaban las unidades requeridas de cada insumo por cantidad de material a micropropagar, ya sea el caso de micropropagación *in-vitro* como el sistema SIT.

Para el caso del SIT, como el proyecto es pionero en la tecnología, no se contaba con información de duración o depreciación de material o inversión requerida, se utilizó tasa estándar y común para las diversas especies.

Los supuestos utilizados para las inversiones y material fungible del sistema de inmersión temporal son:

Depreciación de inversión : 5 años.

Duración de material fungible como mangueras y matraces : 3 años.

El estudio económico se realizó para:

✓ Plantas de Vides:

- Convencional *in-vitro*.
- SIT 2 subcultivos.
- SIT 3 subcultivos.

✓ Microtubérculos de Papas:

- Convencional *in-vitro*.
- SIT con 3 mg de BAP.
- SIT con 5 mg de BAP.

✓ Plantas de Arándanos:

- Convencional *in-vitro*.
- SIT.

Resultados

El detalle del estudio económico para cada especie es:

Plantas de vides

Item	Vid in-vitro			Vid SIT 2 subcultivo			Vid SIT 3 subcultivo		
	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje
Personal	129.605	48	47,2%	43.898	49	30,0%	52.260	19	26,5%
Equipos	8.416	3	3,1%	23.287	26	15,9%	25.271	9	12,8%
Materiales	4.041	1	1,5%	9.904	11	6,8%	11.039	4	5,6%
Insumos	88.549	33	32,2%	28.224	31	19,3%	65.209	24	33,1%
Servicios Generales	31.020	11	11,3%	34.020	38	23,3%	34.020	13	17,3%
Administración	13.082	5	4,8%	6.967	8	4,8%	9.390	3	4,8%
Total	274.712	102	100,0%	146.300	163	100,0%	197.188	73	100,0%
Producción plantas	2.700			900			2.700		
Valor Unitario (\$)	102			163			73		
Material Inicial	100 brotes			100 brotes			100 brotes		

Microtubérculos de papas

Item	Papas in-vitro			Papas SIT 3 mg BAP			Papas SIT 5 mg BAP		
	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje
Personal	129.605	150	56,4%	41.808	108	35,1%	43.898	88	35,8%
Equipos	8.416	10	3,7%	26.191	68	22,0%	26.191	52	21,3%
Materiales	4.041	5	1,8%	11.039	29	9,3%	11.039	22	9,0%
Insumos	52.883	61	23,0%	15.445	40	13,0%	16.783	34	13,7%
Servicios Generales	24.020	28	10,4%	19.020	49	16,0%	19.020	38	15,5%
Administración	10.948	13	4,8%	5.675	15	4,8%	5.847	12	4,8%
Total	229.913	266	100,0%	119.178	309	100,0%	122.778	246	100,0%
Producción m.tubérculos	864			386			500		
Valor Unitario (\$)	266			309			246		
Material Inicial	18 brotes			18 brotes			18 brotes		

Plantas de Arándanos

Item	Arándanos <i>in-vitro</i>			Arándanos SIT		
	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje	Valor (\$)	Unitario	Porcentaje
Personal	71,000	30	37,8%	53,000	13	25,7%
Equipos	7,916	3	4,2%	21,071	5	10,2%
Materiales	2,841	1	1,5%	11,010	3	5,3%
Insumos	73,055	30	38,9%	77,255	19	37,5%
Servicios Generales	24,020	10	12,8%	34,020	9	16,5%
Administración	8,942	4	4,8%	9,818	2	4,8%
Total	187,774	78	100,0%	206,174	52	100,0%
Producción plantas		2.400			4.000	
Valor Unitario (\$)		78			52	
Material Inicial		800			800	

En anexo 3, se adjunta detalle de cálculo de costo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos para el costo unitario de producción, permitieron realizar una comparación entre el sistema convencional de micropropagación y las alternativas para el sistema de inmersión temporal, en base a los porcentajes de variación de los costos por ítem. Además, se obtiene la diferencia respecto a la mejor alternativa del sistema SIT.

A continuación se presenta el análisis para cada especie.

Plantas de vides

Ítem	Producción in-vitro convencional 2700 plantas	Producción SIT 2 subcultivos 900 plantas	Producción SIT 3 subcultivos 2700 plantas	
			Unitario	Relación
Personal	47,2%	30,0%	26,5%	40,3%
Equipos	3,1%	15,9%	12,8%	300,3%
Materiales	1,5%	6,8%	5,6%	273,2%
Insumos	32,2%	19,3%	33,1%	73,6%
Servicios Generales	11,3%	23,3%	17,3%	109,7%
Administración	4,8%	4,8%	4,8%	71,8%
Var. Valor Unitario	100,0%	159,8%	71,8%	

Microtubérculos de papas

Ítem	Producción in-vitro convencional 864 microtubérculos	Producción SIT 3 mg BAP 386 microtubérculos	Producción SIT 5 mg BAP 500 microtubérculos	
			Unitario	Relación
Personal	56,4%	35,1%	35,8%	58,5%
Equipos	3,7%	22,0%	21,3%	537,8%
Materiales	1,8%	9,3%	9,0%	472,0%
Insumos	23,0%	13,0%	13,7%	54,8%
Servicios Generales	10,4%	16,0%	15,5%	136,8%
Administración	4,8%	4,8%	4,8%	
Var. Valor Unitario	100,0%	116,0%	92,3%	

Plantas de Arándanos

Item	Producción in-vitro convencional 2.400 plantas	Producción SIT 4.000 plantas	
		Unitario	Relación
Personal	37,8%	25,7%	44,8%
Equipos	4,2%	10,2%	159,7%
Materiales	1,5%	5,3%	232,5%
Insumos	38,9%	37,5%	63,4%
Servicios Generales	12,8%	16,5%	85,0%
Administración	4,8%	4,8%	
Var. Valor Unitario	100,0%	65,9%	

Al respecto se puede concluir:

- ✓ En el caso de vides y arándanos se producen importantes economías en el costo de producción, principalmente en los items de personal e insumos.
- ✓ Es importante avanzar en este estudio, ya que como se señaló no hay experiencia para contabilizar la duración de los equipos y los materiales, por tanto puede haber diferencias en el costo de producción.
- ✓ El valor de las inversiones equivalen a la importación realizada por el proyecto, sin embargo actualmente es posible encontrar en el país alternativas más económicas. Por consiguiente se producirían economías si se valoraran con estos costos.

1.2. Inmersión en Sistema de Inmersión Temporal

En base al diseño de un módulo de Sistema de Inmersión Temporal con 20 unidades equivalente a 40 frascos, se han valorado cada una de las unidades que se requiere para su implementación. Considerando los requerimientos de la Fuente de Financiamiento se han valorado, considerando la situación al inicio del Proyecto FIA y la actual, vale decir materiales nacionales.

En la situación inicial del Proyecto se valoró el transporte, la internación, el diseño y montaje del Sistema (No se consideró el costo de los estantes que se requieren).

Ítem	Inversión Original (importado)			Inversión (materiales nacionales)		
	Cantidad	Valor Unitario	Total	Cantidad	Valor Unitario	Total
Compresor 1.5 HP	1	129.000	129.000	1	129.000	129.000
Válvulas MAC	4	32.175	128.700	2	45.608	91.216
Equipo fluorescente c/ tubos	20	2.700	54.000	20	2.700	54.000
Reloj Horario	1	19.800	19.800	1	19.800	19.800
Contactores	2	21.000	42.000	2	21.000	42.000
Programadores	1	260.000	260.000	1	75.471	75.471
Tubos 10 -1.5 (mm)	20	2.312	46.240	20	2.312	46.240
Tubos 8 -1.5 (mm)	4	770	3.080	4	770	3.080
Filtro aire	1	327.600	327.600	1	43.800	43.800
Cable (mts)	30	70	2.100	30	70	2.100
Botellas	40	14.310	572.400	40	14.310	572.400
Tapones	40	14.488	579.533	40	14.488	579.533
Derivaciones 10	15	3.887	58.305	15	2.487	37.305
Derivaciones 10-8	40	2.782	111.280	40	3.503	140.120
Unión codo 10	6	2.561	15.366	6	3.000	18.000
Válvula Flujo	2	7.508	15.015	2	7.477	14.954
Racor HI 10	2	1.476	2.951	2	2.207	4.414
Racor HE 10	5	2.451	12.253	5	1.331	6.655
Válvula Compuerta	1	7.508	7.508	1	6.500	6.500
Tapón GS 10	10	774	7.735	10	701	7.010
Tapón GS 8	30	750	22.500	30	700	21.000
Correas Plásticas	100	15	1.500	100	15	1.500
Materiales Menores	1	20.000	20.000	1	20.000	20.000
Mangueras silicona	15	2.321	34.808	15	2.321	34.808
Sub Total			2.473.673			1.970.906
Internación y transporte	1	825.500	825.500			
Montaje y puesta en marcha	1	7.637.409	7.637.409			
Total			10.936.582			1.970.906

DIFUSIÓN Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA

A. ACTIVIDADES TÉCNICO-ADMINISTRATIVAS

- a) Asistencia a reunión informativa en el FIA. Inicio del proyecto
- b) Compra e instalación de los equipos de Inmersión Temporal y equipos de CO₂ en INIA Quilamapu y Hortifrut-Sone
- c) Coordinación de actividades con asesores nacionales e internacionales e investigadores participantes en el proyecto.
- d) Preparación de informes técnico-financieros
- e) Organización de dos seminarios

B. REUNIONES DE TRABAJO

- a) Reuniones técnicas con el personal participante en el proyecto en INIA Quilamapu y Hortifrut-sone
- b) Reuniones de trabajo con el asesor internacional Dr. Dagoberto Casto y Dr. Ródulo Rodón.
- c) Reuniones técnicas con los Supervisores FIA del proyecto Sr. Tomas García-Huidobro y Dr. Mauricio Cañoles en INIA Quilamapu y Hortifrut
- d) Reuniones técnicas y financieras con la Srta. Ximena Soledad Mura Alvarez, Ing. Comercial, de la Contraloría General de la República, División de Auditoría Administrativa en INIA Quilamapu, dos oportunidades, y en el Centro Experimental La Pampa, INIA Remehue.
- e) Reunión Técnica con un representante del BID en Laboratorio de Hortifrut.

C. PRESENTACIONES TÉCNICAS DEL PROYECTO O SUS RESULTADOS

Avilés, R.; Becerra, V.; Paredes, M. 2005. Consideraciones económicas de la micropropagación de microtubérculos de papas y plantas de vides: sistema convencional y de inmersión temporal. 56° Congreso Agronómico de Chile, 6° Congreso Sociedad Chilena de Fruticultura, 2° Congreso Sociedad Chilena de Horticultura, Chillán, Chile.

- Becerra, V., Paredes, M., Rojo, C. 2005. Determinación de estabilidad genética en el proceso de multiplicación de plantas en el sistema de inmersión temporal (SIT). 56° Congreso Agronómico de Chile, 6° Congreso Sociedad Chilena de Fruticultura, 2° Congreso Sociedad Chilena de Horticultura, Chillán, Chile.
- Paredes, M.; Becerra, V.; Avilés, R.; Zuñiga, M. 2002. Evaluación de la factibilidad del uso de la técnica de inmersión temporal en bioreactores para mejorar la eficiencia de la micropropagación en especies anuales, frutales y vides. En: Seminario Investigación y desarrollo en Biotecnología Silvoagropecuaria: situación actual chilena. Santiago. CONICYT-CORFO-FIA-MINECON, Santiago, Chile. 2002.
- Paredes, M.; Becerra, V.; Avilés, R.; Zuñiga, M. 2002. Evaluación de la factibilidad del uso de la técnica de inmersión temporal en bioreactores para mejorar la eficiencia de la micropropagación en especies anuales, frutales y vides. En: lanzamiento del Concurso INNOVA Bio Bio-FIA en Concepción.
- Paredes, M.; Becerra, V.; Castro, D.; Santos Rojas, J. Micropropagación de papa (*Solanum tuberosum* L) mediante la técnica de inmersión temporal. XXI Congreso de la Asociación Latinoamericana de la papa (ALAP), V Seminario Latinoamericano de la papa: Uso y Comercialización. X Reunión de la Asociación Chilena de la papa (ACHIPA), II Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo en patata . Valdivia, mayo, 2004.
- Paredes, M.; Becerra, V.; Castro, D. 2004. Micropropagación de plantas de vid (*Vitis vinifera* L.) en bioreactores de inmersión temporal. V Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología. Redbio 2004. Boca Chica, República Dominicana..
- Paredes, M.; Becerra, V. Castro, D.; Carrasco, I.; Luengo, U.; Rojo, C.; Zuñiga, M. 2004. Sistema de inmersión temporal en bioreactores (SIT) arandano y vid. Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología. Biotecnología ayer, hoy y mañana. Programa EXPLORA, CONICYT. Octubre, 2004. Santiago, Chile.
- Paredes, M.; Becerra, V. Castro, D.; Carrasco, I.; Luengo, U.; Balocchi, C; Obando, M. 2004. Sistema de inmersión temporal en bioreactores (SIT) papa y eucalipto. Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología. Biotecnología ayer, hoy y mañana. Programa EXPLORA, CONICYT. Octubre, 2004. Santiago, Chile.

Paredes, M.; Becerra, V. Castro, D.; Carrasco, I.; Luengo, U. 2004. Micropropagación convencional. Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología. Biotecnología ayer, hoy y mañana. Programa EXPLORA, CONICYT. Octubre, 2004. Santiago, Chile.

Paredes, M., Becerra, V.; Castro, D.; Rojas, J., Carrasco, I, Luengo, U. 2004. Efecto de la dosis de BAP y sacarosa en la microtuberización de papas en bioreactores. 55° Congreso Agronómico de Chile, 5° Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura, 1° Congreso de la Sociedad de Horticultura. Octubre, 2004. Valdivia, Chile.

Zuñiga, M., Paredes, M., Becerra, V., Castro, D. 2005. Mejoramiento de la tasa de multiplicación en arándano a través del sistema de inmersión temporal (SIT) en birreactores. 56° Congreso Agronómico de Chile, 6° Congreso Sociedad Chilena de Fruticultura, 2° Congreso Sociedad Chilena de Horticultura, Chillán, Chile.

D. ARTICULOS DIVULGATIVOS.

Paredes, M. 2005. Inmersión Temporal en Birreactores: Nueva tecnología en micropropagación de plantas en Chile. Revista Tierra Adentro 62:48-49.

Reportaje. Revista América Economía. Junio 2005

SEMINARIOS

1er Seminario proyecto:

Invitados: Dagoberto Castro, Arturo Lavín, Jose Santos Rojas, Gabriela Balze

Investigadores del proyecto: Mario Paredes, Viviana Becerra, Rodrigo Avilés, Marcela Zuñiga. Asistencia 55 personas.

Seminario Final del proyecto:

Investigadores del proyecto: Mario Paredes, Viviana Becerra, Rodrigo Avilés, Marcela Zuñiga. Asistencia 45 personas.

F. PRESENTACIONES VARIAS

a) Autoridades nacionales y regionales: Ministro de Agricultura, Sr. Jaime Campos; Intendente de la Región del BioBio, Sr. José Toha; Seremi de Agricultura, VIII Región, Sr. Andrés Castillo; SERPLAC, Sr. Zunico; Director Nacional del INIA, Sr. Francisco González, Director Regional y Sub Director Investigación Desarrollo, Coordinador del Departamento de Producción Vegetal del INIA Quilamapu y otras autoridades regionales

b) Profesionales, técnicos y alumnos que visitaron el laboratorio de biotecnología INIA Quilamapu.

G. REUNIONES DE REVISIÓN Y DISCUSIÓN DEL PROYECTO

- a) Asesor internacional
- b) Informes técnico financiero FIA
- c) Visitas Contraloría General de la República

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que:

- a) La Inmersión temporal es un sistema adecuado para multiplicar arándano, vid y papa
- b) Las plantas de arándano y vid son altamente susceptibles a la multiplicación en medio líquido, por lo cual es muy importante trabajar con frecuencia de inmersión mas largas y con tiempos de inmersión cortos
- c) Las plantas de papa no presentaron susceptibilidad a la multiplicación en medios líquidos por lo que se pueden usar frecuencias mas cortas y tiempos mas prolongados que arándano y vid
- d) Todos los cultivos y variedades evaluadas presentaron un comportamiento diferencial por lo que la tecnología debe adaptarse a cada caso

e) La aplicación de CO₂ no modificó sustancialmente el sistema de multiplicación en el SIT

f) Es posible realizar el proceso de tuberización en papa en el SIT, pero se producen tubérculos muy pequeños, por lo que se recomienda realizar un período de engorda en invernadero

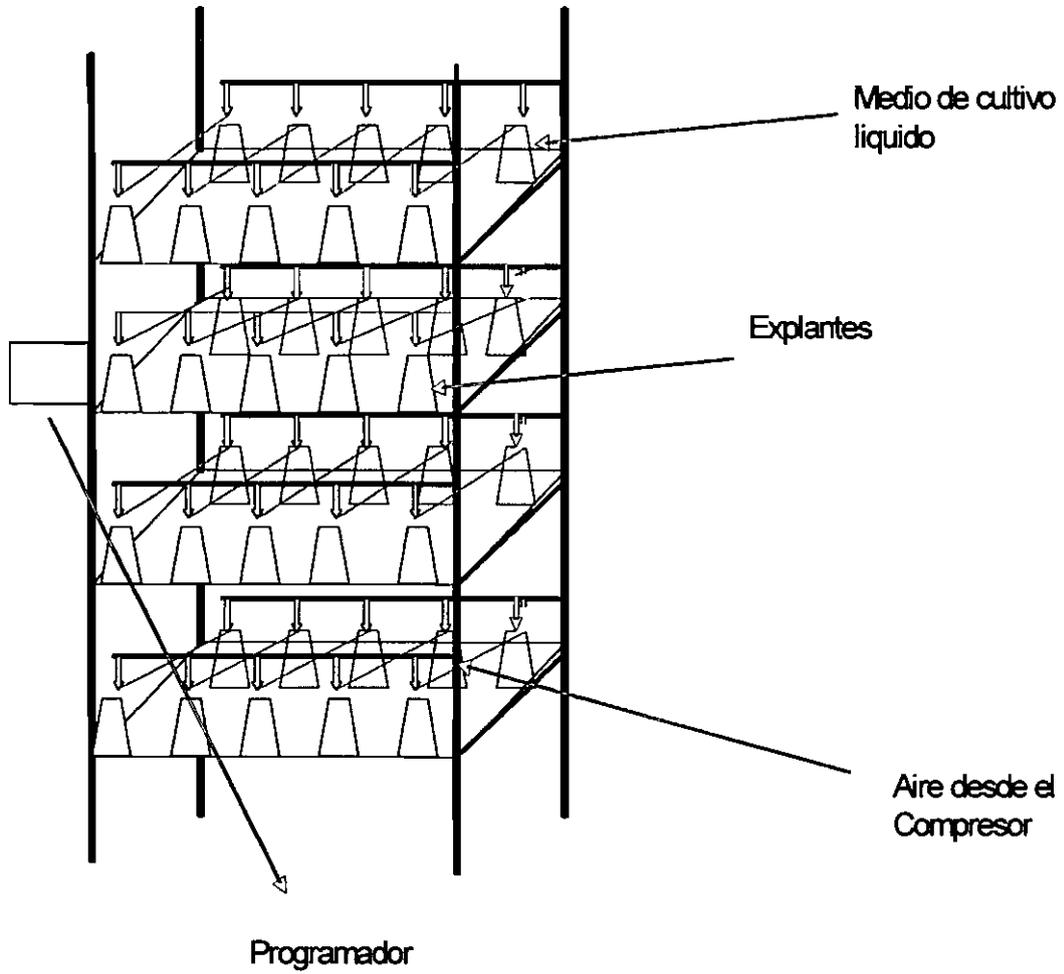
g) El proceso de multiplicación en el SIT no indujo cambios en los patrones genéticos, de acuerdo a los partidores de RAPD utilizados en los cultivos y variedades utilizadas

h) Las principales ventajas económicas del SIT se presentaron en la reducción de costo en el uso de mano de obra e insumos. Desde el punto de vista técnico, se presentó una excelente tasa de multiplicación en arándano y una escasa pérdida de plantas durante el proceso de aclimatación.

i) Las actividades de transferencia se realizaron a través de seminarios, charlas técnicas, presentaciones de trabajos a Congresos nacionales e internacionales y presentaciones en Ferias científicas y tecnológicas. Se adjunta listado de asistentes al Seminario final y presentaciones de los investigadores en Anexo.

j) El desarrollo de este proyecto incentivó la presentación de nuevos proyectos y la aplicación de esta tecnología a nuevos cultivos. La empresa Sone está evaluando la posibilidad de multiplicar arándanos, frambuesa, moras y algunas flores de bulbo. La empresa Bioforest S.A. y la Cooperativa de Mejoramiento genético Forestal, asociadas a INIA Quilamapu están evaluando la posibilidad de usar esta metodología para multiplicar las dos especies de eucalipto mas importantes en el país como son *Eucaliptos globulus* y *E. nitens*.

Anexo 1. Diagrama del sistema de inmersión temporal



Diseño de Sistema de Inmersión Temporal

V. Becerra

Anexo 2. Formulaciones de los medios



Anexo 2.1. Medio basal de arándano Word plant

Compuesto	mg/L
NH ₄ NO ₃	400
Ca (NO) ₃	556
K SO ₄	990
KH PO ₄	170
Ca CL ₂	96
Mg SO ₄ 7 H ₂ O	370
Fe SO ₄ 7 H ₂ O	27,8
Na EDTA	37,3
MnSO ₄	16,9
ZN SO ₄	8,6
H BO ₃	6,2
Na MoO ₄ 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄	0,25
Mio Inositol	100
Solución Vitaminas MS	1 ml
Tiamina	0,9
2 ip	
Azúcar	30 grs
Agar	7 grs

Anexo 2. 2. MEDIO BASAL PARA CULTIVO DE VID EN MEDIO LÍQUIDO
 (Medio usado en micropropagación convencional)

Compuesto químico	(mg/L)
NH ₄ NO ₃	400
KNO ₃	1000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	353
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200
K ₂ HPO ₄	170
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA	37,3
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
Tiamina	1
Ac. Nicotínico	1
Piridoxina	1
Cisteína	1
Biotina	1
Pantotenato de Calcio	0,01
Glutamina	200
Inositol	100
Sacarosa	30 %
BAP	0,1

Anexo 2. 3. Medios de cultivo para micropropagación y microtuberización de papa.

	MEDIO 1	MEDIO 2 Medio Basal para Micropropagación en SIT	MEDIO 3 Medio Basal para Tuberización en SIT**
Compuesto químico	MS (1962) (mgL⁻¹)	Medio Papa MS modif. (mgL⁻¹)	MS modif. (mgL⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
KNO ₃	1900	1900	1900
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	440	440
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	370	370
K ₂ HPO ₄	170	170	170
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
KI	0,83	0,83	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Glicina	2	12,5	12,5
Tiamina	0,1	12,5	12,5
Ac. Nicotínico	0,5	12,5	12,5
Piridoxina	0,5	12,5	12,5
Inositol	100	100	100
Sacarosa	3%	3%	0
Ac. Giberélico	0	0,5	0

* Similar al usado para micropropagar papas en Remehue= Medio basal del ensayo en cultivo líquido.

** Medio basal sin sacarosa y sin BAP solo para tuberización de papas

Anexo 3. Estudio económico

Vides *in-vitro*

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			129.604,5
Profesional	6.779,7	6,2	42.033,9
Operario (horas)	1.412,4	62,0	87.570,6
Equipos			8.416,0
Equipos	8.416,0	1,0	8.416,0
Materiales			4.041,0
Varios	4.041,0	1,0	4.041,0
Insumos			88.549,0
Brotos	25,0	100,0	2.500,0
Desinfección	380,0	1,0	380,0
Medio establecimiento	3.518,0	1,0	3.518,0
Medio multiplicación	3.521,0	3,0	10.563,0
Alcohol de quemar	200,0	2,0	400,0
Bisturí	1.400,0	2,0	2.800,0
Zapatos	266,0	2,0	532,0
Máscaras	78,0	2,0	156,0
Papel de aluminio	100,0	2,0	200,0
Aclimatación	25,0	2.700,0	67.500,0
Servicios Generales			31.020,0
Varios	27.000,0	1,0	27.000,0
Mantenimiento	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			13.081,5
Total Laboratorio			274.712,0

Vides SIT 3 subcultivos

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			52.259,9
Profesional	6.779,7	2,5	16.949,2
Operario (horas)	1.412,4	25,0	35.310,7
Equipos			25.270,8
Fungible	7.364,9	1,0	7.364,9
Equipo mayor	8.509,7	1,0	8.509,7
Accesorios neumáticos	4.569,5	1,0	4.569,5
Accesorios eléctricos	4.826,7	1,0	4.826,7
Materiales			11.038,7
Filtros	5.672,3	1,0	5.672,3
Frascos SIT	4.583,3	1,0	4.583,3
Matraces	508,2	1,0	508,2
Tapones de goma	203,0	1,0	203,0
Mangueras	71,4	1,0	71,4
Capilares	0,5	1,0	0,5
Operación			65.209,0
Brotos	20,0	100,0	2.000,0
Medio multiplicación	1.970,0	1,0	1.970,0
Establecimiento unidades	985,0	1,0	985,0
Subcultivo 1 unidades	985,0	1,0	985,0
Subcultivo 2 unidades	985,0	1,0	985,0
Subcultivo 3 unidades	985,0	1,0	985,0
Alcohol	950,0	1,0	950,0
Bisturí	1.400,0	1,0	1.400,0
Zapatos	266,0	1,0	266,0
Máscaras	78,0	1,0	78,0
Papel Aluminio	275,0	1,0	275,0
Plástico	330,0	1,0	330,0
Aclimatación	20,0	2.700,0	54.000,0
Servicios Generales			34.020,0
Varios	30.000,0	1,0	30.000,0
Mantenición	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			9.390
Total Laboratorio			197.188

Vides SIT 2 subcultivos

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			43.898,3
Profesional	6.779,7	2,1	14.237,3
Operario (horas)	1.412,4	21,0	29.661,0
Inversiones mayores			23.286,5
Fungible	6.444,3	1,0	6.444,3
Equipo mayor	7.446,0	1,0	7.446,0
Accesorios neumáticos	4.569,5	1,0	4.569,5
Accesorios eléctricos	4.826,7	1,0	4.826,7
Inversiones menores			9.904,2
Filtros	4.537,9	1,0	4.537,9
Frascos SIT	4.583,3	1,0	4.583,3
Matraces	508,2	1,0	508,2
Tapones de goma	203,0	1,0	203,0
Mangueras	71,4	1,0	71,4
Capilares	0,5	1,0	0,5
Operación			28.224,0
Brotos	20,0	100,0	2.000,0
Medio multiplicación	1.970,0	1,0	1.970,0
Establecimiento unidades	985,0	1,0	985,0
Subcultivo 1 unidades	985,0	1,0	985,0
Subcultivo 2 unidades	985,0	1,0	985,0
Alcohol	950,0	1,0	950,0
Bisturí	1.400,0	1,0	1.400,0
Zapatos	266,0	1,0	266,0
Máscaras	78,0	1,0	78,0
Papel Aluminio	275,0	1,0	275,0
Plástico	330,0	1,0	330,0
Aclimatación	20,0	900,0	18.000,0
Servicios Generales			34.020,0
Varios	30.000,0	1,0	30.000,0
Mantenición	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			6.967
Total Laboratorio			146.300

Papas in-vitro

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			129.604,5
Profesional	6.779,7	6,2	42.033,9
Operario (horas)	1.412,4	62,0	87.570,6
Equipos			8.416,0
Equipos	8.416,0	1,0	8.416,0
Materiales			4.041,0
Varios	4.041,0	1,0	4.041,0
Operación			52.883,0
Material	101,0	18,0	1.818,0
Desinfección	380,0	1,0	380,0
Medio establecimiento	3.518,0	1,0	3.518,0
Medio multiplicación	3.521,0	3,0	10.563,0
Alcohol de quemar	200,0	1,0	200,0
Bisturí	1.400,0	1,0	1.400,0
Zapatos	266,0	1,0	266,0
Máscaras	78,0	1,0	78,0
Papel de aluminio	100,0	1,0	100,0
Aclimatación	40,0	864,0	34.560,0
Servicios Generales			24.020,0
Varios	20.000,0	1,0	20.000,0
Mantenición	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			10.948
Total Laboratorio			229.913

Papa SIT 3 mg BAP

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			41.807,9
Profesional	6.779,7	2,0	13.559,3
Operario (horas)	1.412,4	20,0	28.248,6
Inversiones mayores			26.191,5
Fungible	8.285,6	1,0	8.285,6
Equipo mayor	8.509,7	1,0	8.509,7
Accesorios neumáticos	4.569,5	1,0	4.569,5
Accesorios eléctricos	4.826,7	1,0	4.826,7
Inversiones menores			11.038,7
Filtros	5.672,3	1,0	5.672,3
Frascos SIT	4.583,3	1,0	4.583,3
Matraces	508,2	1,0	508,2
Tapones de goma	203,0	1,0	203,0
Mangueras	71,4	1,0	71,4
Capilares	0,5	1,0	0,5
Operación			15.445,0
Material	101,0	18,0	1.818,0
Medio multiplicación	3.521,0	1,0	3.521,0
Frascos pequeños	20,0	100,0	2.000,0
Alcohol de quemar	200,0	1,0	200,0
Bisturí	1.400,0	1,0	1.400,0
Zapatos	266,0	1,0	266,0
Máscaras	78,0	1,0	78,0
Papel de aluminio	100,0	1,0	100,0
Establecimiento	412,0	1,0	412,0
Elongación	436,0	1,0	436,0
Medio tuberización	1.354,0	1,0	1.354,0
Aclimatación	10,0	386,0	3.860,0
Servicios Generales			19.020,0
Varios	15.000,0	1,0	15.000,0
Mantenimiento	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			5.675,2
Total Laboratorio			119.178,2

Papa SIT 5 mg BAP

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			43.898,3
Profesional	6.779,7	2,1	14.237,3
Operario (horas)	1.412,4	21,0	29.661,0
Inversiones mayores			26.191,5
Fungible	8.285,6	1,0	8.285,6
Equipo mayor	8.509,7	1,0	8.509,7
Accesorios neumáticos	4.569,5	1,0	4.569,5
Accesorios eléctricos	4.826,7	1,0	4.826,7
Inversiones menores			11.038,7
Filtros	5.672,3	1,0	5.672,3
Frascos SIT	4.583,3	1,0	4.583,3
Matraces	508,2	1,0	508,2
Tapones de goma	203,0	1,0	203,0
Mangueras	71,4	1,0	71,4
Capilares	0,5	1,0	0,5
Operación			16.783,0
Material	101,0	18,0	1.818,0
Medio multiplicación	3.521,0	1,0	3.521,0
Frascos pequeños	20,0	100,0	2.000,0
Alcohol de quemar	200,0	1,0	200,0
Bisturí	1.400,0	1,0	1.400,0
Zapatos	266,0	1,0	266,0
Máscaras	78,0	1,0	78,0
Papel de aluminio	100,0	1,0	100,0
Establecimiento	412,0	1,0	412,0
Elongación	436,0	1,0	436,0
Medio tuberización 1	1.552,0	1,0	1.552,0
Aclimatación	10,0	500,0	5.000,0
Servicios Generales			19.020,0
Varios	15.000,0	1,0	15.000,0
Mantenimiento	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			5.846,6
Total Laboratorio			122.778,1

Arándanos in-vitro

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			71.000,0
Jefe	7.000,0	1,0	7.000,0
Laboratorio	4.000,0	5,0	20.000,0
Jornales Flujo	1.000,0	20,0	20.000,0
Jornales Prep. Medios	1.000,0	12,0	12.000,0
Jornales Supervisión	1.000,0	12,0	12.000,0
Equipos			7.916,0
Equipos	7.916,0	1,0	7.916,0
Materiales			2.841,0
Varios	2.841,0	1,0	2.841,0
Insumos			73.055,4
Medio	1.600,0	5,0	8.000,0
Alcohol	295,0	1,0	295,0
Cloro	300,0	1,0	300,0
Jabón	1.610,0	0,1	161,0
Papel	4,0	8,0	32,0
Nova	500,0	2,0	1.000,0
Servilletas	200,0	2,0	400,0
Papel Aluminio	1.500,0	0,2	300,0
Alusa Plast	2.000,0	0,2	400,0
Bolsas de Basura	150,0	2,0	300,0
Bolsas Plásticas	50,0	4,0	200,0
Bolsas de Papel	100,0	4,0	400,0
Hojas de bisturí	40,0	8,0	320,0
Cinta adhesiva	700,0	0,3	210,0
Tips	0,0	0,0	0,0
Desinfectante	1.174,0	0,1	117,4
Mascarilla	34,0	2,0	68,0
Gorro	26,0	2,0	52,0
Cubre calzado	250,0	2,0	500,0
Aclimatación	25,0	2.400,0	60.000,0
Servicios Generales			24.020,0
Varios	20.000,0	1,0	20.000,0
Mantenimiento	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración			8.941,6
Total Laboratorio			187.774,0

Arándano SIT

Item	Valor Unitario	Cantidad	Total
Personal			53.000,0
Jefe	7.000,0	1,0	7.000,0
Laboratorio	4.000,0	4,0	16.000,0
Jornales Flujo	1.000,0	16,0	16.000,0
Jornales Prep. Medios	1.000,0	8,0	8.000,0
Jornales Supervisión	1.000,0	6,0	6.000,0
Inversiones mayores			21.071,1
Equipos	7.916,0	1,0	7.916,0
Accesorios neumáticos	9.247,8	1,0	9.247,8
Accesorios eléctricos	3.907,3	1,0	3.907,3
Inversiones menores			11.010,0
Varios	11.010,0	1,0	11.010,0
Operación			77.255,4
Medio	1.400,0	9,0	12.600,0
Alcohol	295,0	1,0	295,0
Cloro	300,0	1,0	300,0
Jabón	1.610,0	0,1	161,0
Papel	4,0	8,0	32,0
Nova	500,0	2,0	1.000,0
Servilletas	200,0	2,0	400,0
Papel Aluminio	1.500,0	0,2	300,0
Alusa Plast	0,0	0,2	0,0
Bolsas de Basura	150,0	2,0	300,0
Bolsas Plásticas	50,0	4,0	200,0
Bolsas de Papel	100,0	4,0	400,0
Hojas de bisturí	40,0	8,0	320,0
Cinta adhesiva	700,0	0,3	210,0
Tips	0,0	0,0	0,0
Desinfectante	1.174,0	0,1	117,4
Mascarilla	34,0	2,0	68,0
Gorro	26,0	2,0	52,0
Cubre calzado	250,0	2,0	500,0
Aclimatación	15,0	4.000,0	60.000,0
Servicios Generales			34.020,0
Varios	30.000,0	1,0	30.000,0
Mantenición	4.020,0	1,0	4.020,0
Administración	10%		9.817,8
Total Laboratorio			206.174,4



MICROPROPAGACION DE PLANTAS DE VID (*Vitis vinifera* L.) EN BIOREACTORES DE INMERSION TEMPORAL.



MARIO PAREDES¹, VIVIANA BECERRA¹, DAGOBERTO CASTRO².

¹Biocnología INIA-CRI QUILAMAPU, CHILE. E-mail: mparedes@quilamapu.inia.cl <http://www.inia.cl/quilamapu/biocen>
²Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Rio Negro, Colombia.

INTRODUCCION

La micropropagación *in vitro* convencional es un sistema comúnmente usado para masificar la producción de plantas en un corto período. Sin embargo, esta tecnología presenta algunos problemas de eficiencia como son: escasa mecanización y problemas de aclimatación que encarecen el valor final de las plantas producidas. Por lo que su uso queda reducido a aquellas especies y/o variedades que tienen un alto valor económico. De esta forma, es de imperiosa necesidad evaluar nuevas tecnologías que permitan reducir los costos de producción de plantas para mejorar la rentabilidad de las empresas productoras de éstas.

Se postula que el uso del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en bioreactores puede permitir la introducción de mayores niveles de mecanización en las etapas de multiplicación y elongación de brotes en algunas especies vegetales y reducir los problemas de aclimatación, a través de un aumento en las tasas de multiplicación, porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatación. Todo lo cual, podría reducir el costo final de las plantas producidas.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la factibilidad del uso de la técnica de Inmersión Temporal (SIT) usando bioreactores para mejorar la eficiencia de la micropropagación de plantas de vid.

MATERIALES Y METODOS

El material vegetal inicial de vid fue producido mediante micropropagación *in vitro* convencional de sarmentos obtenidos en huertos del Campo Experimental Cauquenes (INIA). Con este material se produjeron plantas madres, de las cuales se obtuvieron los explantes usados en los experimentos.

Se utilizaron dos cultivares de vid, Sultánina cuya destino de producción es uva de mesa y Cabernet Sauvignon, para la producción de vino. El medio de cultivo líquido utilizado fue el Murashige-Skoog con algunas modificaciones. Durante el desarrollo de los ensayos se realizó un cambio de medio, cada 27 días. Las evaluaciones realizadas fueron: número y longitud de brotes/sarmento, número de brotes hiperhidratados, peso seco y fresco de los brotes, la relación peso seco/peso fresco, número de yemas/brote.

Este trabajo contempló la evaluación de las siguientes condiciones:



Cabernet Sauvignon

Sultánina

- TIEMPO DE INMERSION EN EL SIT: 1, 3 y 5 min.
- FRECUENCIA DE INMERSION EN EL SIT: 6, 12, 18 y 24 horas.
- VOLUMEN DE MEDIO Y NUMERO DE EXPLANTES EN EL SIT: 250, 500 y 750 ml y 6, 9 y 12 explantes por bioreactor.

El diseño experimental fue un Completo al Azar con un arreglo factorial y seis repeticiones.

RESULTADOS

FRECUENCIA Y TIEMPO DE INMERSION EN EL SIT

El cultivar Sultánina tuvo un comportamiento superior a Cabernet Sauvignon en las cuatro características evaluadas (Cuadro 1). Con la frecuencia de inmersión de 24 horas se obtuvo una mayor longitud de brotes, el cual fue similar a 18 horas. Sin embargo, el mayor número de brotes/explante se obtuvo con 6 y 12 horas. La relación Psi/Pf fue similar para las cuatro frecuencias evaluadas. Los tratamientos con frecuencias de 6 y 12 horas presentaron un alto grado de oxidación de las hojas y tallos, por lo cual fueron descartados en este primer trabajo. Basado en esta experiencia, se incluyó una frecuencia de inmersión de 24 horas.

Cuadro 1. Efecto de la frecuencia de inmersión, con 3 min de tiempo de inmersión sobre la longitud de brotes (cm), brotes/explante (N°), peso seco (gr) y relación peso seco/peso fresco en dos cultivares de vid.

Treatm (hr)	Long Br (cm)	Br/exp (N°)	P. seco (g)	Ps/Pf
Cultivar				
Sultánina	5.1a	8.3a	0.15a	0.18a
Cabernet	3.5b	4.8b	0.08b	0.20a
Frecuencia (hr)				
6	3.0c	9.2a	0.08c	0.18a
12	4.2bc	9.3a	0.13ab	0.20a
18	4.4ab	2.7b	0.10bc	0.18a
24	5.8a	1.5b	0.16a	0.23a

Financiamiento: FIA (BIOT-01-A-17)-INIA-HORTIFRUT

Correspondencia: Uberlinda Luengo, Ingrid Carrasco, Carmen Rojo.



Foto 1. Frecuencias de inmersión de 6, 12 y 18 hr. con un tiempo de inmersión de 3 min en el cultivar Sultánina.

De los dos cultivares evaluados, Sultánina presentó nuevamente el mejor comportamiento en todas las variables evaluadas (Cuadro 2). La frecuencia de inmersión de 18 horas produjo un mayor número de brotes con mayor longitud, peso seco, y un mayor número de yemas, aunque la relación peso seco/peso verde fue similar en ambas frecuencias (Cuadro 2). El mejor tiempo de inmersión fue de 1 min si se consideran todas las variables evaluadas (Cuadro 2). Sin embargo, en los tiempos de inmersión de 3 y 5 min, las plantas presentaron una menor oxidación en el tejido en comparación con 1 min.

Cuadro 2. Efecto de la frecuencia de inmersión de 18 y 24 horas con 1, 3 y 5 min de tiempo de inmersión sobre la longitud de brotes (cm), brotes/explante (N°), peso seco (gr) y relación peso seco/peso fresco en dos cultivares de vid.

Treatment	Long br (cm)	Br/Exp (cm)	P. seco (g)	PS/PV	Yemas (N°)
Cultivar					
Sultánina	8.2a	2.0a	0.21a	0.20a	12.1a
Cabernet	3.7b	1.3b	0.09b	0.18a	7.8b
Frecuencia (hr)					
18	5.9a	1.9a	0.17a	0.21a	12.0a
24	4.9a	1.3b	0.13b	0.17a	8.5b
Tiempo (min)					
1	5.0a	2.1a	0.17a	0.19a	10.2a
3	5.0a	1.5b	0.13b	0.20a	9.7a
5	4.9a	1.3b	0.15ab	0.18a	10.1a



Foto 2. Frecuencia de 18 horas con tres tiempos de inmersión en el cultivar Sultánina.

3 VOLUMEN DE MEDIO Y NUMERO DE EXPLANTES EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT)

Durante la evaluación de diferentes volúmenes de medio y número de explantes se observó que los dos cultivares de vid presentaron un comportamiento diferente, siendo superior el de Sultánina. El volumen de 250 mL fue ligeramente superior a los otros volúmenes evaluados al igual que el tratamiento de 6 explantes (Foto 3).

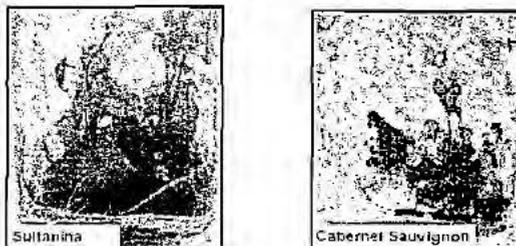


Foto 3. Volúmenes de medio (250 mL) y número de explantes (6) con frecuencia y tiempo de inmersión de 18 horas y 3 min en dos cultivares de vid.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados preliminares obtenidos hasta ahora permiten indicar que, la mejor frecuencia de inmersión para la multiplicación de vides en SIT fue de 18 horas con un tiempo de inmersión de 3 min y que la mejor combinación de volumen de medio número de explantes fue de 250 mL y 6 explantes.

MICROPROPAGACION DE PAPA (*Solanum tuberosum* L) MEDIANTE EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL EN BIOREACTORES.



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
FUNDACION PARA LA INNOVACION AGRARIA, FIA
INIA CRI QUILAMAPU

MARIO PAREDES¹; VIVIANA BECERRA²; DAGOBERTO CASTRO²; JOSÉ SANTOS ROJAS³

¹Biotecnología INIA-CRI QUILAMAPU, CHILE. E-mail: mparedes@quilamapu.inia.cl <http://www.inia.cl/quilamapu/biotec>

²Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Río Negro, Colombia, ³INIA-CRI REMEHUE

³INIA-CRI REMEHUE, CHILE

INTRODUCCIÓN

En el cultivo de la papa la producción de semilla tubérculo de buena calidad es un proceso difícil, complejo y de alto costo. Dentro de este proceso, la micropropagación convencional ha contribuido por una parte, a eliminar virus, viroides y otras enfermedades, por otra, a maximizar la producción de plántulas en un periodo corto de tiempo.

El uso del sistema de inmersión temporal en bioreactores ha permitido aumentar los niveles de mecanización de algunas etapas de la micropropagación en especies vegetales ya que su uso implica una reducción importante costos, aumentos en las tasas de multiplicación, mejoramiento del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatización.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la factibilidad del uso de la técnica de inmersión temporal (SIT) en bioreactores para mejorar la eficiencia de la micropropagación y producción de minitubérculos.



MATERIALES Y METODOS

El material vegetal inicial de papa fue producido mediante micropropagación convencional en el Proyecto de Mejoramiento Genético de papas del CRI Remehue, (Osorno) y enviado al Laboratorio de Biotecnología del CRI Quilamapu, Chile.

Se utilizaron dos cultivares de papa, uno de consumo fresco (Desirée) y otro de uso industrial (Shepody). El medio de cultivo líquido fue el Murashige Skoog, se realizaron substituciones del medio cada 28 días. Las evaluaciones realizadas en esta fase del proyecto fueron: número de brotes sanos e hiperhidratados, longitud de éstos, brotes por explante y la relación peso seco/peso fresco.

Esta investigación contempla las siguientes etapas:

TIEMPO DE INMERSION EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT): Los tiempos de inmersión evaluados fueron de 1, 3 y 5 min.

FRECUENCIA DE INMERSION EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT): Las frecuencias de inmersión evaluadas fueron 3, 6 y 12 h.

VOLUMEN DE MEDIO Y NÚMERO DE EXPLANTES EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT): Los volúmenes de medio evaluados fueron 250, 500 y 750 ml, con 6, 9 y 12 explantes por contenedor. Estos tratamientos fueron evaluados con una frecuencia de inmersión de 6 horas, y con un tiempo de inmersión de 3 min.

El diseño experimental fue completamente al Azar con un arreglo factorial con seis repeticiones.

RESULTADOS

1. TIEMPO DE INMERSION EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT).

Las dos variedades evaluadas tuvieron un comportamiento similar al evaluar la longitud de los brotes y relación peso seco/peso verde, siendo la variedad Shepody superior a Desirée en el número de brotes/explante y peso seco (Cuadro 1). El tiempo de inmersión de 3 min tuvo un efecto positivo al aumentar el número de brotes/explantes peso seco y relación peso seco/peso fresco (Cuadro 1; Foto 1).

Cuadro 1. Efecto del tiempo de inmersión 3 y 5 minutos y la frecuencia de inmersión de 3 horas sobre la longitud de brotes (cm), brotes/explante (N°), peso seco (gr) y relación peso seco/peso fresco en dos variedades de papa.

Treatment	Longitud de brote (cm)	Brotes/explante (N°)	Peso seco (gr)	Peso seco/Peso fresco
Variedad				
Desirée	12.3a	4.7a	0.19a	0.10a
Shepody	11.2a	2.8b	0.14b	0.19a
Tiempo				
3 minutos	11.3a	2.8b	0.15b	0.11a
5 minutos	11.2b	4.7a	0.16a	0.09b



Foto 1. Diferencias presentadas por el cultivar Desirée con los diferentes tiempos de inmersión (1, 3 y 5 minutos), en el cultivar Desirée.

2. FRECUENCIA DE INMERSION EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT).

De las dos variedades utilizadas, Desirée presentó un comportamiento superior a Shepody. El análisis de las diferentes frecuencias de inmersión con un tiempo de inmersión de 3 min., indicó que aparentemente las frecuencias de 6 y 12 horas serían los mejores tratamientos, si se considera los valores de proliferación (brotes/explante) como calidad de los brotes, representado por la relación peso seco/peso fresco (Cuadro 2, Foto 2). Se está evaluando en estos momentos las diferentes frecuencias con otros tiempos de inmersión.

Cuadro 2. Efecto de la frecuencia de 3, 6 y 12 h. con 3 min. de tiempo de inmersión, sobre la longitud de brotes (cm), brotes/explante (N°), peso seco (gr) y relación peso seco/peso fresco en dos variedades de papa.

Treatment	Longitud de brote (cm)	Brotes/explante (N°)	Peso seco (gr)	Peso seco/Peso fresco
Variedad				
Desirée	12.5a	4.0a	0.15a	0.71a
Shepody	11.0b	3.4b	0.11a	0.17a
Tiempo				
3 h	13.7b	2.7b	0.14a	0.80a
6 h	9.8c	4.5a	0.12b	0.72a
12 h	15.1a	4.9a	0.06b	0.92a



Foto 2. La foto muestra las diferencias presentadas por el cultivar Desirée con los tiempos de inmersión de tres, seis y doce horas y con un tiempo de inmersión de 3 minutos.

3. VOLUMEN DE MEDIO Y NÚMERO DE EXPLANTES EN EL SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL (SIT).

Durante la evaluación de diferentes volúmenes de medio y número de explantes se observó que 750 ml de medio de cultivo líquido con 12 explantes (Foto 3) fue el tratamiento que presentó un buen nivel de proliferación y desarrollo de las plantas.

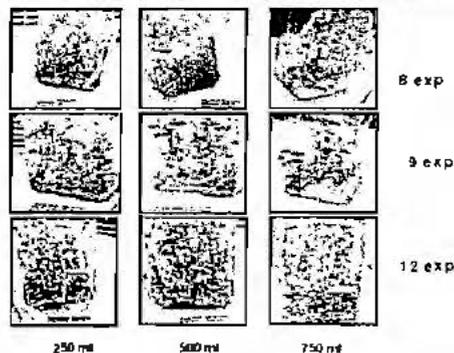


Foto 3. La foto muestra las diferencias presentadas con diferentes volúmenes de medio y número de explantes, con frecuencia y tiempo de inmersión de 6h, 3 min para el cultivar Desirée.

CONSIDERACIONES FINALES

Los resultados preliminares obtenidos hasta ahora permiten indicar que el mejor tiempo de inmersión fue de 3 min., con una frecuencia cada 6 horas, un volumen de medio de 750 ml, y 12 explantes.

Financiamiento: FIA (BIOT-01-A-17); INIA; HORTIFRUT

Efecto de la dosis de BAP y sacarosa en la microtuberización de papas en bioreactores

MARIO PAREDES¹, VIVIANA BECERRA¹, DAGOBERTO CASTRO¹, INGRID CARRASCO¹, UBERLINDA LUENGO²
¹Biotecnología INIA-CRI QUILAMAPU, CHILE. e-mail: mparedes@quilamapu.inia.cl ; http://www.inia.cl/quilamapu/biotec
²Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Río Negro, Colombia.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación es un sistema usado en la propagación masiva de plantas. Esta tecnología se caracteriza por su alto requerimiento en mano de obra y escasa mecanización, lo que encarece el valor final de las plantas producidas, reduciéndose su uso solo a aquellas especies y/o variedades que tienen un alto valor económico.

Una alternativa a la tecnología actualmente usada, es el empleo del sistema de Inmersión Temporal (SIT) en bioreactores. Esta alternativa permite un mayor nivel de mecanización y automatización en las etapas de multiplicación, elongación y enraizamiento en algunas especies vegetales, además de un mejoramiento en la calidad de las plantas producidas.

El SIT significa una importante reducción de costos, aumentos en las tasas de multiplicación, y un mejoramiento del porcentaje de enraizamiento y sobrevivencia de plantas en la etapa de aclimatación.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la factibilidad del uso de la técnica de Inmersión Temporal (SIT) usando bioreactores para mejorar la eficiencia de la producción de microtubérculos en papa.

MATERIALES Y METODOS

ETAPA IN VITRO CONVENCIONAL

El material vegetal inicial de papa fue producido mediante micropropagación convencional en el Laboratorio de Micropropagación del Centro Experimental La Pampa, dependiente de INIA Remehue (Foto 1).

Se utilizaron dos cultivares de papa: Desiree y Shepody cuya producción se destina a consumo en fresco e industrial, respectivamente.

El medio de cultivo líquido fue el Murashige Skoog con algunas modificaciones. La producción de microtubérculos consta de dos etapas: a) Multiplicación de brotes y b) Producción de microtubérculos.

Durante estas etapas se realizaron cambios de medio de cultivo cada 20 días para asegurar la nutrición adecuada de los brotes y microtubérculos.

Las condiciones generales de los ensayos fueron las siguientes:

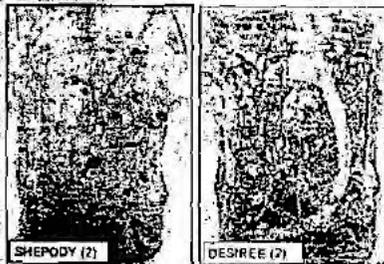
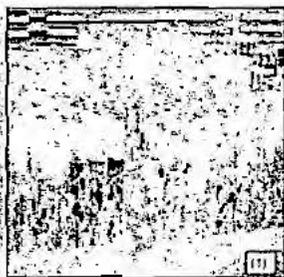
- A) ETAPA DE MULTIPLICACIÓN EN EL SIT
- TIEMPO DE INMERSIÓN: 3 min.
- FRECUENCIA DE INMERSIÓN: 12 horas.
- VOLUMEN DE MEDIO: 250 y 500 ml.
- NÚMERO DE EXPLANTES: 9
- FOTOPERÍODO: 18 h luz y 9 de oscuridad (Foto 2).

ETAPA DE MICROTUBERIZACIÓN EN EL SIT. Condiciones similares a la etapa de multiplicación, pero su desarrollo es bajo condiciones de completa oscuridad (Foto 3).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se usó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial con un número variable de repeticiones, dependiendo del ensayo realizado. Los tratamientos estuvieron conformados por las dos variedades de papa y las diferentes dosis de BAP (0, 0.5, 3.0, y 5.0 mg/L) y sacarosa (0, 4, 8, 10%), aplicadas al medio basal.

Las evaluaciones realizadas en papa fueron: número, peso, y calibre de los microtubérculos.



RESULTADOS

1. Efecto de la concentración de sacarosa en la microtuberización.

La sacarosa es un componente necesario para el proceso de multiplicación y microtuberización. Es así como, la concentración de sacarosa en el medio basal de multiplicación de brotes fluctúa entre un 2 a un 3% de sacarosa, la cual debe ser aumentada durante la etapa de la microtuberización.

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje mínimo para inducir la microtuberización es de un 8%, siendo la concentración óptima entre un 8 y 10%. Con estos porcentajes se produce el mayor número y calibre de los microtubérculos, observándose también un efecto de la variedad (Cuadro 1). Dosis menores de sacarosa afectaron la producción de microtubérculos.

Cuadro 1. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la producción y calibre de microtubérculos.

Variedad	Dosis sacarosa (g/L)	Total (N°)	Microtubérculos		
			P. Fresco (g)	Calibre (mm)	Largo (mm)
Shepody					
	0	13	0.1	4	8
	8	39	0.1	4	7
	10	20	0.1	4	7
Desiree					
	0	19	0.1	3	7
	8	34	0.1	5	9
	10	33	0.1	4	6

Dosis de 0 y 40 g/L de sacarosa no produjeron microtubérculos.

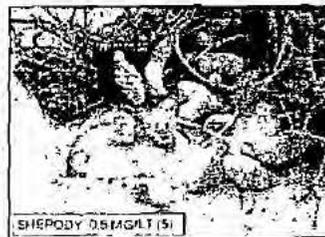
2. Efecto de la dosis de BAP en la microtuberización

Los resultados obtenidos indicaron que es importante incluir BAP en el medio de cultivo líquido para inducir la microtuberización. La dosis de 0.5 mg/L induce una mayor producción y calibre de microtubérculos en ambas variedades en comparación con la no inclusión de BAP.

Cuadro 2. Efecto de diferentes concentraciones de BAP en la producción y calibre de microtubérculos.

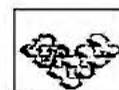
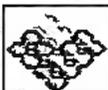
Variedad	Dosis de BAP (mg/L)	Total (N°)	Microtubérculos		
			P. Fresco (g)	Calibre (mm)	Largo (mm)
Shepody					
	0.5	30	0.1	4	7
	3	24	0.1	4	6
	5	24	0.1	4	7
Desiree					
	0.5	41	0.1	4	6
	3	27	0.1	3	7
	5	27	0.1	4	7

La dosis de 0 mg/L de BAP no indujo microtuberización.



CONCLUSIÓN

Las dosis recomendadas para la producción de microtubérculos varía entre un 8 y un 10% de sacarosa y 0.5 de BAP.



MEJORAMIENTO DE LA TASA DE MULTIPLICACIÓN EN ARÁNDANO A TRAVÉS DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) EN BIOREACTORES

MARCELA ZUÑIGA¹, MARIO PAREDES², VIVIANA BÉCERRA², DAGOBERTO CASTRO³

¹HORTIFRUT S.A.; ²INIA-QUILAMAPU, CHILE. E-mail:mparedes@inia.cl; <http://www.inia.cl/quilamapu/biotec>; ³Universidad Católica de Oriente, Antioquia, Río Negro, Colombia

INTRODUCCIÓN

La principal limitante en la producción de plantas de arándano a través del sistema de micropropagación convencional es el alto costo de la planta producida, comparado con otros sistemas de propagación vegetativa. Sin embargo, existen varias empresas en el país, que usan la micropropagación convencional en forma operacional, para multiplicar plantas de arándano. Por ejemplo, la empresa viveros Hortifrut S.A produce en la actualidad un total de 2,6 millones de plantaflores, de las cuales un 50% se producen bajo esta tecnología.

Debido a esta situación, es necesario evaluar tecnologías innovadoras, que permitan reducir el costo de la planta, además de aumentar la eficiencia de la propagación de esta especie.

Una de las principales ventajas del sistema de inmersión temporal en bioreactores (SIT) es la automatización del sistema de multiplicación de plantas. El SIT permite aumentar las tasas de multiplicación y de sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación. Estas ventajas asociadas reducen los costos de producción de plantas.

El objetivo de esta investigación fue aumentar la tasa de multiplicación de plantas de arándano a través del uso del SIT.

MATERIALES Y METODOS

Los cultivares utilizados fueron seleccionados en base a su importancia comercial y adaptación a diferentes zonas del país. Es así, como se seleccionó al cultivar O'Neal, precoz y de mayor importancia en la zona centro-norte. El cultivar Duke, de buena adaptación a la zona centro-sur y el cultivar Elliot, tardío y de gran relevancia en la zona sur.

Los brotes utilizados en el SIT fueron producidos por el sistema de micropropagación convencional utilizado en Hortifrut. El medio de cultivo correspondió al WP y los subcultivos fueron realizados cada 21 días. La cosecha y evaluación de los brotes se realizó a los 63 días.

Los factores evaluados en el SIT fueron:

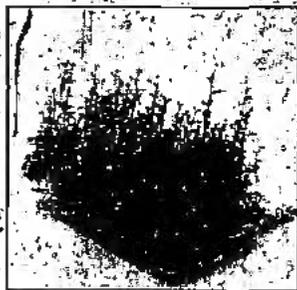
Frecuencia de inmersión: Las frecuencias de inmersión evaluadas fueron 18 y 24 horas.
Tiempo de inmersión: Los tiempos de inmersión evaluados fueron de 1 y 3 min.
Volumen de medio y número de explantes: Los volúmenes de medio evaluados fueron 250, 500 y 750 mL, con 40, 80 y 80 explantes por contenedor. Estos tratamientos fueron evaluados con una frecuencia de inmersión de 24 horas y con un tiempo de inmersión de 3 min.

El diseño experimental utilizado fue un Completamente al Azar con un arreglo factorial con un número variable de repeticiones. Las evaluaciones realizadas fueron número y longitud de brotes, peso seco, hiperhidrabilidad y relación peso seco/peso fresco.

RESULTADOS

1. FRECUENCIA Y TIEMPO DE INMERSIÓN EN EL SIT

Los primeros análisis realizados en el SIT indicaron una respuesta diferente de los tres cultivares evaluados. Elliot presentó un alto porcentaje de brotes oxidados, Duke una coloración roja en las plantas y O'Neal un desarrollo normal. La tasa de multiplicación inicial en O'Neal alcanzó a 43, pero con un alto porcentaje de brotes < 2cm (Cuadro 1).



Cuadro 1. Rango del largo de los brotes (cm) en tres cultivares de arándano en dos frecuencias de inmersión

Rango largo de brotes (cm)	Variedades (% de brotes por rango)					
	Duke		Elliot		O'Neal	
	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs	18 hrs	24 hrs
0,1-2,0	90,4	99	93,0	96,0	86,2	79,9
2,1-4,0	9,6	1,0	7,0	4,0	13,8	20,1

2. VOLUMEN DE MEDIO Y NÚMERO DE EXPLANTES EN EL SIT

Los resultados de la evaluación de tres volúmenes de medio y tres números de explantes en la variedad O'Neal indicaron que estos factores no afectaron significativamente la longitud de los brotes producidos. La mayor proliferación y peso seco de los brotes se obtuvo con un volumen de medio de 750 mL y 80 brotes. La relación Ps/Pf fue afectada solamente por los volúmenes del medio y no por el número de explantes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Longitud de los brotes (cm), proliferación, peso seco y relación peso seco/peso fresco en la variedad O'Neal

Tratamiento	Long. Brote (cm)	Proliferación (N°)	Peso seco (g)	Ps/Pf
Volumen				
250	1,7a	400,4b	1,5b	0,17a
500	1,6a	450,4b	1,6b	0,16ab
750	1,5a	644,3a	2,0a	0,14b
N° explantes				
40	1,6a	415,6b	1,4b	0,15a
60	1,6a	497,4ab	1,6b	0,15a
80	1,6a	631,0a	2,2a	0,16a

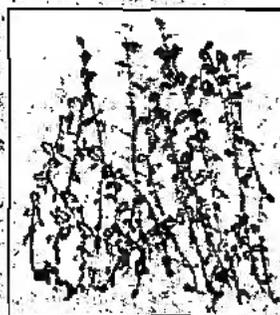


Fig. 1. Sistema de Inmersión temporal en arándano

3. EFECTO DEL CO₂ Y DE IBA

La inyección de CO₂ no tuvo un efecto positivo en la proliferación de los brotes pero fue significativamente superior en el peso seco y relación Ps/Pf en comparación a la no aplicación de CO₂ (Cuadro 3). La aplicación de 0,5 mg/L de IBA tuvo un efecto positivo en aumentar el largo de los brotes, obteniéndose un 53% de los brotes con un largo superior a 2cm.

Cuadro 3. Proliferación (N°), peso fresco y seco, relación peso seco/peso fresco de brotes de la variedad O'Neal con y sin inyección de CO₂

Tratamientos	Brotes		
	Prof (N°)	P. seco (g)	Ps/Pf
Con CO ₂	583,3a	12,5a	0,49a
Sin CO ₂	473,5a	2,4b	0,18b

CONSIDERACIONES FINALES

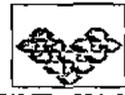
Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento diferente de los tres cultivares estudiados en el SIT.

El cultivar O'Neal presentó el mejor desarrollo.

La mejor frecuencia y tiempo de inmersión para O'Neal en el SIT fue 24 y 3 min con una aplicación de 0,5 mg/L de IBA en el segundo cambio de medio, y a los 42 días de crecimiento. El volumen de medio utilizado fue de 250 mL con 80 explantes.



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA



GOBIERNO DE CHILE
FIA

DETERMINACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA EN EL PROCESO DE MULTIPLICACIÓN DE PLANTAS EN EL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

VIVIANA BECERRA¹; MARIO PAREDES¹; CARMEN ROJO¹; MARCELA ZUÑIGA²

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Quilamapu, Depto. Genética y Fitomejoramiento, Chillán, Chile. E-mail: vbecerra@inia.cl
²Hortifrut S.A.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación de plantas es un tipo de reproducción asexual que se basa en la multiplicación celular, mitosis, por lo cual las plantas producidas por este método deberían ser genéticamente uniformes.

Las plantas producidas mediante meristemas o segmentos nodales tienen un alto grado de uniformidad y las plantas fuera de tipo pueden ser atribuidos a variaciones somaclonales y/o mutaciones al azar. Las principales causas de estas variaciones se podrían agrupar en tres categorías. La primera, variaciones pre-existentes en los tejidos celulares. En segundo lugar, algunos de los componentes del medio de cultivo podrían ser mutagénicos, dentro de ellos las hormonas han sido las principales causantes de las variaciones genéticas detectadas. En tercer lugar, causas ambientales como por ejemplo, altas tasas de multiplicación, cambios nutricionales y sucesivos ciclos de subcultivos.

En forma convencional la identificación y determinación de la pureza del material genético se ha realizado, por observación del fenotipo. Sin embargo, estos marcadores tienen algunas desventajas, como por ejemplo la escasa capacidad discriminatoria, especialmente cuando se tienen que describir materiales estrechamente relacionados (dentro de una especie), subjetividad en la descripción de algunas características e influencia ambiental.

Los marcadores moleculares permiten detectar variabilidad genética directamente a nivel del ADN, por lo cual tienen un nivel de resolución genética superior al análisis fenotípico convencional.

El objetivo de este trabajo fue detectar posibles variaciones genéticas que pudieran ocurrir durante el proceso de micropropagación de papa, vid y arándano en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT) en bioreactores mediante RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio se incluyeron dos cultivares de vid (Cabernet Sauvignon y Sultanina) y papa (Destrae y Shepody) y una de arándano (O'Neil).

El ADN genómico de cada cultivar fue aislado a partir de hojas sanas y jóvenes, desde las plantas madres. El material usado para verificar la estabilidad genética en vid y arándano propagados en el SIT fueron hojas verdes, mientras que en papas fueron tallos y hojas meristemáticas de las plantas después de finalizar el proceso de microtuberización y bajo distintos niveles de hormonas.

Se evaluaron 48 partidores de 10 horas provenientes de los grupos A, C, y D (OPERON Technologies, A). La reacción y condiciones de amplificación fueron seleccionadas por su consistencia y reproducibilidad en las tres especies para ser usada en forma operacional.

Los productos de la amplificación fueron separados en geles de sacarosa (1,8%; 1 X TAE) a 100 Volts y con un tiempo de corrida aproximado de 5 h. Los geles fueron teñidos con amido de etidio para visualizar, fotografar y evaluar las bandas.

Plantas madres vs Material propagado en SIT

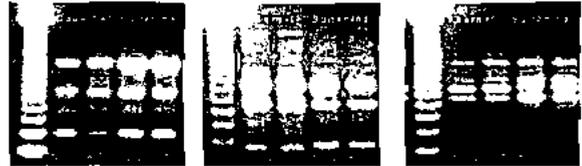


RESULTADOS

Vid

Para las vides micropropagadas en el SIT, el período involucró un período total de 40 días. El medio de cultivo inicial contuvo 0,1 mg/l de BAP y 30 g/l de sacarosa, en el que se mantuvo las plantas por 21 días. Posteriormente, los brotes se subcultivaron, en un medio de elongación que contenía 0,5 mg/l de GA₃ y 30 g/l de sacarosa. Al finalizar esta etapa, se evaluó la estabilidad genética en plantas de vid. De acuerdo a los 48 partidores analizados no se observó variación genética en ninguna de las dos variedades. La Foto 1 muestra idénticos patrones de bandas entre plantas de Sultanina y Cabernet Sauvignon recién introducidas en cultivo *in vitro* convencional (INCV) y aquellas producidas mediante el Sistema de Inmersión Temporal.

Foto 1



Papa

Se evaluó la estabilidad genética en plantas de papa que estuvieron en el SIT, 120 días. Estas plantas pasaron por las etapas de multiplicación, elongación y tuberización. Ello involucró cambios de medios y subcultivos cada 21 días, cambios de hormonas y condiciones ambientales de luz a oscuridad, para la inducción de la tuberización. De acuerdo a lo observado en los 48 partidores analizados no se presentó variación genética entre los individuos analizados. La Foto 2 muestra idénticos patrones de bandas para tres de los 48 partidores analizados en plantas de Shepody y Destrae originales (O) y aquellas derivadas de tratamientos de tuberización donde las dosis de BAP fueron 3 y 5 mg/l.

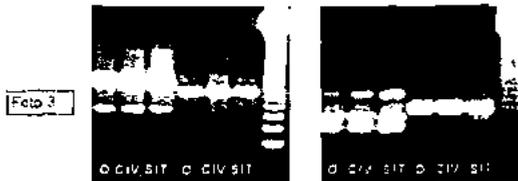
Foto 2



Arándano

Para la variedad O'Neil, micropropagado en el SIT por un período de 80 días. La etapa de multiplicación fue más prolongada que la de las vides, y los subcultivos se realizaron cada 21 días. En la etapa de elongación, se le agregó al medio de cultivo 0,5 mg/l de GA₃ y 30 g/l de sacarosa. Posterior a la etapa de elongación se evaluó la estabilidad genética. De acuerdo a los 48 partidores analizados no se observó variación genética en O'Neil. La Foto 3 muestra idénticos patrones de bandas, para cuatro partidores, entre plantas muestreadas en el huerto (O), en condiciones de cultivo *in vitro* convencional (CIV) y de plantas provenientes del Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

Foto 3



CONSIDERACIONES

Los diferentes tratamientos, tiempos de subcultivos y sistema de micropropagación no produjeron cambios genéticos en las plantas.

LOS RAPD son una técnica molecular factible de implementar en la certificación genética de material micropropagado.



GOBIERNO DE CHILE
MINISTERIO DE AGRICULTURA
INIA QUILAMAPU

CONSIDERACIONES ECONÓMICAS DE LA MICROPROPAGACIÓN DE MICROTUBÉRCULOS DE PAPAS Y PLANTAS DE VIDES: SISTEMA CONVENCIONAL Y DE INMERSIÓN TEMPORAL

Rodrigo Avilés¹, Viviana Becerra¹ y Mario Paredes¹
¹ INIA Quilamapu, Casilla 426, Chileán,
raviles@inia.cl

INTRODUCCIÓN

Una tecnología tendrá éxito, cuando desde el punto de vista económico y productivo sea más eficiente. La micropropagación es un sistema adecuado para masificar la producción de plantas en un corto período de tiempo (Kitto, 1997; Metzseanare y Standaert, 1993). De esta forma, es de imperiosa necesidad evaluar nuevas metodologías que permitan una reducción en los costos de producción para masificar su uso y mejorar la rentabilidad de las empresas que se dedican a la producción de plantas introduciendo por primera vez al país la técnica de inmersión temporal en bioreactores (Jiménez y Faria Silva, 1998).

El objetivo del estudio fue evaluar en forma económica un sistema de producción de plantas de vides y microtubérculos de papas, micropropagadas por técnicas convencionales o de inmersión temporal utilizando bioreactores.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso evaluado corresponde al sistema desarrollado de micropropagación de microtubérculos de papas y plantas de vides en el laboratorio de Biotecnología del Centro Regional de Investigación Quilamapu. La evaluación económica (Edwin, 1996) se dividió en las siguientes componentes:

- Identificación de los sistemas de micropropagación.
- Identificación del esquema de producción.
- Determinación de los costos de producción y su sensibilización.
- Comparación de costos de producción en los sistemas de micropropagación.

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN

Para la implementación de un sistema productivo, el Proyecto desarrolló un sistema de producción de plantas mediante inmersión temporal utilizando bioreactores, para ello se debe tener en cuenta varios objetivos: a) Entregar a tiempo las cantidades acordadas y con la calidad requerida, b) Utilizar en forma adecuada las capacidades instaladas, c) Utilizar en forma óptima los recursos humanos, materiales y financieros.

ESQUEMA PRODUCTIVO

Se identificaron las etapas del esquema de producción y sus respectivos parámetros. Las etapas son: Invernadero, establecimiento, proliferación, elongación, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. En forma esquemática el modelo se presenta en la figura 1. CR: Coeficiente de Rechazo y CM: Coeficiente de Producción. El volumen de producción (Suárez, 1998) se determina bajo la siguiente fórmula:

$$P = MI \cdot (CM \cdot CR)^{Np}$$

- P : Producción a obtener.
MI : Material *in vitro* que se dispone.
CM : Coeficiente de multiplicación.
CR : Coeficiente de rechazo.
Np : Números de subcultivos a realizar.



COSTOS DE PRODUCCIÓN

Para que una tecnología tenga éxito deber ser obligadamente, desde el punto de vista económico, más eficiente (Suárez, 1998; Barnhill Jones y Sluis, 1993). Para determinar el costo de producción de ambos sistemas se elaboraron fichas técnicas. Sobre la base de la información de un consolidado se determinó el costo unitario de producción (Andersson, 1995).

Trabajo desarrollado en el marco del Proyecto FIA (BID-PI-C-2001-1-A-017) "Evaluación de la factibilidad del uso de la técnica de inmersión temporal en bioreactores para mejorar la eficiencia de la micropropagación en especies anuales, frutales y vides". INIA Quilamapu y Hortifrut S.A.

SENSIBILIZACIÓN

La determinación del costo unitario de producción se completó con una análisis de sensibilidad en cuanto a:

- Sistema de Inmersión Temporal en plantas de vides: número de subcultivos.
- Sistema de Inmersión Temporal en microtubérculos de papas: dosis de concentración hormonal BAP.

RESULTADOS

COSTO UNITARIO

Sobre la base del esquema definido y la información generada en las etapas de micropropagación, se determinó el costo unitario y la comparación de las alternativas de micropropagación mediante sistema convencional y de inmersión temporal utilizando bioreactores.

A continuación se presenta las alternativas evaluadas y sus comparación:

Producción de plantas de Vides

Item	Producción <i>in-vitro</i> convencional 2.700 plantas	Producción SIT 2 subcultivos 900 plantas	Producción SIT 3 subcultivos 2.700 plantas	
			Unitario	Relación
Personal	47.2%	30.0%	26.6%	40.3%
Equipos	3.1%	18.0%	12.8%	200.3%
Materiales	1.8%	8.8%	8.6%	273.2%
Insumos	32.2%	18.3%	33.1%	73.6%
Servicios Generales	11.3%	23.3%	17.3%	109.7%
Administración	4.8%	4.8%	4.8%	
Valor Unitario	100.0%	159.8%	71.9%	

Producción de microtubérculos de Papas

Item	Producción <i>in-vitro</i> convencional 884 microtubérculos	Producción SIT 3 mg BAP 388 microtubérculos	Producción SIT 6 mg BAP 800 microtubérculos	
			Unitario	Relación
Personal	34.4%	35.1%	38.8%	58.6%
Equipos	3.7%	22.0%	21.3%	537.8%
Materiales	1.8%	9.3%	9.0%	472.0%
Insumos	23.0%	13.0%	13.7%	84.0%
Servicios Generales	10.4%	18.0%	16.5%	136.8%
Administración	4.8%	4.8%	4.8%	
Valor Unitario	100.0%	116.0%	92.3%	

CONCLUSIONES

- En el caso de plantas de vides se producen importantes economías en el costo de producción, principalmente en los ítems de personal e insumos.
- Es el caso de producción de microtubérculos de papas las diferencias económicas no son relevantes.
- Es importante avanzar en este estudio, ya que no existe experiencia para contabilizar la duración de los equipos, por consiguiente puede haber diferencias en los costos de producción.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson, W.C. 1995. Cost of bricoli plants propagation *in vitro* culture. Hort Science. pp 543-544.
- Barnhill Jones, J. and Sluis C. (Eds). 1993. Marketing of micropropagated plants pp 141-154 In Debergeht P and Zimmerman R. (Eds) Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands
- Edwin, G. 1996. Commercial Micropropagation. Plant Propagation by Tissue Culture Part 2 - In practice.
- Jiménez, E. y Faria Silva, M. 1998. Empleo de bioreactores para la propagación masiva. pp 207-224. En Pérez Ponce (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba.
- Kitto, S.L. 1997. Commercial micropropagation Hort Science. Vol 32 (6) pp 1-3.
- Metzseanare, R. and Standaert, E. 1993. Economic considerations. pp 123-140 In Debergeht P and Zimmerman R. (Eds) Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- Suárez, M. 1998. Organización de la producción. pp 259-280. En Pérez Ponce (Ed). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de Plantas. Cuba.