

INFORME FINAL

I ANTECEDENTES GENERALES

Nombre del proyecto: “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala chilenas*”.

Fecha de aprobación: marzo 2001, Concurso proyectos de Desarrollo e Innovación en biotecnología.

Agente Ejecutor y Asociados: Universidad Austral de Chile; Universidad de Talca.

Coordinador del proyecto: Peter Seemann F.

Costo total:

Aporte del FIA:

Periodo de ejecución: 15 de Enero 2002 a 28 de Febrero de 2006.

II RESUMEN EJECUTIVO

Durante el período comprendido entre Enero de 2002 y Febrero de 2006 se ejecutó el Proyecto “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala chilenas*”. La propuesta consistía realizar en la Universidad Austral de Chile la inducción de poliploidía de 4 especies de *Rhodophiala*: *R. splendens*, *R. bagnoldii*, *R. montana* y *R. rhodolirion*; desarrollar protocolos de cultivo de tejidos para multiplicar estos genotipos además de materiales diploides colectados desde su ambiente natural, luego enviar estos materiales a la Universidad de Talca en donde en forma paralela se desarrollarían métodos para el crecimiento rápido de bulbos y luego se evaluarían las características ornamentales de diploides y poliploides. El último año se incorporó la especie *R. ananuca* en reemplazo de la especie *R. rhodolirion*, ya que esta última fue una especie muy difícil de trabajar, por su baja floración y baja sobrevivencia en cultivo.

Primero se determinaron los cariotipos de las 4 especies utilizando material de colectas realizadas en el Norte Chico y la zona cordillerana de la Séptima Región. Se estableció un protocolo para la inducción de poliploidía, que fue exitoso para dos especies, *R. montana* y *R. splendens*, y se evaluó el grado de poliploidía logrado a través del porcentaje de plantas poliploides obtenidas a partir de muestras tratadas. El análisis de recuento de cromosomas se complementó con estudios del tamaño de estomas y estimaciones de la cantidad de ADN relativa a través de citometría de imágenes. En etapa paralela se desarrollaron ensayos de cultivo de tejidos con el fin de multiplicar rápidamente los materiales diploides nativos y poliploides, además de mantenerlos en un banco de germoplasma *in vitro*.

El trabajo realizado en cultivo de tejidos, durante los cuatro años de ejecución del proyecto fue realizado en base a la propuesta inicial, mediante la utilización del sistema tradicional de multiplicación como es el cultivo en medio sólido con la adición de reguladores de crecimiento comúnmente utilizados, tales como las citoquininas, BAP, Kinetina y 2 iP, en conjunto con la adición de reguladores auxínicos y modificaciones en la concentración de sales o adición de diferentes concentraciones y tipos de carbohidratos al medio de cultivo. Sin embargo, ninguno de estos factores logró mejorar el coeficiente de multiplicación en las cuatro especies de *Rhodophiala in vitro*, alcanzándose valores que fluctuaban entre 1 y 2.

Se debió recurrir a un sistema alternativo de cultivo en medio líquido, como lo es el sistema estacionario con una base de algodón hidrófilo, el cual mejoró la multiplicación *in vitro* en *R. splendens*, con coeficientes de multiplicación cercanos a 3. Junto a esto se incorporaron nuevos reguladores de crecimiento como lo son la meta-topolina y el paclobutrazol que han demostrado incrementar tanto el coeficiente de multiplicación como la calidad de los microbulbillos, lográndose obtener valores que fluctúan entre 4 y 6 microbulbillos/explante, y con tamaños de microbulbillo de hasta 1,0 cm de diámetro.

Parte importante de los materiales originados de la multiplicación *in vitro* y de la manipulación genética fueron transferidos a la Universidad de Talca, conservándose una fracción en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Austral de Chile y en un Invernadero habilitado para el proyecto, por lo cual se cuenta con un valioso material genético para su uso científico y, en el mediano plazo, comercial. Debido al largo período que estas especies toman en florecer, a partir de materiales originados de semilla o microbulbillos provenientes de explantes cultivados *in vitro*, aún no ha sido posible evaluar la floración de los genotipos producidos, los que se encuentran en observación a la espera de visualizar los resultados.

Se evaluaron métodos de crecimiento rápido de bulbos, se cultivaron y evaluaron plantas poliploides, esperándose evaluar también su floración, además de obtener información morfológica, fenológica *in situ* y bajo cultivo y de morfología del bulbo para las especies.

El trabajo de cultivo realizado en diferentes condiciones ambientales, sumado al trabajo en terreno y laboratorio, nos ha permitido obtener resultados positivos, los cuales son un aporte al conocimiento de estas especies y entregan algunas bases para un futuro manejo productivo de estas.

A enero de 2006, fecha de cierre de este informe y dado los avances del proyecto se trabajaba en la extensión del mismo, con el fin de complementar y consolidar las investigaciones realizadas

Los logros del proyecto han sido presentados en distintos congresos nacionales e Internacionales, como son el Congreso Agronómico de Chile (en donde el Proyecto estuvo presente en las versiones 2003, 2004 y 2005), el XIV

Congreso Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícola, San José Las Lajas, La Habana, Cuba, en el Primer Simposio de Horticultura Ornamental, organizado por los miembros del equipo técnico del proyecto en Valdivia, en el Seminario organizado este año por FIA y Redbio “El sector agrícola y la Biotecnología: situación actual y desafíos” y una publicación aceptada en la revista International Plant Breeding.

III TEXTO PRINCIPAL, Actividades realizadas en la Universidad Austral de Chile

1. Cumplimiento de los objetivos del Proyecto:

1.1 Descripción de los objetivos en función de los resultados e impactos obtenidos.

Se logró inducir poliploidia en *Rhodophiala montana* y *R. splendens* confirmando la hipótesis de que es posible obtener individuos poliploides viables en el Género *Rhodophiala*, abriéndose una ventana para el futuro mejoramiento genético de estas especies.

Se ha contribuido a la conservación de las especies mediante la multiplicación de diferentes genotipos y la mantención de un número importante de plantas *in vitro* garantizando la conservación de una proporción de la variabilidad genética de ellas.

Objetivo N° 1 : Determinar cariotipos

Resultados: Determinación de cariotipos de *R. montana*, *R. splendens*, *R. rhodolirion* y *R. bagnoldii*. A través del estudio de microfotografías. No hay discrepancias con resultados esperados.

Objetivo N° 2: Protocolo inducción de poliploides de *Rhodophiala*.

Protocolos desarrollados para *R. splendens* y *R. montana*. Obteniéndose cerca de 30 individuos poliploides.

Objetivo N° 3: Clones de posibles poliploides de las 4 especies.

Se logró obtener individuos poliploides de *R. splendens* y de *R. montana*, pero sólo algunos de ellos mostraron una buena respuesta al cultivo *in vitro*. Esto provoca discrepancias a lo esperado. Se esperaba obtener 15 clones de cada especie.

Objetivo N° 4: Determinación de cariotipo de los poliploides.

Se logró realizar recuentos cromosómicos de los poliploides obtenidos por lo que no existen discrepancias con los resultados esperados.

Objetivo N° 5: Desarrollar un eficiente sistema de multiplicación de material *in vitro*.

Se logró establecer plántulas *in vitro* de las cuatro especies de *Rhodophiala*, pero con bajos coeficientes de multiplicación, en desacuerdo a lo planteado.

Objetivo N° 6: Desarrollar protocolos de micropropagación y multiplicar el material *in vitro*.

Se implementó un protocolo de multiplicación *in vitro*, en medios líquidos estacionario, a partir de microbulbillos, el cual se aplicó eficientemente a todas las especies excepto a *R. rhodolirion* cuya tasa de multiplicación es menor.

2.0 Aspectos metodológicos del proyecto:

2.1 Descripción de la metodología efectivamente utilizada:

Durante la ejecución de este proyecto se aplicaron varias metodologías, algunas de las cuales fueron modificadas en base a los ensayos que se realizaron. Entre las metodologías utilizadas se encuentran:

2.1.1 Metodología empleada en la observación de cromosomas para estudio de cariotipos y recuentos cromosómicos durante inducción de poliploidía.

2.1.2 Metodología empleada en la inducción de poliploidía, en base a la aplicación de antimicóticos como la colchicina.

2.1.3 Metodología empleada en la inducción de la germinación tanto de semillas *in vivo* como *in vitro*

2.1.4 Metodología empleada en la multiplicación *in vitro*

2.1.5 Métodos de crecimiento rápido de bulbos *in vitro* y aclimatización

Las que se explican en detalle en la sección 2.4

2.2 Principales problemas metodológicos enfrentados

1. Bajo porcentaje de establecimiento a partir de escamas de bulbos, debido principalmente a problemas de necrosis, y en menor grado de contaminación y fenolización de las escamas.
2. Poca capacidad germinativa de semillas de *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*, tanto *in vivo* como *in vitro*, debido a contaminación causada principalmente por bacterias y hongos.
3. Baja respuesta en germinación de semillas debido a lentitud y desuniformidad en la germinación.
4. Bajos coeficientes de multiplicación de las cuatro especies, principalmente de *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*.
5. Escasa sobrevivencia de plántulas originadas de semillas tratadas con colchicina.
6. Para confirmar en mejor grado la ploidía del material vegetal se utilizaron herramientas alternativas a la observación de cromosomas, tales como determinación del tamaño de los estomas y citometría de imágenes.

2.3 Adaptaciones o modificaciones

1.- Bajo porcentaje de establecimiento de escamas *in vitro*.

El procedimiento para la desinfección del material vegetal, a partir de escamas de bulbo y la obtención de ellas no presentó modificaciones con respecto a la propuesta original, de la misma forma como los ensayos propuestos con este tipo de material, determinándose el efecto de diferentes tipos de explantes (segmento apical, basal) y tamaño de las catáfilas, utilizándose como medio de cultivo el medio de Murashigue y Skoog (1962), adicionado con diferentes tipos y reguladores de crecimiento y carbohidratos.

Sin embargo, debido a que el establecimiento del material no era el esperado se debieron usar otras alternativas, tales como :

- Diferentes medios de cultivo basales: originalmente estaba propuesto utilizar el Medio de cultivo MS tanto para el establecimiento como para la multiplicación de los bulbillos. Como una forma de ver la respuesta en otros medios se realizaron ensayos con medios especialmente formulados para plantas ornamentales, tales como el medio Knudson, Morel, White y modificando la concentración de macrosales del medio MS.
- Uso de antioxidantes, tales como, Polivinil pirrolidona (PVP), ácido cítrico y ácido ascórbico, cisteína, carbón activado: estos compuestos se utilizaron para prevenir la oxidación de los explantes, debido a la gran cantidad de fenoles que liberaban por causa de las heridas producidas en los cortes. Se realizaron ensayos determinando el efecto del remojo de los explantes en soluciones antioxidantes, y la incorporación de agentes antioxidantes en diferentes concentraciones en el medio de cultivo.
- Como no se tenía definido el tiempo de incubación en la propuesta original se realizaron ensayos para definir diferentes periodos de incubación de los explantes y tipos de frascos.

2.- Para problemas de germinación:

Debido a problemas de contaminantes endógenos de semillas de *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*, se debió modificar el protocolo de germinación de semillas *in vitro*, incluyendo un paso mas en la etapa de desinfección, posterior a la desinfección con hipoclorito de sodio y enjuagues con agua destilada, el cual consiste en la inmersión de las semillas en una solución de antibióticos compuesto por 0,1 g de penicilina y 0,1 g de sulfato de estreptomicina. La solución de antibióticos se trabajo remojando las semillas durante diferentes tiempos de inmersión (30, 60 y 90 minutos) para luego sembrarlas directamente en el medio de cultivo MS con macrosales reducidas al 50%.

3.- Baja respuesta de germinación de las cuatro especies

Debido a la escasa cantidad de material vegetal establecido *in vitro* a partir de escamas de bulbos, se ingresó una gran cantidad de semillas de las cuatro especies, aplicándose en el caso de *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*, el protocolo

de desinfección modificado con la inmersión de las semillas en solución de antibióticos como etapa previa a la siembra. Sin embargo, como el problema de lentitud y desuniformidad de la germinación es una situación propia de la fisiología de las semillas, se debieron hacer ingresos continuos de material para poder contar con plantas de una edad similar y realizar ensayos de multiplicación *in vitro*. Además se ingresaron semillas de híbridos como una forma de aumentar el banco de germoplasma de *Rhodophiala*, producto de cruzamientos realizados por la Universidad de Talca.

4.- Bajos coeficientes de multiplicación

Debido a que la tasa de multiplicación en las cuatro especies, no superó 1 o2 microbulbillos por planta madre, y que el mayor crecimiento de las plantas se presentaba en la parte aérea o brotes, se debieron implementar otras estrategias de multiplicación, para estimular la producción y crecimiento de los microbulbillos, tales como:

- Se realizaron ensayos para determinar el efecto de un corte en cruz en la base de los microbulbillos, en base a trabajos realizados por Olate y Bridgen (2002), quienes señalan que es posible lograr una eficiente micropropagación de *Rhodophiala spp.* mediante “scooring” con una incisión basal. Este factor debió estudiarse con la aplicación de antioxidantes incorporados al medio de cultivo, debido al daño mecánico que se le provocaba a los microbulbillos con la incisión basal.
- Uso de frascos de cultivo de diferente capacidad, para determinar la influencia del espacio interno y por ende la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono en su interior.
- Uso de volúmenes diferentes de medio de cultivo en los frascos.
- Estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento alternativos, no considerados en el proyecto, tales como el uso de citoquininas aromáticas y retardantes de crecimiento como el Paclobutrazol (PBZ), las cuales han sido aplicadas exitosamente en varias especies de plantas para la engorda o crecimiento de los microbulbillos potenciando la acumulación de carbohidratos. Entre las especies tratadas se encuentran algunas monocotiledóneas tropicales, en las cuales se ha incorporado en forma rutinaria para la fase de multiplicación de brotes en sistemas de cultivo en medio líquido por inmersión temporal. Se postula que su uso, promueve la formación de agregados compactos de brotes, con un desarrollo limitado del crecimiento foliar (Lorenzo *et.al.* 1999; Daquinta *et.al.* 1999 a y b), o aumenta la eficiencia de regeneración de brotes adventicios (Chen *et.al.* 2005). Otra de las ventajas que se ha reportado es que previene la mortalidad de las plántulas debido al stress producido en la fase de aclimatización, especialmente de plantas cultivadas en medio líquido, ya que el uso del PBZ disminuye la longitud de los brotes, el espesor de la lámina foliar, y la densidad de estomas, efectos que determinarían una disminución de la transpiración y por ende del marchitamiento de las plantas (Torres y Mogollón, 2002).
- Uso de medios de cultivo en diferentes estados; se comparó la multiplicación y crecimiento de los microbulbillos sembrados en medios sólido, líquido en agitación constante, líquido estacionario con base de algodón hidrófilo, líquido en inmersión temporal. Estos se realizó debido a

las innumerables ventajas que se han descrito en el cultivo en medio líquido, considerándose una técnica ideal para la propagación masiva de plantas *in vitro*, porque reduce la manipulación, aumenta los coeficientes de multiplicación y permite disminuir los costos operacionales. Sin embargo, su principal desventaja es la hiperhidricidad de los tejidos, lo cual ha sido descrito principalmente con el cultivo directo de los explantes en el medio líquido y para evitar este desorden fisiológico, se ha desarrollado diferentes procedimientos, como el empleo de puentes de papel de filtro, tapones de celulosa, esponjas, canastas flotantes así como el empleo de agentes químicos antivitrificantes, etc. (Debergh et.al.; Takayama y Misawa; Ziv; Smith y Spoomer; Wataad et.al.; Hdider y Desjardins, citados por Daquinta (2005). En base a estas publicaciones se logró desarrollar un protocolo para la multiplicación de microbulbillos *in vitro* en medio líquido pero con una base de algodón hidrófilo para apoyo de los microbulbillos, el cual al suplementarse con citoquininas aromáticas, como la Meta-topolina y retardantes del crecimiento como el Paclobutrazol lograron aumentar los coeficientes de multiplicación y engorda de los microbulbillos *in vitro*.

- Se realizaron los primeros ensayos en la técnica de embriogénesis somática, de tal forma que se logró desarrollar un medio de cultivo para la inducción de callos embriogénicos, a partir de hojas de plántulas *in vitro*, semillas y segmentos de escamas de bulbos. Esto se realizó con el objetivo de encontrar otros métodos de regeneración de plantas, descritos como más eficientes, con elevados coeficientes de multiplicación, pero necesitan de un mayor nivel de investigación para poder continuar con las etapas que involucra esta técnica.

5.- Para la engorda de bulbillos *in vitro* y posterior aclimatización.

Se realizaron ensayos para determinar la relación entre el peso y tamaño de los microbulbillos *in vitro*, con su comportamiento *ex vitro*, desde el punto de vista del crecimiento o engorda de los bulbillos, formación de brotes, raíces, peso de la planta completa, bajo diferentes condiciones de luminosidad o bajo condiciones estándar de cultivo. Se trabajó con microbulbillos formados en medios de cultivo sólidos, líquidos, con distintas concentraciones de sacarosa, los cuales fueron divididos en categorías diferentes de acuerdo a su tamaño y peso, para ser sembrados en bandejas con sustrato desinfectado.

Además se determinó el crecimiento de los bulbillos aclimatados en relación a la profundidad de siembra de los bulbillos y tamaño de estos.

6.- Para problemas de sobrevivencia de material tratado con antimicóticos

Se debieron realizar varios ensayos, con la finalidad de determinar las mejores condiciones para la inducción y sobrevivencia de las plantas poliploides

- En el caso de *Rhodophiala montana* se realizó la inducción de poliploidía mediante la germinación de las semillas flotando en soluciones de colchicina al 0,2 % y 0,05%. Esto con el propósito de superar el problema de la obtención de plantas quiméricas. Se estimó que un contacto de la semilla con el antimicótico justo en el momento de su germinación podría asegurar que la sustancia actuara sobre una mayor cantidad de células

meristemáticas en crecimiento activo. Es preciso señalar que estos antimitóticos sólo actúan en las células indiferenciadas. Se colocaron grupos de semillas dentro de placas petri desechables. Se colocaron 30 semillas en concentración 0,05 % y 30 en 0,2 %. Los registros de germinación y sobrevivencia se encuentran en el ítem “Resultados parciales”.

- En el caso de *R. bagnoldii* se realizaron en paralelo ensayos con Trifluralina y Colchicina.
- En el caso de *R. splendens* se agregó otro ensayo de inducción de poliploidía utilizando trifluralina, en semillas germinadas *in vivo*, mediante la aplicación de diferentes concentraciones y tiempos de inmersión; 10 micromolar por 24 horas y 100 micromolar por 24 horas, además del testigo con agua destilada.

7.- Herramientas alternativas para determinación de ploidía

- Medición de tamaño de estomas: se determinó en una porción de la epidermis de la hoja, mediante observación microscópica en 10 estomas por plantas, para posteriormente realizar mediciones del largo del estoma, con un programa computacional (IMAGE J).
- Medición de cantidad de ADN relativa mediante citometría de imágenes: se realizó la medición aproximada de la cantidad relativa de ADN de 15 núcleos en interfase, obteniéndose microfotografías en 15 núcleos por planta. La intensidad de la pigmentación de cada núcleo se analizó utilizando el programa computacional UTHSCSA Image Tool. Las fotografías fueron convertidas a escalas de grises y se seleccionó cada núcleo, utilizándose el valor Integral de Densidad Óptica como medida para cada núcleo.

2.4 Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados.

2.1.1 Metodología empleada en la observación de cromosomas para estudio de cariotipos y recuentos cromosómicos durante inducción de poliploidía.

Esta técnica se trabajó utilizando como material vegetal puntas de raíz en crecimiento activo, principalmente de plantas originadas *in vitro*, debido a que su manejo es más fácil. Una vez obtenidas la raicillas, se cortó el trozo terminal (unos 4 cm) para extraer el meristema radical, luego se procedió a la observación de los cromosomas según la metodología descrita por GRANT *et al.*, (1984), la cual consiste en las siguientes etapas:

- a) Colocar las puntas de raíz dentro de tubos Eppendorf, los cuales permanecieron en contenedor con hielo y a una temperatura de 8° C, durante 24 horas.
- b) Fijar el tejido sumergiéndolo en solución Cloroformo: alcohol: ácido acético 4:3:1 durante 60 minutos.
- c) Inmersión del tejido en HCl 1N a 60 °C durante 8 minutos.
- d) Inmersión del tejido en reactivo Schiff durante 30 minutos.

- e) Digestión con pectinasa *Aspergillus niger* 5% durante una hora
- f) Corte del extremo distal del trozo de raíz
- h) Montaje del tejido en porta objeto, previo remojo de éste en ácido acético al 45%
- i) Colocación de una gota de orceína láctico propiónica 2% sobre el tejido, cubrimiento con cubreobjeto.
- j) Percusión reiterada de la preparación con la punta de un bisturí, hasta disgregar las células, examen de la preparación al microscopio óptico y finalmente un aplastado de las células (“Squash”). Esto último se realizó aplastando la preparación envuelta en toalla absorbente con la palma de la mano.
- k) Examen de la preparación al microscopio óptico 1000X, observación de los cromosomas, toma de microfotografías.

2.1.2 Metodología empleada en la inducción de poliploidía, en base a la aplicación de antimicóticos como la colchicina.

La metodología establecida para la inducción de poliploidía en microbulbillos fue la siguiente:

1. Preparar una solución madre de colchicina al 1%, bajo cámara de bioseguridad, tomando además las siguientes precauciones durante su manipulación: Uso de guantes, anteojos de protección, máscara para vapores tóxicos, delantal de laboratorio.
2. Preparación de medio de cultivo MS con macrosales al 75% sin reguladores de crecimiento, en estado líquido, adicionado con colchicina al 0,05 % y dispensado en frascos de cultivo (20 ml por frasco).
3. Bajo condiciones asépticas obtener microbulbillos desarrollados *in vitro*, preferentemente mayores de 3 mm de diámetro.
4. Eliminar brotes, raíces y escamas fenolizadas de los microbulbillos.
5. Colocar entre 10-15 microbulbillos en los frascos con el medio de cultivo.
6. Colocar los frascos con los microbulbillos en agitación a 80 rpm en un agitador orbital, durante 4-5 días, en cámara de incubación.
7. Eliminar el medio de cultivo con colchicina, en un contenedor especialmente preparado para “reactivos tóxicos”.
8. Realizar dos enjuagues de los microbulbillos con agua destilada.
9. Sembrar cada microbulbillo en frasco individual con medio de cultivo MS sólido con macrosales al 75%, sin colchicina y adicionado con 0,1 mg/L de ácido naftalen acético y 1,0 mg/L de una citoquinina (BAP o 2ip).

2.1.3 Métodos para la evaluación de plantas poliploides

Recuentos cromosómicos

Se emplearon puntas de raíz de una muestra de plantas obtenidas desde a), b) y c); éstas fueron colocadas en forma individual, de tal forma que permitiera la posterior identificación de cada planta, en tubos PCR con agua destilada a temperatura cercana a 4°C en refrigerador durante 24 horas. Posteriormente fueron fijadas en solución Carnoy (4 partes de cloroformo: 3 partes de etanol 95°: 1 parte de ácido acético glacial). Las muestras fijadas fueron conservadas

en etanol 70% en refrigerador. Para realizar la tinción de los cromosomas se utilizó la técnica Feulgen realizándose una hidrólisis de la muestra mediante inmersión en HCl 1N a temperatura de 60° durante 8 minutos. Luego las muestras fueron sumergidas en el reactivo Shiff durante 20 minutos en refrigerador. Posteriormente las muestras fueron colocadas en solución pectinasa 5% *Aspergillus niger* durante 1 hora en refrigerador. Para su montaje se cortó el meristema radical y se colocó sobre portaobjeto con adición de una gota de orceína láctico propiónica 2%. Luego se cubrió la muestra con cubreobjeto para finalmente realizar un aplastado de la preparación (“Squash”) de forma manual.

Las muestras se observaron al microscópico óptico realizándose recuentos en aquellas células que mostraran cromosomas metafásicos dispersos. El número de células en las cuales se realizó el recuento varió entre 3 y 10 células por preparación. Las plantas que mostraron solamente células con número $2n = 18$ se clasificaron como diploides. Las plantas que mostraron células con solamente con números cercanos a $2n = 36$ se clasificaron como poliploides. Las plantas que mostraron ambos tipos de células se clasificaron como mixoploides.

Medición de tamaño de estomas

De plantas originadas desde a), b) y c), a las cuales se les realizó recuentos cromosómicos en puntas de raíz, se les extrajo una porción de la epidermis desde la cara cóncava de la hoja. Esto se realizó extrayendo la hoja y realizando un corte superficial con bisturí para luego desprender la epidermis con una pinza. Este fragmento de la epidermis se colocó en portaobjeto con agua destilada siendo cubierto con cubreobjeto. La observación de los estomas se realizó en microscopio óptico trinocular Carl Zeiss Axiolab, fotografiándose 10 estomas por plantas con cámara digital Sony DSC 75 adaptada, para posterior medición del largo del estoma (Figura 1) con programa computacional IMAGE J, previamente calibrado con reglilla micrométrica que proporcionó una referencia de lectura para convertir pixeles a micras.

Se obtuvo el promedio y la desviación standard de los 10 estomas medidos por planta.

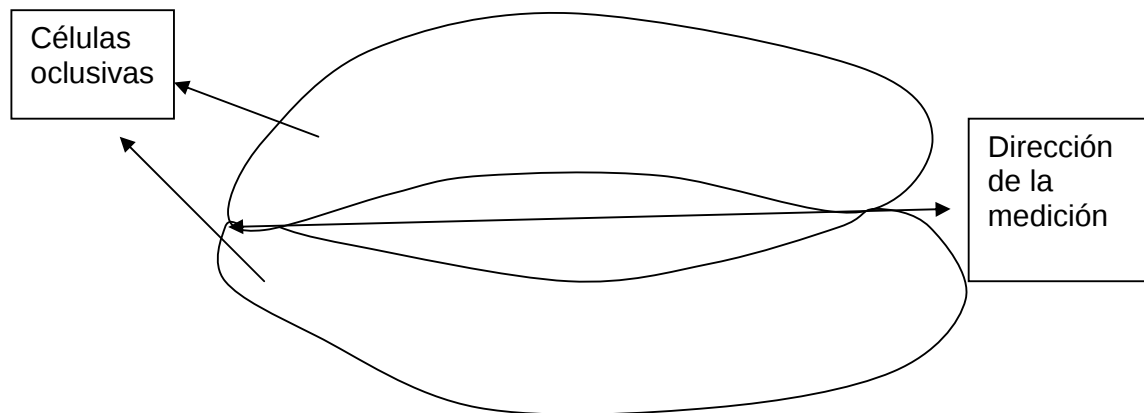


Figura 1: Medición de la longitud de los estomas

Medición de cantidad de ADN relativa mediante citometría de imágenes

De las preparaciones citológicas obtenidas desde puntas de raíz según metodología ya descrita, se realizó la medición aproximada de la cantidad relativa de ADN de 15 núcleos en interfase. Para ello se obtuvieron microfotografías desde cámara digital Sony DSC 75 montada en microscopio Carl Zeiss Axiolab desde 3 a 4 campos distintos de la preparación obteniéndose en total 15 núcleos por planta. La intensidad de la pigmentación de cada núcleo se analizó utilizando programa computacional UTHSCSA Image Tool. Las fotografías fueron convertidas a escalas de grises y se seleccionó cada núcleo, utilizándose el valor Integral de Densidad Óptica como medida para cada núcleo. Los valores obtenidos no poseen un valor por sí mismos pero sí son útiles para comparar entre plantas. De esta forma se obtuvieron datos de número cromosómico (nivel de ploidía), tamaño de estomas y cantidad de ADN relativa de núcleos para cada planta.

Se realizaron estos procedimientos con el fin de verificar la eficacia de métodos alternativos al recuento de cromosomas en la detección de autopoliploides inducidos, debido a que el recuento de cromosomas consume demasiado tiempo y es muy laborioso, es necesario probar la eficacia de técnicas más rápidas para examinar un mayor número de muestras y además obtener más información sobre el resultado de los tratamientos de colchicina.

2.1.4 Metodología empleada en la inducción de la germinación de semillas *in vivo* como *in vitro*

La germinación de semillas de *Rhodophiala* se puede realizar tanto *in vivo* con *in vitro*.

Germinación *in vivo*:

1. Lavar y desinfectar las semillas con agua corriente y detergente por 30 minutos, en agitación.
2. Eliminar el agua con detergente y enjuagar varias veces con agua corriente.
3. Sumergir en etanol 70% durante 5 segundos, luego una solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos, para finalmente realizar 3 lavados con agua destilada estéril.
4. Una vez desinfectadas, colocar las semillas en placas petri estériles, con papel absorbente y colocarlas en cámara de germinación Jacobsen en condiciones ambientales de 20°C y 14 horas de luz.
5. En el caso de *R. rhodolirion* se aplicó un tratamiento de frío: se colocan las semillas en placa petri con agua durante 4 semanas, en cámara de frío, a una temperatura entre 4°C – 8°C), para posteriormente colocarlas a germinar en cámara de germinación.

Germinación *in vitro*:

1. Lavar y desinfectar las semillas con agua corriente más detergente.
2. Eliminar agua con detergente y enjuagar varias veces.
3. Colocar semillas en una solución fungicida:bactericida en agitación durante 30 minutos, para luego eliminar el desinfectante y realizar enjuagues con agua destilada.
4. Bajo condiciones asépticas, desinfectar con etanol 70% durante 5 segundos, luego una solución de Hipoclorito de sodio 1% durante 10 minutos, para finalmente realizar 3 lavados con agua destilada estéril.
5. Sembrar las semillas en frascos con 10 ml de medio de cultivo MS con sus macrosales al 50%.
6. Incubar las semillas en cámara de incubación a 23°C, 16 horas luz y 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$

2.1.5 Metodología empleada en la multiplicación de plantas *in vitro*

La multiplicación *in vitro* se realizó mediante el cultivo de los microbulbillos en medio MS en estado líquido estacionario con base de algodón hidrófilo para el apoyo de los microbulbillos, de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Bajo condiciones asépticas eliminar brotes, raíces y escamas oxidadas de los microbulbillos y realizarles un corte en la base.
2. Sembrar 3-4 microbulbillos en frasco de 12 x 6 cm de tamaño, adicionado con medio líquido MS y una base interna de algodón hidrófilo, suplementado con 2,2-6,6 $\mu\text{mol/L}$ de una citoquinina (meta-topolina, 2ip- BAP).
3. Incubar en forma estacionaria en cámara de incubación a 23°C, 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ durante 30 días.

2.1.6 Métodos de crecimiento rápido de bulbos *in vitro* y aclimatización

Engorda de microbulbillos *in vitro*:

El incremento en el tamaño de los microbulbillos se ha logrado mediante la aplicación de retardantes de crecimiento en combinación con citoquininas aromáticas como la Meta-topolina, al medio líquido con una base de algodón hidrófilo, con lo cual además se logró aumentar los coeficientes de multiplicación. Para ello se procede de la siguiente forma:

1. Obtener microbulbillos bajo condiciones asépticas, realizarles un corte en la base.
2. Sembrarlo en medio de cultivo MS en estado líquido con una base interna de algodón hidrófilo, adicionado con 2,2-6,6 $\mu\text{mol/L}$ de meta-topolina (MTP) y 0,85-1,7 $\mu\text{mol/L}$ de Paclobutrazol (PBZ).
3. Incubar en forma estacionaria en cámara de incubación a 23°C, 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ durante 30 días.

Aclimatización:

Para realizar esta etapa los microbulbillos producidos *in vitro*, se trataron de la siguiente forma:

1. Sacar los microbulbillos de los frascos de cultivo.
2. Eliminar restos de medio de cultivo mediante lavado con agua.
3. Desinfectar los microbulbillos con una solución de hipoclorito de sodio al 0,1%.
4. Tener bandejas con sustrato (turba y arena) desinfectado mediante calor húmedo a 120°C, 1,5 psi durante 15 minutos, humedecido y con agujeros preparados para colocar los microbulbillos.
5. Colocar los microbulbillos en cada agujero y cubrir bien con el sustrato.
6. Asperjar con fungicida para prevenir contaminación por hongos.
7. Cubrir las bandejas con un plástico, para conservar una alta humedad interna.
8. Incubar bandejas en cámara con una temperatura promedio de 23°C y una intensidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de $50 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ *
9. Una vez transcurrida la primera semana descubrir las paulatinamente,.
10. Realizar una evaluación final a los 30 días de aclimatadas las plántulas, para posteriormente ser trasladados a invernadero en donde se mantienen para evaluaciones posteriores.

* La aclimatización de las plantas puede realizarse en cámaras de crecimiento, cámara de aclimatización o directamente en invernadero.

2.1.7 Difusión de los resultados del proyecto.

Como parte de las actividades de difusión se realizaron numerosas publicaciones, las que fueron presentadas en congresos nacionales e internacionales, además de realizarse una actividad especialmente destinada para difundir los resultados del proyecto y de otras actividades en horticultura ornamental que se realizaron en el país.

3.0 Descripción de las actividades y tareas ejecutadas

Descripción de las actividades y tareas ejecutadas en la Universidad Austral de Chile para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas. La carta GANTT indica las actividades correspondientes a la Universidad Austral para consecución de los objetivos 1,2,3,4,5,6 y 10. En negrita se indica el período en que efectivamente se realizó la actividad

CARTA GANTT DEL PROYECTO AÑO 2002			MESES											
Obj	Act	Descripción	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
1	1	Obtención de raicillas a partir de bulbos, obtención de raicillas a partir de semillas, adaptación de protocolo existente para estudios de cariotipo	X	X	X									
		Realizado	X	X	X									
1	2	Adaptación de protocolo existente para determinar cariotipo	X	X	X									
		Realizado	X	X	X									
1	3	Aplicar protocolo adaptado – observación de cromosomas – fotografías de cariotipo		X	X									
		Realizado	X	X	X									
2	1	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: aplicación de colchicina sobre semillas secas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	2	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: Germinación de semillas para posterior aplicación de colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
		Realizado				X	X	X	X	X	X			
2	3	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: ingreso <i>in vitro</i> de explantes de bulbo para posterior aplicación de colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	4	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: ingreso de explantes en medio que contenga colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	5	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: Aplicado a semillas secas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	6	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: Aplicado sobre semillas germinadas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	7	Evaluar protocolo de inducción de			X	X	X	X	X	X	X	X	X	

		poliploidía: aplicado a explantes sumergidos en colchicina y desarrollados posteriormente in vitro															
2	8	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado sobre explantes desarrollados en medio de conteniendo colchicina				X	X	X	X	X	X	X	X				
		AÑO 2002	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D			
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas secas, semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina												X	X		
5	1	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo diferente tamaño de explantes	X	X	X	X	X	X									
		Realizado				X	X	X	X	X	X						
5	2	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo del efecto de la posición del explante	X	X	X	X	X	X									
		Realizado				X	X	X	X	X	X						
5	3	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material <i>in vitro</i> : montar ensayo de utilización de fuente de carbohidratos	X	X	X	X	X	X									
5	4	Determinación de un ensayo eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo de composición del medio de cultivo	X	X	X	X	X	X	X	X							
		Realizado				X	X	X	X	X	X						
5	5	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material <i>in vitro</i> : montar ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación sobre explantes					X	X	X	X							
		Realizado									X	X	X	X			
5	6	Evaluar resultados de multiplicación <i>in vitro</i> de ensayo de diferente tamaño de explante	X	X	X												
		Realizado									X	X	X	X			
5	7	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de la posición del explante	X	X	X	X											
		Realizado									X	X	X	X			
5	8	Evaluar resultados de multiplicación	X	X	X	X											

		<i>in vitro</i> de ensayo de utilización de fuente de carbohidratos															
		Realizado										X	X	X	X		
5	9	Evaluar resultados de multiplicación <i>in vitro</i> ensayo de composición de medio de cultivo	X	X	X	X	X										
		Realizado										X	X	X	X		
5	10	Evaluar resultados de multiplicación <i>in vitro</i> ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación					X	X	X	X	X						
		Realizado										X	X	X	X		
6	1	Desarrollar protocolos de micropropagación en base a ensayos de multiplicación <i>in vitro</i> realizadas										X	X				
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso <i>in vitro</i> para posterior inducción de poliploidía											X	X	X		

CARTA GANTT DEL PROYECTO AÑO 2003			MESES											
Obj.	Act.	Descripción	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas secas, semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado				X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado. Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado				X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado				X	X	X				X	X	X
		Actividades no programadas en la propuesta original												
5		Ensayo tipo de explante, utilización de carbohidratos, composición medio cultivo, balance auxina citoquinina	X	X	X									
5		Exprimentos de inducción de brotación múltiple, embriogénesis somática directa e indirecta, bulbificación y prevención de la oxidación				X	X	X	X	X	X			
5		Ensayos complementarios de composición de medios y condiciones de incubación										X	X	X

CARTA GANTT DEL PROYECTO AÑO 2004			MESES											
Obj.	Act.	Descripción	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas secas, semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado	X	X	X	X								
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado. Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado	X	X	X	X								
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado	X	X	X	X								
		Actividades no programadas en la propuesta original												
5		Ensayos complementarios de composición de medios y condiciones de incubación	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
5		Ensayo de engorde de microbulbillos con distintos niveles de sacarosa					X	X	X	X	X			
5		Organogénesis indirecta en <i>R. splendens</i>					X	X	X	X	X			
5		Ingreso de semillas <i>in vitro</i> de <i>R. splendens</i> , <i>R. bagnoldii</i> , <i>R. rhodolirion</i> y <i>R. montana</i>					X	X	X	X	X			
4		Caracterización citológica de plantas sometidas a inducción de poliploidía a través de parámetros adicionales: tamaño de estomas y citometría de imágenes					X	X	X	X	X	X	X	X
		Ensayos de desinfección para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>R. laeta</i> y <i>R. bagnoldii</i>										X	X	X
5		Ensayos para la multiplicación y engorda de bulbillos <i>in vitro</i> de <i>R. bagnoldii</i> y aclimatización										X	X	X
5		Ensayos de influencia del estado del medio de cultivo en relación a diferentes tipos y concentraciones de citocininas sobre la multiplicación de microbulbillos de <i>R. splendens</i> y <i>R. montana in vitro</i>										X	X	X
5		Determinación de la eficiencia de la cisteína en la prevención de la oxidación										X	X	X
5		Ensayo efecto de un inhibidor de la síntesis de giberelinas sobre la microbulbificación <i>in vitro</i>										X	X	X

		Carta GANTT DEL PROYECTO AÑO 2005	MESES											
Ob j	Act	Descripción	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas secas, semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	X	X	X	X	X	X	X					
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado. Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
		Realizado	X	X	X	X								
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	X	X	X	X								
8	5	Establecimiento de banco de germoplasma de <i>Rhodophiala</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
		Realizado	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	1	Publicación en revista divulgativa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	2	Publicación en revista especializada	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		Realizado												X
		Actividades no programadas en la propuesta original												
4		Caracterización citológica de plantas sometidas a inducción de poliploidía a través de parámetros adicionales: tamaño de estomas y citometría de imágenes	X	X	X	X								
5		Ensayos de desinfección para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>R. laeta</i> y <i>R. bagnoldii</i>	X	X	X	X								
5		Ensayos para la multiplicación y engorda de bulbillos <i>in vitro</i> de <i>R. bagnoldii</i> y aclimatización	X	X	X	X								
5		Ensayos de influencia del estado del medio de cultivo en relación a diferentes tipos y concentraciones de citocininas sobre la multiplicación de microbulbillos de <i>R. splendens</i> y <i>R. montana in vitro</i>	X	X	X	X								
5		Determinación de la eficiencia de la cisteína en la prevención de la oxidación	X	X	X	X								
5		Ensayo efecto de un inhibidor de la síntesis de giberelinas sobre la microbulbificación <i>in vitro</i>	X	X	X	X								
5		Implementación y puesta en marcha del cultivo en medios líquidos mediante el sistema de inmersión temporal SIT en tres especies de <i>Rhodophiala</i>					X	X	X	X	X	X	X	X
5		Implementación de un sistema alternativo en medio líquido, en forma estacionaria con un disco de algodón hidrófilo como base					X	X	X	X	X	X	X	X
5		Incorporación del regulador de crecimiento metatopolina					X	X	X	X	X	X	X	X
5		Incorporación del retardante de crecimiento Paclobutrasol					X	X	X	X	X	X	X	X

5		Comparación de diferentes sistemas de cultivo <i>in vitro</i>					X	X	X	X	X	X	X	X
5		Realización de ensayos de aclimatización					X	X	X	X	X	X	X	X

Razones que explican las discrepancias con el cronograma programado:

Durante el año 2002, se realizaron los estudios de cariotipo según lo programado y se desarrollaron experimentos de inducción de poliploidía en semillas. La inducción de poliploidía en explantes *in vitro* se postergó a espera del desarrollo de un eficiente sistema de cultivo *in vitro*. Los resultados de los primeros ensayos para este objetivo no fueron satisfactorios por lo que no se contaba con suficiente material como para llevar a cabo los experimentos de duplicación cromosómica ni las condiciones de cultivo *in vitro* para llevar las plántulas tratadas a buen término.

El año 2003, gracias al desarrollo de actividades adicionales en cultivo de tejidos, lo que permitió mejorar los protocolos y generar un suficiente número de plantas, se realizaron experimentos de inducción de poliploidía *in vitro*, continuándose con los experimentos *in vivo*. En lo relacionado con el desarrollo de un eficiente sistema de multiplicación de material *in vitro*, la incorporación masiva de semillas a germinar *in vitro*, los experimentos a través de organogénesis indirecta y los múltiples ensayos tendientes a definir las condiciones de cultivo óptimas, permitían vislumbrar progresos en el desarrollo de un sistema eficiente de cultivo *in vitro* pero aún no completamente satisfactorias.

Otro aspecto importante a destacar fue el cambio de estrategia para el ingreso de material *in vitro*. En un principio se pensó en incorporar escamas gemelas disectadas desde bulbos colectados directamente de la naturaleza. Sin embargo, la carga microbial que inevitablemente acompaña a los órganos vegetales subterráneos, junto a la falta en ese momento de un protocolo de multiplicación *in vitro* afinado, producían una gran pérdida de plantas por contaminación y regeneración no exitosa. Esto motivó a incorporar masivamente semillas, las que luego de germinar *in vitro*, eran capaces de bulbificar (debido a la adición de sacarosa al medio de cultivo). Este microbulbillo era utilizado para los experimentos de multiplicación. Cada uno de estos microbulbillos era un genotipo distinto. Esto permitió contar con mayor cantidad de material para el desarrollo de los experimentos

Durante los años 2004 y 2005, se realizaron actividades adicionales para aumentar la eficiencia del sistema de multiplicación *in vitro* y actividades originalmente no programadas para evaluar el grado de poliploidía logrado. Las razones respondían, en el primer caso a la necesidad de aumentar la tasa de multiplicación *in vitro*, debido a que, si bien el establecimiento, cultivo *in vitro* y aclimatización *ex vitro* se conseguían sin problemas en las especies de *Rhodophiala*, la inducción de brotación múltiple a partir del microbulbillo era escasa. Se constató que la capacidad de multiplicación era dependiente del genotipo y que algunos individuos eran susceptibles de ser clonados rápidamente, sin embargo, la mayoría de los genotipos mostraban una fuerte dominancia apical regenerando solo un brote por planta. La utilización de

medios líquidos y la aplicación de nuevos reguladores de crecimiento (metatopolina) permitieron aumentar las tasas de propagación.

En el caso de inducción de poliploidía, se tuvo éxito en *R. montana* y *R. splendens*. Especialmente en la primera mediante la aplicación de colchicina *in vitro*. Debido a que el recuento de cromosomas es una forma, aunque segura, de comprobar la poliploidía, es muy laboriosa, demanda gran cantidad de tiempo y está supeditada a la existencia de raíces en crecimiento activo que presenten células en metafase que permitan visualizar preparaciones con cromosomas dispersos. Esto último no siempre ocurre por lo que es necesario monitorear las plantas pesquizando la formación de raíces jóvenes. Además, las plantas jóvenes de *Rhodophiala*, producen solo 1 o 2 raíces profundizadoras, tomando varios meses la formación de un sistema radicular abundante. Esto provocó que la disponibilidad de tejido para los análisis fuera escasa. En respuesta a esto, se realizaron análisis adicionales que incorporaron la medición del tamaño estomas (que en algunas especies correlaciona positivamente con la ploidía) y la incorporación de la técnica de citometría de imágenes, técnica que, a través del análisis con un Software de microfotografías de núcleos en interfase teñidos mediante la reacción Feulgen, permite estimar la cantidad de ADN relativo.

4.0 Resultados del proyecto

4.1 Cariotipos y recuentos cromosómicos durante inducción de poliploidía.

4.1.1 Idiograma de *R. bagnoldii*

Las Figura 2a y 2b muestran el idiograma y microfotografías de cromosomas de *R. bagnoldii*, con un número cromosómico $2n = 2x = 18$; su cariotipo está compuesto de un par metacéntrico, 3 pares submetacéntricos y 5 pares subtelocéntricos.

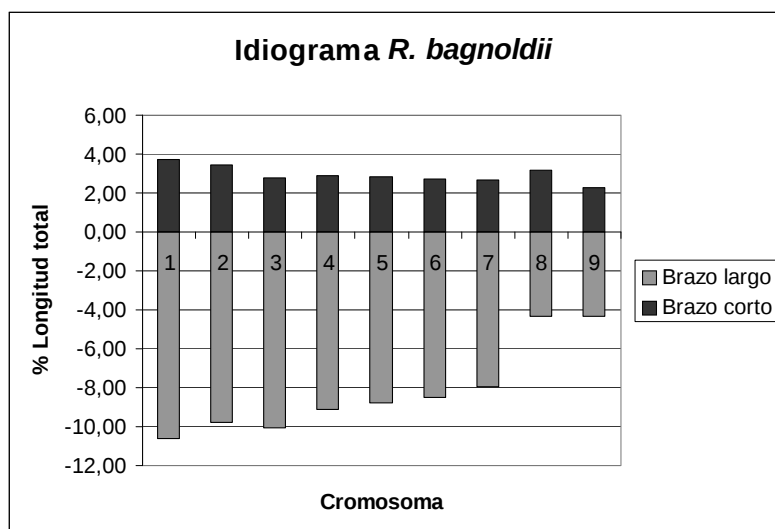


Figura 2a. Idiograma de *R. bagnoldii*

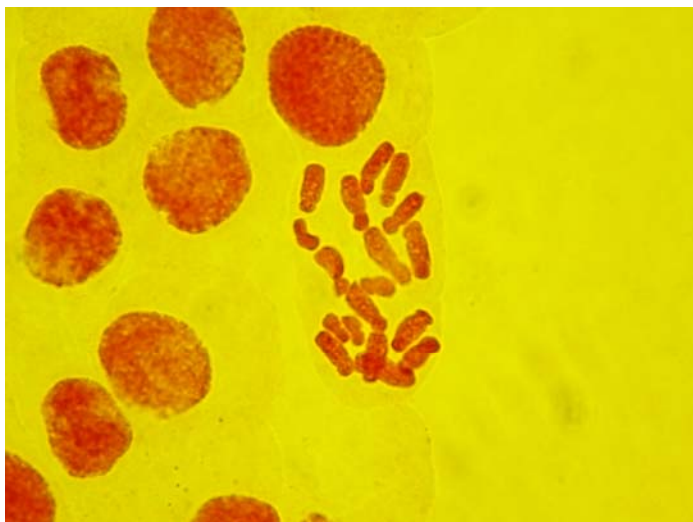


Figura 2b. Microfotografía de cromosomas metafásicos de *R. bagnoldii*

4.1.2. Idiograma de *R. montana*

La Figura 3a y 3b muestran el idiograma y microfotografías de cromosomas de *R. montana*, con un número cromosómico $2n = 2X=18$. Cabe señalar que algunas células mostraban cromosomas supernumerarios teniendo 19 o 20 cromosomas. Su cariotipo está compuesto de 6 pares subtelocéntricos, 1 par submetacéntrico y 2 pares metacéntricos.

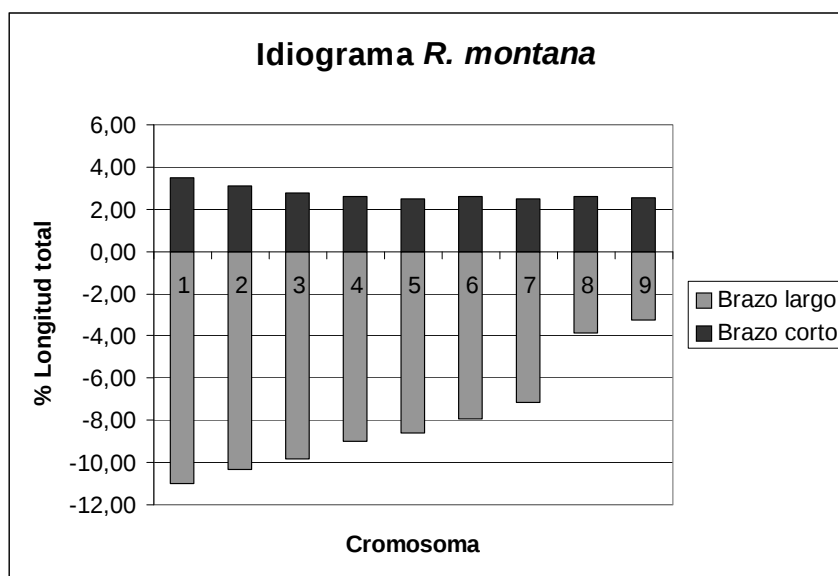


Figura 3a. Idiograma de *R. montana*

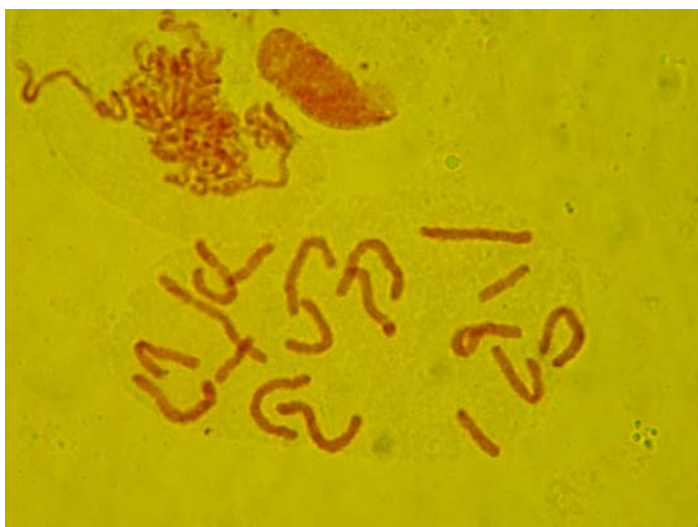


Figura 3b. Microfotografía de cromosomas metafásicos de *R. montana*

4.1.3 Idiograma de *R. rhodolirion*

R. rhodolirion posee una dotación cromosómica de $2n = 2X = 16$. Su cariotipo está compuesto de 4 pares submetacéntricos y 4 pares metacéntricos.

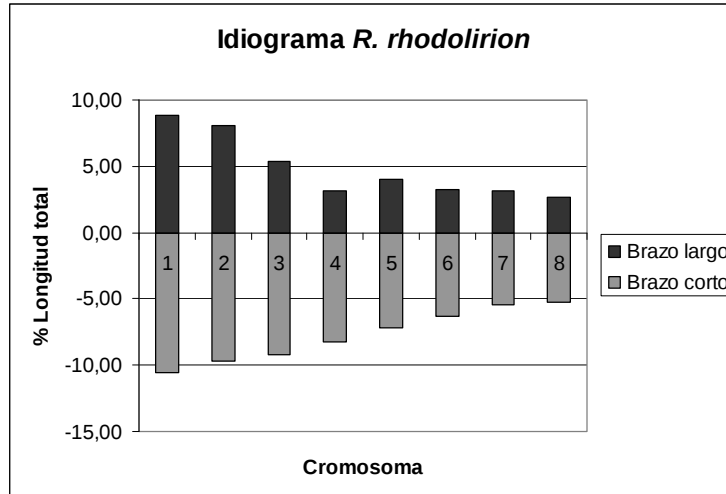


Figura 4a. Idiograma de *R. rhodolirion*

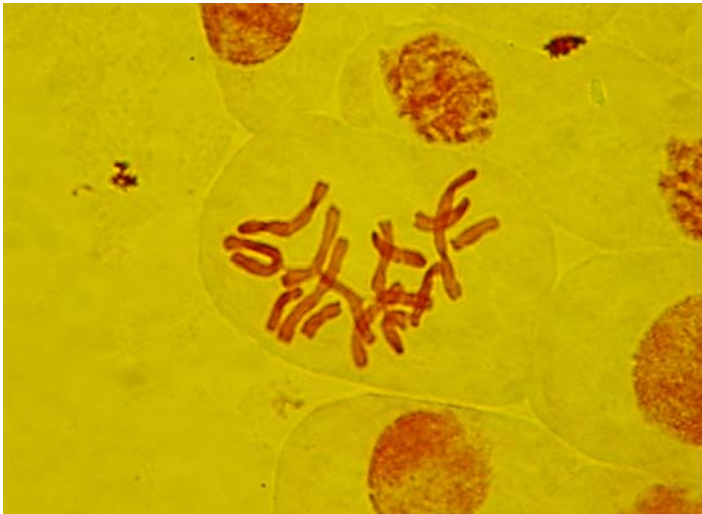


Figura 4b. Microfotografía de cromosomas metafásicos de *R. rhodolirion*

4.1.4 Idiograma de *R. splendens*.

Con una dotación cromosómica de $2n = 2X = 18$. Su cariotipo está compuesto de 6 pares subtelocéntricos y 2 pares metacéntricos

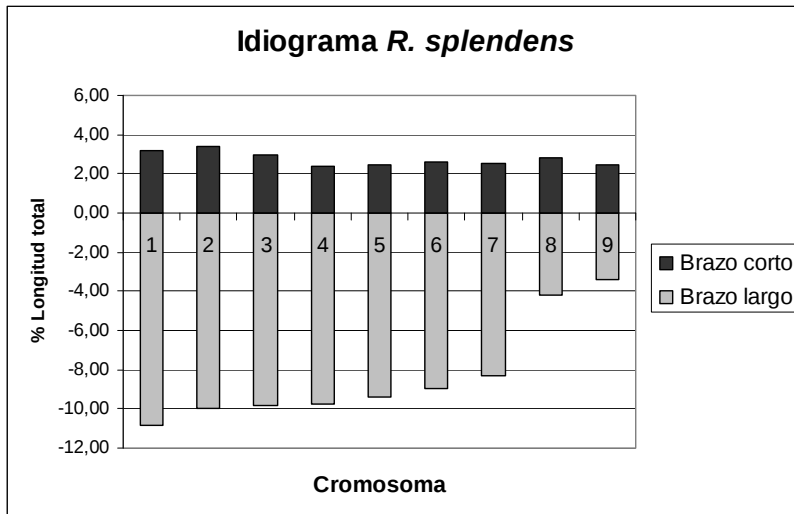


Figura 5a. Idiograma de *R. splendens*



Figura 5b. Microfotografía de cromosomas metafásicos de *R. splendens*

La determinación de cariotipos indicó que tres de las especies, *R. splendens*, *R. montana* y *R. bagnoldii* poseen una dotación cromosómica de $2n = 18$, mientras que *R. rhodolirion* tiene un número cromosómico $2n = 16$. Además *R. rhodolirion* difiere en morfología cromosómica con respecto a las demás especies. En esta última, los cromosomas de mayor tamaño corresponden al tipo metacéntrico, mientras que en las restantes los cromosomas metacéntricos son los más pequeños del cariotipo, siendo los de mayor tamaño tendientes a la telocentría. Las cuatro especies se encontrarían en estado diploide ya que

los números cromosómicos básicos propuestos para el género son $x = 8$ y $x = 9$.

4.2 Inducción de poliploidía, en base a la aplicación de colchicina

A continuación se entregan los resultados de inducción de poliploidía en las especies en las que se tuvo éxito.

4.2.1 Resultados de tratamiento de colchicina aplicada *in vivo* a semillas en germinación

<i>R. splendens</i>	Tratamiento
	0,05 colchicina x 4 horas
Analizadas*	21
Poliploides	2
	0,05 x 12
Analizadas	5
Poliploides	1
	0,2 x 4
Analizadas	1
Poliploides	0
	0,2 x 12
Analizadas	5
Poliploides	3
	10 uM trifluralina
Analizadas	17
Poliploides	0
	100 uM trifluralina
Analizadas	19
Poliploides	1

* En algunos tratamientos el número de plantas analizadas es bajo debido a la baja sobrevivencia.

4.2.2 Poliploides obtenidos desde tratamientos de colchicina aplicada *in vitro*

<i>R. montana</i>					
Medio c/colchicina 0,05%		0,1 % colch. por 8 horas		0,2 % colch. Por 4 horas	
Analizadas	Poliploides	Analizadas	Poliploides	Analizadas	Poliploides
39	12	13	3	17	3
<i>R. splendens</i>					
Medio c/colchicina 0,05%		0,1 % colch. por 8 horas		0,2 % colch. Por 4 horas	
Analizadas	Poliploides	Analizadas	Poliploides	Analizadas	Poliploides
8	1*	13	0	17	3

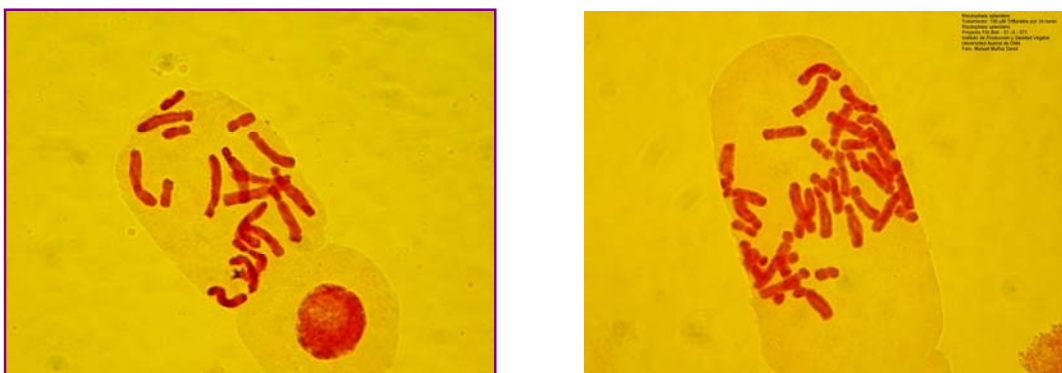
Datos corresponden a genotipos analizados en diferentes tratamientos

Las especies que mejor respondieron a la inducción de poliploidía fueron *R. montana* y *R. splendens*. Teniendo los tratamientos *in vitro* la mayor eficiencia.

La inmersión de microbulbillos en brotación en medio MS líquido en agitación adicionado con colchicina al 0.05 % permitió obtener la mayor cantidad de plantas poliploides

El cultivo *in vitro* permitió además tratar un mayor número de plantas y multiplicar los individuos poliploides con mayor eficiencia que los tratamientos *in vivo*.

Figura 6. Microfotografías cromosomas de planta de *R. splendens* diploide (izquierda) y poliploide (derecha)



4.3 Evaluación de plantas poliploides

Resultados evaluación citomorfológica de plantas sometidas a inducción de poliploidía.

El Cuadro 1 muestra los valores de Integral de Densidad óptica del núcleo de 8 plantas diploides y 7 poliploides, apreciándose la eficacia de la citometría de imágenes (IOD) en la detección de los poliploides, ya que los valores IOD de plantas con 36 cromosomas corresponden a valores cercanos al doble de los diploides (18 cromosomas), mientras que las plantas tetraploides no siempre muestran estomas de mayor longitud

Esta nueva herramienta permite identificar poliploides en el caso de que, en algún individuo, no se obtengan células en metafase mitótica con cromosomas lo suficientemente dispersos para realizar un recuento. Para identificar poliploides se puede usar el criterio de considerar un individuo como tal si su valor IOD es superior al promedio menos 2 veces la desviación estándar de los poliploides aquí analizados.

La Figura 7 muestra gráficamente los resultados de mediciones de cantidad de ADN relativo y tamaño de estomas. En el eje de las ordenadas, se muestra el límite inferior como para considerar un individuo poliploide (simbolizado por un triángulo verde) según el valor IOD. La nube de puntos superior corresponde a los individuos poliploides.

Los valores de tamaño de estomas pueden ser útiles en el caso de que algún individuo presente estomas de tamaño sustancialmente superior a los diploides. En ese caso puede considerársele como posible poliploide para así volver a repetir los análisis de recuento de cromosomas en ese individuo. Es necesario insistir que el recuento de cromosomas solo puede realizarse en plantas que posean raíces jóvenes, en crecimiento activo, de la cual se obtengan células en metafase con cromosomas dispersos. Esto último no siempre sucede, por lo que cualquier otra herramienta de análisis es valiosa.

Cuadro 1. Recuentos cromosómicos, cantidad de ADN relativo del núcleo y promedio tamaño de estomas en 8 individuos de *R. montana*.

Genotipo	IOD	Cromosomas	Estomas
m 170	17106383	18	42.8
m 485-5b 0.2	11614887	18	41.4
m 580-5 0.1	14191496	18	41.9
m 770 – 2	13465382	18	45.3
m 882-2	11970693	18	41.5
m 204	14674696	18	54.9
mb 12 xb-5	11876320	18	47.7
m 894-1	11655558	18	36.8
mb 120 x-6	23336698	36	63.0
m 576-4 0.1%	24550276	36	48.3
m 501 0.2 - 4	22555484	36	59.5
mb 12 x-d	25234820	36	44.8
mb 123 bx	22154378	36	59.2
mb 123 ax-7	25992771	36	48.7
mb 12x-4	25343904	36	42.1

Se considera el recuento de cromosomas y la medición de ADN relativo del núcleo (IOD) como la herramienta principal en la determinación de la ploidía, siendo la medición de los estomas una técnica auxiliar para identificar posibles poliploides.

Figura 1. Integral de densidad óptica del núcleo y tamaño de estomas en plantas de *R. montana* analizadas.

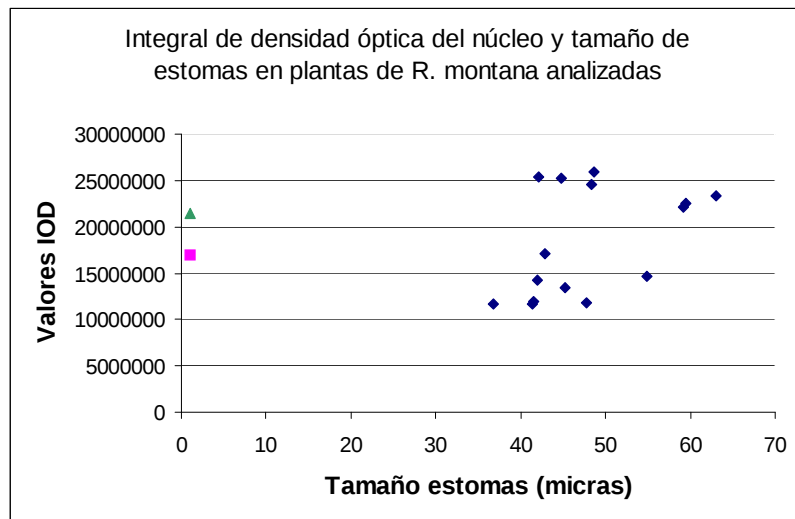
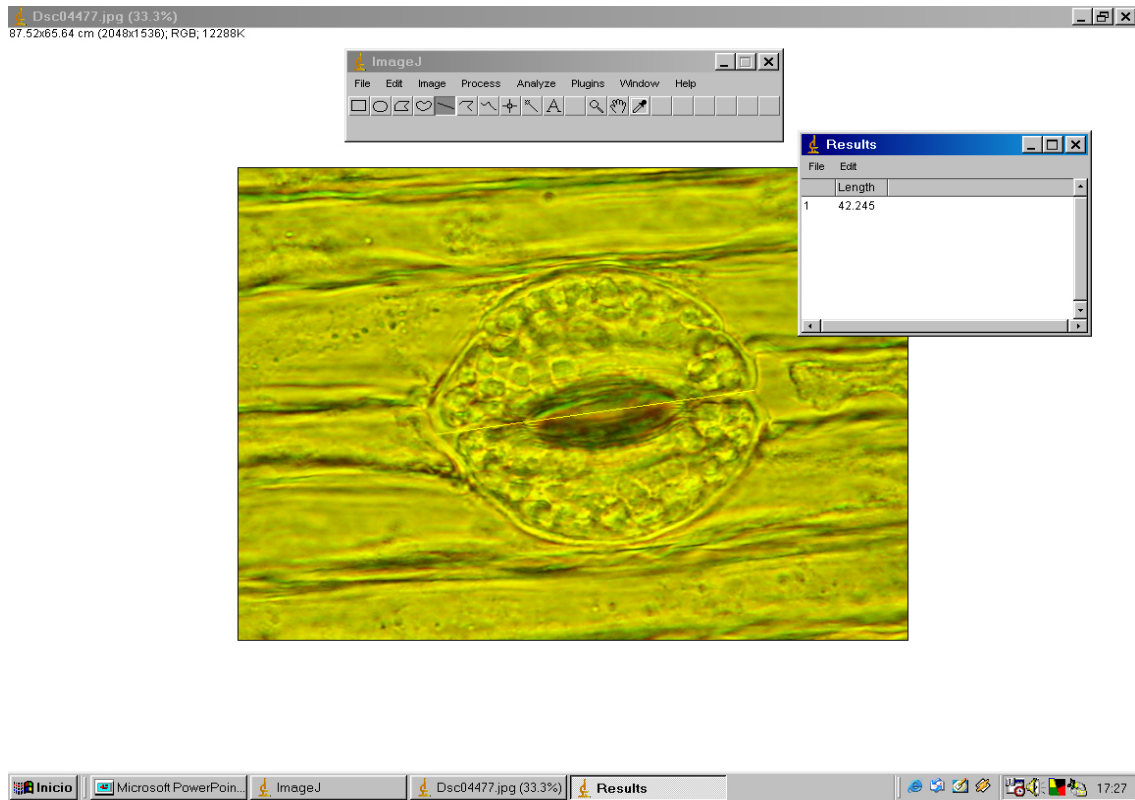


Figura 2. Medición de estomas utilizando el Software Image J.



4.4 Inducción de la germinación de semillas *in vivo* como *in vitro*

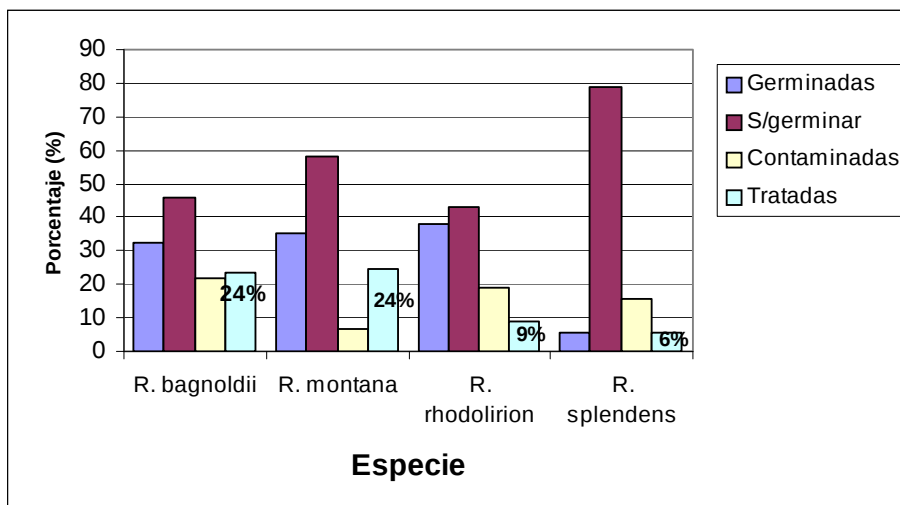
En ambos casos los porcentajes de germinación fueron desuniforme en el tiempo, con porcentajes de germinación que oscilaron entre 27-80% dependiendo de la especie y el periodo de evaluación. Sin embargo, en general se puede concluir que la germinación *in vitro* presentó valores mas altos, y presenta la ventaja de que el material se encuentra en buenas condiciones sanitarias para continuar multiplicándolo bajo condiciones similares o si se desea utilizar para su caracterización citológica es mas fácil de trabajar, debido a que no se daña las puntas de las raíces.

Cuadro 2. Comparación de los porcentajes de germinación bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, mediante protocolo estándar.

	% de germinación	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
<i>R. bagnoldii</i>	32% en 20 días	27-52% en 40 días
<i>R. splendens</i>	82% en 60 días	80% en 70 días (sin remojo previo) 84% en 50 días (con remojo previo)
<i>R. rhodolirion</i>	46 % en 70 días	
<i>R. montana</i>		63- en 70 días 73% en 50 días

Mediante el protocolo de germinación de semillas *in vitro*, se logró aumentar significativamente la cantidad y variabilidad de las cuatro especies, llegándose a establecer una gran cantidad de genotipos diferentes, con los cuales se contó con material suficiente para realizar ensayos de inducción de poliploides y multiplicación *in vitro*.

Figura 3. Situación al 11 de septiembre 2004 de las semillas ingresadas al banco de germoplasma de las 4 especies de *Rhodophiala sp.*



Para solucionar los problemas de contaminantes endógenos presentados en las semillas de *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion* se realizaron ensayos mediante la aplicación de antibióticos. En los primeros ensayos no se logró erradicar en forma aceptable los microorganismos contaminantes, pero la tendencia era utilizar una solución de penicilina y estreptomicina (0,1 g/L) durante 60 minutos.

Cuadro 3. Efecto de diferentes tiempos de inmersión en antibióticos para la eliminación de microorganismos en *R. rhodolirion*

Tiempo (min)	Porcentaje de semillas sobrevivientes	Porcentaje de semillas eliminados	
		Contaminación (%)	Involución del embrión (%)
0	12	78	10
30	10	66	24
60	24	60	16
90	20	64	16

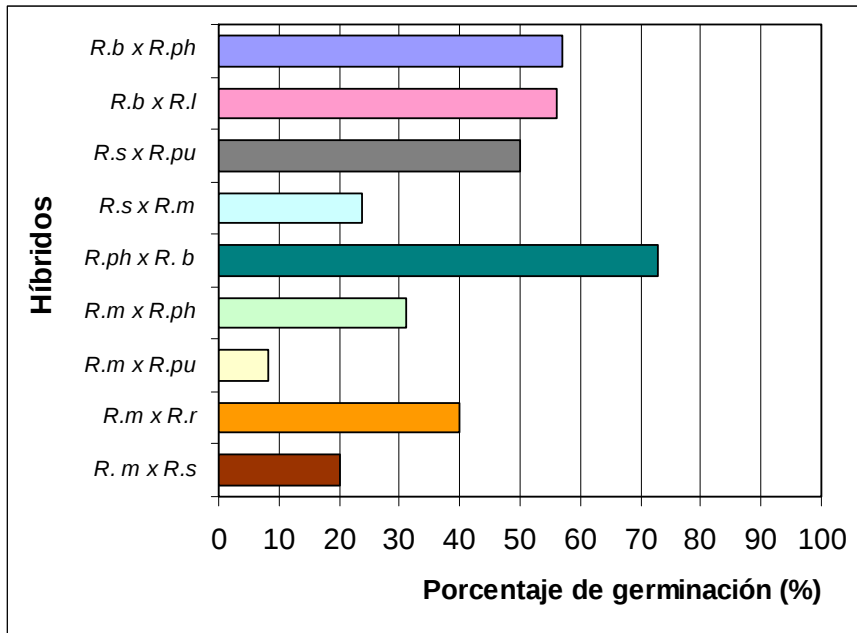
En el caso de *R. bagnoldii* se aplicó el tratamiento con inmersión en antibióticos pero durante 60 y 120 minutos, determinándose porcentajes de germinación mayores del 60%.

Cuadro 4 . Aplicación de antibióticos para la eliminación de bacterias en *R. bagnoldii*.

Tiempo de acción antibióticos	Nº semillas ingresadas	Nº semillas con desarrollo de plántulas con microbulbillo
60 minutos	100	61 (61%)
120 minutos	100	68 (68%)

Debido a que la Universidad de Talca comenzó a realizar cruzamientos entre las diferentes especies se obtuvieron semillas de diez híbridos, las cuales se ingresaron a condiciones *in vitro* aplicando el protocolo estándar de germinación de semillas. Estas incorporaciones entregaron porcentajes de germinación que fluctúan entre un 18-73%. Los porcentajes de germinación para cada híbrido se presentan en la siguiente figura.

Figura 4. Porcentaje de germinación de híbridos de *Rhodophiala*.



4.5 Multiplicación de plantas *in vitro*

Debido a que el crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro* era principalmente mediante el desarrollo de un bulbillo con un brote y varias raíces, se debía encontrar un sistema de multiplicación que sea más eficiente en cuanto a la cantidad de microbulbillos producidos y su calidad. Mediante la aplicación de un corte basal en microbulbillo de *R. montana*, se observó que afectó en forma significativa la formación de nuevos microbulbillos, aumentando la tasa de multiplicación de 1 a 2. Sin embargo, la realización de esta excisión provocó

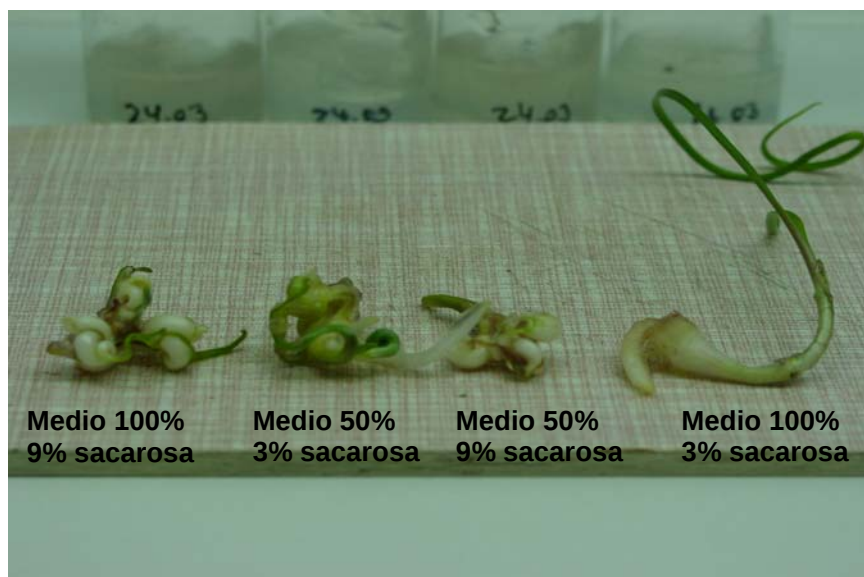
una herida que estimula la liberación de compuestos fenólicos, lo cual es perjudicial para el cultivo.

Cuadro 5. Supervivencia y regeneración de *R. montana* a partir de microbulbillos sin y con corte en cruz en la zona basal.

Evaluaciones <i>in vitro</i> (30 días de cultivo)	<i>R. montana</i>	
	Sin corte	Con corte
Supervivencia (%)	100	100
Número de brotes	1,1 b	2,0 a
Longitud de brotes (cm)	4,3	4,4
Número de raíces	1,0	1,1
Longitud de raíces (cm)	2,3	1,1
Número de microbulbillos	1,1 b	2,0 a
Diámetro de microbulbillos (cm)	0,7	0,5

Este factor también fue analizado en medios de cultivo de diferente composición y con niveles de sacarosa.

Figura 5. Regeneración de microbulbillos de *R. montana* a partir de bulbillos con corte en cruz.



Cuadro 6. Tasa de multiplicación de *R. montana* en medios con diferentes concentración de macrosales.

Macro Medio MS	Tasa de Multiplicación	
	Bulbos completos	Bulbos cortados en cruz
100%	1,0	1,8
50%	1,0	1,9

Medio MS, adicionado con 0,1/1,0 mg/L de ANA/2iP y 3% de sacarosa

Debido a que los coeficientes de multiplicación con la técnica de una incisión en la placa basal no superaban los 2 microbulbillos, y a que esta técnica provoca un gran daño al bulbillo, se debió recurrir a otros sistemas de cultivo. El cultivo en medio líquido se ha descrito como un eficiente sistema para aumentar los coeficientes de multiplicación y disminuir la oxidación de los explantes, el cual comenzó aplicarse de diferentes formas; medio líquido en agitación, medio líquido estacionario con soporte de disco de algodón y medio líquido en inmersión temporal en comparación al medio solidificado con agar propuesto inicialmente en el proyecto.

Para ello se realizaron varios ensayos, entre los que se destacan los siguientes:

1.- Comparación de uso de medio líquido versus medio sólido:

Se utilizó como medio basal el MS 100%, sin reguladores de crecimiento, 30 g/L de sacarosa y dispensado 50 ml de medio en frascos de 350 ml de capacidad, colocando en la base un disco de algodón hidrófilo y sembrando microbulbillos con corte basal de *R. montana* y *R. splendens*, incubándose durante dos meses en cámara a 23°C, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-2}$ y 16 horas luz.

Cuadro 7. Coeficiente de multiplicación, porcentaje de hiperhidricidad y oxidación de microbulbillos de *Rhodophiala montana* en medio líquido versus sólido.

Tratamiento	N° de brotes por bulbo	Hiperhidricidad	Oxidación
Líquido	1.47 a	16 %	16%
Sólido	1.42 a	5 %	0 %

Cuadro 8. Biomasa de microbulbillos de *Rhodophiala montana* en medio líquido versus sólido.

Tratamiento	ICB	ICTI	Peso raíz	Peso Hojas	Peso Total	Peso bulbo
Líquido	2.08 a	3.90 a	0.42 a	0.17 a	2.43 a	1.78 a
Sólido	0.78 b	2.86 a	0.42 a	0.11 a	1.38 a	0.77 b

* ICB: Índice de crecimiento de bulbo; ICT: Índice de crecimiento total.

Cuadro 9. Número de brotes, hiperhidricidad y oxidación de microbulbillos de *Rhodophiala splendens* en medio líquido versus sólido.

Tratamiento	N° brotes por bulbo	Hiperhidricidad	Oxidación
Líquido	2.06 a	40 %	35%
Sólido	1.08 a	5 %	11%

Cuadro 10. Resultados en aumento de biomasa de microbulbillos de *Rhodophiala splendens* en medio líquido versus sólido.

Tratamiento	ICB	ICT	Raíz	Hoja	Peso Total	Peso Bulbo
Líquido	2.063 a	3.30	0.22	0.17	1.83	1.35
Sólido	1.081 b	3.17	0.58	0.13	1.84	1.09

* ICB: Índice de crecimiento de bulbo; ICT: Índice de crecimiento total.

Con la realización de estos ensayos se llegó a la conclusión de que el estado físico del medio no parece influir en la multiplicación de ellos, pero que el uso de medio líquido, favorece el aumento de biomasa del bulbo, con perdidas de material por oxidación e hiperhidricidad. Los coeficientes de multiplicación fueron menores o iguales a 2, similar al obtenido en el ensayo de la aplicación de un corte en la base de los microbulbillos, sin embargo, cabe destacar que el medio de cultivo utilizado no se encontraba suplementado con reguladores de crecimiento.

2.- Comparación de dos sistemas de cultivo:

Se utilizaron frascos de 50 ml de capacidad total con 10 ml de medio de cultivo (Sistema 1) y frascos de 350 ml de capacidad con 45 ml de medio de cultivo (Sistema 2), utilizando el medio MS líquido completo sin reguladores de crecimiento para microbulbillos con corte en la base de las especies *R. montana* y *R. splendens*.

Cuadro 11. Multiplicación, enraizamiento e hiperhidricidad de microbulbillos de *Rhodophiala splendens* en dos sistemas de cultivo *in vitro*

Tratamiento	N° brotes por bulbo	% enraizam.	Hiperhidricidad (%)
Sistema 1	1.25 a	81	11%
Sistema 2	1.60 a	85	14%

Cuadro 12. Resultados en aumento de biomasa de microbulbillos de *Rhodophiala splendens* en dos sistemas de cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Indice crec. Bulbo	Indice crec. Total	Peso Final g	Peso bulbo g
Sistema 1	1.44 b	7.07 a	1.27 a	0.51 b
Sistema 2	2.45 a	8.29 a	2.12 a	0.98 a

Cuadro 13 . Resultados en multiplicación, enraizamiento e hiperhidricidad de microbulbillos de *Rhodophiala montana* en dos sistemas de cultivo *in vitro*

Tratamiento	Nº brotes por bulbo	% enraizam.	Hiperhidratación (%)
Sistema 1	1.5 a	84	8
Sistema 2	2.08 a	84.6	16

Cuadro 14 . Resultados en aumento de biomasa de microbulbillos de *Rhodophiala montana* en dos sistemas de cultivo *in vitro*

Tratamiento	Indice crec. Bulbo	Indice crec. total	Peso Final (g)	Peso bulbo (g)
Sistema 1	1.65 a	5.66 a	1.20 a	0.59 a
Sistema 2	4.46 b	8.63 b	2.14 b	1.19 b

Con estos ensayos se logró determinar que el uso de frascos de mayor tamaño y con mayor cantidad de medio de cultivo favorece principalmente la calidad de los microbulbillos, pero no logra mejorar los coeficientes de multiplicación en ninguna de las dos especies.

3.- Comparación de medio líquido y sólido en relación a diferentes tipos y concentraciones de citoquininas:

En este ensayo se utilizaron microbulbillos *in vitro* de diferentes genotipos de *Rhodophiala splendens*, los cuales fueron sembrados en 50 ml de medio de cultivo MS 100%, en estado líquido estacionario con una base de algodón hidrófilo y en estado sólido con 8 g/L de agar, 30 g/L de sacarosa. Este medio de cultivo fue adicionado con las citoquininas 6-benzilaminopurina (BAP) y meta-topolina (MTP), en forma independiente en concentraciones de 2.2, 4.4 y 6.6 $\mu\text{mol/L}$, además del testigo sin reguladores de crecimiento, incubados durante dos meses.

En los siguientes cuadros se observa una respuesta diferente en cuanto a las variables de producción (coeficiente de multiplicación) y calidad para los

microbulbillos de una misma especie cuando son sometidos bajo condiciones ambientales y nutritivas similares. Esta variable va a depender del genotipo, y en menor grado del número de repeticiones de los ensayos.

Cuadro 15. Coeficiente de multiplicación de *R. splendens* en medios líquidos adicionados con citoquininas

	Ensayo 1 (n=8)				Ensayo 2 (n=4)			
	Concentración (μmol/L)				Concentración (μmol/L)			
	Testigo	2,2	4,4	6,6	Testigo	2,2	4,4	6,6
Medio sólido								
Testigo	1,87				2,62			
BAP		2,75	2,5	2,37		3,45	3,75	2,75
MTP		3,37	2,75	2,87		2,75	4,5	2,83
Medio Líquido								
Testigo	2,6				2,56			
BAP		3,5	2,8	2,6		3	2,87	3,5
MTP		3,7	3,12	3,25		3,37	3,5	2,25

* n: Valores promedios de acuerdo al número de repeticiones.

Cuadro 16. Incremento en peso de microbulbillos de *R. splendens* en medios líquidos adicionados con citoquininas

	Ensayo 1 (n=8)				Ensayo 2 (n=4)			
	Peso microbulbillos (g)				Peso microbulbillos (g)			
	Concentración (μmol/L)				Concentración (μmol/L)			
	Testigo	2,2	4,4	6,6	Testigo	2,2	4,4	6,6
Medio sólido								
Testigo	1,6				5,6			
BAP		1,5	2,4	1,2		1,9	4,1	2,7
MTP		3,0	1,1	2,6		2,6	3,8	2,2
Medio Líquido								
Testigo	0,6				1,9			
BAP		1,3	0,8	1,4		1,9	2,5	2,3
MTP		0,9	1,4	1,9		1,6	3,1	2,8

* n: Valores promedios de acuerdo al número de repeticiones (Peso inicial-peso final).

Cuadro 17. Diámetro final de microbulbillos de *R. splendens* en medios líquidos adicionados con citoquininas

	Ensayo 1 (n=8)*				Ensayo 2 (n=4)*			
	Diámetro microbulbillos (cm)				Diámetro microbulbillos (cm)			
	Concentración (μmol/L)				Concentración (μmol/L)			
	Testigo	2,2	4,4	6,6	Testigo	2,2	4,4	6,6
Medio sólido								
Testigo	0,31				0,58			
BAP		0,31	0,30	0,19		0,35	0,38	0,52
MTP		0,31	0,35	0,37		0,45	0,46	0,48
Medio Líquido								
Testigo	0,23				0,67			
BAP		0,36	0,31	0,24		0,41	0,38	0,40
MTP		0,26	0,26	0,36		0,32	0,41	0,21

* n: Valores promedios de acuerdo al número de repeticiones

A pesar de las diferencias en la respuesta de ambos ensayos, se logró establecer que el uso de medio líquido en forma estacionaria con base de algodón hidrófilo, fue más favorable para la producción y crecimiento de microbulbillos en la mayoría de los tratamientos.

En cuanto al uso de la citoquinina meta-topolina esta presentó una respuesta mas favorable en la mayoría de los tratamientos, siendo su uso recomendado para la inducción de microbulbillos en concentraciones de 2,2- 4,4 μmol/L.

Figura 6: Plántulas *in vitro* de *R. splendens* en cultivo en medio liquido con base de algodón hidrófilo.



4.- Efecto de diferentes concentraciones de Meta-topolina sobre el crecimiento para cuatro especies de *Rhodophiala*.

Este ensayo se realizó con microbulbillos de *R. bagnoldii*, *R. ananuca*, *R. montana* y *R. splendens*, en forma separada, sembrando dos microbulbillos en frascos de 350 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo MS completo y 30 g/L de sacarosa y cinco repeticiones por tratamiento. Los parámetros que se presentan sin procesar estadísticamente, son:

Coefficiente de multiplicación (CM):

$\text{Coeficiente de multiplicación} = \frac{\text{Nº de microbulbillos inicial} + \text{Nº de microbulbillos final}}{\text{Nº de microbulbillos inicial}}$
--

Peso total planta (g)

Incremento de materia fresca planta completa (IMFPC) (g) e Incremento materia fresca bulbillo (IMFB) (g)= Peso final planta/microbulbillo- Peso inicial.

Peso bulbo final (PBF).

Diámetro bulbo final (DBF)

Longitud de brote (LB).

Cuadro 18. Coeficiente de multiplicación de *Rhodophiala bagnoldii* cultivada en medios adicionados con diferentes concentraciones de Meta-topolina.

Tratamientos	Parámetros evaluados						
	CM	Peso total planta (g)	ICMF Planta (g)	Peso total bulbo (g)	ICMF bulbo (g)	LB (cm)	DB final (cm)
0/0	2,6	2,2	1,7	1,0	0,4	7,8	0,6
*0,1/1,0 (a)	1,9	2,5	1,9	1,0	0,5	5,5	0,9
*0,1/1,0 (b)	2,0	3,6	3,0	1,6	1,1	9,3	0,8
0,5	2,3	2,1	1,3	1,0	0,3	8,8	0,4
1,0	0,4	1,7	1,1	0,6	0,1	5,8	0,3
2,5	0,8	1,3	0,8	0,6	0,1	5,2	0,3
5,0	1,0	1,7	1,1	0,8	0,3	6,2	0,3
7,5	1,5	0,7	0,1	0,2	-0,3	2,9	0,1

* (a): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Benzilaminopurina (BAP).

(b): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Meta-topolina (MTP).

Cuadro 19. Coeficiente de multiplicación de *Rhodophiala ananuca* cultivada en medios adicionados con diferentes concentraciones de Meta-topolina.

Tratamientos	Parámetros evaluados						
	CM	Peso total planta	ICMF Planta (g)	Peso total bulbo (g)	ICMF bulbo (g)	LB (cm)	DBF (cm)
0/0	2,4	1,4	1,2	0,4	0,2	8,9	0,4
*0,1/1,0 (a)	2,1	2,2	1,5	1,4	0,7	7,3	0,6
*0,1/1,0 (b)	1,9	1,8	1,5	0,6	0,3	6,3	0,7
0,5	2,1	1,4	1,0	0,5	0,1	9,2	0,4
1,0	2,4	0,9	0,6	0,3	0,1	7,1	0,2
2,5	2,6	2,0	1,5	0,7	0,2	12,0	0,5
5,0	2,1	0,9	0,6	0,3	0,02	6,4	0,2
7,5	2,0	0,6	0,4	0,2	-0,04	6,2	0,2

* (a): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Benzilaminopurina (BAP).
 (b): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Meta-topolina (MTP).

Cuadro 20. Coeficiente de multiplicación de *Rhodophiala montana* cultivada en medios adicionados con diferentes concentraciones de Meta-topolina.

Tratamientos	Parámetros evaluados						
	CM	Peso planta final (g)	ICMF planta (g)	Peso bulbo final (g)	ICMF bulbo (g)	LB (cm)	DB final (cm)
0/0	2,1	1,3	0,8	0,8	0,3	10,4	0,6
*0,1/1,0 (a)	2,0	1,7	1,2	0,8	0,3	8,0	0,6
*0,1/1,0 (b)	1,5	0,7	0,1	0,1	-0,4	5,1	0,3
0,5	1,8	1,1	0,6	0,6	0,04	6,8	0,6
1,0	2,1	2,1	1,1	1,1	0,1	11,4	0,8
2,5	2,3	1,8	1,2	0,8	0,2	14,7	0,6
5,0	1,9	1,2	0,6	0,6	-0,02	10,0	0,5
7,5	2,0	1,1	0,6	0,4	-0,1	4,4	0,3

* (a): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Benzilaminopurina (BAP).
 (b): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Meta-topolina (MTP).

Cuadro 21. Coeficiente de multiplicación de *Rhodophiala splendens* cultivada en medios adicionados con diferentes concentraciones de Meta-topolina.

Tratamientos	Parámetros evaluados						
	CM	Peso planta final (g)	ICMF planta (g)	Peso bulbo final (g)	ICMF bulbo (g)	LB (cm)	DB final (cm)
0/0	2,1	3,3	2,1	2,3	1,1	6,8	0,4
*0,1/1,0 (a)	2,0	3,1	2,2	1,5	0,5	5,5	0,8
*0,1/1,0 (b)	2,2	2,6	1,8	1,7	1,0	6,5	0,4
0,5	2,3	2,0	1,6	0,9	0,5	10,3	0,5
1,0	2,1	3,7	2,4	1,4	0,1	6,7	0,5
2,5	2,5	1,9	1,5	0,7	0,2	8,8	0,4
5,0	3,4	2,1	1,3	0,8	0,06	6,6	0,4
7,5	2,3	2,0	1,3	0,6	-0,1	6,0	0,3

* (a): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Benzilaminopurina (BAP).
 (b): Medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/l de ácido naftalen acético (ANA) y 1,0 mg/L de Meta-topolina (MTP).

4.- El uso de retardantes de crecimiento en relación a la aplicación de citoquininas en la producción y calidad de los microbulbillos.

Para determinar el efecto del Paclobutrazol en relación a concentraciones estándar de las citoquininas BAP y Meta-topolina se realizó un ensayo utilizando microbulbillos de *R. splendens*. Estos fueron sembrados en un medio MS 100% líquido con base de algodón hidrófilo, adicionándose dos concentraciones de citoquininas; 2,2 y 4,4 $\mu\text{mol/L}$ en relación a dos concentraciones de Paclobutrazol (PBZ), 0,85 $\mu\text{mol/L}$ y 1,7 $\mu\text{mol/L}$, además de los testigos, sin reguladores de crecimiento, de tal forma de totalizar 9 tratamientos. Se utilizaron 5 repeticiones por tratamiento con un número variable de microbulbillos, pero determinando su peso y diámetro inicial, de tal forma que al cabo de dos meses de incubación se realizó una evaluación final obteniéndose de esta forma los coeficientes de multiplicación e incrementos de crecimiento en peso y tamaño.

De acuerdo con los resultados, se establece un aumento notable en las variables analizadas, tanto en los coeficientes de multiplicación como en el tamaño de los microbulbillos.

Cuadro 22. Coeficiente de multiplicación en microbulbillos de *R. splendens* tratados con Paclobutrazol y citoquininas en medio líquido

	Concentración Paclobutrazol ($\mu\text{mol/L}$)		
	0	0,85	1,7
Concentración Citoquinina ($\mu\text{mol/L}$)			
0	4,1	4,6	5,1
2,2 BAP	6,8	3,7	2,9
2,2 MTP	3,4	4,5	4,5

n=5. Valores promedios de acuerdo al número de repeticiones.

En el caso del coeficiente de multiplicación este factor ha ido mejorando paulatinamente, a medida que se incorporan nuevas estrategias de multiplicación, presentando en este caso valores promedios que oscila entre 2,9 y 6,8 bulbillos/tratamiento, de tal forma que los coeficientes de multiplicación que en un comienzo eran de 1 o 2 bulbillos hijos por bulbo madre, ahora con la aplicación del sistema de cultivo estacionario con disco basal de algodón hidrófilo conjuntamente con la incorporación de nuevos reguladores de crecimiento, han aumentado a 4 o 6 bulbillos hijos.

En forma paralela al aumento en el número de microbulbillos, también ha ido mejorando el crecimiento de ellos, tanto en tamaño y por ende en peso.

En este ultimo parámetro, los valores que tradicionalmente se han entregado han sido los promedios del tratamiento, esto quiere decir que no reflejan el aumento en peso de los microbulbillos en forma individual, pero para tener una idea de cómo afectó la incorporación de estos reguladores de crecimiento, la siguiente tabla entrega estos valores, obtenido en base a la diferencia del peso final e inicial (peso total) en relación al número final de microbulbillos por tratamiento. Como puede verse, la incorporación de medios líquidos y la combinación de reguladores de crecimiento han mejorado notoriamente el número, y calidad de los microbulbillos, lo cual es uno de los factores mas importantes a considerar para el siguiente proceso de este sistema de multiplicación, como es la aclimatización, engorda y floración de los bulbos, sin embargo, falta por evaluar algunos factores morfológicos de los bulbillos que pueden afectar la respuesta de ellos bajo condiciones *ex vitro*.

Cuadro 23. Parámetros evaluados en *R. splendens* tratados con retardantes de crecimiento

Citoquinina ($\mu\text{mol/L}$)	Paclobutrazol ($\mu\text{mol/L}$)	Peso total (g)	Nº final bulbillos	Peso bulbillo (g)	Tamaño promedio bulbillo s(cm)
0	0	3,4	3,6	0,9	0,38
2,2 BAP	0	2,6	6,2	0,4	0,26
2,2 MTP	0	4,0	3,0	1,3	0,46
0	0,85	5,4	4,8	1,1	0,41
2,2 BAP	0,85	4,7	2,8	1,6	0,59
2,2 MTP	0,85	5,2	5,2	1,0	0,56
0	1,7	4,8	4,8	1,0	0,32
2,2 BAP	1,7	3,3	2,0	1,6	1,06
2,2 MTP	1,7	5,7	4,4	1,3	0,45

n=5. Valores promedios de acuerdo al número de repeticiones.

Figura 7. Plántulas de *R. splendens* en cultivo en medio líquido estacionario con base de algodón hidrófilo y retardantes de crecimiento.



Paralelamente se evaluó el cultivo en inmersión temporal como método alternativo para la producción de microbulbillos, cuyos resultados se presentan en un trabajo de tesis realizada especialmente para determinar la aplicabilidad de este sistema en el cultivo *in vitro* de *Rhodophiala*.

4.6 Crecimiento rápido de bulbos *in vitro* y aclimatización

4.6.1 Engorda de bulbillos *in vitro*

La engorda de los microbulbillos o su aumento en tamaño se evaluó bajo diferentes condiciones.

1.- El efecto de la sacarosa en diferentes concentraciones en microbulbillos de *R. bagnoldii*, cultivados bajo un flujo de fotones fotosintéticamente activos estándar de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un flujo de fotones fotosintéticamente activos de $119 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Cuadro 24. Diámetro de la planta (cm) para el efecto principal sacarosa en la especie *R. bagnoldii*.

Niveles	Repetición	Promedio	LS Sigma	Grupo
0 g/L	24	0.2791	0.0292	e
120 g/L	22	0.3103	0.0305	d
90 g/L	24	0.4025	0.0292	c
60 g/L	24	0.4220	0.0292	b
30 g/L	24	0.4520	0.0292	a

* Prueba de Tukey (5%)

Este análisis muestra que los factores estudiados no tuvieron una influencia significativa en el diámetro de bulbo, aunque se mantiene una tendencia en la que concentración de 30 g/L de sacarosa produce un bulbillo de mayor diámetro.

Cuadro 25. Diámetro de la planta (cm) para el efecto principal irradianza en la especie *R. bagnoldii*

Niveles	Repetición	Promedio	LS Sigma	Grupo
50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	60	0.5536	0.0553	b
119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	58	0.5146	0.0564	a

Cuadro 26. Peso de la planta (g) en los diferentes tratamientos para la especie *R. bagnoldii*.

Tratamientos	Repetición	Promedio	Grupo
120 g/L, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.1850	c
120 g/L, 119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	10	0.1877	c
90 g/L, 119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.3099	c
60 g/L, 119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.5015	c b
0 g/L, 119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.5593	c b
0 g/L, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.5683	c b
90 g/L, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.6240	c b
60 g/L, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	0.7410	c b
30 g/L, 119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	1.0146	b a
30 g/L, 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12	1.3369	a

*Prueba de Tuckey.

El nivel de sacarosa se vuelve un factor mucho más crítico con altos niveles de irradianza, ya que los tratamientos en donde se aplicó una concentración distinta a la óptima (30 g/L) produjeron los menores pesos de planta en condiciones de mayor intensidad lumínica.

Los efectos de un nivel de flujo fotónico fotosintético más alto (119 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provocó una disminución en el peso de las plantas, obteniéndose los mayores aumentos en el peso de las plantas con 30 g/L de sacarosa independiente del nivel de irradianza.

Cabe señalar que el tratamiento de 30 g/L de sacarosa *in vitro*, produjo un promedio de peso de planta superior a 1 g, en ambas condiciones de luminosidad. Los resultados de la aclimatización muestran que las plantas con un peso mayor a 1g tuvieron una sobrevivencia de 90%. SANTOS et al. (1998) indican que en *Narcissus tazeta*, plantas con un peso sobre 0,25 g, dos hojas y un abundante sistema radicular, aseguran una sobrevivencia de 80 a 90%.

2.- Resultados engorda de bulbillos de *R. splendens* y *R. montana* en medio sólido utilizando distintas concentraciones de sacarosa

Los resultados obtenido en cuanto a la variable diámetro de bulbo para *R. montana* se presentan en el siguiente cuadro.

Cuadro 27. Diámetro de bulbillos de *R. montana* bajo diferentes concentraciones de sacarosa

Concentración	Diámetro promedio (cm)
10 g/L	0.37
20 g/L	0.41
30 g/L	0.39
40 g/L	0.39
50 g/L	0.40

Los resultados obtenidos en *R. splendens* se presentan en el Cuadro 28.

Cuadro 28. Diámetro de bulbillos de *R. splendens* bajo diferentes concentraciones de sacarosa

Concentración	Diámetro promedio (cm)
10 g/L	0.33
20 g/L	0.42
30 g/L	0.49
40 g/L	0.45
50 g/L	0.49

Los análisis de varianza demostraron que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, indicando que la dosis de sacarosa aplicada al medio de cultivo puede variar entre 10 y 50 g/L sin producir diferencias. No obstante, es necesario señalar que existe una fuerte influencia del genotipo en los resultados, ya que ciertos genotipos pueden alcanzar diámetros de 6 a 7 mm, mientras que otros solo 2 mm. El diámetro promedio del bulbo obtenido para *R. montana* es de 4 mm aprox. y para *R. splendens* pueden llegar a 5 mm.

4.6.2 Resultados de aclimatización

A continuación se muestra el número y porcentaje de plantas sobrevivientes de *Rhodophiala bagboldii*, luego de un mes de ser mantenidas en cámara de aclimatización, a 23°C, 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Como una estimación de la condición de las plantas se realizaron varias evaluaciones de acuerdo a la categoría de clasificación según peso inicial.

Cuadro 29. Resultados aclimatización a un mes de trasplante *ex vitro*

Categorías	Nº plantas Inicial	Nº sobreviv.	% sobreviv.	Nº plantas*	%	Hojas*	%	Raíces*	%	Peso planta (g) ¹
< 0.1 g	8	2	25,0	2	100	2	100	0	0	0,06
0.1 - 0.5 g	54	41	75,9	41	100	41	100	37	90	0,26
0.5 - 1 g	37	32	86,5	32	100	31	96,9	30	97	0,56
1 - 1.5 g	11	10	90,9	10	100	10	100	10	100	1,23
1.5 - 2 g	3	3	100,0	3	100	3	100	3	100	1,44
> 2 g	5	5	100,0	5	100	5	100	5	100	1,52
Total	118	93	78,8							

* datos se refieren a número de plantas con presencia de bulbo, hojas y raíces

¹ Peso promedio de planta de la categoría.

Es posible observar que la sobrevivencia al trasplante es bastante alta, lo que coincide con lo observado en otras amaryllidaceas (SANTOS et al., 1998). Existe una tendencia a que las plantas de mayor peso tienen mayores posibilidades de sobrevivir. Con plantas de 0,5 a 1 g se logra sobre 80% de sobrevivencia al trasplante, y con plantas sobre 1,5 g se logra un 100%.

Prácticamente todos los bulbos crecen en forma normal, con hojas y sistema radical desarrollado. Llama la atención que en las categorías de mayor peso inicial, se encontró finalmente un peso promedio menor al inicial, habiendo bajado levemente en categoría de peso. Esto puede indicar que las condiciones de aclimatización no fueron totalmente óptimas: Se constató que algunas raíces mostraban síntomas de stress, aparentemente por exceso de humedad ya que se advertían lesiones de color rojizo e incluso indicios de pudrición, por lo cual sería necesario en futuros ensayos controlar de mejor manera la humedad en el sustrato.

A continuación se muestran los resultados en lo referente a peso final alcanzado por las plantas, índice de crecimiento (calculado como ganancia de peso fresco por unidad de peso de bulbo inicial al comienzo de la aclimatación), y porcentaje de sobrevivencia de las plantas provenientes de medio líquido y sólido.

El primer cuadro muestra los resultados tras 30 días de aclimatación en cámara de crecimiento en bandejas con sustrato arena:turba.

Cuadro 30. Resultados en plantas aclimatadas *ex vitro* de *R. montana* (30 días post-trasplante)

Tratamiento	Peso Final (g)	Índice de crecimiento	Sobrevivencia
Líquido	1.26 a	0.09 a	81 %
Sólido	0.79 a	0.39 a	93 %

Luego de un mes del trasplante a condiciones *ex vitro*, manteniendo la temperatura y luminosidad idénticas a las suministradas durante el cultivo *in*

vitro, se aprecia una menor sobrevivencia de las plántulas provenientes de medio líquido. El mayor peso logrado en la fase cultivo *in vitro* por las plantas proveniente de medio líquido no se traduce en una mayor ganancia de peso post trasplante, no existiendo diferencias estadísticamente significativas en el peso final alcanzado. El índice de crecimiento post trasplante no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos. Las ventajas del medio líquido, en cuanto al aumento de peso *in vitro*, se pierden luego del trasplante a condiciones *ex vitro*.

Cuadro. 31. Aclimatización de plantas en invernadero de *R. montana* provenientes de medios MS sólido y líquido

Tratamiento	Peso final	Indice Crecimiento	% sobrev.
Líquido	1.09 a	0.11 a	68 %
Sólido	0.89 a	0.71 a	93 %

Se acentúa la menor sobrevivencia de las plantas provenientes de medio líquido, confirmándose la menor aptitud al trasplante de estas plantas. El peso, que inicialmente era mayor en las plantas de medio líquido tiende a homologarse con sus contrapartes provenientes de medio sólido. El índice de crecimiento post trasplante, numéricamente mayor en las plantas provenientes de medio sólido, no presenta diferencias estadísticamente significativas. Cabe destacar que se mantiene constante el porcentaje de sobrevivencia de las plantas provenientes de medio sólido, 93%, el cual es un excelente nivel de sobrevivencia. Las condiciones de invernadero no afectaron la sobrevivencia de las plantas provenientes de medio sólido, lo que no se repitió en las plantas de medio líquido. Como era esperable, la mayor hiperhidricidad observada en las plantas de medio líquido se tradujo en una menor competencia *ex vitro*.

Si bien las condiciones en el invernadero pudieron no ser óptimas, las diferencias aquí señaladas quedaron en evidencia ya en la aclimatación en la cámara de incubación, en donde la temperatura era de 22 a 24°C, la luminosidad de 3000 lux donde el único stress post trasplante fue el reemplazo del medio de cultivo MS con sustrato arena turba. Este sustrato fue regado con solución MS 50% cada quince días, lo cual es un suministro abundante de nutrientes. Aún en estas condiciones las plantas provenientes de medio líquido se resintieron.

Se muestra un cuadro con el peso alcanzado y sobrevivencia de las plantas provenientes de medios líquidos y sólidos pero divididas en cuartiles según el peso al inicio del trasplante (fin de la etapa de cultivo *in vitro*)

Cuadro 32. Aclimatización de plantas de *R. montana* provenientes de medio líquido según categorías de peso inicial

Origen Medio MS líquido	Intervalo de peso (g)	Peso Final (g)	Indice crecimiento	% sobrevivencia
Cuartil 1	0.16 – 0.73	0.94	1.02	100
Cuartil 2	0.74 – 1.06	0.97	0.22	75
Cuartil 3	1.06 – 2.65	1.51	-0.05	75
Cuartil 4	3.00 – 3.81	0.95	-0.74	25

Cuadro 33. Aclimatización de plantas de *R. montana* provenientes de medio sólido según categorías de peso inicial.

Origen Medio MS sólido	Intervalo de peso (g)	Peso Final (g)	Indice crecimiento	% sobrevivencia
Cuartil 1	0.05 – 0.24	0.32	1.54	100
Cuartil 2	0.38 – 0.54	0.72	0.51	100
Cuartil 3	0.55 – 0.87	1.20	0.90	100
Cuartil 4	1.10 – 2.22	1.31	-0.09	75

Llama la atención la tendencia particularmente notable en las plantas provenientes de medio líquido, en donde las de mayor peso tienen una menor probabilidad de sobrevivir al trasplante *ex vitro*. Aparentemente, el gran aumento de peso producido en la etapa *in vitro* se constituye en una desventaja una vez cultivadas las plantas en condiciones *ex vitro*. En los medio sólidos esta tendencia no es tan marcada, aunque en el cuartil de mayor peso se perdió una planta.

Los índices de crecimiento son mayores en medio sólido, sin embargo, se aprecia que las plantas de menor peso inicial luego exhiben un mayor índice de crecimiento post trasplante. Los valores entregados corresponden a promedios, en donde las plantas muertas toman el valor cero en cuanto a peso final e índice de crecimiento ≤ 1 . Sin embargo, más allá de los alcances estadísticos, se aprecia claramente que el gran peso alcanzado por las plantas en los medio líquidos no constituye una ventaja en invernadero y no parece posible confirmar lo reportado en Narciso, en donde una rápida engorda *in vitro* puede producir una floración adelantada debido a que se obtienen bulbos de mayor calibre. Estos bulbos de mayor calibre de *Rhodophiala* obtenidos en medio líquido son competentes en un muy bajo porcentaje en condiciones *ex vitro*. Debe reducirse los problemas de hiperhidricidad, para lo cual pueden ser útiles los sistemas de inmersión temporal o productos antivitrificación. También sería conveniente intercalar una etapa de cultivo en medio sólido antes del trasplante. De todas maneras, es conveniente clarificar si el aumento excesivo de peso durante la etapa *in vitro*, afecta al bulbo en su crecimiento posterior.

La etapa de aclimatización también se estudio con plántulas de *R. montana*, que presentaban contaminación, las cuales fueron divididas en diferentes rangos de tamaño.

Para ello se dividieron las plántulas en 3 categorías:

Categoría 1: 54 microbulbillos de 0,2-0,4 cm de diámetro ecuatorial

Categoría 2: 66 microbulbillos de 0,5-0,6 cm de diámetro ecuatorial

Categoría 3: 53 microbulbillos de 0,7-1,2 cm de diámetro ecuatorial

Estos microbulbillos fueron lavados y desinfectados, evaluando inicialmente el tamaño ecuatorial, peso fresco, número y longitud de microbulbillos, hojas y raíces.

Posteriormente los microbulbillos fueron transplantados a bandejas con sustrato desinfectado (turba y arena) y cubiertas para mantener una alta humedad e incubadas en cámara con una temperatura promedio de 23°C y una intensidad de flujo de fotones fotosintéticamente activos de 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$. A partir de la primera semana las bandejas fueron descubiertas paulatinamente, realizando una evaluación final a los 30 días de aclimatadas las plántulas, para posteriormente ser trasladados a invernadero en donde se mantienen para evaluaciones posteriores.

Cuadro 34. Resultados de aclimatización en base a diferentes tamaños de microbulbillos en *R. montana*.

Rango calibre (cm) Hojas	Emergencia Foliar	Número de hojas	Longitud
0,2-0,4	80%	1,6	5,8
0,5-0,6	90%	1,4	5,3
0,7-1,2	100%	1,5	7,3

Figura 8. Plántulas de *R. montana* en condiciones de aclimatización.



Aclimatización a macetas en invernadero.

A continuación se muestran los parámetros de sobrevivencia y crecimiento de bulbos de *R. montana* provenientes de medios líquidos y sólidos.

Cuadro 35. Aclimatización de plantas de *R. montana* luego de tres meses en invernadero frío de Valdivia en macetas con mezcla de suelo y arena

Medio de origen	% Sobrev.	Peso final	IC	Dif. Peso
Sólido	87.15	1.21 +/- 1.07	1.50 +/- 1.73	0.49 +/- 1.03
Líquido	68.75	1.26 +/- 1.37	0.45 +/- 1.58	-0.33 +/- 1.80
5% signif.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

La diferencia en peso que alcanzaron los bulbos en el medio líquido durante la etapa *in vitro* ya no se produce en la etapa *ex vitro*, transcurridos tres meses de aclimatización, incluso los medios sólidos provocaron una mayor sobrevivencia, con índices de crecimiento numéricamente mayores y diferencia de peso favorable.

Cuadro 36. Aclimatización de plantas de *R. montana* luego de tres meses en invernadero frío de Valdivia en macetas en mezcla de suelo y arena

Medio de origen	Diámetro	N° hojas	Largo hoja mayor	N° raíces	Largo raíz mayor
Sólido	5.55 +/- 3.49	1.62 +/- 1.02	11.18 +/- 6.84	2.93 +/- 2.88	17.2 +/- 12.85
Líquido	5.11 +/- 4.37	1.41 +/- 1.90	7.84 +/- 8.42	4.82 +/- 6.63	15.30 +/- 16.61
5% signif.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Cuadro 37. Aclimatización de plantas *R. splendens* en cámara de crecimiento

Medio de origen	% Supervivencia	Peso Final	IC
Sólido	93.75 +/- 12.00	1.03 +/- 1.13	0.85 +/- 0.96 a
Líquido	75.00 +/- 20.40	1.12 +/- 0.76	-0.11 +/- 0.63 b
5% signif.	N.S.	N.S.	*

Cuadro 38. Aclimatización de plantas *R. splendens* en cámara de crecimiento

Medio de origen	Diámetro	Nº hojas	Largo Hoja mayor	Nº raíz	Largo raíz mayor
Sólido	6.28 +/- 3.16	1.37 +/- 0.88 a	12.06 +/- 7.13	1.43 +/- 1.03 a	8.90 +/- 7.31 a
Líquido	6.36 +/- 4.68	0.62 +/- 0.71 b	7.62 +/- 8.41	0.68 +/- 1.01 b	4.06 +/- 5.62 b
5% signif.	N.S.	*	N.S.	*	*

Se aprecia que en medios sólidos se logró un mayor crecimiento post trasplante, como lo reflejan el mayor índice de crecimiento, mayor número de hojas, número y largo de raíces también estadísticamente superiores a lo ocurrido en medio líquido. La supervivencia es numéricamente mayor en medios sólidos.

Cuadro 39. Aclimatización en invernadero de plantas *R. splendens*

Medio de Origen	% Supervivencia	Peso Final	IC
Sólido	93.75% +/- 12.5	0.98 +/- 0.77	1.19 +/- 1.40 a
Líquido	56.25 +/- 31.4	0.93 +/- 1.05	-0.19 +/- 0.84 b
Signif. 5%	N.S.	N.S.	*

Cuadro 40. Aclimatización en invernadero de plantas *R. splendens*

Medio de Origen	Diámetro	Nº hojas	Largo Hojas	Nº raíces	Largo Raíces
Sólido	5.58 +/-2.61	1.62 +/- 0.88 a	13.53 +/- 6.73 a	2.37 +/- 1.89 a	9.71 +/- 7.34
Líquido	4.90 +/- 5.05	0.62 +/- 0.80 b	7.40 +/- 8.97 b	1.18 +/- 1.90 b	4.81 +/- 6.61
Signif. 5%	N.S.	*	*	*	N.S.

Cuadro 41. Aclimatización en invernadero de crecimiento de plantas *R. splendens* en macetas.

Medio de origen	Sobrevivencia (%)	Peso Final	IC	Diferencia de Peso
Sólido	93.75	1.42 +/- 1.16 a	2.22 +/- 2.19 a	0.88 +/- 0.86 a
Líquido	37.50	0.83 +/- 1.47 b	-0.22 +/- 1.22 b	-0.43 +/- 1.49 b
5% signif.		*	*	*

Cuadro 42. Aclimatización en invernadero de crecimiento de plantas *R. splendens* en macetas

Medio de Origen	Diámetro (mm)	N° hojas	Largo hojas	N° raíces	Largo raíces
Sólido	5.94 +/- 2.93 a	1.43 +/- 0.81 a	16.71 +/- 6.72 a	7.43 +/- 9.34a	17.37 +/- 8.96 a
Líquido	2.95 +/- 4.23 b	0.64 +/- 0.99 b	4.91 +/- 8.20 b	3.23 +/- 7.75b	7.00 +/- 11.49 b
5% Signif.	*	*	*	*	*

Los parámetros de crecimiento muestran un mayor peso promedio, número y largo de hojas y raíces en las plantas provenientes de medio sólido. Es necesario resaltar la alta mortalidad de las plantas provenientes de medio líquido. Para cada parámetro, los individuos muertos tomaron el valor cero para el análisis. Considerando solo los individuos sobrevivientes, el peso final de los individuos de medio líquido es 2.35 +/- 1.61 y sólido 1.51 +/- 1.13, y el diámetro 8.38 +/- 1.64 y 6.34 +/-2.04 respectivamente.

Cuadro 43. Aclimatización en cámara de crecimiento de plantas *R. ananuca*

Medio de Origen	% Supervivencia	Peso Final	IC
Sólido	93.7 +/- 12.5 a	0.82 +/- 0.40	0.22 +/- 0.62 a
Líquido	56.2 +/- 23.9 b	0.50 +/- 0.52	-0.53 +/- 0.49 b
5% Signif.	*	N.S.	*

Cuadro 44. Aclimatización en cámara de crecimiento de plantas *R. ananuca*

Medio de origen	Diámetro (mm)	N° hojas	Largo hojas	N° raíces	Largo raíces
Sólido	8,20 +/- 4.00	1.12 +/- 0.5 a	9.03 +/- 6.66 a	0.68 +/- 0.47 a	6.31 +/- 6.42 a
Líquido	5.00 +/- 5.20	0.56 +/- 0.72 b	2.53 +/- 3.44 b	0.18 +/- 0.41 b	1.11 +/- 2.94 b
5% Signif.	N.S.	*	*	*	*

Cuadro 45. Aclimatización en invernadero de plantas de *R. ananuca*

Medio de Origen	% Supervivencia	Peso Final	IC
Sólido	93.75 +/- 12.5 a	1.33 +/- 0.57 a	1.18 +/- 1.01 a
Líquido	56.25 +/- 31.45 b	0.57 +/- 0.72 b	-0.40 +/- 0.74 b
5% signif.	*	*	*

Cuadro 46. Aclimatización en invernadero de plantas de *R. ananuca*

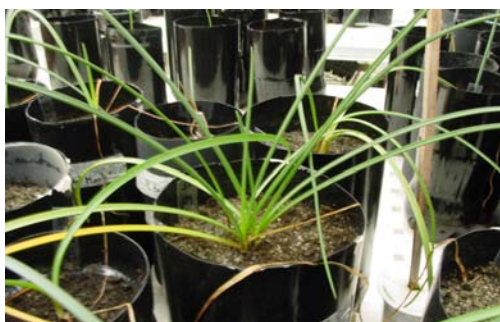
Medio de Origen	Diámetro	Nº hojas	Largo hojas	Nº raíces	Largo raíces
Sólido	7.28 +/- 2.21 a	2.31 +/- 1.40 a	18.05 +/- 5.68 a	1.68 +/- 0.94 a	17.13 +/- 6.54 a
Líquido	3.53 +/- 4.18 b	1.00 +/- 1.31 b	7.43 +/- 9.25 b	0.56 +/- 1.68 b	5.46 +/- 7.75 b
5% Signif.	*	*	*	*	*

Cuadro 47. Aclimatización en maceta de plantas *R. ananuca*

Medio de Origen	Supervivencia (%)	Peso Final (g)	IC	Diferencia de peso (g)
Sólido	93.75	1.84 +/- 0.79 a	2.04 +/- 1.41 a	1.21 +/- 0.61 a
Líquido	37.50	0.63 +/- 0.94 b	-0.37 +/- 0.89 b	-0.09 +/- 0.73 b
5% signif.		*	*	*

Cuadro 48. Aclimatización en maceta de plantas *R. ananuca*

Medio de Origen	Diámetro	Nº de hojas	Largo de Hojas	Nº raíces	Largo raíces
Sólido	7.71 +/- 2.32 a	1.62 +/- 0.88 a	19.36 +/- 6.56 a	1.81 +/- 0.98 a	23.67 +/- 9.56 a
Líquido	2.96 +/- 3.97 b	0.68 +/- 1.01 b	7.18 +/- 9.87 b	0.62 +/- 0.95 b	8.04 +/- 11.54 b
5% signif.	*	*	*	*	*



Los resultados indican que el éxito de la aclimatación en plantas de provenientes de medio líquido es bastante incierto, con una mortalidad elevada y poca correlación con algún modelo que pueda predecir el peso final a partir del peso inicial. En promedio, las plantas provenientes de medio sólido alcanzan pesos finales superiores y mayor desarrollo de hojas y raíces, con una supervivencia muy alta, lo que hace indica que le medio sólido asegura una aclimatación exitosa, situación que se ha producido en las otras dos especies estudiadas en este trabajo. En el análisis, los valores de las variables para plantas muertas toma valor cero. Considerando solo las plantas sobrevivientes, el peso final alcanzado por las de medio líquido fue 1.69 +/-

0.70 g y por las de medio sólido 1.97 +/- 0.64 g; el diámetro promedio alcanzado fue 7.9 +/- 0.82 y 8.23 +/- 1.11 respectivamente. Por lo tanto, antes de la aclimatización ex vitro, las plántulas debieran pasar por una fase de cultivo en medio sólido



Figura 9. Plantas aclimatizadas en invernadero, en tubetes y luego transplantadas a macetas de mayor capacidad.

6.0 Descripción de impactos obtenidos:

Se logró inducir poliploidia en *Rhodophiala montana* y *R. splendens* confirmando la hipótesis de que es posible obtener individuos poliploides viables en el Género *Rhodophiala*, abriéndose una ventana para el futuro mejoramiento genético de estas especies.

Se ha contribuido a la conservación de las especies mediante la multiplicación de diferentes genotipos y la mantención de un número importante de plantas *in vitro* garantizando la conservación de una proporción de la variabilidad genética de ellas.

Se ha desarrollado un sistema de multiplicación a través de cultivo de tejidos que permite contar con material vegetal para continuar trabajos tendientes al desarrollo de nuevas variedades.

7.0 Problemas enfrentados

En un principio se pensó en incorporar escamas gemelas disectadas desde bulbos colectados directamente de la naturaleza. Sin embargo, la carga microbial que inevitablemente acompaña a los órganos vegetales subterráneos, junto a la falta en ese momento de un protocolo de multiplicación *in vitro* afinado, producían una gran pérdida de plantas por contaminación y regeneración no exitosa. Esto motivó a incorporar masivamente semillas, las que luego de germinar *in vitro*, eran capaces de bulbificar (debido a la adición

de sacarosa al medio de cultivo). Este microbulbillo era utilizado para los experimentos de multiplicación. Cada uno de estos microbulbillos era un genotipo distinto. Esto permitió contar con mayor cantidad de material para el desarrollo de los experimentos

Debido a que el recuento de cromosomas es una forma, aunque segura, de comprobar la poliploidía, es muy laboriosa, demanda gran cantidad de tiempo y está supeditada a la existencia de raíces en crecimiento activo que presenten células en metafase que permitan visualizar preparaciones con cromosomas dispersos. Esto último no siempre ocurre por lo que es necesario monitorear las plantas pesquizando la formación de raíces jóvenes. Además, las plantas jóvenes de *Rhodophiala*, producen solo 1 o 2 raíces profundizadoras, tomando varios meses la formación de un sistema radicular abundante. Esto provocó que la disponibilidad de tejido para los análisis fuera escasa. En respuesta a esto, se realizaron análisis adicionales que incorporaron la medición del tamaño estomas (que en algunas especies correlaciona positivamente con la ploidía) y la incorporación de la técnica de citometría de imágenes, técnica que, a través del análisis con un Software de microfotografías de núcleos en interfase teñidos mediante la reacción Feulgen, permite estimar la cantidad de ADN relativo.

8.0 Difusión

Los resultados del proyecto se presentaron, ya sea como exposiciones orales y en modalidad de poster en diferentes congresos, tales como:

- Publicación presentada a revista Plant Breeding.
- Seminario “Sector agrícola y la biotecnología, situación actual y desafíos”, FIA y REDBIO. Santiago 3 y 4 de noviembre del 2005.
- Primer Simposio de Horticultura Ornamental, 29 y 30 de septiembre de 2005. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- VII Jornada de Investigación Científica. Universidad Austral de Chile. Valdivia, 6-10 de Diciembre de 2004.
- XIV Congreso Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrarias. 9-12 de noviembre de 2004. San José de Las Lajas, Cuba.
- 55º Congreso Agronómico de Chile. 5º Congreso sociedad chilena de fruticultura. 1er Congreso sociedad chilena de horticultura, 19-22 de Octubre 2004. Valdivia, Chile
- 54º Congreso Agronómico de Chile, 8 de noviembre de 2003, Torres del Paine, Chile.

Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids.

M. MUÑOZ^{1,2}, R. RIEGEL^{1,3} and P. SEEMANN¹

¹Institute of Plant Production and Protection, Universidad Austral de Chile; ² Graduate School - Faculty of Agricultural Sciences, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile; ³ Corresponding author, E-mail: rriegel@uach.cl

Aceptada en Plant Breeding, con fecha 5 de enero 2006.

Abstract

The rapid and early detection of autotetraploid individuals is a fundamental requirement in genetic improvement programmes based on chromosome duplication. Counting chromosomes provides certainty of the ploidy level of an individual, however, it is very laborious. In this work, image cytometry is proposed as an easy alternative method to detect tetraploid individuals. Plantlets of the species *Rhodophiala montana* treated with colchicine were karyomorphologically analysed. Based on the Feulgen stain, chromosomes were counted and the integrated density (ID) value of interphase nuclei was determined.

The average DNA content measured with image cytometry for the polyploid individuals was 1.88 times more than that for the diploid individuals. With this methodology, 100 % effectiveness in the selection was achieved, rapidly identifying all autotetraploid individuals.

BIOTECNOLOGÍA Y MEJORAMIENTO DE ESPECIES CHILENAS DEL GÉNERO *Rhodophiala* Presl. (Amaryllidaceae)

Seemann¹, P., Riegel¹, R. Jara, G¹., Muñoz¹, M., Schiappacasse², F., Peñailillo² P. y Basoalto², A.

1Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias.

2Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias

pseemann@uach.cl

INTRODUCCIÓN

En Chile las especies nativas, en general, han sido poco valoradas y aún menos estudiadas en relación a su uso potencial como plantas ornamentales. Es un hecho que el país posee una enorme diversidad de especies bulbosas endémicas, constituyendo un *pool* genético que merece ser estudiado y analizado con el objetivo de crear y mejorar nuevas variedades. En floricultura se busca que las plantas cultivadas tengan grandes flores y fuertes tallos. Para esto, el uso de material poliploide ha producido grandes avances en el mejoramiento de especies florícolas. Si bien la poliploidía es una condición genética frecuente en las angiospermas, también puede ser inducida artificialmente mediante la aplicación de antimitóticos como la colchicina. La duplicación cromosómica que genera la inducción de autopoliploidía provoca gigantismo celular y mayor duración de los ciclos, con lo cual es posible obtener órganos más grandes. Es por esta razón que los individuos poliploides suelen presentar flores de mayor tamaño, mayor intensidad de la pigmentación y mayor duración de la floración, los cuales pueden ser inducidos por medios artificiales. Entre los géneros con potencial de mejoramiento genético, hay varias especies de *Rhodophiala* que presentan características que las hacen atractivas como flores de corte, plantas de maceta o de jardín, sin embargo, el mejorar sus características naturales las haría más atractivas para diferentes mercados. Es por ello que dentro del marco del Proyecto FIA-BIOT-01-A-071 “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento de especies de *Rhodophiala* chilenas” se ha iniciado el estudio de las especies *Rhodophiala rhodolirion*, *R. splendens*, *R. montana*, *R. bagnoldii*, y, posteriormente, *R. laeta*, especies geófitas que se caracterizan por presentar un bulbo tunicado como órgano reservante y producir atractivas flores.

Los objetivos de este proyecto fueron enfocados en tres planos:

- 1.- Determinar cariotipos de las especies, establecer un protocolo para la inducción de poliploidía y evaluar el grado de poliploidía logrado,
- 2.- Desarrollar protocolos de multiplicación *in vitro*, para la multiplicación masiva del material, optimizando los sistemas de micropropagación, y
- 3.- Evaluar bajo condiciones de invernadero métodos de crecimiento rápido de bulbos, optimizar el cultivo de las plantas diploides y poliploides, y evaluar la floración de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación del cariotipo se realizó a partir de raíces en crecimiento activo, utilizándose en una primera etapa semillas o bulbos plantados en sustrato de arena/turba, para posteriormente realizar la selección e inducción de poliploides con material producido *in vitro*. A partir de raíces en crecimiento se extrajo el meristema, procediéndose a la tinción de los cromosomas según la metodología descrita por GRANT *et. al.* (1984). Para la inducción de poliploidía se utilizaron microbulbillos originados *in vitro*, ya sea de semillas o escamas de bulbos, los cuales fueron sembrados en medio de cultivo adicionado con colchicina en concentración de 0,01-0,05% por 10 o 4 días o mediante el remojo de semillas recién germinadas *ex vitro* en una solución de colchicina al 0,05% por 12 horas y 0,2% por 4 horas, mas los respectivos testigos. Las evaluaciones realizadas fueron; sobrevivencia, crecimiento

de plántulas, recuentos del número cromosómico en puntas de raíz y mediciones del tamaño de los estomas en las hojas, además de determinar la cantidad de ADN en los núcleos a través de citometría de imágenes utilizando el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Para el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* se utilizó tejido meristemático proveniente de trozos de disco basal de escamas, simples o gemelas. Los bulbos fueron lavados y desinfectados según procedimientos habituales y cultivados en medio completo o diluido, compuesto por las sales y vitaminas del MS, y diversos tipos y concentraciones de auxinas y citoquininas, gelificado con Agar o Gelrite, o bien en medio líquido en agitación o estacionario con base de algodón hidrófilo, regulando el pH a 5,7. Además se hicieron ensayos para comparar los efectos de medios de cultivo basales, diferentes tipos y concentraciones de azúcares, el uso de antioxidantes o retardantes del crecimiento. La incubación habitualmente se hizo a temperaturas de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, un fotoperíodo de 16 horas luz y un FFF de $50 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$. Paralelamente se ingresaron semillas al cultivo *in vitro* de modo de establecer su capacidad de germinación e iniciar un banco de germoplasma a partir de ellas. Del mismo modo se hicieron ensayos de inducción de poliploidía *in vitro*, utilizando semillas o bulbillos. Finalmente, se hicieron ensayos de engorda de bulbillos *in vitro* y de aclimatación a condiciones *ex vitro* de plántulas micropropagadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de cariotipos de las especies en estudio indicó que tres de las especies, *R. splendens*, *R. montana* y *R. bagnoldii* poseen una dotación cromosómica de $2n = 18$, mientras que *R. rhodolirion* tiene un número cromosómico $2n = 16$. Los tratamientos con colchicina en concentración de 0,2% por 4 horas permitieron inducir tetraploidía en el 6,9% de las semillas de *R. splendens* tratadas, aumentando este resultado a 21,4% en la inducción *in vitro*. Del mismo modo es posible inducir la formación de poliploidía en las demás especies en estudio. El tratamiento con Trifluralina no permitió sobrevivencia de las semillas tratadas. El poder germinativo de las semillas, con fines de inducción de poliploidía dependió del lote analizado. En *R. rhodolirion* se observó germinación de 1 a 38%, en *R. splendens* de 78 – 80%, en *R. montana* de 62 – 70% y en *R. bagnoldii* de 30 a 52%, en tiempos variables, según la especie, desde 1 a 80 días.

La respuesta al cultivo *in vitro*, igualmente fue muy variable según la especie, el tipo de explante y el tratamiento utilizado. No obstante, en todas las especies se logró la brotación *in vitro*, aunque en bajos porcentajes, a partir de tejido vegetativo de escamas de bulbo. Las respuestas fluctuaron entre 0 y 15% de brotación en *R. rhodolirion* hasta 0 – 50% en *R. splendens* al usar escamas simples o gemelas. La germinación de semillas *in vitro* permitió incorporar gran cantidad de genotipos a cultivo dando origen a un banco de germoplasma de mas de 1100 accesiones de las 4 especies en estudio. Posteriormente, se agregó *R. laeta*, a partir de bulbos, con una buena respuesta al cultivo *in vitro*. Del mismo modo, la utilización de medios líquidos estacionario, permitieron buenos progresos en mejorar la eficiencia de cultivo *in vitro* en las cinco especies en estudio.

Los trabajos de engorda de bulbillos, realizados en Talca, permitieron resultados promisorios en términos de aumento de calibre, por efecto de diversos tratamientos de control ambiental. Del mismo modo, se ha observado floración bajo condiciones de invernadero con calibres variables según la especie, por ej.: *R. rhodolirion*, calibres 7/9 a 14/16, *R. splendens*, 3/4 a 5/6, *R. montana*, 1/2 a 5/6 y *R. bagnoldii*, calibres 7/9 a 20/21, con floraciones que se producen entre junio y enero.

Trabajo Financiado por Proyecto FIA- BIOT-01-A-071

INDUCCIÓN Y DETECCIÓN DE AUTOPOLIPLOIDÍA EN *Rhodophiala Presl.**

Muñoz, M¹., Riegel, R¹. Seemann, P¹., Jara, G¹., Schiappacasse, F²., Peñailillo, P²., Basoalto, A²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Casilla 567, Valdivia, Chile. E-mail: mamunoz@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La duplicación cromosómica ha sido ampliamente utilizada en horticultura para obtener nuevas y/o mejorar características agronómicas. En especies de uso ornamental esta técnica ha permitido lograr flores de mayor tamaño y de texturas más intensas, así como un período de floración más prolongado. Para realizar un aumento de ploidía en vegetales, es frecuente el tratamiento de plántulas jóvenes en crecimiento activo con colchicina, un alcaloide natural con acción antimitótica. Desde los tratamientos de colchicina aplicados *in vitro*, es posible obtener una población numerosa de plantas, sin embargo, sólo una pequeña fracción de los individuos sobrevivientes a los tratamientos con el alcaloide son efectivamente autopoliploides. El presente trabajo tiene como objetivo dar a conocer los resultados obtenidos en los experimentos de inducción de poliploidía mediante la aplicación de antimitóticos a plántulas jóvenes *in vivo* e *in vitro* y en el desarrollo de nuevas técnicas de detección de estos autopoliploides desde una población de plantas tratadas de *Rhodophiala*.

MATERIAL Y MÉTODOS

En una primera etapa se realizaron experimentos *in vivo* a partir de tratamientos a semillas en germinación de *R. splendens*, sometiendo material vegetal de 2 a 10 días luego de la germinación a soluciones de colchicina 0,05% y 0,2% por 4 y 12 horas. Luego las plantas fueron cultivadas en macetas con sustrato turba:vermiculita:perlita. Se realizaron recuentos cromosómicos en aplastados de los meristemas radicales tratados con la reacción de feulgen modificada para evaluar el éxito de la inducción. En una segunda etapa se realizaron experimentos *in vitro* con *R. montana*, *R. splendens*, *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion*, tratándose plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro* con soluciones de colchicina al 0,1% durante 8 horas y 0,2% durante 4 horas. También se trataron bulbillos *in vitro* en medio de cultivo líquido Murashigue Skoog adicionado con 0,05% de colchicina (p/v) en agitación. El éxito de la inducción se evaluó mediante recuentos cromosómicos en plántulas provenientes de subcultivos de las plantas tratadas. Debido a que la realización de recuentos cromosómicos es un proceso laborioso altamente demandante en tiempo, en una tercera etapa se realizaron investigaciones conducentes a desarrollar nuevas técnicas para la detección de autopoliploides inducidos. Para esto se estudió un grupo de 14 plántulas de *R. montana*, 7 de ellas diploides y otras 7 tetraploides (determinadas mediante recuentos cromosómicos) investigándose la asociación entre el tamaño de estomas y el nivel de ploidía y la aplicación de la técnica de citometría de imágenes para la estimación de la cantidad de ADN nuclear. La estimación de la cantidad de ADN en los núcleos celulares se realizó con las mismas preparaciones citológicas antes descritas. De ellas se obtuvieron 3 a 4 nuevas microfotografías en escala de grises, desde las cuales se midieron un total de 15 núcleos en estado de interfase por planta. Utilizando el programa computacional UTHSCSA Image Tool (disponible en <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) se obtuvo el valor Integral de Densidad Óptica (IOD). Este valor IOD, considera el tamaño e intensidad de pigmentación de cada núcleo teñido con la reacción Feulgen.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la inducción de poliploidía en *R. splendens* y *R. montana*. Los resultados de la inducción de poliploidía *in vivo* en *R. splendens* se muestran en los Cuadros 1, 2 y 3.

CUADRO 1 Inducción de poliploidía *in vivo* en *R. splendens*.

Tratamiento	% sobrevivencia	N° analizadas	% poliploides*	% mixoploides	% diploides
0.05% col. x 4 h	69%	18	11 %	33%	67%
0.05% col. x 12 h	40%	5	20 %	0	80%
0.2% col. x 4 h	21%	5	60 %	40%	0
0.2% col. x 12 h	0.05%	1	0	0	100%
Testigo	100 %				
10 uM trif x 24 h	66%	17	0	12.5%	58.3%
100 uM trif x 24 h	41%	19	5.2 %	15.7%	78.9%

* Porcentaje de poliploidía identificado a través de recuentos cromosómicos en la muestra analizada

CUADRO 2 Inducción de poliploidía aplicando colchicina *in vitro* a *R. splendens*

Tratamiento	N° tratadas	% sobreviv.	N° analizado	% poliploide	% mixop	% diploides
0.1 % x 8 h	68	83	12	0	25	75
0.2 % x 4 h	69	64	14	20	33	46

CUADRO 3 Inducción de poliploidía aplicando colchicina *in vitro* a *R. montana*

Tratamiento	Tratados	% sobreviv.	N° analizado	% poliploide	% mixop	% diploide
0.1 x 8 h	312	33	10	20	0	80
0.2 x 4 h	312	44	10	20	0	80
0.05 x 5d	60	60	31	38	19	41

En cuanto al estudio del tamaño de estomas y citometría de imágenes en 14 plantas de *R. montana* los resultados muestran que si bien las plantas poliploides en promedio tienen estomas de mayor tamaño, no es posible discriminar el nivel de ploidía en forma individual del 100% de las plantas, debido a que los valores obtenidos no reflejan una clara separación entre los dos grupos. El análisis citométrico de las imágenes obtenidas de los núcleos de los individuos diploides arroja como promedio un contenido relativo de ADN de 12,83 +/-1,34 millones (valor IOD sin unidad) y de 24,10 +/-1,62 millones para los individuos poliploides. Concordante con la teoría de la duplicación del contenido de ADN en el caso de individuos autotetraploides estos presentan un valor cercano al doble (1,88) del contenido de ADN que las plantas diploides. El promedio IOD de las plantas diploides más 2 veces su desviación estándar (15,51 millones) y el promedio de los poliploides menos 2 veces su desviación estándar (20,86 millones) pueden ser utilizados como parámetros de selección con un 100% de eficiencia.

BIBLIOGRAFÍA

COHEN, D. y YAO, J. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 47: 43 – 49.
HARDIE, D., R. GREGORY y D. HERBERT. 2002: From pixels to picograms: A beginners' guide to genome quantification by Feulgen Image analysis densitometry. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 50: 735 – 749.

ESTUDIOS REALIZADOS EN TORNO AL CULTIVO DE TEJIDOS EN *Rhodophiala* CHILENAS

Jara, G.¹, Seemann, P.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.²
y Basoalto, A.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
E-mail: gjara@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

El potencial de regeneración *in vitro* de la familia Amaryllidaceae, mediante la utilización de escamas gemelas o triples en presencia de la placa basal, es considerado por ser especie y genotipo dependiente y la tasa de multiplicación puede variar entre 2 y 15 yemas por explante (Ziv and Kipnis, 2000) o entre 2- 25 yemas por explante (Fennel and van Staden, 2004), de tal forma que pueden presentarse diferentes tipos de respuesta. En este sentido hay algunas especies en que se ha logrado desarrollar un eficiente sistema de multiplicación, como en el caso de *Narcissus*, *Hemerocallis*, *Hippeastrum*, entre otras (Vishnevetsky et al., 2003), pero también se han reportado otras especies que no han respondido tan eficientemente, como es el caso de algunas especies de *Nerine*, *Eucrosia*, *Hippeastrum*, o en cuatro especies de *Rhodophiala*. La respuesta de este género ha sido estudiada extensamente mediante el desarrollo del Proyecto FIA “Aplicaciones Biotecnológicas para el mejoramiento genético de *Rhodophiala chilenas*”, analizando factores que influyen en la multiplicación y crecimiento de los microbulbillos, prevención de la fenolización en los explantes y aclimatización, principalmente mediante el cultivo de órganos en medios semisólidos. Sin embargo, debido a que la respuesta de las diferentes especies ha sido poco eficiente, se ha tenido que recurrir a otros sistemas de multiplicación, como es el caso del cultivo en medio líquido estacionario o mediante la inmersión temporal e incluso incursionar en técnicas como la embriogénesis somática, las que se ha postulado que aumentan los coeficientes de multiplicación en una gran variedad de especies, incluso en las consideradas las mas recalcitrantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Establecimiento de los cultivos: se ha realizado a partir de bulbos y semillas de la especies *R. bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*. En el caso de bulbos estos son desinfectados y seccionados hasta obtener escamas dobles o triples, las que son sembrándose individualmente en frascos de 80 x 25 mm con 10 ml de medio de cultivo compuesto por las sales y vitaminas de Murashigue y Skoog (1962). Se han estudiado diferentes factores para inducir la brotación y formación de microbulbillos como, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, carbohidratos, concentración de macrosales, tipo de escamas, entre otros. Para la incorporación de semillas se ha utilizado el medio MS reducido a la mitad.

Multiplicación de microbulbillos: una vez inducido los microbulbillos, estos han servido de material para realizar ensayos de multiplicación, en el cual se han estudiado el efecto de diferentes concentraciones de citoquininas en combinación con auxinas, la reducción de las macrosales, el efecto de un corte en cruz en la placa basal de los microbulbillos, el aumento de la concentración de sacarosa. Mas recientemente se han establecido ensayos para determinar el uso de medios líquidos en forma estacionaria, analizando factores como la incorporación de citoquininas aromáticas, el uso del paclobutrazol o diferentes volúmenes de medio de cultivo, utilizando para ellos frascos de mayor tamaño.

Las condiciones de incubación han sido de un FFF de 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de 24°C, evaluándose al cabo de 30 o 60 días de incubación, el porcentaje de fenolización, sobrevivencia en base a la sanidad del material vegetal y necrosis por fenolización, escamas hinchadas, brotación, N° y tamaño de los microbulbillos, brotes y raíces.

Embriogénesis somática: esta técnica se ha desarrollado mediante la inducción de callos a partir de laminas foliares y microbulbillos de plántulas *in vitro*, sembrados en medio MS adicionados con diferentes tipos y concentraciones de auxinas, principalmente 2,4-D y ANA e incubados en oscuridad durante 90 días. Una vez formados los callos estos son trasladados a medio de multiplicación MS con 0,1 mg/L ANA y 1,0 mg/L BAP.

Aclimatización: se ha realizado principalmente con material que presenta algún síntoma de contaminación, utilizando para ello sustrato de turba y arena. Estos microbulbillos se han dividido en tres calibres, 0.2-0.4, 0.5-0.6, y 0.7-1.2, utilizando nueve repeticiones con seis microbulbillos cada una, manteniéndolas durante 15 días en cámaras de luz artificial con un FFF de 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura que oscila entre los 12-23°C, cubiertas para mantener la humedad relativa, para posteriormente ser evaluadas y trasladado a invernadero.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha descrito en otros trabajos el establecimiento de *Rhodophiala in vitro* a partir de escamas ha entregado porcentajes de brotación muy bajos, para lo cual se ha tenido que recurrir al ingreso de semillas aumentando de esta forma el Banco de Germoplasma de *Rhodophiala in vitro* y *ex vitro*. Sin embargo, del mismo modo como se ha reportado para otras Amaryllidaceae la multiplicación *in vitro* ha sido lenta, y muy dependiente del genotipo, con coeficientes de multiplicación en promedio de 1.0 en medios semisólidos y en algunos casos de 2.0 al realizar un corte en cruz en la zona basal del microbulbillo. La utilización de medios líquidos estacionario ha permitido aumentar a 2.1 la tasa de multiplicación en *R. splendens*, aunque todavía no puede considerarse como un método de multiplicación eficaz, con lo cual se espera que mediante la utilización del cultivo de inmersión temporal estos coeficiente sean mayores.

En el caso de inducción de callos a partir de material de desecho como son las hojas de las plántulas *in vitro* se ha logrado una respuesta favorable en casi todos los tratamientos utilizados, estableciéndose un protocolo para la inducción de callo *in vitro*. Sin embargo, es necesario establecer la secuencia en el desarrollo de las diferentes etapas de la embriogénesis somática, de tal forma de definir los medios de cultivo para la germinación y maduración de los embriones. A pesar de esto se han regenerado plántulas a partir de callos, especialmente del genotipo 363 de *R. splendens*, a partir de callos de hojas en un medio compuesto por 2,0 mg/L de 2,4-D y 10 mg/L de ANA.

En el caso de la aclimatización, los microbulbillos con raíces formadas *in vitro* han respondido exitosamente, presentándose una relación directa entre el tamaño de los microbulbillos y la emergencia foliar, la cual fluctuó entre un 80 % (calibre de 0.2-0.4), 90% (calibre de 0.5-0.6) y un 100% (calibre de 0.7-1.2).

ZIV. M. H. LILIEN-KIPNIS. 2000. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro*. Plant Cell Reports 19: 845-850.

FENNELL, C.W. AND J. van STADEN. 2004. Biotechnology of southern African bulbs. South African Journal of Botany 70 (1) 37-46.

VISHNEVETSKY, J. E. ZAMSKI AND M. ZIV. 2003. Enhanced bud and bulblet regeneration from bulbs of *Nerine sarniensis* cultured *in vitro*. Plant Cell Reports. 10.1007/s00299-003-0580-2.

Trabajo Financiado por Proyecto FIA- BIOT-01-A-071

HACIA EL MEJORAMIENTO DE PLANTAS ORNAMENTALES NATIVAS: EL CASO DE *Rhodophiala* Presl. (Amaryllidaceae).

Seemann¹, P, Jara, G¹., Muñoz¹, M., Riegel¹, R Schiappacasse², F., Peñailillo² P. y Basoalto², A.

¹Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias.

²Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias. E-mail:pseemann@uach.cl

INTRODUCCIÓN

En Chile las especies nativas, han sido poco valoradas y estudiadas en relación a su uso potencial como plantas ornamentales. En floricultura se busca que las plantas cultivadas tengan grandes flores y fuertes tallos. Para esto, se ha utilizado el uso de material poliploide inducido artificialmente mediante la aplicación de colchicina. Entre los géneros con potencial de mejoramiento genético, hay varias especies de *Rhodophiala* que las hacen atractivas como plantas ornamentales. Es por ello que dentro del marco del Proyecto FIA-BIOT-01-A-071 “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento de especies de *Rhodophiala chilenas*” se ha iniciado el estudio de las especies *Rhodophiala rhodolirion*, *R. splendens*, *R. montana*, *R. bagnoldii* y, posteriormente, *R. laeta*. Los objetivos de este proyecto fueron:

- 1.- Determinar cariotipos y establecer protocolos para la inducción de poliploidía.
- 2.- Desarrollar protocolos de multiplicación *in vitro*.
- 3.- Evaluar métodos de crecimiento rápido de bulbos, y evaluar la floración de las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación del cariotipo se realizó a partir de raíces de plántulas *in vitro*, mediante la aplicación de técnicas citológicas. Para la inducción de poliploidía se utilizaron microbulbillos *in vitro*, en medio de cultivo con colchicina en diferentes concentraciones y tiempos de inmersión. Las evaluaciones se realizaron en base a sobrevivencia, crecimiento de plántulas, recuentos del número cromosómico, tamaño de los estomas, la cantidad de ADN por citometría de imágenes utilizando el software UTHSCSA Image Tool.

El establecimiento de material *in vitro* se realizó mediante organogénesis a partir de tejido meristemático, desinfectadas y cultivadas en medio compuesto MS, diversos tipos y concentraciones de auxinas y citoquininas, además de diferentes medios de cultivo basales, tipos y concentraciones de azúcares, uso de antioxidantes o retardantes del crecimiento. La incubación se realizó a temperaturas de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, un fotoperíodo de 16 horas luz y un FFF de $50 \mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$. La multiplicación se realizó mediante el uso de medio líquido estacionario. Paralelamente se ingresaron semillas al cultivo *in vitro*. Finalmente, se hicieron ensayos de engorda de bulbillos *in vitro* y de aclimatación a condiciones *ex vitro* de plántulas micropropagadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de cariotipos indicó que tres de las especies, *R. splendens*, *R. montana* y *R. bagnoldii* poseen una dotación cromosómica de $2n = 18$, mientras que *R. rhodolirion* tiene un número cromosómico $2n = 16$. Los tratamientos con colchicina permitieron inducir tetraploidía en un 21,4% de los microbulbillos *in vitro*.

La germinación de las cuatro especies es desuniforme en el tiempo con valores que oscilan entre un 38% - 80%. La respuesta al cultivo *in vitro*, igualmente fue muy variable, lográndose regenerar brotes *in vitro*, en bajos porcentajes. La optimización de la multiplicación se logró con la utilización de medio líquido estacionario. Los trabajos de engorda de bulbillos, realizados en Talca, permitieron resultados

promisorios en términos de aumento de calibre. Del mismo modo, se ha observado floración bajo condiciones de invernadero con calibres variables según la especie.

EFFECTO DE META-TOPOLINA SOBRE LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE *R. splendens* EN MEDIOS LÍQUIDO.

Jara, G.¹, Seemann, P.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.²
y Basoalto, A.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
E-mail: gjara@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

Las citoquininas son un grupo de reguladores de crecimiento involucradas en múltiples funciones en el desarrollo de las plantas, desde la germinación de las semillas hasta la senescencia. Estas se encuentran naturalmente en las plantas o son preparadas sintéticamente, como el N⁶-benzilaminopurina, 6-furfurylaminopurina, entre otras, siendo en su mayoría del tipo isoprenoides. Sin embargo, existen otro tipo de citoquininas del tipo aromáticas, aisladas de derivados hidroxilados del BAP, conocidos como topolinas, de las cuales la forma meta es la más activa (Mok et.al. 2005). La actividad de estas methoxytopolinas ha sido demostrada mediante bioensayos con crecimiento de callos en tabaco, inducción de síntesis de betacianina en cotiledones de *Amaranthus*, en la actividad antisenescente en cebada y en la formación de clorofila en cotiledones de pepino. El rol de la citoquininas en la micropropagación convencional utilizando medios sólidos, ha sido analizado en varias especies de *Rhodophiala*, en las cuales se reportan coeficientes de multiplicación muy bajos (Jara et. al. 2004). Algunos autores han reportado que el uso de medios líquidos es un excelente sistema para aumentar los índices de multiplicación, especialmente mediante el uso de la inmersión temporal en medios suplementados con citoquininas. No obstante, recientemente se ha reportado que la aplicación del BAP en el cultivo bajo inmersión temporal de *Musa* no aumenta los índices de multiplicación como ocurre con otros cultivos, pero que mediante la aplicación de meta-topolina estos índices se elevan notablemente, evitándose además realizar la fase de alargamiento (Escalona et. al. 2003 a). En base a estos antecedentes es que el presente trabajo tiene como objetivo comparar los índices de multiplicación de microbulbillos *in vitro* de *R. splendens*, utilizando medios de cultivo adicionado con las citoquininas meta-topolina y BAP en forma sólida y líquida, de tal forma de definir concentraciones óptimas para inducir la brotación y bulbificación.

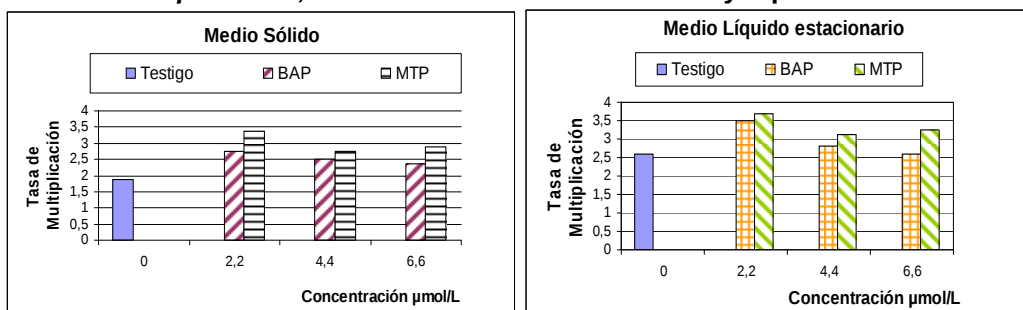
MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron microbulbillos de *R. splendens* originados de semillas, a los cuales se les eliminaron las hojas, raíces y escamas oxidadas para de esta forma realizarles un corte basal y sembrarlos en frascos con 50 ml de medio de cultivo MS en estado sólido y líquido, adicionado con 0, 2,2, 4,4 y 6,6 $\mu\text{mol/L}$ de la citoquininas N⁶-Benzilaminopurina (BAP) y N⁶-(3-hydroxibenzil) adenina (meta-topolina), de tal forma de completar siete tratamiento en medio sólido y siete tratamientos en medio líquido, con ocho repeticiones por tratamiento y un microbulbillo por frasco. Los cultivos se mantuvieron en cámara de luz artificial con un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$, fotoperiodo de 16 horas luz y una temperatura de 24°C, evaluándose al cabo de 60 días, la tasa de multiplicación, mediante la relación número de microbulbillos inicial + número microbulbillos final/ número microbulbillos inicial, diámetro ecuatorial y peso fresco de la planta completa, obteniendo de esta forma el incremento de materia fresca de las plántulas. El procesamiento estadístico de los datos consistió en el análisis de varianza (ANOVA) y test de Fisher (LSD) sobre el efecto de los factores principales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del mismo modo como lo reportado para otras especies, la utilización de medios líquidos fue mas favorable para aumentar la tasa de multiplicación de *R. splendens*, la cual presentó un promedio de 2,6 microbulbillos en el medio testigo líquido, en cambio en medios sólidos fue de 1,9. La incorporación de citoquininas al medio de cultivo aumentó la tasa de multiplicación, observándose una mejor respuesta de la meta-topolina que del BAP, tanto en medios sólidos como líquidos, con una tasa de multiplicación promedio de 3,4 microbulbillos, sin embargo, esta respuesta no fue significativa, al igual que el estado del medio. Al analizar la interacción para las variables de calidad, solamente el peso de los microbulbillos se encuentra influenciado significativamente por los diferentes tratamientos, con los mayores valores para el medio sólido adicionado con meta-topolina en concentraciones de 2,2-6,6 $\mu\text{mol/L}$. En cuanto al calibre de los microbulbillos estos presentaron un rango entre 0,19 y 0,37 cm. A pesar de que solamente se presentaron diferencias estadísticamente significativas para el peso de los microbulbillos, el comportamiento de las demás variables para algunos tratamientos fue mas favorable en los medios adicionados con la citoquinina meta-topolina en medios líquidos.

CUADRO 1 Efecto del BAP y MTP sobre la tasa de multiplicación promedio en *R. splendens*, cultivadas en medio MS sólido y líquido estacionario.



BIBLIOGRAFÍA

ESCALONA, M., I. CEJAS, J. GONZÁLEZ-OLMEDO, I. CAPOTE, S. ROELS, M.J. CAÑAL, R. RODRÍGUEZ, J. SANDOVAL Y P. DEBERGH. 2003a. Efecto de meta-topolina sobre la propagación del plátano utilizando un biorreactor de inmersión temporal. InfoMusa 12 (2): 28-30.

JARA, G., SEEMANN, P., MUÑOZ, M., RIEGEL, R., SCHIAPACASSE, F., PEÑAILILLO, P. Y VICO, V. 2004. Investigaciones preliminares realizadas en torno al establecimiento *in vitro* de especies chilenas de *Rhodophiala*. XIV Congreso Científico. INCA. Cuba.

MACHTELD C. MOK, RUTH C., MARTIN, PETRE I. DOBREV, RADOMIRA VANKOVÁ, P. SHING HO, KEIKO YONEKURA-SAKAKIBARA, HITOSHI SAKAKIBARA AND DAVID W.S. MOK. 2005. Topolins and hydroxylated thidiazuron derivatives are substrates of cytokinins O-glucosyltransferase with position specificity related to receptor recognition. Plant Physiology, 137: 1057-1066.

*Financiado mediante Proyecto FIA-BIOT-01-A-071

CONSIDERACIONES TECNICAS SOBRE EL USO DE BIORRECTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL (BIT) *

Jara, G.¹, Muñoz, M.¹, Seemann, P.¹ y Daquinta, M.².

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile. Chile. E-mail: gjara@uach.cl.

²Centro de Bioplasmas. Universidad de Ciego de Avila (UNICA), Ciego de Avila, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El uso del medio líquido para la propagación *in vitro* se considera una técnica ideal para la propagación masiva de plantas, porque reduce la manipulación y es un requisito indispensable para la automatización del proceso, además de disminuir los costos operacionales. Sin embargo, su principal desventaja es la hiperhidricidad de los tejidos. Para evitar este problema, se desarrollaron diferentes procedimientos, como el cultivo en agitación, el empleo de puentes de papel de filtro, tapones de celulosa, esponjas, canastas flotantes etc. así como el empleo de agentes químicos antivitrificantes. Alvard et al. (1993) estudiaron cinco métodos diferentes de cultivo en comparación con el medio sólido en la propagación de meristemas de bananos, desde la cual surgió un nuevo concepto para el cultivo *in vitro* en medio líquido: la inmersión temporal. Esta técnica se ha empleado exitosamente en la proliferación de brotes múltiples, ya sea mediante organogénesis o embriogénesis somática (Cuadro 1) o para la obtención de brotes aptos para el enraizamiento *ex vitro* y la aclimatización siendo Cuba, uno de los países pioneros en el desarrollo tecnológico de este sistema (Escalona, 1999). Mediante un entrenamiento realizado en el Centro de Bioplasmas (Cuba), se logró obtener los conocimientos y capacitación para implementar y desarrollar el Sistema de Inmersión Temporal en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, de la Universidad Austral de Chile, el cual fue aplicado inicialmente para el cultivo de tres especies, de tal forma de controlar alguno de los factores que influyen en el manejo de los BIT y del material vegetal, y de esta manera dejarlo en condiciones aptas para ser utilizado en la micropropagación de diferentes especies de *Rhodophiala chilenas*.

CUADRO 1 Coeficientes de multiplicación en micropropagación convencional (MC) y en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)

Cultivo	Variedad	MC	BIT
Caña de Azúcar	Cayena Lisa	8.0	68.8
	C 91-301	3.7	34.1
	C1051-73	4.1	58.0
	C120-78	3.9	30.2
	C323-68	4.3	39.5
	C85-212	3.8	31.6
	C85-214	4.0	29.8
	CP-5243	4.0	32.5
Malanga	INIVIT	3.0	10.44
	México 1	2.8	7.71
Banano	FHIA-18	3.8	7.40
	FHIA-01	3.4	10.4
	Gran Enano	4.0	16.6
Syngonium	W. Butterfly	7.3	28.0
	Pixie	2.2	18.4
Spathyphyllum	Sensation	3.7	17.6
Phylodendrom	Xanadu	2.0	8.8

Fuente: Centro de Bioplasmas (2004)

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la instalación del sistema se utilizó la tecnología propuesta por Escalona (1999). Las baterías de cultivo fueron frascos de vidrio de 1000 ml con tapa Twist off, con nipples de bronce, anillos de goma del nipple, mangueras de silicona autoclavables de

17”, tuberías de PVC, filtros hidrofóbicos de 50 mm de diámetro y 0,2 µm de tamaño de poro, electroválvulas simples, programadores digitales y un compresor de aire. En un frasco se colocaron los explantes compuestos de diez brotes de *Lobelia bridgesii*, *Ruta graveolens*, y *Nothofagus alessandri*. Se sembraron tres frascos de cada especie utilizando 40 ml de medio de cultivo por explante compuesto por las sales y vitaminas de Murashigue y Skoog (1962) adicionado con 2,0% de sacarosa, 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L BAP, con un tiempo de inmersión de 3 minutos dos veces al día, por 25 días.

FIGURA 1 Montaje Sistema de Inmersión Temporal en Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Austral de Chile.



Ruta graveolens

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo operacional de los BIT, desde la esterilización del medio de cultivo hasta la siembra de las baterías involucra una menor manipulación de los frascos de cultivo, con lo cual los riesgos de contaminación son menores. Sin embargo, para que esto sea efectivo, es necesario tomar ciertas precauciones, como ser; evitar que los filtros tomen contacto con el vapor del autoclave, que los nipples, tapas y mangueras estén correctamente apretados, de tal forma de evitar que se suelten producto del calor y la presión, además de evitar salidas de aire durante su funcionamiento. A pesar de que en la instalación de los BIT no fueron consideradas algunos de estos aspectos no se presentaron pérdidas de material vegetal por contaminación, con lo cual se logró un 100% de establecimiento de los brotes en las diferentes especies. Cada batería funcionó correctamente, lográndose la regeneración de brotes nuevos a partir de la primera semana, no obstante, uno de los factores importantes ha considerar es el tamaño de los explantes. De esta manera se puede concluir que la puesta en marcha de este sistema de multiplicación fue eficiente, con lo cual se encuentra en condiciones apropiadas para ser utilizado en ensayos de micropropagación de *Rhodophiala sp.*

REFERENCIAS

- ALVARD D, F COTE , C TEISSON (1993). Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effect of temporary immersion of explants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 55-60
- ESCALONA M, J. C. LORENZO, B. GONZÁLEZ, M. DAQUINTA, J. L. GONZÁLEZ, Y. DESJARDINS, C. G. BORROTO. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. Plant Cell Reports 18 (9): 743-748.

Entrenamiento Financiado mediante Programa de Formación y Promoción para la Innovación FIA- FP-V-2004-1-A-014

INVESTIGACIONES PRELIMINARES REALIZADAS EN TORNO AL ESTABLECIMIENTO *in vitro* DE ESPECIES CHILENAS DE *Rhodophiala**

Jara, G.¹, Seemann, P.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.²
y Vico, V.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia,
Chile. E-mail: gjara@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

Chile posee una gran diversidad de especies bulbosas endémicas, constituyendo un pool genético que merece ser rescatado y estudiado. Entre estas especies destacan las pertenecientes a la Familia Amaryllidaceae, tales como *R. bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*, las cuales se distribuyen desde la III a la X región de nuestro país. Son plantas geófitas, que producen hermosas flores de llamativos colores. Las investigaciones realizadas en torno a esta especie han sido principalmente en torno a estudios citológicos y de multiplicación (Palma-Rojas, 1999). Al igual que otras Amaryllidaceas, la propagación a partir de bulbos en forma natural no ha sido un método efectivo, ya que produce escasos bulbillos hijos, con lo cual se han investigado otras alternativas tales como, el seccionamiento y obtención de escamas gemelas, el corte en cruz y el vaciado. La aplicación de técnicas biotecnológicas, mediante la micropropagación, ha sido la más utilizada en la mayoría de las geófitas que se desarrollan comercialmente. En el caso de *Rhodophiala*, esta técnica ha sido aplicada en *R. montana*, *R. rhodolirion*, *R. splendens* y *R. bagnoldii*. No obstante lo anterior, se espera que los conocimientos en la micropropagación de otras geófitas sean aplicados exitosamente a las cuatro especies en estudio, de tal forma de elaborar un protocolo para el cultivo *in vitro*, ya sea mediante la incorporación de material vegetativo o germinación de semillas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron con escamas de bulbos y semillas de *R. bagnoldii* y *R. montana* y bulbos *in vitro* de *R. rhodolirion*. El establecimiento *in vitro* se realizó mediante las técnicas de desinfección habituales. Se llevaron a cabo ensayo con escamas dobles, para determinar el efecto de la prevención en la liberación de fenoles, con ácido cítrico/ácido ascórbico (AC/AA), Polivinil Pirrolidona (PVP) y carbón activado, diferentes concentraciones de ANA y citoquininas, carbohidratos, concentraciones de las macrosales del medio MS en combinación con diferentes concentraciones de sacarosa, y con microbulbillos se ensayaron medios de cultivo con reducción de macrosales y diferentes concentraciones de ANA/BAP, mientras que en el caso de semillas se determinó el porcentaje de germinación. Todos los ensayos se incubaron a 16 horas luz, 21°C y un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Las evaluaciones se realizaron a los 30 días de iniciado el cultivo, evaluándose el número y longitud de brotes, hinchamiento de escamas, porcentaje de oxidación, sobrevivencia y porcentaje de germinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empardecimiento de los explantes se logró controlar en forma significativa mediante la aplicación de carbón activado al medio de cultivo en *R. bagnoldii*, mientras que en *R. montana* la respuesta no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, no lográndose determinar una respuesta clara en cuanto a la efectividad de los agentes antioxidantes. A pesar de la pérdida de material por oxidación, se logró una

tasa de sobrevivencia mayor del 46,7%, después de 30 días de cultivo, sin embargo, la regeneración de brotes fue muy baja, del orden de 1-2 brotes por escama. Esta respuesta, puede explicarse a que la evaluación de las escamas se realizó a los 30 días de incubación y no a los 90 días como lo realizado por otros investigadores.

CUADRO 1 Prevención de la oxidación y sobrevivencia en escamas de bulbos de *R. bagnoldii* y *R. montana* sometidas a diferentes tratamientos.

Tratamiento	<i>R. bagnoldii</i>		<i>R. montana</i>	
	Fenolización (%)	Sobrevivencia (%)	Fenolización (%)	Sobrevivencia (%)
Medios				
MS 100% (testigo)	46,7 b	46,7	40,0	90,0
MS 100% + CA	16,7 a	60,0	0	70,0
MS 75%	63,3 b	60,0	10,0	80,0
MS 75% + CA	10,0 a	53,3	30,0	70,0
Significancia	*	NS	NS	NS
Remojo antioxidantes				
Control en agua	42,5	57,5	10,0	80,0
AC/AA	25,0	60,0	20,0	80,0
PVP	35,0	47,5	20,0	80,0
Significancia	NS	NS	NS	NS

Promedios en una columna seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente entre sí. Test de Tukey ($p \leq 0,05$). a Datos representan un promedio de 10 escamas gemelas.

El efecto de medios con reguladores de crecimiento y carbohidratos, no fue significativo para la brotación y/o bulbificación en las escamas de *R. montana*. Esta situación también se presentó en *R. bagnoldii* en medios de cultivo adicionados con carbón activado. A pesar del bajo porcentaje de brotación, las escamas que formaron brotes, se adaptaron a condiciones de cultivo *in vitro*, aumentado paulatinamente su capacidad de regeneración, como se observa en el Cuadro 2, en donde se alcanzó un porcentaje de brotación de hasta un 55% para *R. rhodolirion*, activándose además la bulbificación con un máximo de 30% en medio MS normal.

CUADRO 2 Respuesta morfogénica de bulbillos *in vitro* de *R. rhodolirion*

Tratamientos		Parámetros evaluados		
Macro MS (%)	ANA/BAP (mg/L)	Brotación (%)	Enraizamiento (%)	Bulbificación (%)
100	0/0	10.0±9.4	5.0±5.0	10.0±9.5
100	0,1/1,0	55.0±25.1	0.0±0.0	30.0±22.1
50	0/0	40.0±25.3	10.0±9.5	20.0±16.8
50	0,1/1,0	40.0±25.3	10.0±9.5	25.0±19.7

En relación a la germinación *in vitro*, *R. montana* presentó una curva mas uniforme, con un porcentaje de germinación del 40%; mientras que *R. bagnoldii*, presentó valores de un 28%, a los 42 días post siembra. Este sistema de propagación ha sido mas eficiente permitiendo aumentar notoriamente el banco de germoplasma de las cuatro especies de *Rhodophiala* en estudio.

BIBLIOGRAFÍA

PALMA- ROJAS, C. 1999. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* Presl. y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae). In: Seminario “Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura”. Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y DIUT, Universidad de Talca. 79 p.

***Trabajo Financiado mediante Proyecto FIA-BIOT-01-A-071**

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE CITOQUININAS SOBRE LA REGENERACIÓN DE BROTOS *in vitro* DE *Rhodophiala rhodolirion**

Seemann, P.¹, Jara, G.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.²
y Vico, V.²

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. E-mail: pseemann@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

Rhodophiala rhodolirion es una planta ornamental geófito nativa, con bulbo tunicado, de 1-4,1 cm de diámetro. Habita en las laderas secas y asoleadas de la Cordillera de los Andes y de la Costa entre la V-VII Región. Presenta una inflorescencia con una sola flor solitaria grande, rosado-carmín, que la hace muy atractiva ornamentalmente. Debido a que su propagación vegetativa en forma natural no ha sido eficiente se han debido estudiar otras alternativas de propagación, como la micropropagación, la cual ha sido aplicada exitosamente en una gran cantidad de geófitos ornamentales. Debido a esto la presente investigación plantea promover la formación *in vitro* de brotes de *Rhodophiala rhodolirion* bajo medios inductivos con diferentes concentraciones y tipos de citoquininas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se estableció con dos bulbos de *Rhodophiala rhodolirion* colectados en la localidad de Pichuante, VII región. Las escamas fueron sembradas en medio MS, con macrosales reducidas al 75%, adicionado con agar (0,8%), carbón activado (0,5%), sacarosa (3%) y ácido naftalen acético, ANA (0,1 mg/L). El medio fue suplementado con 6-Benzilaminopurina (BAP), 2-isopentiladenina (2iP), Tidiazurón (TDZ) y kinetina (KIN) en concentraciones de 0,5 y 1,0 mg/L, además de los testigos (T1 y T2) sin reguladores de crecimiento (0/0) o solo con ácido naftalen acético (0,1/0).

Se aislaron secciones de escamas dobles de cada uno de los bulbos las que fueron desinfectadas con etanol 70% e hipoclorito de sodio 1%. Se obtuvieron 131 secciones del bulbo 1 y 69 del bulbo 2 (n=200). Cada sección o “explante” se sembró en frascos individuales con 10 mL de medio de cultivo, incubadas durante 120 días en cámara con fotoperíodo de 16 horas luz, con un flujo de fotones fotosintéticamente activos de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ y 23°C, para finalmente realizar las siguientes evaluaciones: Número y longitud de brotes con microbulbillos y porcentaje de brotación.

RESULTADOS

Los resultados indican que la sobrevivencia y brotación alcanzan un valor promedio del 26 y 21% respectivamente. La brotación fue mas adecuada en el medio con 0,1 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de BAP, sin diferencias estadísticamente significativas con las citoquininas restantes. Por otra parte se presentó un rendimiento promedio de 28 microbulbillos por bulbo, lo cual refleja la baja capacidad de regeneración que presenta *Rhodophiala rhodolirion* a partir de material vegetativo (Cuadro 1).

CUADRO 1 Parámetros de sobrevivencia y brotación en *Rhodophiala rhodolirion*

Trat.	ANA / Citoquinina (mg / L)	% Sobrevivencia	% Brotación
1	0 / 0 (T1)	15	5
2	0,1 / 0,5 BAP	30	55
3	0,1 / 1,0 BAP	30	20
4	0,1 / 0,5 2iP	25	15
5	0,1 / 1,0 2iP	35	30
6	0,1 / 0,5 KIN	26	16
7	0,1 / 1,0 KIN	38	9
8	0,1 / 0,5 TDZ	25	5
9	0,1 / 1,0 TDZ	20	20
10	0,1 / 0 (T2)	15	35
	Promedio	26	21

CUADRO 1 Número y longitud de brotes en *Rhodophiala rhodolirion*

Conc. ANA / Citoquinina (mg / L)	Nº de brotes	Long. de brotes (cm)
0 / 0 (T1)	0,05 bc	0,05 b
0,1 / 0,5 BAP	0,55 a	0,3 a
0,1 / 1,0 BAP	0,2 abc	0,05 b
0,1 / 0,5 2iP	0,15 abc	0,12 ab
0,1 / 1,0 2iP	0,3 abc	0,15 ab
0,1 / 0,5 KIN	0,16 ab	0,13 ab
0,1 / 1,0 KIN	0,09 abc	0,07 ab
0,1 / 0,5 TDZ	0,05 c	0,15 ab
0,1 / 1,0 TDZ	0,2 abc	0,015 ab
0,1 / 0 (T2)	0,35 abc	0,08 ab

CONCLUSIONES

- La sobrevivencia y brotación presentó valores promedio de un 26 y 21% respectivamente.
- La mejor inducción de brotes se logró en el medio de cultivo adicionado con 0,1 mg/L de ANA y 0,5 mg/L de BAP, sin diferencias estadísticamente significativas con las otras citoquininas.
- Se obtuvo un rendimiento promedio de 28 microbulbillos por bulbo.

***Trabajo Financiado mediante Proyecto FIA-BIOT-01-A-071**

**RESPUESTA *in vitro* DE MICROBULBILLOS de *Rhodophiala montana*
SOMETIDOS A INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA EN PRESENCIA DE COLCHICINA***

Jara, G.¹, Seemann, P.¹, Muñoz, M.¹, Riegel, R.¹, Schiappacasse, F.², Peñailillo, P.² y Vico, V.².

¹Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
E-mail: gjara@uach.cl

²Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Talca, Chile.

INTRODUCCIÓN

En floricultura se busca que las plantas cultivadas tengan grandes flores y fuertes tallos. Esto ha llevado al uso preferencial de individuos poliploides como material parental, siempre que éstos se encuentren disponibles en forma silvestre o cultivada, en caso contrario puedan ser inducidos por medios artificiales. Las especies de *Rhodophiala* presentan varias características favorables, sin embargo el aumentar el tamaño de la flor, intensidad de color, altura, etc., las haría más atractivas para diferentes mercados. Hoy en día la mayor parte de los cultivares comerciales corresponden a individuos tetraploides. La poliploidía se ha utilizado en numerosas especies ornamentales, como por ejemplo en *Begonia*, híbridos de *Chrysanthemum indicum*, Freesia, Gladiolus, Iris, Narcissus, híbridos de *Pelargonium*, *Primula sinensis* y *P. obconica*, Rosa, *Tagetes patula* y *Tulipa sp.* En las plantas anteriores se han creado individuos tetraploides, e incluso en algunas de ellas se han creado individuos triploides, pentaploides y hasta hexaploides (Meerov, 2000).

Hoy en día se reconoce la inducción de clones poliploides por medio de colchicina, oryzalina u otro medio en diversas especies, así como también han sido desarrolladas técnicas citológicas que permiten reconocer la dotación cromosómica de diferentes individuos (North, 1979). Además las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* están suficientemente desarrolladas para una multiplicidad de especies cultivadas, incluídas muchas geófitas. Existe información sobre otras bulbosas, la cual debe ser adaptada para alcanzar las características superiores deseadas, así como también se espera que el manejo aplicado a *Hippeastrum* y a otras especies de similar morfología en otros países, pueda ser aplicado exitosamente en las cuatro especies en estudio.

En base estos antecedentes el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de regeneración y crecimiento en microbulbillos de *Rhodophiala montana* tratados con una solución de colchicina y determinar posteriormente su ploidía.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microbulbillos de *Rhodophiala montana* fueron cultivados en medio MS líquido, adicionado con colchicina al 0,05%, durante 4 días en agitación constante. Luego este medio fue desechado y reemplazado por uno fresco sin colchicina, en donde fueron sembrados los microbulbillos realizándoles a la mitad de ellos un corte en cruz en la zona basal y la otra mitad se sembraron sin corte en cruz, para ser incubados durante 60 días. Además para comparar el crecimiento de microbulbillos tratados con colchicina se incubaron microbulbillos sin la aplicación de colchicina, con corte en cruz y sin corte, incubándolos durante 30 días. Cada microbulbillo fue sembrado en forma individual, en medio MS solidificado con 0,8% de agar, e incubados en cámara con fotoperiodo de 16 horas luz, flujo de fotones fotosintéticamente activos de 50 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$ y 23°C, para realizar las siguientes evaluaciones: Número y longitud de brotes y raíces, número y diámetro de microbulbillos y sobrevivencia (%).

La comprobación de la duplicación cromosómica se realizó en puntas de raíz, mediante tinción citológica y observación microscópica (Grant et. al. 1984).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que el coeficiente de multiplicación fue mayor en los microbulbillos con corte basal, tanto en los testigos y en los tratados con colchicina, presentándose en los microbulbillos tratados con colchicina sin corte y con corte en cruz, una menor tasa de sobrevivencia. Con respecto a la duplicación cromosómica se encuentran en evaluación los diferentes genotipos tratados con colchicina, sin embargo se ha logrado producir duplicación cromosómica en algunos genotipos, los cuales se encuentran en multiplicación

CUADRO 1 Sobrevivencia y regeneración de *R. montana* sin y con aplicación de colchicina

Evaluaciones <i>in vitro</i> (30 días de cultivo)	<i>R. montana</i> sin aplicación de colchicina		Evaluaciones <i>in vitro</i> (60 días de cultivo)	<i>R. montana</i> con aplicación de colchicina	
	Sin corte	Con corte		Sin corte	Con corte
Sobrevivencia (%)	100	100	Sobrevivencia (%)	80,0 a	40,0 b
Número de brotes	1,1 b	2,0 a	Número de brotes	0,3	0,5
Longitud de brotes (cm)	4,3	4,4	Longitud de brotes (cm)	0,7	0,8
Número de raíces	1,0	1,1	Número de raíces	0,7	0,5
Longitud de raíces (cm)	2,3	1,1	Longitud de raíces (cm)	1,5	1,1
Número de microbulbillos	1,0 b	2,0 a	Número de microbulbillos	1,0 b	1,6 a
Diámetro de microbulbillos (cm)	0,7	0,5	Diámetro de microbulbillos (cm)	0,4 a	0,2 b

BIBLIOGRAFÍA

GRANT, J., BROWN, A. Y GRACE, J. 1984. Cytological and Isozyme Diversity in *Glicine tomentella* Hayata (Leguminosae). Australian Journal of Botany. 32:665-677.

MEEROW, A. W. 2000. Breeding Amaryllis. En Callaway, D.J. y M.B. Callaway (eds.). Breeding ornamental plants. Timber Press, Inc.

NORTH, C. 1979. Plant breeding and genetics in horticulture. The Macmillan Press. Londres. Gran Bretaña. 100p.

***Trabajo Financiado mediante Proyecto FIA-BIOT-01-A-071**

GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE *Rhodophiala* spp.

Seemann¹, P., Muñoz¹, M., Riegel¹, R. Jara¹, G., Schiapacasse², F., Peñailillo², P.
y Vico², V.

Universidad Austral de Chile¹. Casilla 567 Valdivia, Chile.

E-mail: pseemann@uach.cl

²Universidad de Talca. Casilla 747 Talca.

INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Rhodophiala* se caracterizan por poseer bulbos tunicados y hojas linear lanceoladas. Sus flores de color amarillo, rosado o rojo de color amarillos, rosado o rojo dispuestas en umbelas, el perigonio en forma de embudo está formado por 6 tépalos. El androceo presenta seis estambres con filamentos rojos y anteras amarillas. Gineceo sincárpico compuesto de tres carpelos, ovario ínfero y estigma trifido. Las semillas son negras, brillantes, aplanadas y levemente aladas (Peñailillo, 1999).

Durante los últimos años la Universidad Austral de Chile y la Universidad de Talca han desarrollado estudios acerca del género *Rhodophiala*. En el marco de estas investigaciones se ha utilizado material propagado a través de semilla el cual ha sido colectado directamente desde su hábitat natural. En el presente trabajo se describe la dinámica de la germinación de semillas de cuatro especies del género y las condiciones en la cual es posible inducirla.

MATERIAL Y METODOS

Se indujo la germinación *in vitro* e *in vivo*. Las especies estudiadas y la procedencia del material vegetal se describen en el Cuadro 1, para los ensayos de germinación *in vitro*.

CUADRO 1 Ensayos realizados desde mayo a agosto de 2002.

Especie	Lugar de colecta	Temporada de colecta
<i>R. splendens</i>	Vilches Alto, VII región	1998 – 1999
<i>R. montana</i>	Laguna del Maule, VII region	1998 – 1999
<i>R. rhodolirion</i>	Pichuante, VII Region	1998 – 1999
<i>R. bagnoldii</i>	La Serena, IV región	2001 – 2002

La metodología empleada para el ingreso de las semillas *in vitro* fue la siguiente:

Lavado de las semillas en agua corriente con detergente en agitación durante 30 minutos. Inmersión de las semillas 5 segundos en ETOH 70%. Inmersión de las semillas 10 minutos en NaClO 1%, tres enjuagues con agua destilada estéril dentro de cámara de flujo laminar horizontal. Colocación de las semillas en medio MS modificado reduciéndose a la mitad la concentración de macronutrientes.

De *R. bagnoldii* se sembraron 50 semillas. Se sembraron 2 grupos de 50 semillas de *R. splendens*. Uno de estos grupos se sometió a un remojo en agua destilada durante 24 horas antes de ser ingresada a medio MS. Las semillas de *R. rhodolirion* y *R. montana* se sometieron a un tratamiento de frío 8°C durante 3 y 4 semanas respectivamente antes de ser ingresadas *in vitro*. Se sembraron 100 semillas de estas dos especies. Para la germinación *in vivo* se realizaron ensayos desde junio a agosto de 2003 (Cuadro 2).

CUADRO 2 Ensayos realizados desde Junio a Agosto de 2003

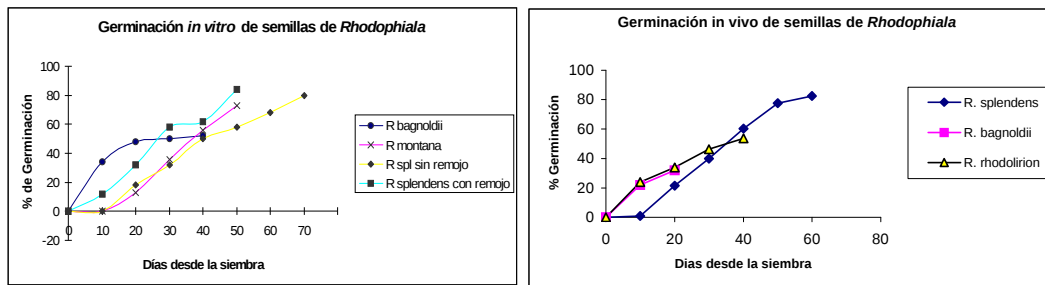
Especie	Lugar de colecta	Temporada de colecta
<i>R. splendens</i>	Vilches Alto, VII región	Marzo 2003
<i>R. montana</i>	Laguna del Maule, VII region	Marzo 2003
<i>R. rhodolirion</i>	Pichuante, VII Region	Marzo 2003
<i>R. bagnoldii</i>	Huasco, III región	Noviembre 2002

Las semillas se desinfectaron en forma similar a la descrita para la germinación *in vitro*. Se colocaron grupos de 250 semillas de cada especie en cámara de germinación Jacobsen a 20°C y 14 horas luz. En el caso de *R. rhodolirion* las semillas se sometieron a un remojo en agua destilada en frío 4-8°C durante 4 semanas

RESULTADOS

Debido a que la germinación de las semillas fue lenta y desuniforme en el tiempo se presentan los resultados como curvas de germinación a través del tiempo. Los siguientes cuadro muestran la germinación *in vitro* e *in vivo* de tres especies de *Rhodophiala*

Los porcentajes máximos de germinación *in vitro* fueron los siguientes: *R. bagnoldii*, 52 % en 40 días; *R. splendens* (sin remojo previo) 80% en 70 días, *R. splendens* (con remojo previo) 84% en 50 días; *R. montana* 73% en 50 días. Los porcentajes máximos de germinación *in vivo* fueron: *R. bagnoldii* 32% a los 20 días; *R. splendens* 82% en 60 días; *R. rhodolirion* 53% en 40 días.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

PEÑAILILLO, P. 1999. Introducción a las geófitas nativas de valor comercial. En: Seminario, Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura. Universidad de Talca. Pp: 1 – 10.

Trabajo financiado por Proyecto FIA-BIOT-01-A-071

9.0 Conclusiones y recomendaciones

Se indican las conclusiones obtenidas para cada objetivo planteado.

1.- El estudio de cariotipos reveló que *R. montana*, *R. splendens* y *R. bagnoldii* poseen un número cromosómico $2n = 2x = 18$; mientras que *R. rhodolirion* $2n = 2x = 16$. Esta última especie difiere de las restantes en estudio en cuanto a morfología cromosómica, lo que sugiere que *R. rhodolirion* está en una posición taxonómica más alejada del resto de las especies. Las cuatro especies se encontrarían en su estado natural en condición diploide ya que los números básicos propuestos para el género son $X = 8$ y $X = 9$.

2.- El establecimiento de un protocolo de inducción de poliploidía dependerá de la especie, el genotipo y las condiciones de cultivo que estimulen un rápido crecimiento y división celular activa que permitan la acción de antimitóticos como la colchicina. En las especies en estudio, se obtuvo individuos poliploides en *R. splendens* y *R. montana* siendo efectivos los tratamientos de semillas en germinación y microbulbillos en solución de colchicina 0,1% aplicada por 8 horas *in vitro*, 0,2% aplicada por 4 horas *in vitro* e *in vivo* y cultivo de microbulbillos en brotación en medio adicionado con colchicina 0,05% P/V. Por 4 a 5 días.

3.- Se demostró que es factible la inducción de poliploidía en *R. montana* y *R. splendens* contándose con plantas poliploides que se encuentran en observación.

4.- El recuento de cromosomas permitió la identificación de individuos poliploides. Esta técnica puede ser complementada con estudios del tamaño de estomas y la estimación de la cantidad de ADN relativo a través de citometría de imágenes.

5.- Existe una fuerte influencia del genotipo en la respuesta a la multiplicación *in vitro*. Durante el desarrollo del proyecto se han identificado los genotipos con una mayor capacidad de multiplicación los que se encuentran disponibles en el banco de germoplasma.

6.- Se logró desarrollar un sistema eficiente de micropropagación de material *in vitro* a partir de microbulbillos utilizando medio MS líquido adicionado con metatopolina. La aclimatización de *Rhodophiala* a condiciones *ex vitro* es exitosa mostrando una buena capacidad de adaptación a condiciones de invernadero frío.

10.- Otros aspectos de interés

Se incorporó una nueva especie a condiciones *in vitro*, *Rhodophiala ananuca*, la cual fue establecida a partir de escamas de bulbos. Esta especie ha respondido en mejor forma al proceso de multiplicación comparado con las demás especies en estudio. Además se incorporaron 10 híbridos proveniente de cruzamientos entre las diferentes especies.

Se comenzó a implementar el cultivo en medios líquidos por inmersión temporal, mediante el cultivo de microbulbillos en biorreactores, de tal forma de establecer diferentes condiciones de cultivo, tales como frecuencias y tiempos de inmersión, cantidad de medio y de microbulbillos por biorreactor, junto con la aplicación de los reguladores de crecimiento meta-topolina y paclobutrazol para mejorar la calidad y producción de los microbulbillos, junto con evitar una posible deshidratación durante la etapa de aclimatización.

Se logró el establecimiento de callos embriogénicos a partir de material vegetal de la parte aérea de plántulas *in vitro* (hojas) o del aislamiento de embriones inmaduros, de tal forma que se determinó el medio de inducción de callos. Sin embargo, no se continuó con la realización de ensayos debido a la falta de experiencia en reconocer los diferentes estados de desarrollo de los embriones somáticos y a que es una técnica muy compleja, que necesita de mucha dedicación.

12.- Bibliografía consultada.

CHEN, J., HALL, D. y DE LUCA, VICENZO. 2005. Effects of the growth retardant paclobutrazol on large scale micropropagation of daylily (*Hemerocallis spp.*).

DAQUINTA, M, LEZCANO, Y, MOSQUEDA, O, ESCALONA M, y BORROTO, G (1999). Efecto del paclobutrazol en la multiplicación de bananos en sistemas de inmersión temporal. Agrícola Vergel.

DAQUINTA, M, LEZCANO, Y, MOSQUEDA, O, ESCALONA M, C BORROTO, G. (1999). Efecto del paclobutrazol y thidiazuron en la multiplicación in vitro de bananos en diferentes formas de cultivo. Revista Brasileira de Fruticultura.

DAQUINTA, M. 2005. Avances en la micropropagación de plantas ornamentales. In Avances en Horticultura Ornamental. Eds. Seemann, P., Jara, G., Castro, I. y Muñoz, M., Valdivia, Chile, UACH, 167 p.

LORENZO, J.C., B. L. GONZÁLEZ, M. ESCALONA, C. TEISSON, R. CASTILLO, P. ESPINOSA, M. SÁNCHEZ, D. ESPINOSA, C. PUENTES, Z. FUNDORA, A. I. GLESIAS, C. BORROTO, M. E. ASPIOLEA, Z. HERNÁNDEZ, I. CAPOTE. 1999. Proliferación de la caña de azúcar en sistemas de inmersión temporal. Cuadernos de Fitopatología. 26(61). 77-79.

NARANJO, C. y POGGIO, L. 2000. cariotipos de cinco especies de *Rhodophiala*. Online: <http://www.biologia.edu.ar/sab/boletin/35-3.htm>.

OLATE, E. y BRIDGEN, M. 2002. Techniques for the in vitro propagation of *Rhodophiala spp.* XXVI International Horticultural Congress. Toronto, Canada. Symposium 19:472.

TORRES, J. y MOGOLLON, N. 2002. Efecto del PBZ sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae* Parker ex Hooker previo a la aclimatización. Bioagro 14 (1): 25-28.

Actividades desarrolladas en la Universidad de Talca

III. Texto principal

1. Cumplimiento de los objetivos

1.1 Evaluar métodos de crecimiento rápido de bulbos

Se cumplió totalmente, ya que durante la realización del proyecto se evaluaron prácticamente todos los factores que influyen en el crecimiento de los bulbos. Se llegó a proponer una metodología, la cual consiste en el riego con solución nutritiva de Cooper y la aplicación de calor basal a los bulbos. Lo que falta con respecto a esto ajustar la temperatura hasta encontrar la más adecuada para el desarrollo de las plantas

1.2 Cultivar las plantas poliploides

Se realizó el cultivo de las plantas disponibles, encontrándose que éstas presentan una baja sobrevivencia. Algunos de los poliploides fueron cultivados con calor basal registrándose su evolución. Otros fueron utilizados en ensayos, registrándose su respuesta a los tratamientos aplicados.

1.3 Evaluar las plantas poliploides, esperándose evaluar también su floración

Este objetivo se cumplió parcialmente, y final del proyecto es posible contar con gráficos que muestran la evolución fenológica de las plantas poliploides cultivadas. También se cuenta con cuadros que muestran la evolución en las características más importantes para evaluar el desarrollo de las plantas, como son: diámetro, peso, número de hojas y número de raíces. Sin embargo, no fue posible evaluar la floración de los poliploides.

2. Aspectos metodológicos

2.1 Descripción de la metodología efectivamente utilizada

2.1.1 Material Vegetal

Para la realización de los estudios y experimentos se utilizaron bulbos de *R. montana*, *R. bagnoldii*, *R. splendens*, *R. rhodolirion* y *R. ananuca*, recolectados y multiplicados durante la ejecución del proyecto “Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial”. También se utilizaron bulbos recolectados en las diferentes salidas a terreno realizadas durante la ejecución del proyecto, bulbos provenientes de almácigos realizados con semillas recolectadas en las salidas a terreno y bulbos de cultivo in vitro provenientes de la Universidad Austral de Chile.

2.1.2 Cultivo en invernadero

2.1.2.1 Elección de las mejores condiciones térmicas para el crecimiento y desarrollo de los bulbos

En enero de 2002 se sacaron de sus respectivos contenedores todos los bulbos disponibles del proyecto financiado por FIA y ejecutado por la Universidad de Talca denominado “Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial”, se separaron según calibre y se plantaron en macetas nuevas. Los bulbos con calibre hasta 6/7 se plantaron individualmente en macetas plásticas de 12,5 cm de diámetro y 11,5 cm de alto, los bulbos con calibre mayor a 6/7 se plantaron individualmente en macetas plásticas de 21 cm de diámetro y 18 cm de alto. Como sustrato se utilizó una mezcla de tierra de hojas y arena en proporción 1:1. Posteriormente se distribuyeron dejando la mitad en la Estación Experimental Panguilemo de la Universidad de Talca (Figura 2.1) donde se mantuvieron en invernadero sin calefacción y con enfriamiento de aire por medio de paneles evaporativos y extractores, la otra parte se dejó en el invernadero de floricultura del Campus Lircay de la Universidad (Figura 2.2), donde se mantuvieron sin calefacción y sin aclimatación (Cuadro 2.1). El riego se realizó con manguera de modo que el agua llegara a la zona de raíces, con frecuencias de día por medio en el invernadero del Campus Lircay y dos veces por semana en el invernadero de la E/E, en verano. En invierno los riegos se realizaron un día a la semana. Mensualmente, durante todo el periodo de duración del proyecto se midió el número de hojas por planta, con el fin de determinar la época y el grado de actividad de las plantas que se relaciona directamente con el crecimiento de los bulbos.



Figura 2.1 Invernadero E/E Panguilemo

Figura 2.2 Invernadero Campus Lircay

Cuadro 2.1 Distribución por especie y calibre de los bulbos establecidos en E/E Panguilemo y Campus Lircay al inicio y al final del registro

Especie	Calibre	Enero de 2002		Enero de 2005	
		N° bulbos E/E Panguilemo	N° bulbos Campus Lircay	N° bulbos E/E Panguilemo	N° bulbos Campus Lircay
R. montana	1	13	14	0	0
	1/2	49	49	0	5
	2/3	36	35	3	3
	3/4	10	11	13	10
	4/5	6	7	16	14
	5/6	6	7	12	6
	6/7			4	3
	7/8			0	4
	8/9			5	3
	>8/9			8	0
R. splendens	1/2	6	7	0	5
	2/3	24	24	6	10
	3/4	30	31	6	4
	4/5	14	13	3	2
	5/6	13	14	5	1
	6/7			3	3
	7/8			4	0
	9/10			1	0
R. bagnoldii	1/2	1	1	0	0
	2/3	2	2	0	0
	3/4	10	9	0	1
	4/5	10	11	4	3
	5/6	16	16	4	3
	6/7			4	0
R. rhodolirion	3/4	1	1	0	0
	4/5	1	1	0	0
	5/6	3	3	0	0

2.1.2.2 Experimentos de duración y calidad de la luz

En junio de 2002 se comenzó a realizar un ensayo de luminosidad en plántulas de las 4 especies de *Rhodophiala* para conocer el efecto de la intensidad de la luz y el fotoperiodo sobre el número de hojas y el peso del bulbo luego de algunos meses de cultivo. El ensayo se realizó en el invernadero de la E/E Panguilemo con dimensiones de 40 m de largo y 8 m de ancho cubierto con polietileno transparente de 0,2 mm. Para este ensayo se utilizaron plántulas cultivadas desde semilla en bandeja speedling, las que al momento del trasplante presentaban una hoja emergida, éstas fueron colocadas en vasos individuales transparentes de 11 cm de largo y 6,5 cm de diámetro, con un sustrato compuesto por tierra de hojas y arena en proporción 1:1. Después de la plantación todos los vasos se regaron a saturación. El manejo del cultivo durante el ensayo incluyó riego cada vez que las plantas presentaban una pérdida de humedad aproximada al 20% y aplicación de solución funguicida (Captan 1g/L y Benlate 1g/L) cada dos riegos.

Para los efectos de intensidad lumínica y fotoperiodo a los diferentes tratamientos, se instaló una ampolleta incandescente de 75 watts con reflector sobre cada parcela a una altura de 75 cm desde el nivel del suelo (Figura 4.3). El funcionamiento de las ampolletas fue controlado mediante un reloj programador, que permite el encendido y apagado automático a la hora correspondiente durante el día o la noche. Los criterios utilizados en el manejo del fotoperiodo del cultivo se basaron en el análisis de la información obtenida en la tesis de grado “Análisis del fotoperiodo en Chile y su aplicación al cultivo del crisantemo en Talca”. Para evitar que la luminosidad interfiriera en otras parcelas se construyó un armazón de alambre sostenido por postes de madera, el cual se cubrió con tela negra tipo raquelada por un lado y sarga por el otro, fijadas a la estructura con pinzas de madera (Figura 2.4).

Para mantener un registro de la temperatura ambiental, se instalaron 3 termómetros de máxima y mínima a nivel de suelo y en el centro de una parcela elegida al azar de cada uno de los tratamientos.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos para cada especie y 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición correspondió a una parcela experimental de 0,7 a 0,7 m con un total de 15 a 17 plantas por especie, excepto *R. bagnoldii*, que quedó con tres plantas por parcela, ya que no se disponía de más material. La distribución de las plantas dentro de cada parcela fue al azar. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tratamiento 0: Control, sólo luz natural

Tratamiento 1: 18.5 h continuas de luz artificial

Tratamiento 2: Interrupción de la noche (luz artificial desde las 23:30 hasta las 02:00 de la madrugada)

Tratamiento 3: Luz complementaria (luz artificial desde el inicio del crepúsculo civil matutino hasta la hora de término del crepúsculo civil vespertino).



Figura 2.3 Ensayo de iluminación 2002



Figura 2.4 Ensayo de iluminación 2002

En junio de 2003 se comenzó un nuevo ensayo para evaluar la influencia del régimen de iluminación sobre el comportamiento y desarrollo de plántulas de *Rhodophiala*, esta vez se utilizaron dos niveles de intensidad luminosa en plántulas de *R. montana*, *R. bagnoldii* y *R. splendens*, *R. rhodolirion* se incorporó al ensayo en julio. Para este experimento se utilizaron plántulas que habían sido cultivadas en vasos plásticos, las que al momento de la plantación presentaban 1 hoja emergida. El manejo del cultivo durante el ensayo incluyó riego cada vez que las plantas presentaban una pérdida de humedad aproximada al 20%.

El ensayo se realizó en el invernadero de la E/E Panguilemo.

Para los efectos de controlar la intensidad luminosa se instalaron 8 ampolletas fluorescentes de 20 watts (que reemplazan a una de 75 watts en términos de intensidad luminosa), con reflector a una altura del suelo a la base de la ampolleta de 90 cm. El funcionamiento de las ampolletas fue controlado mediante un reloj programador, que permite que las luces se enciendan y apaguen automáticamente a la hora correspondiente. Las luces permanecieron encendidas desde el inicio del crepúsculo civil matutino hasta la hora de término del crepúsculo civil vespertino.

Para montar el ensayo se utilizó el mismo armazón de alambre y madera construido de año 2002. Para no interferir con la luminosidad entre los tratamientos se colocaron pliegos de papel aluminio fijados a la estructura con pinzas de madera.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 2 tratamientos para cada especie y 4 repeticiones por tratamiento. Cada repetición correspondió a una parcela experimental de 0,7 a 0,7 m con un total de 20 plantas por especie. La distribución de las plantas dentro de cada parcela fue al azar. Los tratamientos fueron los siguientes:

Tratamiento 0: Control, sólo luz natural

Tratamiento 1: Luz complementaria (luz artificial desde el inicio del crepúsculo civil matutino hasta la hora de término del crepúsculo civil vespertino).

Se registró cada 15 días el número y longitud de hojas por planta, al final del ensayo se evaluó calibre, peso, número de raíces por bulbo y muerte de plántulas.

2.1.2.3 Experimentos de aplicación de calor basal a los bulbos

Con el fin de obtener un crecimiento más rápido de los bulbos y basados en los estudios realizados por Doorduyn, J.C. y Verkerke, W. (2002) en *Hippeastrum*, se realizaron dos ensayos de aplicación de calor basal.

El primer ensayo comenzó a realizarse en mayo de 2004 en el invernadero de la E/E Panguilemo de dimensiones totales de 40 m de largo y 8 m de ancho, cubierto con polietileno transparente de 0,2 mm. Para el ensayo se dispuso de un mesón de propagación de 3x1m cubierto con una capa de 6 cm de arena húmeda, el cual se dividió en dos sectores, en uno se dispuso una red de cables calefactores en medio de la capa de arena para proporcionar el calor a la base de los bulbos (Figuras 4.5 y 4.6). El otro sector quedó sin cables calefactores. Las temperaturas registradas en el sector con calor en un día de invierno fueron: a las 08:00h 18°C, a las 11:00h 20°C y a las 16:00h 22°C, mientras que en el sector sin calor fueron a las 08:00h fue 10°C, a las 11:00h fue de 15°C y a las 16:00h fue de 18°C. No se han realizado registros durante la noche.

Se utilizaron bulbillos de *R. montana* provenientes de cultivo in vitro, los cuales se dividieron según su origen (escamas o semillas) y según su genotipo, y dentro de cada genotipo se subdividieron de acuerdo al calibre inicial. Se disponía de pocos bulbillos por genotipo, por lo que se hizo difícil obtener un número mínimo unidades por repetición. La mitad de los vasos de un mismo genotipo, origen y calibre se coloraron en la parte de la mesa que disponía de calor y la otra mitad de los vasos en el sector sin calor. También se colocaron bulbillos de *R. splendens*, *R. montana*, *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion* provenientes de semillas, se realizaron 3 repeticiones de 10 plántulas cada una de las 4 especies en el sector con calor y en sector sin calor.

Durante el invierno se regó una o dos veces por semana, y a partir de agosto comenzó un programa de fertirrigación, basado en la aplicación de solución de Cooper. Se realizó un ajuste de conductividad eléctrica y pH de la solución de riego basado en las recomendaciones realizadas en la literatura para *Hippeastrum*, estableciéndose un valor de 1,8 mS/cm para la CE y 6,1 para pH. La corrección de CE se realizó aplicando diferentes cantidades de soluciones madre a la solución de riego, la corrección de pH se realizó aplicando ácido fosfórico. En el caso de *R. bagnoldii* no se aplicó este último ya que el pH en condiciones naturales es cercano a 8 cercano y el pH de la solución original es 7,4. Desde septiembre cada 15 días se realizaron riegos con agua pura con el objeto de lavar las posibles sales acumuladas por la aplicación de la solución fertilizante. Al término del ensayo se evaluó el diámetro y peso de los bulbillos, número de raíces y número de hojas.

En marzo de 2005 se estableció un nuevo ensayo de aplicación de calor basal a los bulbos. En esta oportunidad se utilizaron bulbos de mayor calibre, que corresponden a los bulbos con que se inició el proyecto, también se utilizaron los bulbos más grandes del ensayo anterior. Estos se distribuyeron aleatoriamente en los 2 tratamientos (con calor basal y sin calor basal), además se incluyeron en el tratamiento con calor los 3 bulbos tetraploides con que se contaba. La metodología utilizada fue similar a la descrita anteriormente. En diciembre de 2005 los bulbillos fueron cosechados y se evaluaron las mismas variables mencionadas anteriormente.

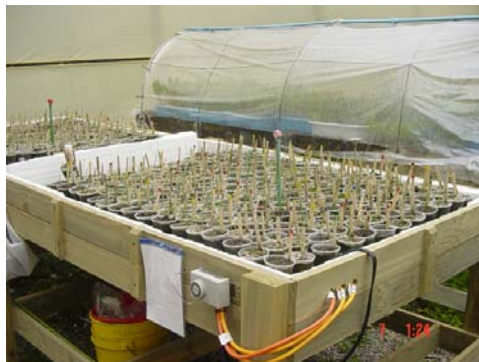


Figura 4.5 Ensayo de aplicación de calor basal



Figura 4.5 Ensayo de aplicación de calor basal

2.1.2.4 Experimentos de exposición al frío

En el mes de mayo de 2002 se establecieron dos ensayos con bulbos de *R. rhodolirion* recolectados en el mes de abril en el sector Los Queñes, para evaluar el efecto de distintos tratamientos de frío preplantación y la presencia o ausencia de raíz sobre el comportamiento de las plantas.

Primer ensayo en *R. rhodolirion*

Se utilizaron 48 bulbos calibre 10/11 a 13/14 separados en dos grupos: calibres 10/11 y 11/12 (24 bulbos) y calibres 12/13 y 13/14 (24 bulbos). A ambos grupos se aplicaron tres tratamientos de frío (0, 4 y 7 semanas). Los bulbos fueron colocados en bolsas plásticas perforadas rellenas con aserrín húmedo, previo a esto a todos los bulbos se les cortó la raíz. Los bulbos del tratamiento control fueron colocados en la bodega a temperatura ambiente hasta el momento de la plantación, los bulbos de los tratamientos restantes fueron colocados en el refrigerador a una temperatura entre 8 y 10°C hasta cumplir el periodo de frío respectivo, en el caso de los bulbos con tratamiento de 4 semanas de frío, luego de cumplido este plazo los bulbos fueron sacados del refrigerador y llevados a la bodega. Cuando se cumplieron las 7 semanas de frío del último tratamiento todos los bulbos fueron plantados.

La plantación se realizó en macetas de 21 cm de diámetro y 18 cm de alto, en un sustrato compuesto por tierra de hoja y arena en proporción 1:1. Posteriormente la mitad de los bulbos de cada tratamiento se trasladó al invernadero de la E/E Panguilemo y la otra mitad al invernadero del Campus Lircay. Al momento de la plantación se registró la presencia o ausencia de raíces y de hojas por bulbo. Se registró la fecha de la emergencia de las hojas y cada 3 semanas desde la plantaciones ha evaluado el número de hojas por planta.

Segundo ensayo en *R. rhodolirion*

Los bulbos se separaron en dos grupos, calibre 7/8 a 8/9 (10 bulbos) y 14/15 a 15/16 (10 bulbos). Los bulbos de ambos grupos se sometieron a un tratamiento de frío (entre 8 y 10°C) por 6 semanas. Una vez cumplido el periodo de frío se tomaron 5 bulbos de cada grupo y se les cortó la raíz. Posteriormente, todos los bulbos (con y sin raíz) fueron plantados en macetas de 21 cm de diámetro y 18 cm de alto con sustrato compuesto por una mezcla de tierra de hojas y arena. Las plantas se trasladaron al invernadero del Campus Lircay. Se registró

la fecha de la emergencia de las hojas y se evaluó cada tres semanas el número de hojas por planta.

Ensayo realizado en *R. montana*

Se recolectaron bulbos de diferentes calibres en el sector Laguna del Maule, los cuales fueron calibrados y separados en dos grupos: calibre 6/10 que incluye bulbos calibre 6/7 a 9/10 (10 bulbos) y calibre 10/14, que incluye bulbos calibre 10/11 a 13/14 (10 bulbos). En cada grupo la mitad de los bulbos se sometió a un tratamiento de 8 semanas de frío y la otra mitad se mantuvo almacenada a temperatura ambiente.

Los bulbos que fueron sometidos a frío se colocaron en bolsas perforadas rellenas con aserrín húmedo y se mantuvieron en refrigerador a una temperatura entre 8 y 10°C. Una vez cumplidas las 8 semanas de frío, todos los bulbos (con y sin frío) se plantaron en macetas de 21 cm de diámetro y 18 cm de alto usando un sustrato compuesto por tierra de hojas y arena en proporción 1:2 y se dejaron bajo invernadero.

Al momento de la plantación se registró la presencia o ausencia de raíces y número de hojas por bulbo. Se registró la fecha de emergencia de hojas y cada tres semanas desde plantación se evaluó el número de hojas por planta.

2.1.2.5 Experimento de fertilización

Se estableció un ensayo para comparar el efecto de 3 diferentes concentraciones de solución nutritiva de Cooper sobre el crecimiento y desarrollo de bulbillos provenientes de cultivo *in vitro* de 3 especies, *R. montana*, *R. splendens* y *R. bagnoldii*.

El ensayo se realizó en el invernadero de la Estación Experimental de Panguilemo de la Universidad de Talca, de 40 m de largo y 8 m de ancho cubierto con polietileno transparente de 0.2 mm. Los bulbillos que se utilizaron en el ensayo estaban plantados individualmente en vasos plásticos transparentes de 300 cc con una mezcla de tierra de hojas (previamente desinfectada) y turba en proporción 1:1. Los vasos se colocaron sobre el piso del invernadero cubierto con plástico negro, distribuidos en forma aleatoria e identificados con palos de helado pintados de diferente color, según tratamiento y especie.

Para la fertilización se utilizó solución nutritiva de Cooper, la misma que se utilizó para el ensayo de aplicación de calor basal, en 3 concentraciones, 0, 100 y 200%. La aplicación de fertilizante se realizó una vez por semana, aplicándose 30 cc de solución nutritiva por vaso, y cuando se requirieron riegos adicionales, éstos se realizaron con agua pura.

Para cada especie los bulbillos de cultivo *in vitro* se dividieron según el origen (escamas o semilla), y según el calibre. Los tratamientos se aplicaron según la cantidad de bulbillos disponibles para repetición. El ensayo se estableció el día 28 de julio de 2005, comenzándose con los riegos el mismo día.

El experimento fue conducido en un diseño completamente al azar, según la especie y la disponibilidad de material

R. montana (provenientes de bulbo) con 3 niveles de fertilización (0, 100 y 200%).

R. montana (proveniente de semilla) con 2 niveles de fertilización (0 y 100%).

R. bagnoldii (proveniente de bulbo) con 3 niveles de fertilización (0, 100 y 200%).

R. bagnoldii (proveniente de semilla) con 2 niveles de fertilización (0 y 100%).
R. splendens (proveniente de bulbo) con 3 niveles de fertilización (0, 100 y 200%).

Una vez finalizado el experimento se evaluó el incremento en calibre de los bulbillos.

Se realizó un análisis de varianza para determinar el efecto de los tratamientos aplicados sobre la variable estudiada. Donde hubo significancia se realizó la separación de medias mediante el test de rango múltiple de Duncan.

2.1.2.6 Manejo de bulbos provenientes de cultivo in vitro

A comienzos de julio de 2003 llegaron las primeras plantas producidas in vitro, 3 plantas tetraploides y 3 mixoploides de *R. splendens*, las plantas se colocaron en el invernadero de la E/E Paguilemo donde fueron evaluadas periódicamente.

A fines de mayo de 2004 llegó una nueva partida de bulbillos provenientes de cultivo in vitro, esta vez de la especie *R. montana*. Llegaron 124 bulbillos de los cuales 116 provenían escama y 8 de semilla, éstos fueron sacados de vitro y enviados directamente a la U. de Talca. También llegaron 120 bulbillos de la especie provenientes de escamas con un periodo de aclimatación. Los bulbillos se lavaron y se registró calibre, número y largo de hojas y se plantaron en vasos de plástico transparente de 11 cm de alto por 6,5 cm de diámetro usando un sustrato compuesto por turba y perlita en proporción 1:1, los bulbillos se plantaron superficialmente. Posteriormente se llevaron al invernadero de la E/E, donde fueron evaluados periódicamente.

En enero de 2005 llegaron desde la U. Austral bulbillos de todas las especies obtenidos desde escama y desde semilla, estos provenían directamente de cultivo in vitro, sin periodo de aclimatación. Luego de evaluar peso, diámetro ecuatorial, Nº de hojas y Nº de raíces los bulbillos fueron plantados en vasos de plástico transparente de 11cm de alto y 6,5 cm de diámetro usando un sustrato compuesto por turba y perlita en proporción 1:1, los bulbillos se plantaron superficialmente. Posteriormente se llevaron al invernadero de la E/E, donde fueron evaluados periódicamente.

2.1.3 Otros

2.1.3.1 Estudios de propagación vegetativa

En mayo de 2004 se realizó un ensayo de propagación vegetativa para determinar con qué método se obtiene una producción más rápida de bulbos. Las técnicas utilizadas se describen a continuación:

Seccionamiento: Consiste en remover las escamas externas del bulbo, las raíces y el cuello del bulbo, luego se corta verticalmente a través del centro, generándose 2, 4, 6, o más secciones dependiendo del número de cortes realizado. Esta técnica se utilizó en 1 bulbo de *R. rhodolirion* calibre 6/7 y 3 bulbos de *R. bagnoldii* calibre 7/8, 9/10 y 10/11.

Corte en cruz o scoring: Consiste en remover las raíces y parte del plato basal con un cuchillo, posteriormente se realizan cortes en cruz verticalmente, desde el centro de la base del bulbo hasta una profundidad aproximada a un tercio del tamaño de este, esta técnica se realizó con dos bulbos de *R. bagnoldii* calibre 12/13, dos bulbos de *R. montana* calibre 11/12 y 14/15 y un bulbo de *R. rhodolirion* calibre 8/9.

Ahuecado o scooping: Esta técnica consiste en eliminar completamente el plato basal del bulbo con un cuchillo o cuchara cortante. Esta técnica se realizó con tres bulbos de *R. bagnoldii* calibre 10/11, 14/15 y 15/16, *R. rhodolirion* calibre 7/8 y un bulbo de *R. montana* calibre 14/15.

Luego de realizados los cortes, los bulbos o secciones de bulbo se colocaron en una bandeja con aserrín húmedo en una habitación cerrada con una temperatura ambiental de alrededor de 20°C hasta que se realizó la evaluación final el día 20 de septiembre de 2004.

2.1.2.2 Estudios de germinación y desarrollo de plántulas

A fines de febrero de 2003 se colocaron en bandejas de germinación con papel filtro húmedo 20 semillas de cada especie. Las cajas con semillas de *R. splendens* y *R. bagnoldii* fueron llevadas a una bodega a temperatura ambiente hasta que comenzaron a germinar. Las cajas con semillas de *R. montana* y *R. rhodolirion* se colocaron en frío a una temperatura entre 8 y 10°C por 4 y 3 semanas, respectivamente. Una vez cumplido este periodo las cajas fueron llevadas a la bodega hasta que las semillas comenzaron a germinar. A medida que se produjo la germinación, las plántulas fueron colocadas en vasos plásticos transparentes con una mezcla de tierra de hojas y arena en proporción 1:2. Las plántulas se mantuvieron en el invernadero del Campus Lircay. Se evaluó días a germinación, porcentaje de emergencia, número y longitud de hojas.

2.1.2.3 Siembras

Primera siembra

Entre enero y febrero de 2002 se realizó la primera siembra. Se utilizaron semillas de *R. montana* y *R. rhodolirion* recolectadas en marzo de 2000, de *R. splendens* recolectadas en marzo de 1999 y de *R. bagnoldii* recolectadas en enero de 2002. A las tres primeras se les realizó una pregerminación en agua y se dejaron en el laboratorio de hortalizas de la Universidad de Talca a una temperatura aproximada de 18 a 20°C por una semana, posteriormente las semillas se colocaron en cajas de germinación con papel filtro húmedo y se asperjaron con una solución fungicida de Captan y Benlate (1g/L). Luego, las semillas de *R. montana* y *R. rhodolirion* se sometieron a frío (8-10°C) por 3 y 4 semanas, respectivamente, mientras que *Rhodophiala splendens* se trasladó inmediatamente a la E/E a una cámara de germinación sin luz y a una temperatura ambiental de 15°C aproximadamente. Lo mismo ocurrió con las dos primeras especies, pero después del tratamiento de frío. En el caso de *R. bagnoldii* las semillas se pregerminaron directamente en las cajas de germinación y se llevaron inmediatamente a la cámara de germinación en la E/E sin someterse a tratamiento de frío.

La siembra se realizó en bandejas speedling con turba húmeda como sustrato y se fue realizando en la medida que las semillas germinaban en las cajas de germinación en la cámara. Todas las bandejas se colocaron en una piscina de 1,5x1,5x0,05m, la cual se construyó en el piso del invernadero de la E/E Panguilemo con bordes de ladrillo y forrada con plástico negro. El riego fue por subirrigación, además, se realizaron riegos superficiales en forma de aspersión y se procuró mantener una lámina de agua de aproximadamente un centímetro.

Segunda siembra

En abril de 2002 se realizó la siembra de semillas recolectadas durante la temporada en la precordillera de Los Andes en la VII región, en esta oportunidad se utilizaron semillas de *R. splendens* recolectadas en marzo en el sector Radal 7 tazas, *R. rhodolirion* recolectadas en marzo en el sector Los Queñes y *R. montana* recolectadas en marzo de 2000 en el sector Laguna del Maule. Todas las semillas se sometieron a un tratamiento de pregerminación que consistió en colocar las semillas en 5 cajas de germinación por especie (250 semillas por caja) con papel filtro humedecido con una solución de Captan (1g/L) y Benlate (1g/L). Posteriormente, las semillas de *R. splendens* se llevaron a la E/E y se mantuvieron en una cámara de germinación sin luminosidad y a una temperatura ambiente entre 15 y 20°C. Las semillas de *R. rhodolirion* y *R. montana* se sometieron a un tratamiento de frío (8 a 10°C) por 3 y 4 semanas, respectivamente. Una vez cumplido el periodo de frío se llevaron a la cámara de germinación. Una vez que comenzaron a germinar se procedió a la siembra en bandejas speedling con una mezcla de tierra de hojas y arena en proporción 1:1 como sustrato. Se registró la fecha de emergencia de la primera hoja, número de plántulas emergidas y se observó el tipo germinación.

Tercera siembra

En abril de 2003 se coloraron 230 semillas de cada una de las especies de *Rhodophiala* estudiadas en cajas de germinación con papel filtro húmedo. Las cajas de *R. splendens* y *R. bagnoldii* se llevaron inmediatamente a una bodega en el subterráneo del laboratorio y se mantuvieron en ese lugar hasta que germinaron las semillas. Las cajas de *R. montana* y *R. rhodolirion* se llevaron a frío por 4 y 3 semanas respectivamente, a una temperatura entre 8 y 10°C. Transcurrido este tiempo se llevaron a la bodega. En la medida que las semillas fueron germinando se sembraron individualmente en vasos plásticos de 11 cm de alto y 6,5 de diámetro usando un sustrato compuesto por tierra de hojas y arena en proporción 1:2. Los vasos se colocaron en el invernadero de la E/E Panguilemo bajo subirrigación hasta el momento de comenzar los ensayos.

Cuarta siembra

En abril de 2004, la metodología utilizada fue similar a la mencionada anteriormente, también se utilizaron 230 semillas de cada una de las 4 especies.

Siembra de semillas provenientes de cruzamientos interespecíficos

Se realizó la siembra de las semillas obtenidas en los cruzamientos interespecíficos realizados en la primavera de 2004 y verano de 2005. Las semillas resultantes de cada cruzamiento se dividieron en dos grupos según los padres para probar diferentes condiciones de germinación, en refrigerador a 5°C y en bodega a 15°C. En general, todos los cruzamientos en que uno de los dos padres fue *R. montana* se colocaron a 5°C, ya que del proyecto anterior se sabía que las semillas de esta especie requieren frío. Se mantuvieron en estas condiciones hasta el momento de la emergencia de la radícula. Posteriormente fueron transplantadas a una mezcla de tierra de hojas y arena en proporción 1:1 (desinfectada). Se colocaron en el invernadero de la Estación Experimental

Panguilemo, registrándose la fecha de emergencia de la primera hoja (Figura 4.7).



Figura 2.7 Emergencia de plántulas de Híbridos

Pruebas de germinación en semillas de *Rhodophiala ananuca*

Desde el primero de julio de 2005 se realizó un ensayo para determinar los requerimientos de germinación de la especie *R. ananuca*, recientemente incluida en el proyecto. Se evaluó la aplicación de diferentes periodos de frío húmedo sobre la germinación de las semillas.

El ensayo se realizó en el Laboratorio de Hortalizas de la Universidad de Talca, ubicado en el Campus Lircay. Para el periodo de frío se utilizó un refrigerador casero al cual se le ajustó la temperatura de refrigeración a 5°C. Para embeber las semillas se utilizaron vasos de precipitado, y para las pruebas de germinación se utilizaron cajas plásticas con papel filtro humedecido con agua destilada. Las semillas provenientes de la localidad de Aguada de Tongoy, III región, recolectadas a fines de octubre de 2004 fueron desinfectadas con solución de Captan al 0.1%. Posteriormente fueron colocadas en vasos de precipitado con agua destilada por 48 horas. Al finalizar este periodo 100 semillas fueron trasladadas a sustrato y las 400 restantes se distribuyeron en las cajas de germinación y se colocaron en el refrigerador durante 1, 2, 3 y 4 semanas, una vez cumplido el periodo de frío se sembraron en bandejas con una mezcla tierra de hojas más arena en proporción 1:1 (desinfectada) y se colocaron en el invernadero de la Estación Experimental Panguilemo. Todas las semillas pasaron a sustrato aunque no se registrara germinación al momento de la evaluación.

Se realizó un experimento sencillo en el que se midió el número de semillas germinadas en cada tratamiento y se calculó el porcentaje de germinación a 1, 2, 3, y 4 semanas desde la plantación, después de los respectivos periodos de frío.

Se evaluó el número de semillas germinadas en cada tratamiento cada semana después de la siembra y se calculó el porcentaje de germinación.

Se realizó el cálculo de los porcentajes.

2.1.2.4 Estudios de morfología del bulbo

Se realizaron varias disecciones de bulbos (cuadro 2.), con el fin de conocer la morfología del bulbo y saber si existe relación entre el número de escamas y el número de yemas florales.

Para la disección se lavó muy bien el bulbo, eliminando restos de tierra y túnica, posteriormente utilizando un cuchillo bien afilado se eliminó escama por escama describiendo el tipo de estructura, hasta llegar al centro del bulbo.

Cuadro 2. Disecciones de bulbo realizadas durante el proyecto

Especie	Calibre	Fecha
R. bagnoldii	24/25	Marzo de 2003
R. splendens	14/15	Agosto de 2004
R. bagnoldii	24/25	Marzo 2005
R. bagnoldii	17/18	Marzo 2005
R. ananuca	23/24	Marzo de 2005

2.1.2.5 Cruzamientos interespecíficos e intergénero

Durante las temporadas 2004 y 2005 se realizaron cruzamientos entre las especies estudiadas, utilizando la siguiente metodología:

A partir de fines de octubre de 2004, al inicio de la temporada de floración, se comenzó con un programa de cruzamientos, para lo cual previamente se cosechó el polen temprano en la mañana, por lo tanto, en la tarde anterior se marcaron todos los botones que potencialmente abrirían al día siguiente y se cubrieron con un capuchón de papel para evitar la polinización natural. El polen se extrajo con un pincel delgado con el que se cepillaron suavemente las anteras, colocando por debajo de estas un frasco para recoger el polen. El polen recolectado puede usarse inmediatamente si hay flores listas, es decir, con estigma receptivo. Si no se utiliza, debe ser almacenado en un frasco sellado herméticamente en el refrigerador.

Las flores utilizadas como hembras también se seleccionaron el día anterior. Aquellas que presentaban botones a punto de abrir se cubrieron con capuchones de papel. Al día siguiente se observó que las anteras aún estuvieran inmaduras, se emascularon y las flores se polinizaron con el polen recogido. Para realizar la polinización se utilizó un pincel fino que se introdujo en el frasco con polen, luego este polen se depositó en el pistilo de la flor femenina, posteriormente la flor se cubrió con un capuchón de papel por un día. Cuando los frutos cuajados maduraron, se cosecharon las semillas y se almacenaron en frascos de vidrio con gel de sílice a temperatura ambiente. Se calculó el porcentaje de fructificación, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{Fructificación} = (\text{N}^\circ \text{ de frutos cuajados} / \text{N}^\circ \text{ de flores polinizadas}) * 100$$

Cada flor polinizada se identificó con una tarjeta que contenía la siguiente información:

- Fecha de recolección del polen
- Fecha de polinización
- Nombre de los padres

Durante la temporada 2005 se repitió la metodología utilizada el año anterior, para la recolección de polen y polinización de flores. Se procuró realizar los

cruzamientos que no se realizaron la temporada anterior y se incluyó la especie *Phycella australis*. En esta etapa se realizaron autopolinizaciones (con el polen de la misma flor), polinización cruzada con el polen de otra planta (de la misma especie) y polinización cruzada con otras especies. El objetivo fue determinar el grado de autopolinización que presentan las especies en relación a la polinización cruzada.

2.1.2.6 Excursiones y recolección de material vegetal

Durante la realización del proyecto se realizaron varias excursiones, tanto la precordillera de la VII Región, como al norte chico, III y IV regiones. En el Cuadro 2. Se muestran los lugares visitados y el objetivo de la excursión.

Cuadro 2. Excursiones realizadas durante la ejecución del proyecto y objetivo buscado.

Lugar	Fecha	Objetivo/actividad
Los Queñes (VII)	Marzo de 2002	Recolección de semillas de <i>R. rhodolirion</i>
Laguna del Maule (VII)	Marzo de 2002*	Recolección de semillas de <i>R. montana</i>
Radal 7 tazas (VII)	Marzo de 2002	Recolección de semillas de <i>R. splendens</i>
Los Queñes (VII)	Abril de 2002	Recolección de bulbos de <i>R. rhodolirion</i>
Llanos Amarillos (III)	Septiembre 2002**	Recolección de bulbos y semillas de <i>R. bagnoldii</i>
Llanos Amarillos (III)	Octubre de 2002***	Recolección de semillas de <i>R. bagnoldii</i>
Laguna del Maule (VII)	Marzo 2003 4	Recolección de semillas y bulbos de <i>R. montana</i>
Los Queñes (VII)	Marzo de 2003 5	Recolección de semillas de <i>R. rhodolirion</i>
Radal 7 tazas (VII)	Marzo de 2003 6	Recolección de semillas de <i>R. splendens</i>
Laguna del Maule (VII)	Marzo de 2004	Recolección de semillas de <i>R. montana</i>
Los Queñes (VII)	Marzo de 2004	Recolección de bulbos y semillas de <i>R. bagnoldii</i> . Muestra de suelo
Radal 7 tazas (VII)	Marzo de 2004	Recolección de semillas de <i>R. splendens</i>
Radal 7 tazas (VII)	agosto de 2004	Recolección de bulbos de <i>R. splendens</i> , mediciones de temperatura del suelo, intensidad luminosa, profundidad y tamaño de los bulbos

2.1.2.7 Registro de temperaturas máximas y mínimas diarias

Durante todo el periodo de realización del proyecto se registraron las temperaturas extremas diarias en la E/E Panguilemo a través de un sensor instalado dentro del invernadero, y en el invernadero del Campus Lircay a través de un termómetro de máxima y mínima. Los registros se adjuntan en el Anexo 2.

2.1.2.8 Envío de material vegetal

Se realizaron envíos periódicos de material vegetal a la Universidad Austral, el cual consistió en semillas y/o bulbos de las especies en estudio. Así mismo, se recibió periódicamente material vegetal proveniente de cultivo in vitro tanto de bulbos como de semillas de las especies estudiadas.

2.2 Principales problemas metodológicos enfrentados

2.2.1 Evaluación de métodos de crecimiento rápido de bulbos

El principal problema metodológico enfrentado fue la falta de material vegetal homogéneo para trabajar, en general se trabajó con pocas repeticiones y una cantidad de unidades experimentales mínima por tratamiento en cada ensayo. Durante el desarrollo del proyecto se descubrió que la especie *Rhodophiala rhodolirion* es muy difícil de trabajar, los bulbos recolectados presentaron una alta mortalidad, así como también aquellos obtenidos desde semilla, por lo que finalmente fue reemplazada del proyecto.

2.2.2 Cultivo de plantas poliploides

En general se realizó como estaba previsto el único inconveniente fue que las plantas poliploides presentaron baja sobrevivencia.

2.2.3 Evaluación de los poliploides incluida su floración

La evaluación de los poliploides en cuanto a su desarrollo vegetativo se realizó como estaba previsto, sin embargo, no fue posible evaluar la floración de éstos.

2.3 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto y explicación de estas modificaciones

2.3.1 Evaluación de métodos de crecimiento rápido de bulbos

Originalmente los riegos se realizarían con un fertilizante soluble completo con microelementos de SOQUIMICH, utilizando una solución con 80 ppm de nitrógeno. Finalmente los riegos se realizaron sólo con agua, excepto en los experimentos de aplicación de calor basal y fertilización en que se aplicó solución de Cooper, debido a que entrega una mayor cantidad de nutrientes.

2.3.2 Cultivo de plantas poliploides

En la propuesta original se planteó el uso de una mezcla de tierra de hojas y arena (1:1) o turba y arena (1:1) como sustrato para los bulbos poliploides, esta se reemplazó por una mezcla de turba y perlita (1:1), ya que esta proporciona una mejor aireación y tiene una mejor capacidad de retención de humedad.

2.3.3 Evaluación de los poliploides incluida su floración

La metodología indicaba que se llevaría un registro mensual de la evolución de las plantas con mediciones del número de hojas, esto se combinó con la medición del calibre de las plantas aproximadamente cada 6 meses.

3. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas

Actividades año 2002	ejecutadas	programadas	
Recolección de material en ambiente natural	si	si	
Siembra de semillas nuevas	si	si	
Evaluación de crecimiento y desarrollo de bulbos en invernadero climatizado versus no climatizado	si	si	
Siembra de semillas antiguas	si	si	
Experimentos de duración y calidad de la luz en bulbos poliploides	no	si	A esta fecha aún no se obtenían bulbos poliploides
Aclimatación de plántulas poliploides	no	si	A esta fecha aún no se obtenían plantas poliploides

Actividades año 2003	ejecutadas	programadas	
Recolección de material vegetal en ambiente natural	si	si	
Siembra de semillas nuevas	si	si	
Experimentos de duración y calidad de la luz en bulbos diploides	si	si	
Experimentos de exposición al frío	parcialmente	si	Sólo se realizó en bulbos de <i>R. rhodolirion</i>
Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	parcialmente	si	Las plantas poliploides obtenidas presentaron baja sobrevivencia
Aclimatación de plántulas poliploides	parcialmente	si	Las plantas poliploides obtenidas presentaron baja sobrevivencia

Actividades año 2004	ejecutadas	programadas	
Recolección de material vegetal en ambiente natural	si	si	
Siembra de semillas nuevas	si	si	
Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	si	si	
Aclimatación de plántulas poliploides	si	si	
Experimentos de exposición al frío	parcialmente	si	Sólo se realizó en bulbos de <i>R. montana</i>
Experimento de aplicación de calor basal	si	no	
Cruzamientos	si	no	
Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides	no	si	Aún no se ha obtenido floración de los poliploides obtenidos

Actividades año 2005	ejecutadas	programadas	
Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	si	si	
Aclimatación de plántulas poliploides	si	si	
Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides	no	si	No se ha obtenido floración de los poliploides inducidos
Establecimiento de banco de germoplasma	si	si	
Publicaciones			
Experimento de fertilización	si	no	
Experimento de aplicación de calor basal	si	no	

Actividades año 2006	ejecutadas	programadas	
Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides	no	si	No se ha obtenido floración de los poliploides
Cruzamientos	si	no	
Recuento de material vegetal	si	si	
Publicación en revista especializada	no	si	
Elaboración informe final	si	si	

4. Resultados del proyecto

4.1 Material vegetal

Al finalizar el proyecto se ha realizado un recuento general del material vegetal disponible en Talca, incluyendo bulbos de todas las especies estudiadas, provenientes del proyecto “Multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial”, recolectados durante la ejecución del proyecto y provenientes de cultivo in vitro. También, se realizó el recuento de semillas almacenadas, provenientes principalmente de las recolecciones en terreno. En este inventario se agregan los híbridos, plántulas y semillas producto de los cruzamientos realizados durante las temporadas 2004-2005 y 2005-2006. El detalle se presenta en el Anexo 1.

4.2 Cultivo en invernadero

4.2.1 Elección de la mejores condiciones térmicas para el crecimiento y desarrollo de los bulbos

R. montana: En las figuras 4.1 a 4.7, se muestra la evolución en el número de hojas en plantas de *R. montana* de diferentes calibres, medidas durante el periodo de ejecución del proyecto. Las plantas cultivadas en el invernadero de la E/E Panguilemo presentaron un desarrollo de área foliar levemente mayor que las cultivadas en el invernadero del Campus Lircay, con excepción del calibre 6/7, en que esto no se aprecia claramente. En general, se observó una periodicidad en la aparición de hojas con un máximo en primavera, entre septiembre y noviembre independiente del invernadero en que crecieron. En calibres menores a 6/7, se observó otro periodo de máxima producción de

hojas a comienzos de verano. Aparentemente esta especie presenta en cultivo un pequeño periodo de receso a fines de verano.

R. splendens: En la figuras 4.8 a 4.12 Se observa la evolución en el número de hojas por planta. Prácticamente no hubieron diferencias entre ambos invernaderos, la producción de hojas fue muy similar. El mayor número de hojas se observó en primavera, además, se observó una pequeña alza entre marzo y mayo (dependiendo del calibre). Ambos periodos fueron seguidos de otro con escasa o nula producción de hojas.

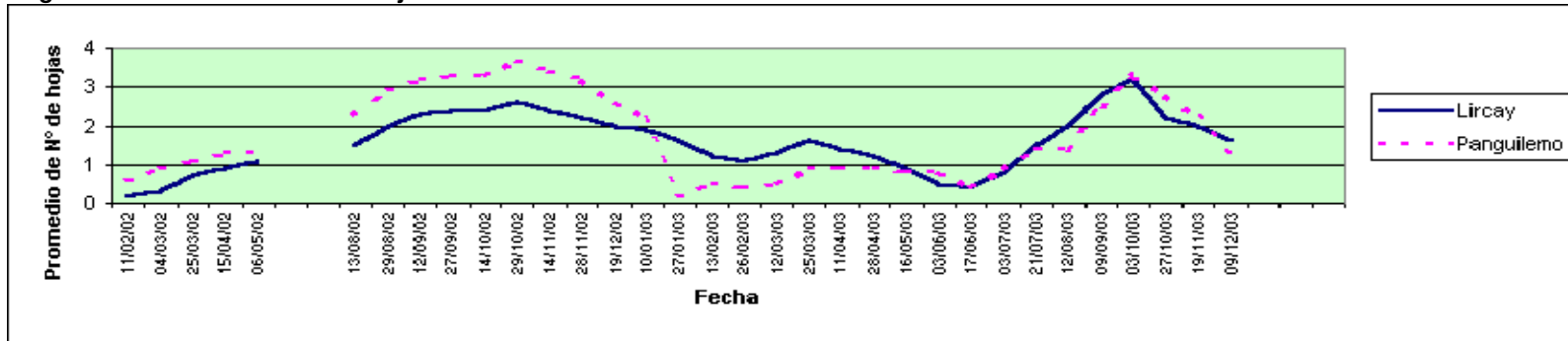
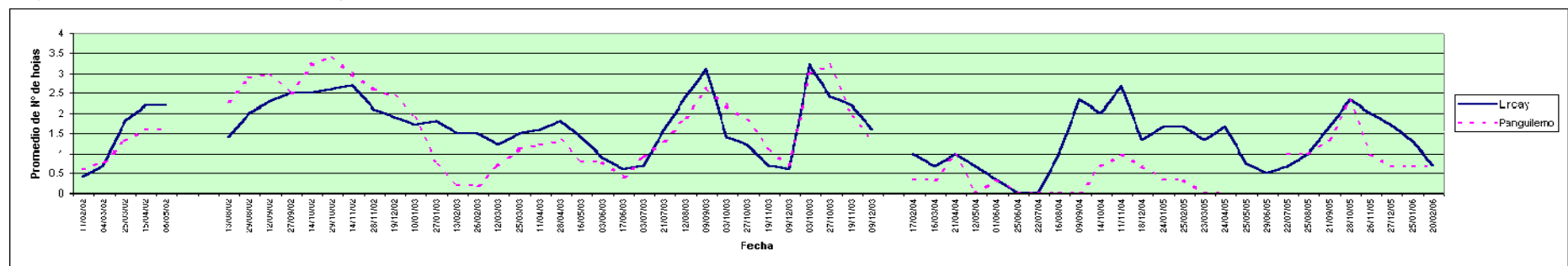
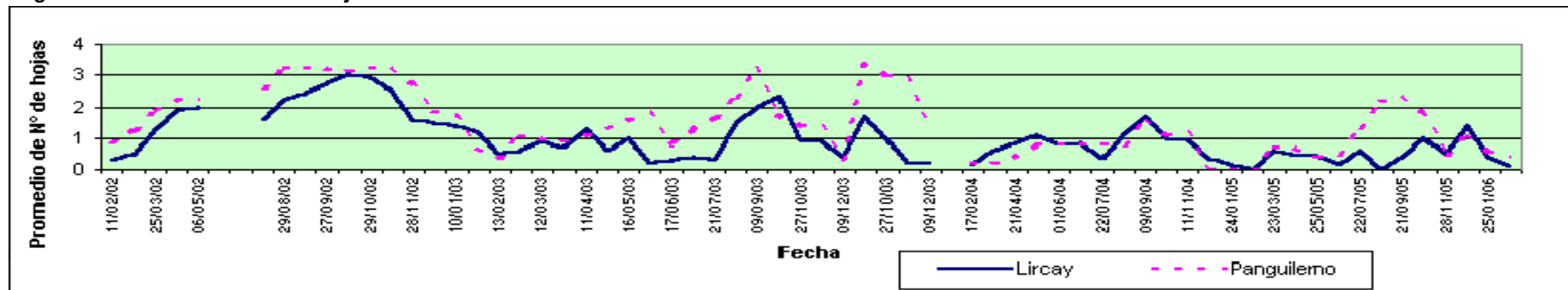
Figura 4.1 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 1/2 años 2002 a 2003Figura 4.2 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 2/3 años 2002 a 2006Figura 4.3 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 3/4 años 2002 a 2006

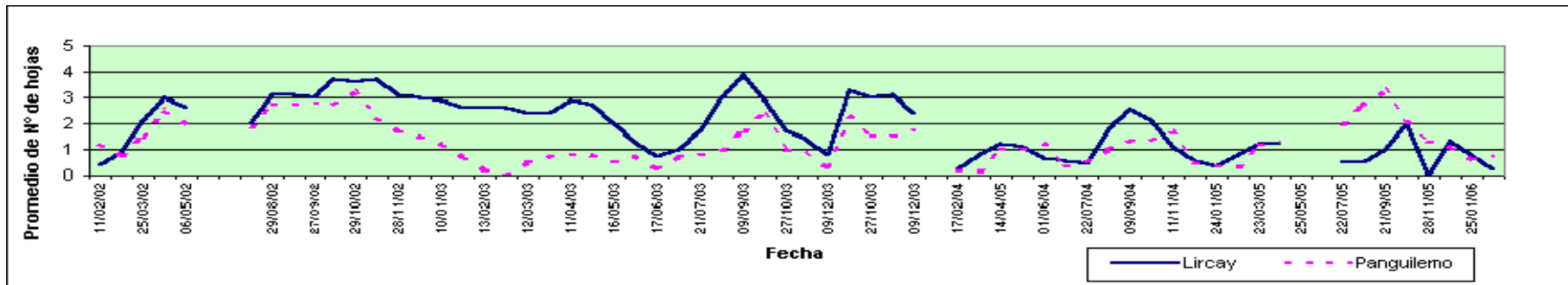
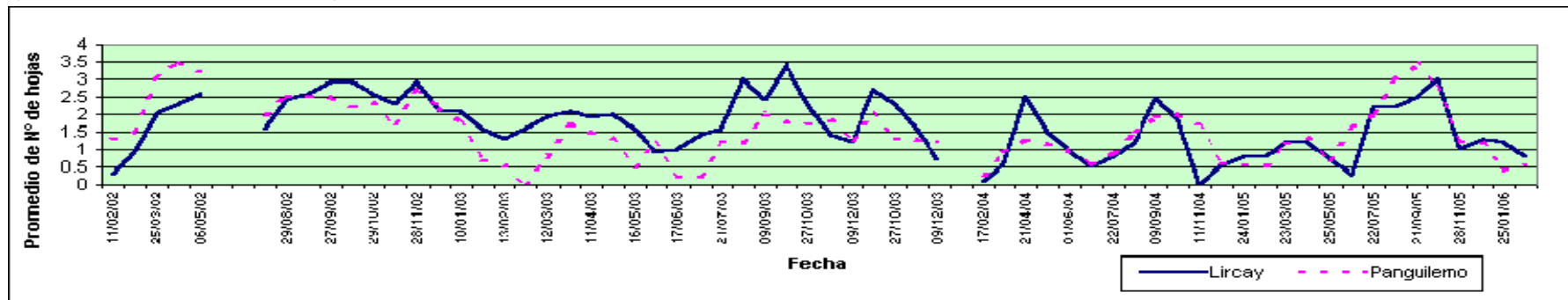
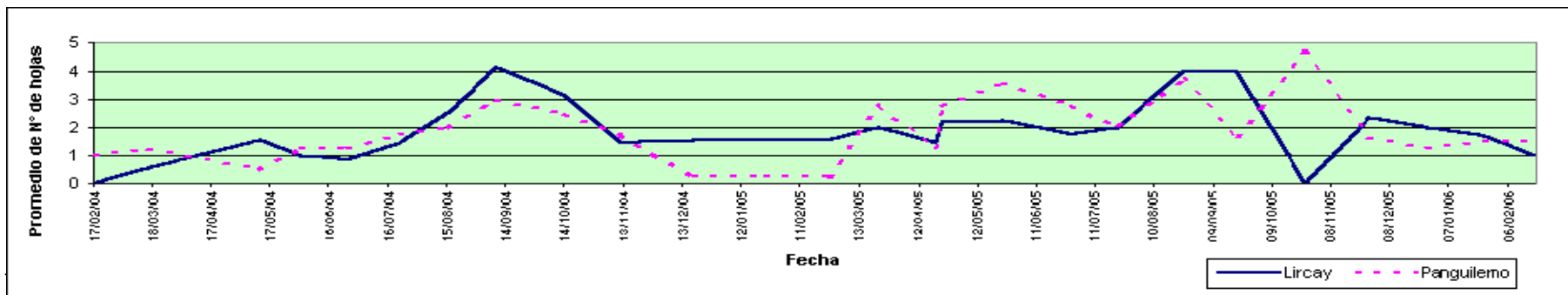
Figura 4.4 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 4/5 años 2002 a 2006Figura 4.5 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 5/6 años 2002 a 2006Figura 4.6 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 6/7 años 2004 a 2006

Figura 4.7 Promedio de N° de hojas en *R. montana* calibre 7/8 años 2004 a 2006

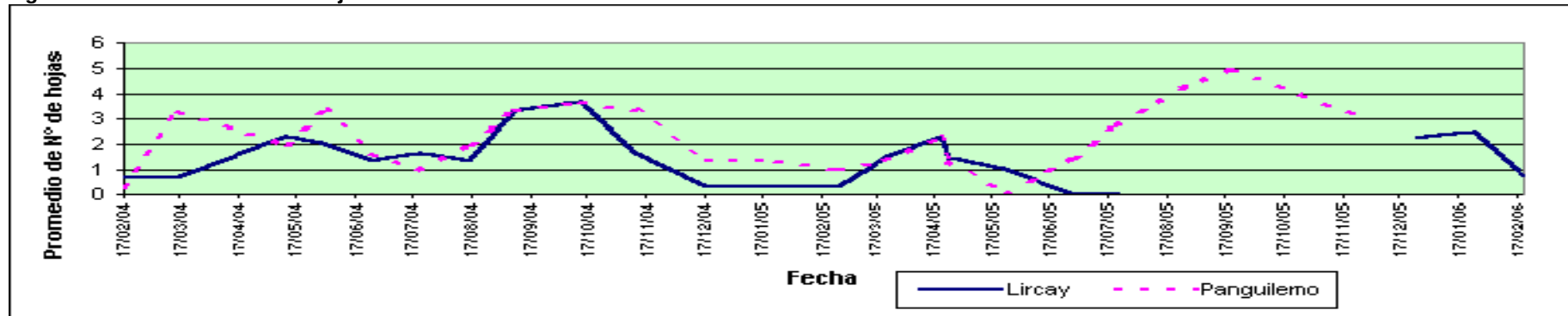


Figura 4.8 Promedio de N° de hojas en *R. splendens* calibre 1/2 años 2002 a 2004

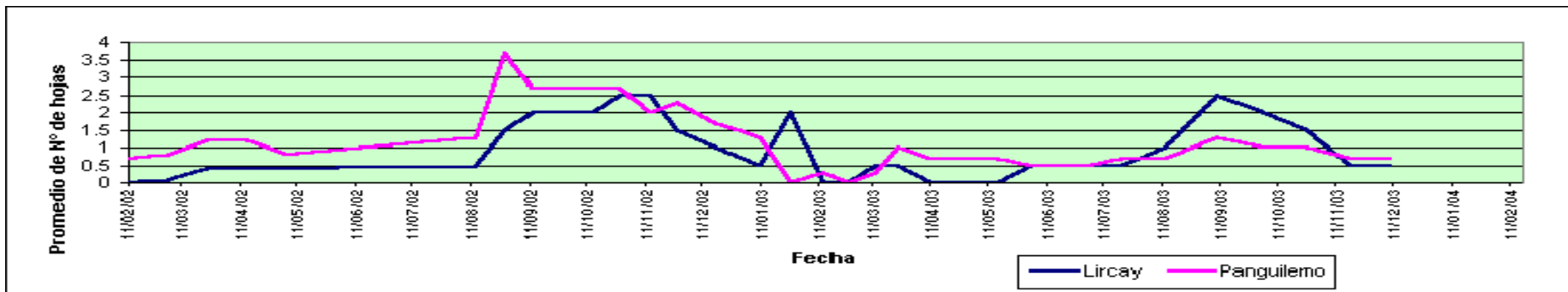


Figura 4.9 Promedio de N° de hojas en *R. splendens* calibre 2/3 años 2002 a 2006

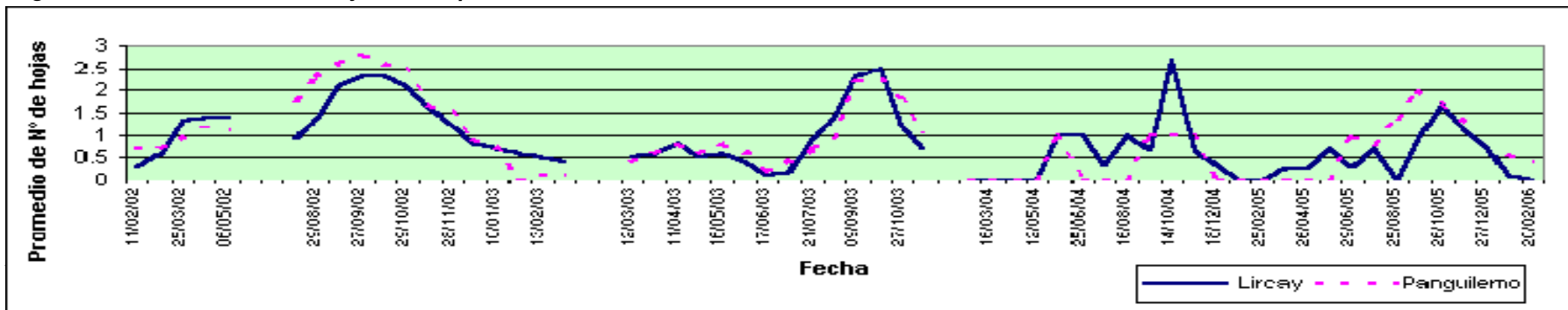


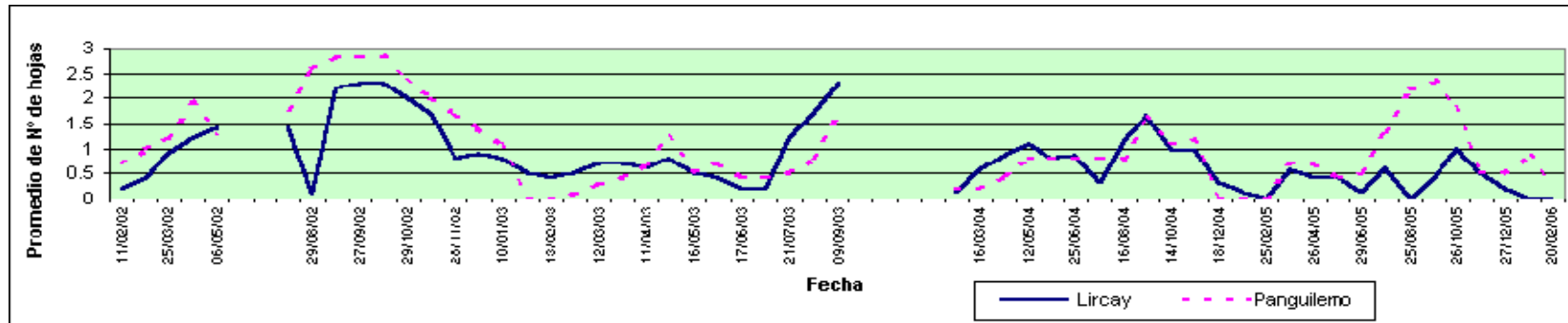
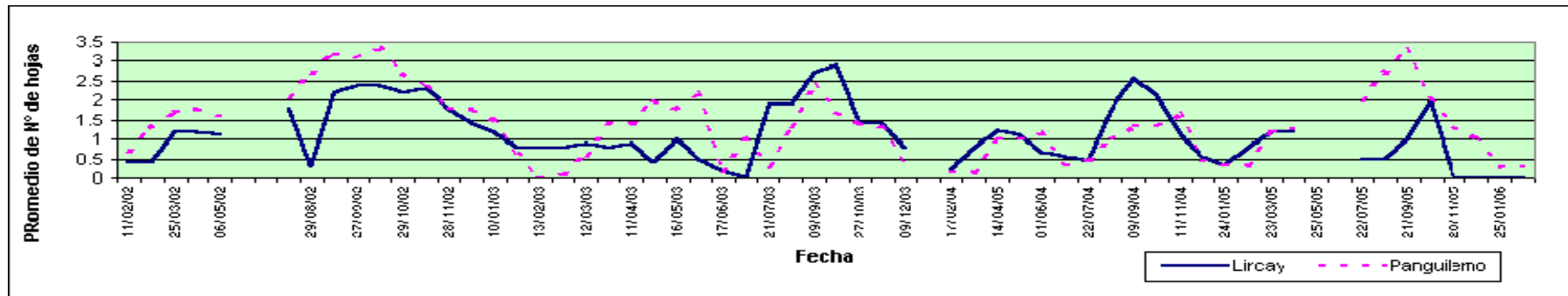
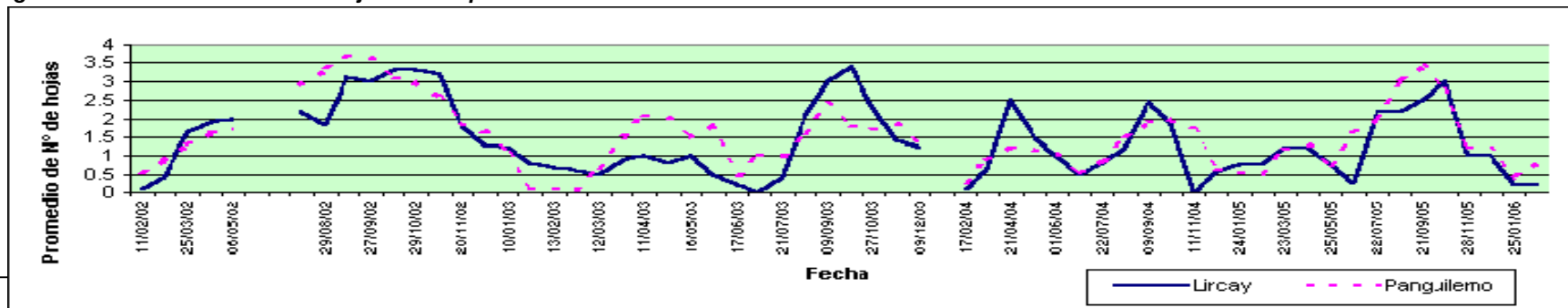
Figura 4.10 Promedio de N° de hojas en *R. splendens* calibre 3/4 años 2002 a 2006Figura 4.11 Promedio de N° de hojas en *R. splendens* calibre 4/5 años 2002 a 2006Figura 4.12 Promedio de N° de hojas en *R. splendens* calibre 5/6 años 2002 a 2006

Figura 4.13 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 1/2 años 2002 a 2003

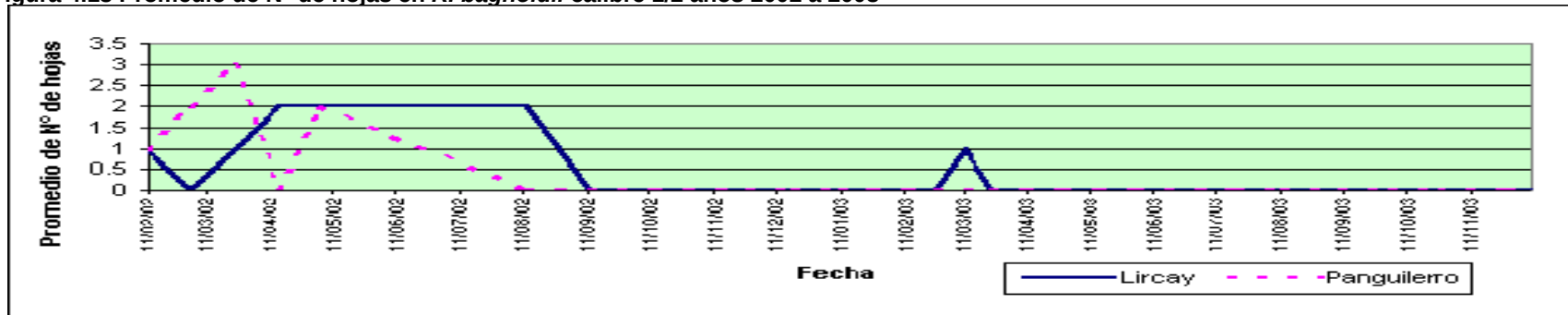


Figura 4.14 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 2/3 años 2002 a 2003

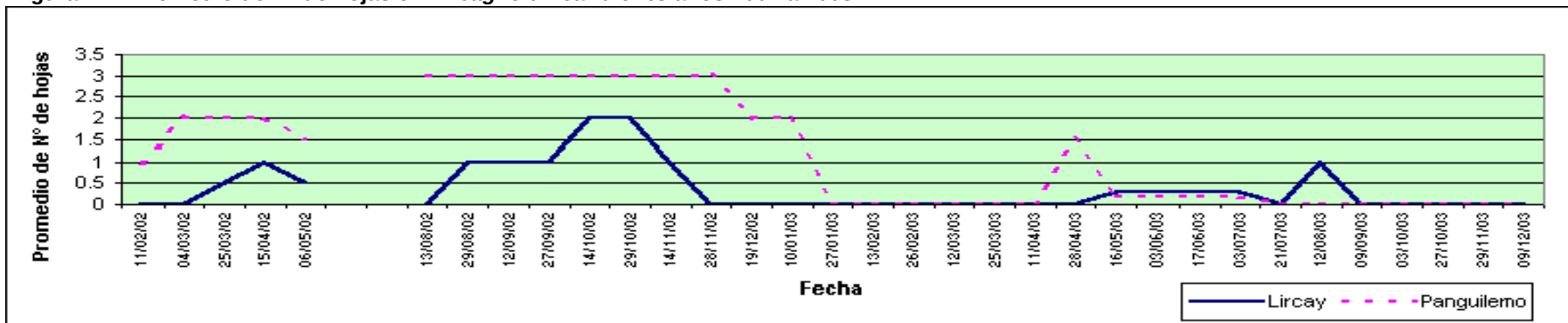


Figura 4.15 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 3/4 años 2002 a 2006

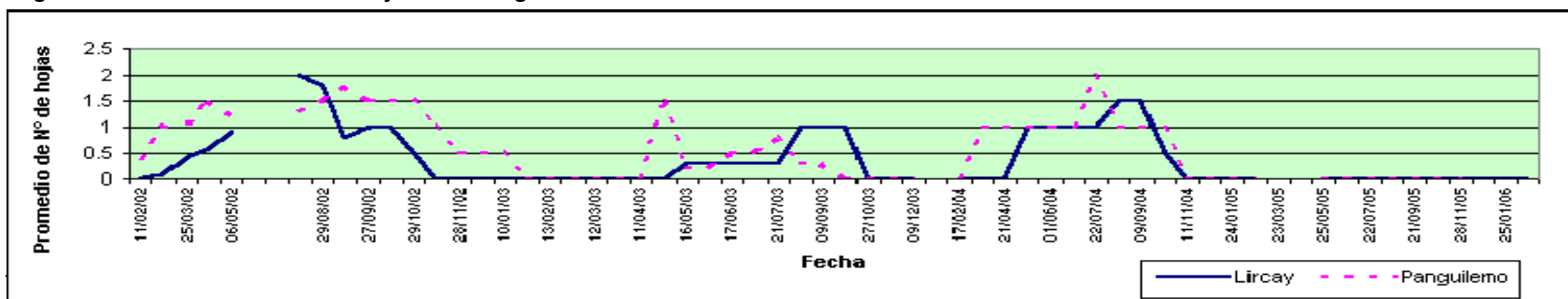


Figura 4.16 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 4/5 años 2002 a 2006

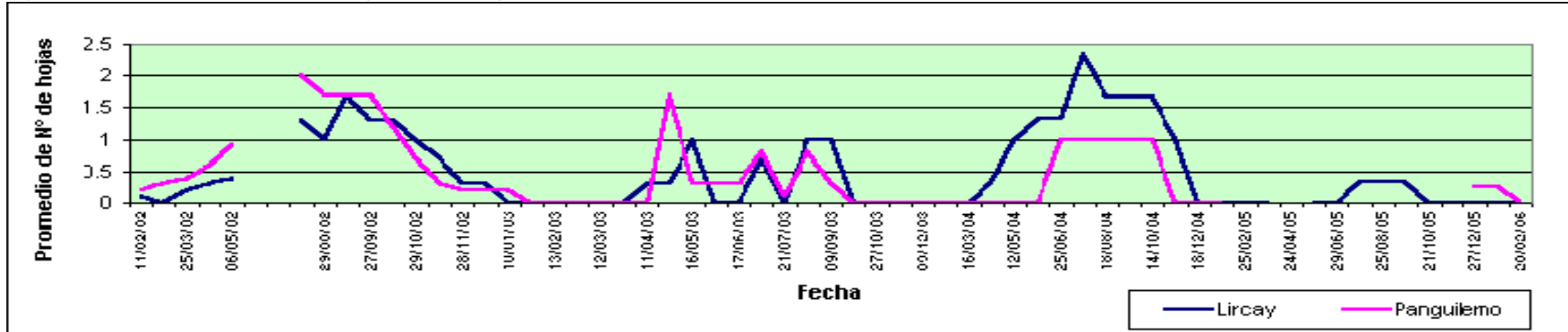


Figura 4.17 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 5/6 años 2002 a 2006

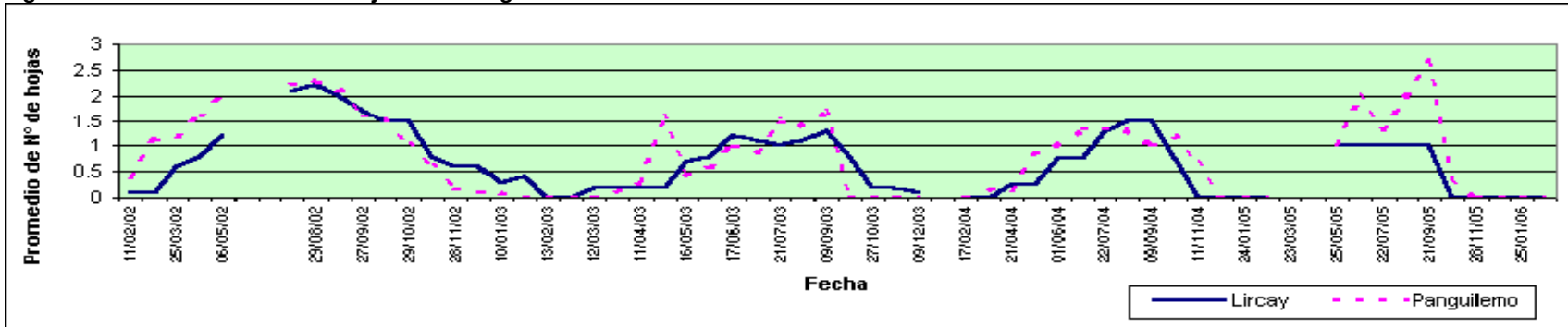


Figura 4.18 Promedio de N° de hojas en *R. bagnoldii* calibre 6/7 años 2004 a 2006

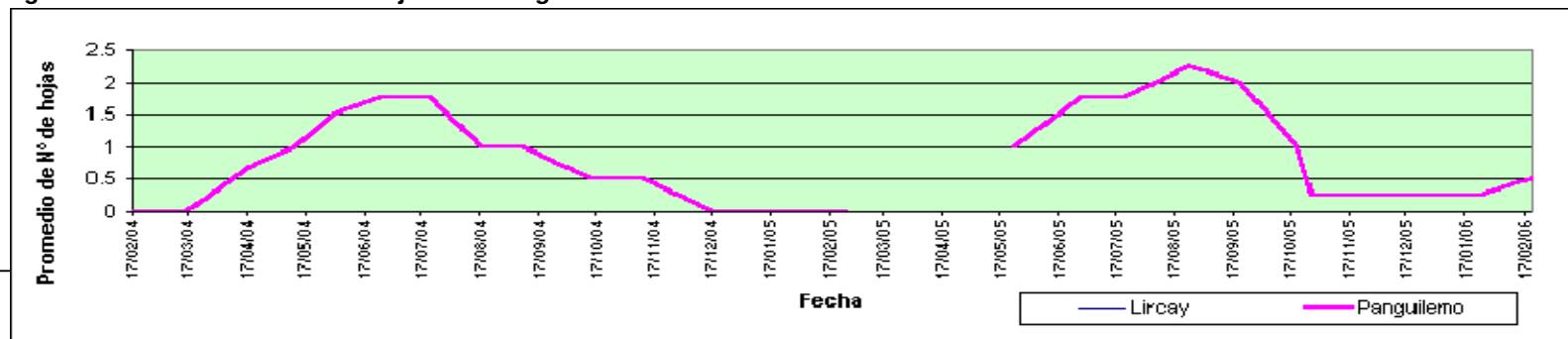


Figura 4.19 Promedio de N° de hojas en *R. rhodolirion* calibre 3/4 años 2002 a 2003

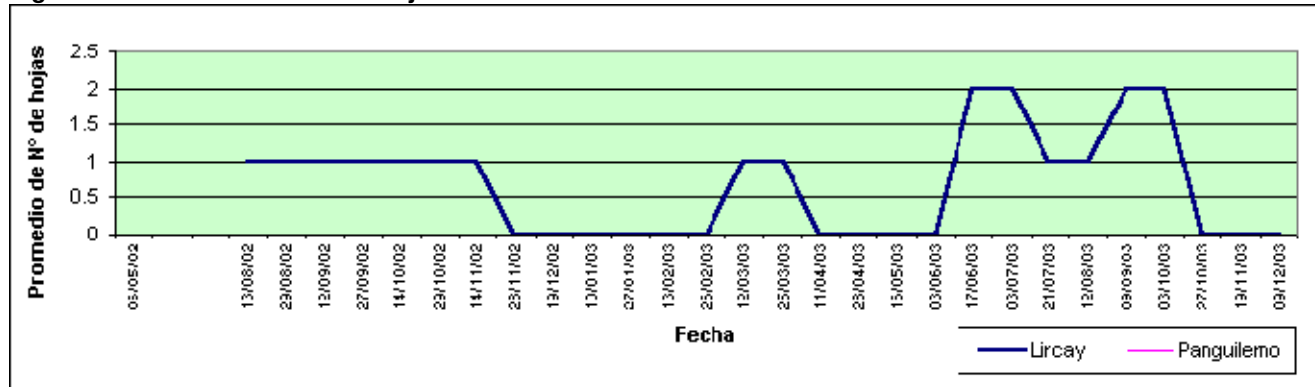
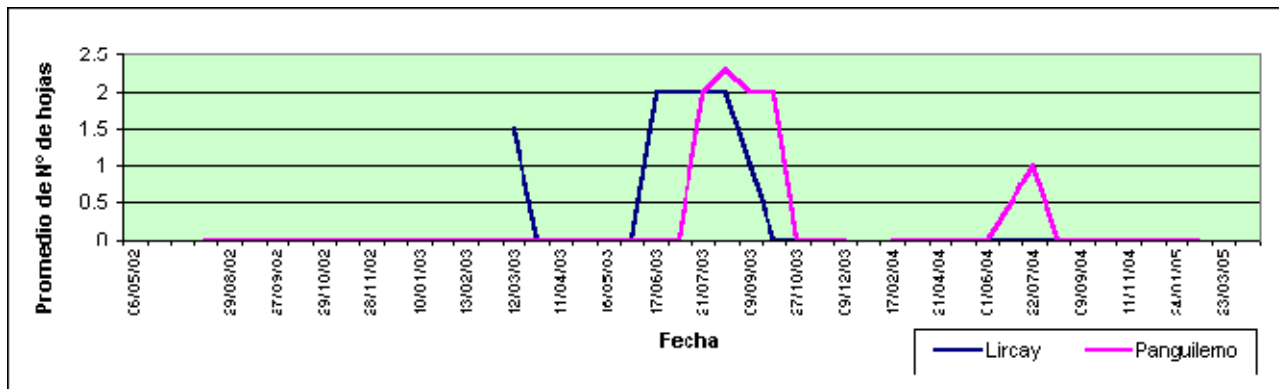


Figura 4.20 Promedio de N° de hojas en *R. rhodolirion* calibre 4/5 años 2002 a 2005



R. bagnoldii: En las figuras 4.13 a 4.18 se observa la evolución en el número de hojas para diferentes calibres, éste fue levemente mayor en el invernadero de la E/E Panguilemo. Se apreció que el máximo número de hojas se produce entre fines de invierno y principios de primavera, con un marcado receso en los meses de verano. En casi todos los calibres, excepto 6/7, se observó una leve alza otoñal, la cual podría indicar una mayor periodicidad en el desarrollo de los bulbos.

R. rhodolirion: No se observó claramente cual fue el mejor ambiente para el crecimiento de las plantas. En las figuras 4.19 y 4.20 se observa que las plantas mostraron 2 o 3 alzas marcadas en el número de hojas durante el periodo de registro, también se observa un marcado receso en verano y otro mínimo entre abril y mayo.

Durante su ciclo de crecimiento y desarrollo las plantas muestran un ritmo constante de producción de hojas y yemas florales. En la naturaleza, estas plantas florecen una vez al año, por lo cual, es probable que durante un año (o una temporada) las plantas desarrollen primero hojas y posteriormente yemas florales (aunque esta puedan ser o no emitidas), para luego entrar a un periodo de receso más o menos largo. La periodicidad que muestran estas especies con más de un máximo en el número de hojas por planta por temporada, podría ser un indicio de que este ciclo de desarrollo sucede en plantas cultivadas más de una vez por año, con lo cual se podría cambiar la época de floración, lo que se ha observado en las especies *R. montana* y *R. bagnoldii*. Sería interesante estudiar en qué momento se forma la vara floral y cuales son los factores que determinar la floración de las especies.

4.2.2 Experimentos de duración y calidad de la luz

El Cuadro 4.1 se muestran los resultados obtenidos en diciembre del año 2002 luego de 6 meses de tratamiento con diferentes intensidades de iluminación y fotoperiodo. El efecto sobre el diámetro ecuatorial fue significativo sólo en el caso de *R. splendens* siendo mayor en los tratamientos en los tratamientos sin luz artificial, con luz continua y con interrupción nocturna que con el uso de luz complementaria. El efecto sobre el peso del bulbo y sobre en N° de raíces no fue significativo en ninguna de las especies. El efecto sobre el número de hojas fue significativo sólo en la especie *R. splendens* siendo mayor en el tratamiento con interrupción nocturna, pero no distinto de los tratamientos sin luz artificial y con luz continua los que a su vez fueron mayores pero no diferentes estadísticamente del tratamiento con luz complementaria.

En la especie *R. bagnoldii* no se obtuvo en el momento de la cosecha suficiente material para realizar análisis estadístico.

Cuadro 4.1 Efecto de los tratamientos de luz aplicados sobre el diámetro, peso y N° de raíces en 3 especies de *Rhodophiala*

Tratamiento	<i>R. splendens</i>				<i>R. montana</i>				<i>R. rhodolirion</i>			
	Diám. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Sin luz artificial	6,34 a	1,38	3,83	1,54 ab	5,71	1,14	3,85	1,67	5,14	0,3	0,84	0
Luz continua	6,42 a	1,37	4,18	1,25 ab	6,13	1,41	3,95	1,5	5,15	0,26	1,04	0
Interrupción nocturna	6,24 a	1,54	4,15	1,83 a	5,64	0,96	3,72	1,87	5,14	0,26	1	0
Luz complementaria	5,7 b	0,99	3,65	1,13 b	5,41	0,97	3,74	1,38	4,83	0,27	0,87	0
significancia	*	n. S.	n. S.	*	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.

Los resultados obtenidos el año 2003 son parecidos, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, como se muestra en el Cuadro 4.2, excepto en la variable peso de bulbo para la especie *R. splendens*, en que se obtuvo un mayor peso promedio en bulbos tratados con luz artificial. Para la especie *R. bagnoldii* el diámetro ecuatorial fue significativamente mayor en los bulbos tratados con luz artificial.

En el cuadro 4.3 se muestra el efecto sobre las variables N° de hojas por planta y N° de raíces por planta. Como se aprecia, tampoco existieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, excepto en la especie *R. bagnoldii*, en que el N° de hojas fue significativamente mayor en las plantas tratadas con luz artificial.

Cuadro 4.2 Efecto de los tratamientos aplicados sobre el diámetro ecuatorial, longitudinal y peso en 4 especies de *Rhodophiala*

Tratamiento	R. splendens			R. montana			R. rhodolirion			R. bagnoldii		
	Diam. Ecuat. (mm)	Diam. long. (mm)	Peso (g)	Diam. Ecuat. (mm)	Diam. long. (mm)	Peso (g)	Diam. Ecuat. (mm)	Diam. long. (mm)	Peso (g)	Diam. Ecuat. (mm)	Diam. long. (mm)	Peso (g)
Sin luz artificial	4,78	18,26	0,46	4,83	14	0,51	5,46	25,12	0,51	5,06	20,76	0,38
Con luz artificial	4,8	18,37	0,52	4,96	15,1	0,51	5,47	15,7	0,53	5,34	22,2	0,4
	n. S.	n. S.	*	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	*	n. S.	n. S.

Cuadro 4.3 Efecto de los tratamientos aplicados sobre el N° de raíces y N° de hojas en 4 especies de *Rhodophiala*

Tratamiento	R. splendens		R. montana		R. rhodolirion		R. bagnoldii	
	N° de raíces	N° de hojas	N° de raíces	N° de hojas	N° de raíces	N° de hojas	N° de raíces	N° de hojas
Sin luz artificial	3,52	0,6	3,18	0,72	1,29	0,015	1,86	0,14
Con luz artificial	3,53	0,8	3,23	0,72	1,54	0,015	1,94	0,22
	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	*

4.2.3 Experimentos de aplicación de calor basal

En el Cuadro 4.4 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de aplicación basal realizado el año 2004. En general, el factor que más se vio afectado por la aplicación de los tratamientos fue el diámetro del bulbo, el cual fue significativamente mayor en los bulbos de *R. montana*, *R. bagnoldii* y el clon MB130 de *R. montana* tratados con calor basal. También, se observó un efecto significativo sobre el peso, siendo este valor mayor en los bulbos de *R. montana*, *R. splendens* y *R. bagnoldii* tratados con calor basal. El número de hojas sólo fue significativamente diferente en la especie *R. bagnoldii*, siendo mayor en los bulbos tratados con calor basal.

Cuadro 4.4 Efecto del calor basal sobre diámetro ecuatorial, peso, N° de hojas y N° de raíces en 3 especies de *Rhodophiala* y el Clon MB 130 de *R. montana*. Ensayo año 2004

Tratamiento	R. montana				R. splendens				R. bagnoldii				R. montana Clones MB130			
	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Con calor basal	9,1 a	4,3 a	4,5	2,36	6,7	3,2 a	4,3 a	2,1	7,0 a	2,2 a	4,4	1,4	8,1 a	2,2	4,4	1,4
Sin calor basal	8,2 b	3,8 b	4,8	2,53	6,3	2,5 b	3,6 b	1,8	6,0 b	1,7 b	4	1,8	6,1 b	1,8	4	1,8
Significancia	*	*	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	n. S.	*	*	n. S.	n. S.	*	n. S.	n. S.	n. S.

Como puede observarse en los cuadros 4.5 a 4.7 los resultados obtenidos el año 2005 confirman en parte que las variables que se ven afectadas mayormente por efecto de los tratamientos son el diámetro y el peso del bulbo. Aunque las

diferencias obtenidas en los promedios para los distintos tratamientos aplicados son en algunos casos mayores que las encontradas en el ensayo anterior, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre ellos, probablemente debido a que el material vegetal fue más heterogéneo y en menor cantidad que el usado el año 2004, cuando todas las plantas provenían de almácigos realizados en la misma época o de cultivo in vitro.

Cuadro 4.5 Efecto del calor basal sobre diámetro ecuatorial, peso, N° de hojas y N° de raíces en *Rhodophiala*. Ensayo año 2005

Tratamiento	C. inicial 2/3 semillas UTAL				C. inicial 3/4 semillas UTAL				C. inicial 7/8 Proy. Bulbosas			
	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Con calor basal	20.9	12.37	2.29	2.57	25.06	16.06	4.6	3.2	25.3	21.6	5.7	4.0
Sin calor basal	22.29	16.92	3.57	3.0	18.48	9.25	4.0	2.67	24.47	21.1	4.4	3.3
Significancia	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Cuadro 4.6 Efecto del calor basal sobre diámetro ecuatorial, peso, N° de hojas y N° de raíces en *Rhodophiala montana* proveniente de cultivo in vitro y Clon MB 130. Ensayo año 2005

Tratamiento	C. inicial 3/4 escamas in vitro				C. inicial 3/4 microbulbillos			
	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Con calor basal	21.26	5.4	13.8	5.4	17.81	14.5	2.36	1.85
Sin calor basal	15.96	2.8	2.8	2.8	18.08	8.0	1.38	1.23
Significancia	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Cuadro 4.7 Efecto del calor basal sobre diámetro ecuatorial, peso, N° de hojas y N° de raíces en *Rhodophiala splendens* y *R. bagnoldii*. Ensayo año 2005.

Tratamiento	<i>R. splendens</i>								<i>R. bagnoldii</i>			
	C. inicial 2/3 semillas UTAL				C. inicial 4/5 semillas UTAL				C. inicial 2/3 semillas UTAL			
	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diam. ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Con calor basal	14.85	6.98	3.27	1.36	15.12	7.06	2.5	1.21	11.55	3.78	1.5	0.8
Sin calor basal	16.56	9.99	3.1	1.3	15.46	6.14	1.8	1.4	12.45	4.99	1.86	0.57
Significancia	n. s.	*	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

4.2.4 Experimentos de exposición al frío

En las figuras 4.21 a 4.24 se observa el comportamiento de las plantas sometidas a distintos tratamientos de frío. Las plantas mantenidas en el Campus Lircay tuvieron un comportamiento muy parecido a las mantenidas en la E/E Panguilemo. El periodo de máxima emisión de hojas se registró entre mayo y septiembre, y el periodo vegetativo se extendió hasta fines de diciembre excepto en los bulbos tratados con 7 semanas de frío mantenidos en el invernadero de la E/E Panguilemo, de ambos calibres. No se observó efecto positivo sobre la floración, ya que, sólo una planta floreció, perteneciente al calibre 12/14 sin frío mantenida

en el invernadero de la E/E. Al momento de la cosecha, la mayoría de los bulbos mantuvo su calibre inicial.

Figura 4.21 Evolución en el número de hojas por bulbo de *R. rhodolirion* calibre 10/12 sometidos a diferentes periodos de frío, mantenidos en el invernadero del Campus Lircay

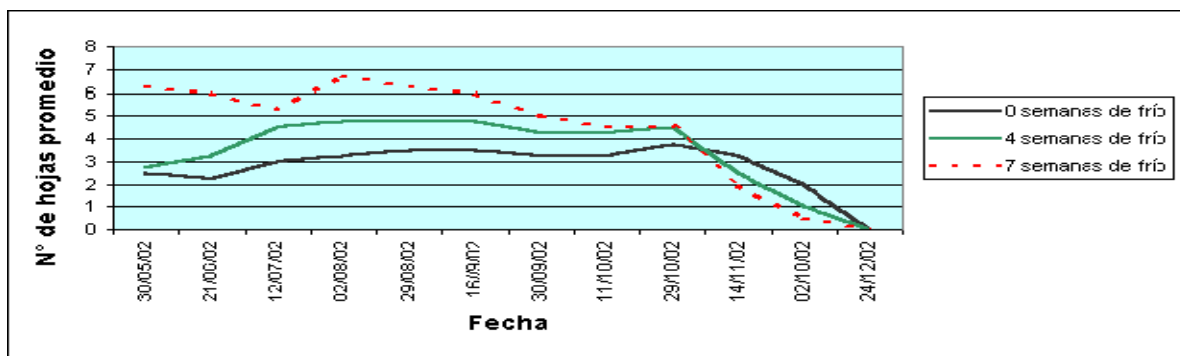


Figura 4.22 Evolución en el número de hojas por bulbo de *R. rhodolirion* calibre 10/12 sometidos a diferentes periodos de frío mantenidos en el invernadero de la E/E Panguilemo

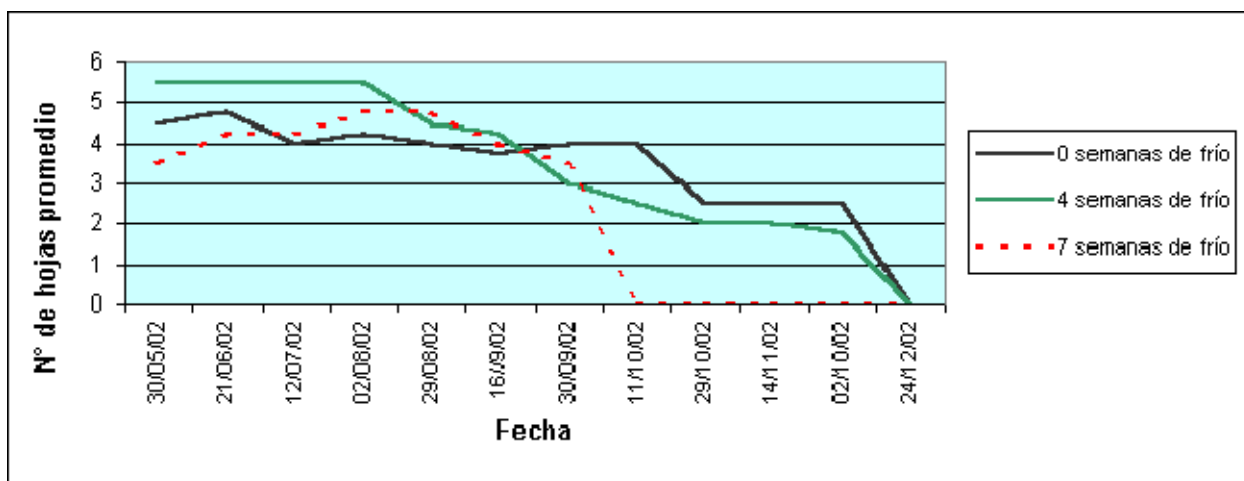


Figura 4.23 Evolución en el número de hojas por bulbo de *R. rhodolirion* calibre 12/14 sometidos a diferentes periodos de frío mantenidos en el Campus Lircay

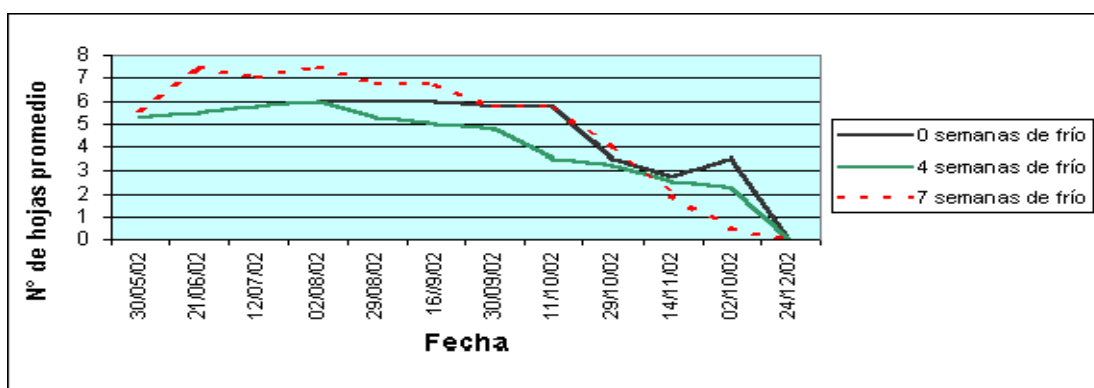


Figura 4.24 Evolución en el número de hojas por bulbo de *R. rhodolirion* calibre 12/14 sometidos a diferentes periodos de frío mantenidos en el invernadero de la E/E Panguilemo.

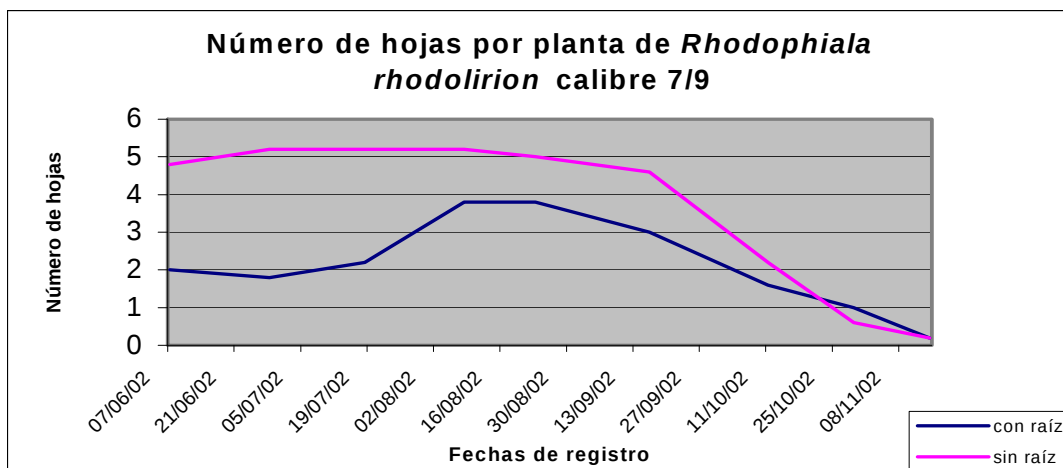
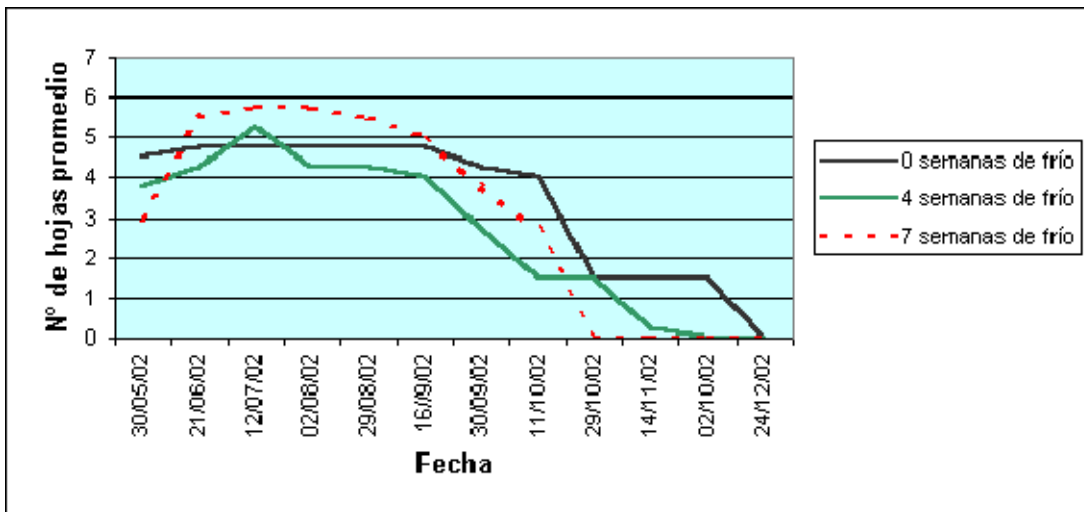
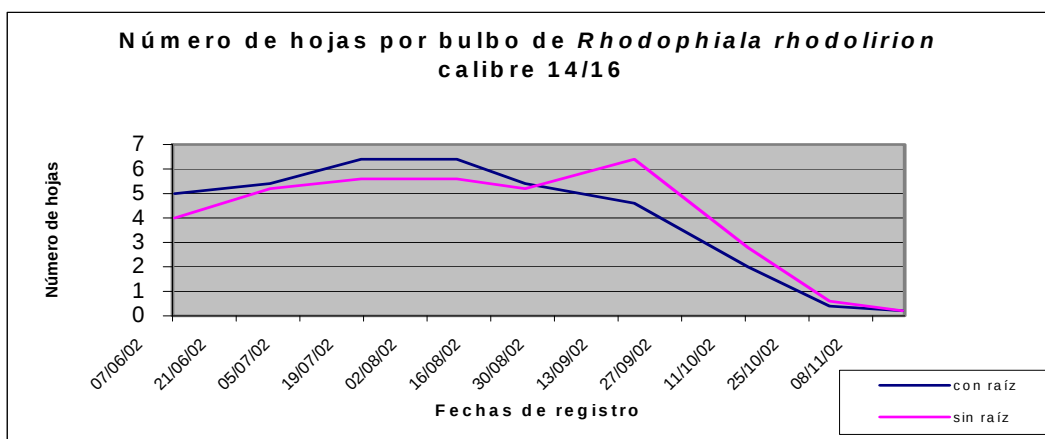


Figura 4.25 N° de hojas por planta de *R. rhodolirion* calibre 7/9 sometidos a 6 semanas de frío plantados con y sin raíz.

En el segundo experimento realizado en *R. rhodolirion*, donde los bulbos fueron plantados con y sin raíz se registró un comportamiento mas o menos similar en los dos calibres estudiados, el máximo número de hojas se produjo en agosto. Cabe destacar que la primera medición registrada corresponde al número de hojas que las plantas tenían al momento de comenzar el experimento, y que los bulbos calibre 7/9 plantados sin raíz desarrollaron un mayor número de hojas en promedio que los plantados con raíz. En el caso del calibre 14/16 las plantas con y sin raíz alcanzaron un máximo sobre 6 hojas por planta, primero las plantas con raíz y luego las plantas sin raíz. No se registró un efecto positivo sobre la floración.

Figura 4.26 N° de hojas por planta de *R. rhodolirion* calibre 14/16 sometidos a 6 semanas de frío plantados con y sin raíz.



En el experimento de aplicación de frío en *R. montana*, los bulbos calibre 6/10 con frío presentaron siempre un mayor número de hojas que los bulbos sin frío, en cambio, los bulbos de calibres 10/14 sin frío presentaron un mayor número de hojas, los bulbos sometidos a frío se mantuvieron con un bajo número de hojas y hacia el final del periodo de registro este valor comenzó a aumentar.

Figura 4. 27 Número de hojas por bulbo de *Rhodophiala montana* calibre 6/10 sometidos a dos tratamientos de frío antes de plantar en Lircay

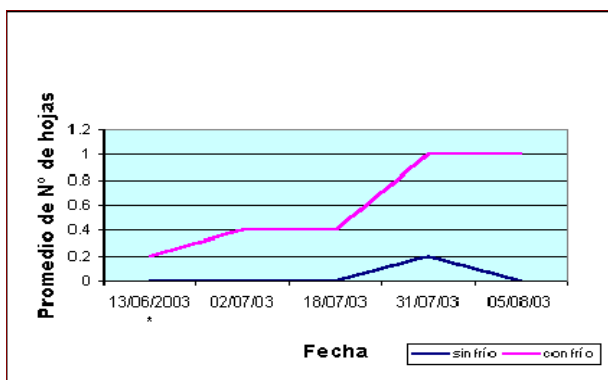
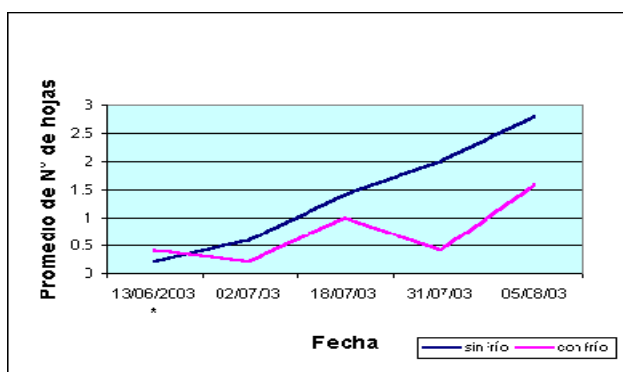


Figura 4. 28 Número de hojas por bulbos de *Rhodophiala montana* calibre 10/14 sometidos a dos tratamientos de frío antes de plantar en Lircay



De los resultados obtenidos en estos experimentos se deduce que el frío tiene cierta influencia en el comportamiento de las plantas, es posible, que este vaya relacionado con otros factores ambientales los cuales no han sido estudiados aun, siendo esta la razón de que las respuestas obtenidas sean tan variables.

4.2.5 Experimento de fertilización

Los resultados obtenidos no muestran un efecto claro del nivel de fertilización sobre las variables estudiadas (Cuadro 4.8). En general, las respuestas a la fertilización varían según la especie. En *R. montana*, en los bulbos de calibre 1/2 es donde se obtuvo una mejor respuesta con diferencias significativas en el peso del bulbo y número de hojas y altamente significativa en el N° de raíces, siendo estos valores mayores en aquellos bulbillos fertilizados al doble de la dosis normal. No hubo diferencias significativas en el diámetro entre los tratamientos. En el caso del peso y número de hojas, los valores obtenidos con el doble de la dosis de

fertilizante no fueron significativamente distintos de los obtenidos con la dosis normal.

Cuadro 4.8 Efecto del nivel de fertilización sobre el diámetro, peso, N° de hojas por bulbo y N° de raíces en bulbillos producidos in vitro de *R. montana*. Evaluados después de 5 meses de cultivo.

Tratamiento	Origen Semillas calibre 1/2				Origen Semillas calibre 2/3				Origen Bulbos calibre 0/1				Origen bulbos calibre 1/2			
	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat. (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° raíces	N° de hojas
Sin fertilización	8,04	1,44	2,4	1,2	11,95	3,27	0,75	4,5	7,18	1,33	1,4	2,6	8,1	1,2b	1,2a b	2,3b
Con dosis normal	7,76	1,96	3	0,6	10,47	2,02	0,33	2,33	8,6	2,3	0	5	8,3	1,74ab	0,4b	3,4ab
Doble de la dosis	7,5	1,45	2,5	0,86					7	1,3	2	2	11,02	3,4a	2,8a	4,7a
Significancia	n. s.	n.s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	*	**	*

n. s. : No significativo; *: significativo Test de Duncan $p \leq 0,05$, ** altamente significativo, Test de Duncan $p \leq 0,01$

En *R. bagnoldii* también se observa un aumento del diámetro a dosis crecientes de fertilizante, el cual no es estadísticamente significativo, y no se replica en las demás variables.

Cuadro 4.9 Efecto del nivel de fertilización sobre el diámetro, peso, N° de hojas por bulbo y N° de raíces en bulbillos producidos in vitro de *R. bagnoldii*. Evaluados después de 5 meses de cultivo.

Tratamiento	Origen Semillas calibre 1/2				Origen Semillas calibre 2/3			
	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Sin fertilización	6,2	0,57	1	1	8,7	1,5	0,5	2,25
Con dosis normal	7,8	1,3	0,8	1,8	6,95	1,2	0,5	0,5
Doble de la dosis	8,2	1,2	1	1,7	9,25	1,5	0,7	1,3
Significancia	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. No significativo

En *R. splendens* tampoco hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 4.10 Efecto del nivel de fertilización sobre el diámetro, peso, N° de hojas por bulbo y N° de raíces en bulbillos producidos in vitro de *R. splendens*. Evaluados después de 5 meses de cultivo.

	<i>Origen Semillas calibre 1/2</i>			
Tratamiento	Diám. Ecuat (mm)	Peso (g)	N° de raíces	N° de hojas
Sin fertilización	7,9	1,4	1	2,8
Con dosis normal	8,3	1,3	0,7	1,7
Doble de la dosis	8,2	1,8	0,6	1,8
Significancia	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

n. s. No significativo

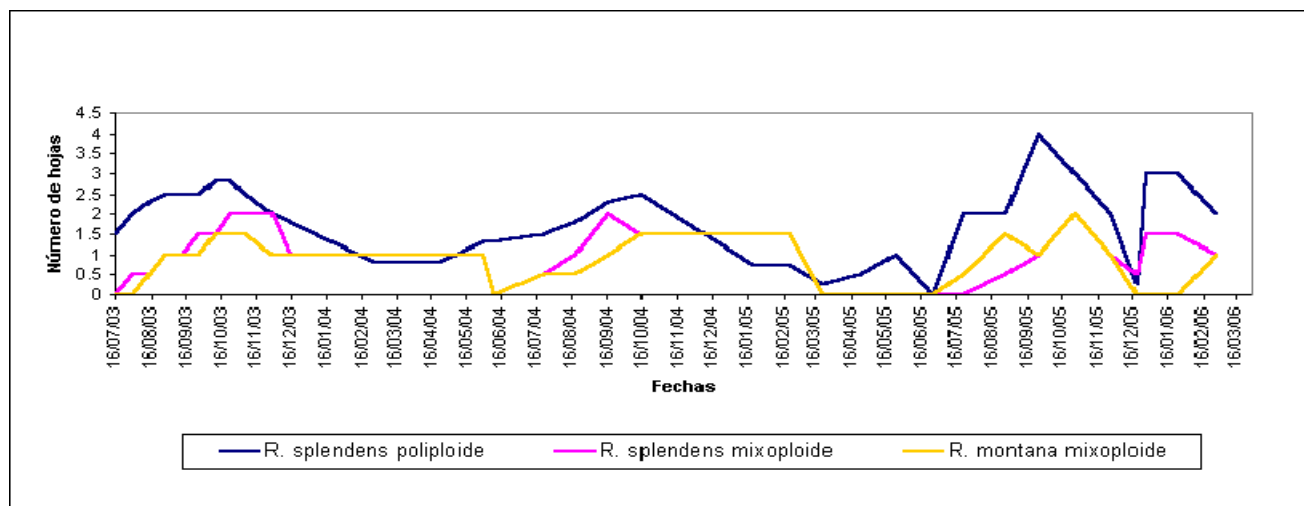
Al momento de la evaluación algunas plantas presentaron un gran desarrollo radicular, el cual en estos casos es responsable en gran parte del peso del bulbo, que incluyó el peso de las raíces.

La variabilidad en las respuestas obtenidas a la fertilización, podría indicar que las plantas presentan adaptaciones a suelos pobres en nutrientes o que poseen un metabolismo muy eficiente para el uso de éstos. También puede ser que estuvieron poco tiempo con el programa de fertilización, o que el efecto de la fertilización no se detecta en forma inmediata. Se podría extender el estudio a dos temporadas

4.2.6 Manejo de bulbos provenientes de cultivo in Vitro

Desde el primer envío de bulbos, el año 2003 se han realizado registros del comportamiento de este material y su evolución. En la figura 4.29 se observa la evolución del número de hojas desde que llagaron las plantas hasta la fecha de cierre del informe, los bulbos poliploides (1 en la actualidad) mostraron un mayor desarrollo de hojas alcanzando en el último periodo un máximo de 4 hojas por planta. *R. splendens* es una especie que florece bajo cultivo en diciembre, cuando las hojas aun están presentes, después junto con la fructificación se produce un descenso en la emisión de hojas. En la figura 4.29 se observa este descenso en diciembre muy marcado durante las 2 últimas temporadas, pero no se registró floración. No sabemos si hubo formación de flor, la que podría haber abortado.

Figura 4.29. Número de hojas por bulbo en *Rhodophiala splendens* poliploide, mixoploide y *Rhodophiala montana* mixoploide trasladadas al invernadero Panguilemo desde Valdivia en julio de 2003



En los cuadros 4.11 y 4.12 se observa el estado actual de los bulbillos diploides y tetraploides enviados desde la U. Austral en marzo de 2005. En general, se observa un incremento considerable de los diámetros ecuatoriales tanto en los poliploides como en los diploides. El número de hojas se ha mantenido constante, lo cual se explica por la constante renovación de estas estructuras. Los bulbos diploides han mostrado una mayor capacidad de adaptación a cultivo con un porcentaje de sobrevivencia de 66% comparado con el 27% que mostraron los bulbos poliploides.

Cuadro 4.11 Evaluación final de los bulbillos enviados en marzo de 2005. Poliploides

N° plántula	Genotipo	Estado al 18 de marzo de 2005						Estado a marzo de 2006		
		N° de hojas	Long. Hoja más larga (cm)	N° de raíces	Long. Raíz más larga (cm)	Diám. Ecuatorial (mm)	Peso plántula completa (g)	N° de hojas	Long. Hoja más larga (cm)	Diám. Ecuatorial (mm)
1	m501b-8	2	5	2	6	2	0.09	Muerto		
3	m501-4	2	12	4	7	4	0.66	1	18.5	13,3
5	m501-4	1	6	1	8	2	0.32	1	12.1	8,8
6	m501-4	1	10	2	8	4	0.29	1	17	10,8
7	mb12x	3	9	4	6	3	0.52	muerto		
9	mb12bx	3	6	2	8	5	0.66	muerto		
11	mb12bx	1	2,5	0	0	3	0.15	muerto		

Cuadro 4.12 Evaluación final de los bulbillos enviados en marzo de 2005. Diploides

N° plántula	Genotipo	Estado al 18 de marzo de 2005						Estado a marzo de 2006		
		N° de hojas	Long. Hoja más larga (cm)	N° de raíces	Long. Raíz más larga (cm)	Diám. Ecuatorial (mm)	Peso plántula completa	N° de hojas	Long. Hoja más larga (cm)	Diám. Ecuatorial (mm)
1	M922	1	0.3	0	0	1	0.93	Muerto		
3	M922	2	6	2	2	4,5	0.29	Muerto		
4	M922	0	0	0	0	5	0.26	2	14.8	6,3
5	M922	2	3.7	2	10	3	0.19	0		10
6	Mb130	3	6	7	10	6	1.27	2	9.6	15,5
7	Mb130	2	9.5	5	7	7	1.3	3	19.2	18,2
8	Mb130	2	8.2	3	12	5	0.74	3	12.8	9,6
9	Mb130	1	7.5	2	3	4	0.24	4	22.3	16,4

4.3 Otros

4.3.1 Estudios de propagación vegetativa

En *R. rhodolirion* con el método de estrellado se logró el mayor número de bulbillos por bulbo y también se obtuvieron bulbos más grandes. En *R. bagnoldii*, sucede algo similar lográndose obtener 15 bulbillos por bulbo madre en su mayoría de calibres 1/2 y 2/3. En *R. montana* (Figura 4.30) el método de estrellado también resulta ser más eficiente pero en esta especie el método de ahuecado también da buenos resultados. Los resultados muestran que los métodos de propagación utilizados son efectivos en todas las especies utilizadas, con excepción del ahuecado en *R. bagnoldii*. No se observa un mejor método en general, ya que cada especie responde en diferente forma.



Figura 4.30 Bulbillos obtenidos con el método de estrellado

Cuadro 4.13 Distribución por calibre de los bulbillos obtenidos usando diferentes técnicas de propagación vegetativa

Especie	Técnica de propagación	Calibre bulbo madre	Nº de bulbillos por bulbo madre	Nº de bulbillos por calibre			
				1	1/2	2/3	3/4
<i>R. rhodolirion</i>	División	6/7	1	1			
	Ahuecado	7/8	1		1		
	Estrellado	8/9	6	1	5		
<i>R. bagnoldii</i>	División	7/8	6	1	1	2	2
		7/8	7	2	5		
	Ahuecado	10/11	0				
		14/15	0				
		15/16	0				
	Estrellado	12/13	10	2	4	4	
		12/13	15	1	6	7	1
<i>R. montana</i>	División	9/10	1	1			
	Ahuecado	14/15	6		4	2	
	Estrellado	11/12	6	2	2	2	
		13/14	1		1		

4.3.2 Estudios de germinación y desarrollo de plántulas

Como se observa en el Cuadro 4.14 Las especies *R. montana* y *R. splendens* presentaron mayores porcentajes de germinación, por sobre el 90%. *R. bagnoldii* y *R. rhodolirion* presentaron porcentajes de germinación bajo el 50%. El cuadro también muestra los porcentajes de emergencia de plántulas, donde se ve que las especies con mayor porcentaje de germinación también presentan mayor porcentaje de emergencia y viceversa.

Cuadro 4.14 Porcentaje de germinación y emergencia de 4 especies de rhodophiala

Especie	<i>R. montana</i>	<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. splendens</i>	<i>R. rhodolirion</i>
Germinación %	95	35	90	45
Emergencia %	90	25	75	15

El porcentaje de emergencia se evaluó a partir del número de semillas iniciales (20)

Con relación al número de días a germinación y emergencia, el Cuadro 4. 15 muestra que las semillas que en promedio fueron más lentas en germinar fueron *R. rhodolirion* con 39 días y *R. montana* con casi 38 días y las plántulas más lentas en emerger fueron las de *R. rhodolirion* y *R. splendens* con 14 días, pero las diferencias en emergencia fueron mínimas, ya que ocurrió desde 12 días en *Rhodophiala bagnoldii* a 14 días en *R. splendens* y *R. rhodolirion*.

Cuadro 4.15 Número de días promedio a germinación y emergencia de cuatro especies de *Rhodophiala*

Número de días a	<i>R. montana</i>	<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. splendens</i>	<i>R. rhodolirion</i>
Germinación	37.8	10.6	18.8	39.2
Emergencia	13.3	12	14.1	14

En el caso de *R. montana* y *R. rhodolirion* los días a emergencia se consideraron desde que las semillas se colocaron en frío, 4 y 3 semanas respectivamente.

En el caso de los días a emergencia los días se consideraron desde que las semillas se sembraron en las macetas

En general en los Cuadros 4.14 Y 4.15 se puede observar que la germinación de las semillas y la emergencia de las cuatro especies de *Rhodophiala* es muy irregular y no ocurre al mismo tiempo.

Siembra de semillas provenientes de cruzamientos

En el Cuadro 4.16 Se muestra la sobrevivencia de los híbridos sembrados el 1º de julio de 2005. No es posible establecer un parámetro para explicar la muerte de algunas plántulas, ni tampoco asumir que los híbridos de algunos cruzamientos específicos o de algún padre específico tienen mejor sobrevivencia que otros.

Cuadro 4.16 Sobrevivencia de híbridos sembrados en julio de 2005

Cruzamiento	Número de semillas	Número de plántulas a agosto de 2005	Número de plántulas a marzo de 2006
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	11	10	10
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. montana</i>	3	3	2
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	10	10	5
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	4	4	2
<i>R. bagnoldii</i> X <i>R. montana</i>	8	8	4
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	10	10	5
<i>R. phycelloides</i> X <i>R. montana</i>	5	5	4
<i>R. splendens</i> x <i>R. rhodolirion</i>	1	1	0
<i>R. ignea</i> x <i>R. montana</i>	7	7	4
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	24	25	19
<i>R. splendens</i> X <i>R. montana</i>	15	12	0
<i>Putú</i> x <i>R. splendens</i>	5	5	4
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	13	13	4
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	15	15	14
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	7	7	0
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	5	10	0
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	12	12	4
<i>R. berteriana</i> x <i>R. montana</i>	10	10	7
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	13	12	11
<i>R. ananuca</i> x <i>R. bagnoldii</i>	11	11	0
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. montana</i>	8	6	4
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	16	16	2
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	24	24	4

<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	12	12	0
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	9	9	0
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. montana</i>	9	8	4
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	18	16	12
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	9	9	6
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	14	12	7
<i>R. bagnoldii</i> x <i>R. phycelloides</i>	22	22	19
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	30	30	14

Pruebas de germinación en *R. ananuca*

Las semillas presentaron gran capacidad de germinación, no necesitando de tratamientos especiales de estratificación. La emergencia de las plántulas también fue alta, los valores se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4.17 Porcentaje de emergencia de plántulas a 4 semanas de la siembra

Tratamiento	Porcentaje de emergencia
Imbibición en agua destilada por 48 hrs.	99
1 semana de frío a 5°C	75
2 semanas de frío a 5°C	83
3 semanas de frío a 5°C	99
4 semanas de frío a 5 °C	95

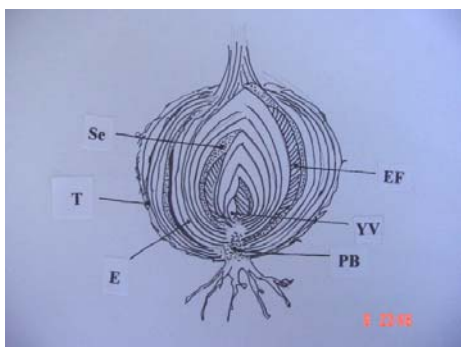
4.3.3 Estudios de morfología del bulbo

Al realizar un corte transversal en un bulbo con calibre floral, es posible apreciar la disposición de las yemas y estructuras florales y vegetativa dentro el bulbo y su distribución con respecto a las escamas o catáfilos.

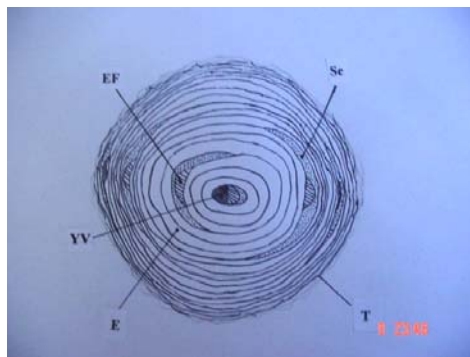
Como se aprecia en las figuras 4.31 y 4. 32, las yemas florales se disponen dentro del bulbo en forma alterna cada 3 escamas, en línea recta, en el mismo plano y van siempre junto a una estructura denominada escama semienvainadora, ya que ésta rodea al centro del bulbo sólo parcialmente.

Todas las escamas, incluidas las semienvainadoras corresponden a bases de hojas, las que se han elongado o se elongarán alguna vez durante el crecimiento del bulbo. Las escamas son más gruesas en el centro del bulbo, y se van adelgazando a medida que se alejan de este, pasando finalmente a constituir la túnica o capa externa del bulbo. De las observaciones realizadas es posible inferir que las especies de *Rhodophiala* siguen un patrón de desarrollo determinado cada temporada, el cual consiste en formación de escamas, formación de la flor, elongación de hojas y floración (la cual puede ocurrir mientras el follaje está presente o después de la senescencia de este). Se forman dos tallos florales por temporada, de los cuales puede emerger 1, 2 o ninguno. No se conoce el mecanismo que activa el proceso de inducción floral, tampoco se conoce el mecanismo que induce a un aborto de la yema.

En algunas disecciones se observó el desarrollo de un bulbo hijo, el cual se forma cercano al tallo floral, entre éste y la escama semienvainadora.



Esquema de un corte longitudinal de un bulbo de *Rhodophiala*, mostrando las estructuras del bulbo, PB: plato basal, E: escama o catáfilo; T: túnica, YV: yema vegetativa, Se: escama protectora o vainadora



Esquema de un corte transversal de un bulbo de *Rhodophiala*, mostrando las estructuras del bulbo, PB: plato basal, E: escama o catáfilo; T: túnica, YV: yema vegetativa, Se: escama protectora o semienvainadora

4.3.4 Cruzamientos interespecíficos e intergéneros

La temporada 2005 se repitieron los cruzamientos entre las especies estudiadas en el proyecto, incluyendo *R. ananuca*, *R. phycelloides* y *Phycella australis*. Se trató de realizar los cruces que no se hicieron el año anterior y también se repitieron algunos. En los Cuadros 4.18 y 4.19 se muestra un resumen de los cruzamientos realizados y las semillas híbridas obtenidas. La mayoría de las especies fueron compatibles entre ellas, incluso las autopolinizadas, que en los cruzamientos realizados en el Campus Lircay no dieron frutos. En el invernadero de la E/E si resultaron. Los cruzamientos con la especie *Phycella australis* también originaron semillas, excepto en aquellos con *R. montana*, *R. phycelloides* y *R. splendens* como hembra. Otro aspecto interesante es el gran número de semillas que se obtienen en algunos cruzamientos, como, *R. montana* x *R. montana*, *R. splendens* x *R. splendens* y *P. australis* y *R. splendens* autopolinizadas.

Cuadro 4.18 Semillas resultantes de los cruzamientos realizados la temporada 2005-2006. Cruzamientos realizados en el Campus Lircay

Macho	Hembra	Nº de cruzamientos	de compatibles	Nº de semillas totales
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. bagnoldii</i>	4	2	84
autopolinizada	<i>R. bagnoldii</i>	5	1	27
<i>R. phycelloides</i>	<i>R. bagnoldii</i>	2	0	
<i>Phycella australis</i>	<i>R. bagnoldii</i>	3	1	3
<i>R. ananuca</i>	<i>R. bagnoldii</i>	1	1	16
<i>R. montana</i>	<i>R. bagnoldii</i>	1	0	
<i>R. ananuca</i>	<i>R. montana</i>	2	1	7
<i>R. phycelloides</i>	<i>R. ananuca</i>	2	2	48
<i>R. montana</i>	<i>R. ananuca</i>	1	1	3
autopolinizada	<i>R. ananuca</i>	4	0	
<i>R. ananuca</i>	<i>R. ananuca</i>	1	1	20
<i>R. splendens</i>	<i>R. ananuca</i>	1	0	
autopolinizada	<i>R. montana</i>	6	0	
<i>R. montana</i>	<i>R. montana</i>	2	1	39
<i>R. splendens</i>	<i>R. montana</i>	1	1	37
<i>Phycella australis</i>	<i>R. phycelloides</i>	1	0	
autopolinizada	<i>R. phycelloides</i>	2	1	50
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. phycelloides</i>	1	1	62
<i>R. montana</i>	<i>Phycella australis</i>	5	2	84
<i>Phycella australis</i>	<i>Phycella australis</i>	3	1	68
autopolinizada	<i>Phycella australis</i>	2	2	138
<i>Phycella australis</i>	<i>R. montana</i>	1	0	

Cuadro 4.19 Semillas resultantes de los cruzamientos realizados la temporada 2005-2006. Cruzamientos realizados en la E/E Panguilemo

Macho	Hembra	Nº de cruzamientos	de compatibles	Nº de semillas totales
<i>Phycella australis</i>	<i>R. montana</i>	1	0	
Autopolinizada	<i>R. montana</i>	13	6	74
<i>R. ananuca</i>	<i>R. montana</i>	5	5	66
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. montana</i>	1	0	
<i>R. montana</i>	<i>R. montana</i>	13	11	171
<i>R. ananuca</i>	<i>R. splendens</i>	10	3	56
<i>R. phycelloides</i>	<i>R. montana</i>	3	0	
Autopolinizada	<i>R. ananuca</i>	1	1	21
<i>R. splendens</i>	<i>R. montana</i>	1	0	
Autopolinizada	<i>R. splendens</i>	15	4	103
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. splendens</i>	2	1	13
<i>R. phycelloides</i>	<i>R. splendens</i>	2	1	18
<i>R. montana</i>	<i>R. splendens</i>	9	4	86
<i>R. splendens</i>	<i>R. splendens</i>	12	8	214
<i>Phycella australis</i>	<i>R. splendens</i>	1	0	

4.3.5 Excursiones y recolección de material vegetal

En general, se cumplieron todos los objetivos relacionados con las excursiones, si bien en algunas oportunidades hubo problemas, y los objetivos no pudieron cumplirse, todos los lugares de recolección se visitaron más de una vez, de modo que las actividades finalmente se realizaron.

5. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto

Hubo poco material homogéneo para realizar los experimentos y para haber realizado más. Fue difícil obtener bulbos de un mismo calibre y de la misma especie. Cuando se comenzó a trabajar con semillas se presentó el problema de la variabilidad genética. Lo óptimo sería contar con clones de igual calibre para realizar los ensayos.

Al comienzo del proyecto hubo problemas para realizar algunas recolecciones de material vegetal, ya que el camino hacia el sector de recolección estaba inhabilitado, esto se solucionó yendo a recolectar material vegetal posteriormente cuando el camino ya estaba habilitado.

Uno de los principales problemas técnicos enfrentados estuvo relacionado con el experimento de calor basal, en el cual se debía mantener una temperatura constante del sustrato. Lamentablemente en la E/E Panguilemo se corta

diariamente la electricidad durante los meses de mayo a septiembre por ahorro de energía, por lo tanto la temperatura deseada no se pudo mantener.

6. Conclusiones y Recomendaciones

Efecto de temperaturas sobre el crecimiento

Durante la ejecución del proyecto se ha observado que en general las plantas muestran un mejor crecimiento bajo temperaturas no extremas, es decir con enfriamiento del aire en verano (temperatura media de 21°C en el mes de enero), y muestran un crecimiento reducido durante el invierno. Se piensa que la mejor condición para el crecimiento de los bulbos y emisión de hojas es la de una temperatura constante cercana a los 20°C.

En plántulas de las especies en que se aplicó calor basal (*R. bagnoldii* y *R. montana*) el diámetro y peso de los bulbos fue significativamente superior al de las plantas sin calor basal. En el caso de *R. splendens* sólo el peso del bulbo fue superior en bulbos con calor basal; el diámetro fue igual en ambos tratamientos. Lamentablemente, en nuestras condiciones actuales, la temperatura del calor basal no es constante, puesto que en la estación experimental, que es donde se han realizado los experimentos, se corta diariamente la electricidad entre las 6 pm y las 11 pm. Además, no se han probado diferentes temperaturas, como se ha hecho en *Amaryllis*.

Por esto se propone aplicar diferentes temperaturas basales constantes en camas calientes puestas en una sala del Campus Lircay de la Universidad de Talca que esté a una temperatura ambiental constante de 20°C.

Efecto de condiciones de luz sobre el crecimiento

Se realizaron durante dos temporadas diferentes experimentos cultivando plantas de 4 especies bajo distintas condiciones de intensidad de luz, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos. Se decidió no continuar investigando en este tema.

Efecto de la nutrición sobre el crecimiento

El uso de solución nutritiva de Cooper ha mostrado buenos resultados en los ensayos de aplicación de calor basal. En el ensayo en que se aplicaron diferentes dosis de fertilizante a plantas provenientes de cultivo in vitro las respuestas fueron diferentes de acuerdo a la especie. Los mejores resultados se obtuvieron en bulbillos de *R. bagnoldii* calibre 1/2 proveniente de cultivo in vitro de bulbos, los que mostraron un aumento significativo del peso, N° de hojas y N° de raíces al aplicar fertilizante. En los demás no se obtuvieron diferencia significativas aun cuando se ve que los tratamientos con fertilización tuvieron mayores promedios en las variables estudiadas que los sin fertilización. Sólo en el caso de *R. montana*

calibre 1/2 proveniente de cultivo in vitro de semillas los diámetro obtenidos fueron más altos en el tratamiento sin aplicación de fertilizante.

Determinación del periodo de receso

De acuerdo a observaciones realizadas en el ambiente natural, las especies de cordillera, que son *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*, muestran un receso estival que comienza después de la floración, la cual ocurre principalmente en enero. El crecimiento se reactiva con las primeras lluvias y el follaje permanece verde incluso bajo la nieve. En *R. bagnoldii* y *R. ananuca*, que son plantas del norte, la floración ocurre en primavera. En verano el follaje desaparece, para emerger en mayo o más tarde, según la humedad disponible. Bajo cultivo en invernadero, las fechas de floración son similares a las del ambiente natural, excepto para *R. montana* y *R. bagnoldii*, en que se ha observado floración en distintas épocas del año. Para determinar el periodo de receso se registró durante 4 años el número de hojas en varias plantas (regadas) de *R. bagnoldii*, *R. montana* y *R. splendens*. Se observó un marcado periodo de receso en *R. bagnoldii*, ya que desde enero a abril desaparece el follaje. En *R. montana*, hay menos hojas entre enero y junio, sin llegar a desaparecer completamente. En *R. splendens* en general hay un menor número de hojas entre enero y marzo. Se piensa que si se logra acortar el periodo de receso se puede lograr un mayor crecimiento anual del bulbo.

Estudios de disección periódica de bulbos

Al disectar bulbos de las diferentes especies se observó que todas las escamas corresponden a bases de hojas, y todas las especies presentan una morfología similar, en cuanto a que se forman unidades de 3 escamas concéntricas y luego una cuarta escama semienvainadora, que protege a una estructura floral. Estas unidades se repiten dos veces en la temporada, dando origen a dos yemas florales, de las cuales pueden llegar a florecer ambas, una o ninguna cada año. Es decir, cada bulbo puede dar hasta dos flores por año. También se observó que los nuevos bulbillos se forman dentro del bulbo madre, entre una escama semienvainadora y los restos de una yema floral. Las nuevas yemas florales se forman durante el periodo de crecimiento y cerca de la fecha de floración de las yemas que se habían formado la temporada anterior.

Cruzamientos entre especies

De los cruzamientos efectuados entre las diferentes especies, se han obtenido semillas viables, que ya están en cultivo. Se observó que existe una alta compatibilidad entre las especies en estudio, y hay individuos híbridos de casi todas las combinaciones. Se incluyó *R. phycelloides* en los cruzamientos porque se disponía de plantas de un proyecto anterior, y también se logró realizar algunos cruzamientos con el polen que se trajo de *R. ananuca* (antes la llamamos *R. aff. laeta*, planta encontrada en Aguada de Tongoy). Al incluirse más especies en el proyecto, éstas se incluirán en esta actividad.

Evaluación de tetraploides

De los tres tetraploides de *R. splendens* enviados por la Universidad Austral, sólo ha sobrevivido un individuo que aún no ha florecido, pero que muestra hojas más anchas y más largas que individuos diploides (normales) de la misma edad. Las plántulas poliploides de *R. montana* están creciendo activamente, y se espera su floración para al menos un año.

Taxonomía de las especies

Hay problemas taxonómicos en la familia Amaryllidaceae, familia a la cual pertenecen las plantas en estudio. Según el trabajo de Ravenna, publicado en 2003, no existiría el género *Rhodophiala*, y nuestras plantas en estudio pertenecerían a otros géneros. Por medio de estudios morfológicos, anatómicos, citológicos, moleculares y corológicos sería posible determinarlas. En la Universidad Austral se ha estado trabajando en la metodología para separar especies, por lo cual se dispone de la metodología, infraestructura y competencias para poder finalmente determinar taxonómicamente las especies que ya se están estudiando, así como las nuevas especies que se propone agregar durante la extensión del proyecto.

7.0 Difusión de los resultados del proyecto.

Los resultados del proyecto se presentaron, ya sea como exposiciones orales y en modalidad de poster en diferentes congresos, tales como:

- 4ª Jornada de Investigación y Asistencia Técnica. Universidad de Talca, Talca. Diciembre 2005
- Primer Simposio de Horticultura Ornamental, 29 y 30 de septiembre. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Exposición de flores de invierno. Club de jardines de Chile. 25-28 de Agosto 2005, Santiago, Chile.
- Charla pasantía a Dinamarca. Enero de 2004
- 3ª Jornada de Investigación y Asistencia Técnica. Universidad de Talca. Diciembre 2003

AVANCES EN ESTUDIOS DE CRECIMIENTO Y FLORACIÓN DE ESPECIES DE *Rhodophiala*

Schiappacasse, F.¹, Peñailillo, P.¹, Basoalto, A.¹, Seemann, P.², Jara, G.² y Muñoz, M.²

¹Departamento de Horticultura, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca.

² Inst. de Prod. y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia.
E-mail: fschiap@utalca.cl

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El potencial ornamental que muestran diferentes especies de *Rhodophiala* (geófita nativa) ha estimulado la realización de un proyecto ejecutado entre la Universidad Austral de Chile y la Universidad de Talca, que pretende la creación de individuos poliploides. Con la poliploidía se espera obtener individuos de follaje, varas florales y flores más grandes, los cuales serán más atractivos para diferentes mercados. Durante cuatro años se han buscado protocolos para la inducción de la poliploidía y para la multiplicación *in vitro*. Al mismo tiempo, se han realizado estudios tendientes a conocer la morfología y fisiología de la planta, y a lograr un crecimiento rápido de los bulbos. En el presente trabajo se muestran los avances en estos últimos temas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron plantas de 4 especies: *Rhodophiala bagnoldii*, *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*. En el último año se agregó *R. aff. laeta*. Se observó su crecimiento bajo diferentes condiciones ambientales; se cultivaron bajo invernadero con y sin enfriamiento del aire en el periodo estival; se cultivaron plántulas con y sin calor basal; se cultivaron bajo diferentes condiciones de intensidad lumínica. Se comparó el desarrollo fenológico bajo invernadero y en su ambiente natural. Se realizaron disecciones periódicas de bulbos para conocer su morfología y la evolución de la yema floral. También, por varios años se registró el número de hojas para determinar el periodo de receso de cada especie y durante el último año se realizaron cruzamientos entre las diferentes especies.

RESULTADOS

Al registrar el número de hojas de plantas de diferentes calibres durante todo un año, se observó que prácticamente en todos los casos el número fue mayor en las plantas que se encontraban en el invernadero de la estación experimental Panguilemo, el cual está provisto de un sistema de panel húmedo, que enfría el aire y mantuvo una temperatura media de 21°C en el mes de enero. El otro invernadero alcanzó temperaturas superiores.

Se sembraron semillas de *R. bagnoldii*, *R. montana* y *R. splendens* y se dispusieron las plántulas a comienzos de julio y hasta noviembre en vasos individuales, en un mesón de propagación con la mitad provista de cables calefactores y la otra mitad sin. Con calor basal la temperatura aproximada promedio fue de 20°C y sin calor basal fue inferior, de aproximadamente 14°C. Las plantas fueron regadas a partir de agosto con la solución de Cooper, ajustando el pH según la especie. En *R. bagnoldii* y *R. montana* el diámetro y peso de los bulbos a los cuales se aplicó calor basal fue significativamente superior al de las plantas sin calor basal. En el caso de *R. splendens* sólo el peso del bulbo fue superior en bulbos con calor basal; el diámetro fue igual en ambos tratamientos.

Se realizaron durante dos temporadas diferentes experimentos cultivando plantas de 4 especies bajo distintas condiciones de intensidad de luz, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos.

En el ambiente natural, las especies de cordillera, que son *R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*, muestran un receso estival que comienza después de la floración, la cual ocurre principalmente en enero. El crecimiento se reactiva con las primeras lluvias y el follaje permanece verde incluso bajo la nieve. En *R. bagnoldii* y *R. aff. laeta*, que son plantas del norte, la floración ocurre en primavera. En verano el follaje desaparece, para emerger en mayo o más tarde, según la humedad disponible. Bajo cultivo en invernadero, Las fechas de floración son similares, excepto para *R. montana* y *R. bagnoldii*, en que se ha observado floración en distintas épocas del año. Para determinar el periodo de receso se registró durante 4 años el número de hojas en varias plantas (regadas) de *R. bagnoldii*, *R. montana* y *R. splendens*. Se observó un marcado periodo de receso en *R. bagnoldii*, ya que desde enero a abril desaparece el follaje. En *R. montana*, hay menos hojas entre enero y junio, sin llegar a desaparecer completamente. En *R. splendens* en general hay un menor número de hojas entre enero y marzo.

Al disectar bulbos de las diferentes especies se observó que todas las escamas corresponden a bases de hojas, y todas las especies presentan una morfología similar, en cuanto a que se forman unidades de 3 escamas concéntricas y luego una cuarta escama semienvainadora, que protege a una estructura floral. Estas unidades se repiten dos veces en la temporada, dando origen a dos yemas florales, de las cuales pueden llegar a florecer ambas, una o ninguna. También se observó que los nuevos bulbillos se forman dentro del bulbo madre, entre una escama semienvainadora y los restos de una yema floral.

De los cruzamientos efectuados entre las diferentes especies, se obtuvieron semillas viables, que ya están en cultivo.

En resumen, según los estudios, las plantas muestran un mejor comportamiento bajo temperaturas no extremas, y un crecimiento más rápido con calor basal. Por otro lado, el receso parece promoverse con temperaturas altas, aunque hay muchas interrogantes. Los bulbos grandes forman dos yemas florales cada año, y al realizar los cruzamientos se observó una alta compatibilidad entre las especies.

Anexo 1

INVENTARIO GENERAL DE BULBOS EXISTENTES EN LOS INVERNADEROS DE LA UNIVERSIDAD DE TALCA A MARZO DE 2006

MB 130		170 / 1	4 / 5	sin calor 2004
MB 130		20 / 1	muerto	
MB 130		30 / 1	muerto	
MB 130		50 / 1	muerto	
MB 130		40 / 1	4 / 5	sin calor 2004
MB 130		60 / 1	muerto	
MB 130		80 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 130		70 / 1	muerto	
MB 130		100 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 130		110 / 1	4 / 5	con calor 2004
MB 130		90 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 130		130 / 1	6 / 7	con calor 2004
MB 130	14a	0 / 1	5 / 6	con calor 2004
	14b	0 / 1	5 / 6	con calor 2004
MB 130		150 / 1	5 / 6	con calor 2004
MB 130		121 / 2	6 / 7	sin calor 2004
MB 130		11 / 2	5 / 6	sin calor 2004
MB 130		160 / 1	4 / 5	con calor 2004

MB 127		10 / 1	muerto	
MB 127		20 / 1	4 / 5	con calor 2004
MB 127		30 / 1	3 / 4	sin calor 2004
MB 127		40 / 1	muerto	
MB 127		50 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 127		60 / 1	muerto	
MB 127		70 / 1	muerto	
MB 127		80 / 1	5 / 6	con calor 2004
MB 127		90 / 1	8 / 9	con calor 2004, 2005
MB 127		100 / 1	muerto	

MB 136		10 / 1	3 / 4	con calor 2004
MB 136		20 / 1	4 / 5	con calor 2004
MB 136		30 / 1	3 / 4	con calor 2004
MB 136		40 / 1	3 / 4	sin calor 2004
MB 136		50 / 1	3 / 4	sin calor 2004
MB 136		60 / 1	muerto	

MB 128		11 / 2	6 / 7	sin calor 2004, con calor 2005
MB 128		21 / 2	muerto	

MB 1		10 / 1	4 / 5	con calor 2004
MB 1		20 / 1	muerto	
MB 1		31 / 2	4 / 5	sin calor 2004

MB 1	4	1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
MB 1	5	1 / 2	4 / 5	con calor 2004
MB 1	6	1 / 2	muerto	

MB 129		0 / 1	5 / 6	con calor 2004
MB 129	1	0 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 129	2	0 / 1	5 / 6	sin calor 2004

MB 58	1	0 / 1	3 / 4	con calor 2004
MB 58	2	0 / 1	3 / 4	sin calor 2004

MB 11	1	0 / 1	4 / 5	sin calor 2004
MB 11	2	0 / 1	muerto	
MB 11	3	0 / 1	muerto	
MB 11	4	0 / 1	muerto	
MB 11	5	1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
MB 11	6	1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
MB 11	7	1 / 2	muerto	
MB 11	8	1 / 2	muerto	

MB 53		0 / 1	5 / 6	sin calor 2004
MB 53		0 / 1	4 / 5	con calor 2004

MB 41		0 / 1	muerto	
MB 41		0 / 1	5 / 6	sin fert.,sin calor, con turba

MB 131	1	0 / 1	5 / 6	con calor 2004
MB 131	2	0 / 1	5 / 6	sin calor 2004

MB 8	1	1 / 2	3 / 4	con calor 2004, sin calor 2005
MB 8	2	1 / 2	muerto	
MB 8	3	1 / 2	muerto	
MB 8	4	1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
MB 8	5	1 / 2	muerto	
MB 8	6	1 / 2	muerto	

MB 64		0 / 1	4 / 5	sin calor 2004
MB 64		0 / 1	3 / 4	con calor 2004

MB 12	1	1 / 2	4 / 5	con calor2004,sin calor 2005
MB 12	2	1 / 2	muerto	
MB 12	3	1 / 2	muerto	
MB 12	4	1 / 2	5 / 6	sin calor 2004 2005
MB 12	5	1 / 2	2 / 3	sin calor 2004 2005
MB 12	6	1 / 2	muerto	

MB 97		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
-------	--	-------	-------	----------------

MB 97		1 / 2	muerto	
MB 757		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004

MB 5		1 / 2	6 / 7	con calor 2004,2005
MB 5		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004

MB 6	1	2 / 3		
MB 6	2	2 / 3	4 / 5	con calor 2004, sin calor 2005
MB 10		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
MB 10		1 / 2	muerto	
MB 35		0 / 1	1 / 2	sin fert. Sin calor
MB 37		0 / 1	1 / 2	sin fert. Sin calor
MB 140	1	1 / 2	1 / 2	sin fert. Sin calor
MB 140	2	1 / 2	1 / 2	sin fert. Sin calor
MB 15		0 / 1	1 / 2	sin fert. Sin calor
MB 25		0 / 1	muerto	
MB 25		1 / 2	muerto	

Bulbos enviados de Valdivia 02/06/04

Origen: bulbillos microaclimatados

Fecha de evaluación: Marzo, 02/2006

Código	N° del bulbillo	Calibre inicial	Calibre final	Observación
M 39	1	1 / 2	5 / 6	con calor 2004
	2	0 / 1	3 / 4	con calor 2004
M 689		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005

Proyecto FIA código Biot 01-A-71

“Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de cuatro especies de
Rhodophiala chilenas”

M 123		1 / 2	4 / 5	con calor 2004
M 252		1 / 2	2 / 3	con calor 2004
M 701		0 / 1	6 / 7	sin calor 2004
M 761		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
M 862		1 / 2	2 / 3	con calor 2004
M 862		1 / 2	4 / 5	con calor 2004
M 8	1	0 / 1	4 / 5	sin calor 2004
	2	0 / 1	muerto	
M 215		1 / 2	6 / 7	con calor 2004
M 285		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005
M 661		0 / 1	3 / 4	sin calor 2004, con calor 2005
M 5		0 / 1	4 / 5	con calor 2004
M 111		0 / 1	3 / 4	sin calor 2004
M 100		1 / 2	muerto	
M 73		1 / 2	5 / 6	con calor 2004,2005
M 783		0 / 1	3 / 4	sin calor 2004
M 919		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005
M 671		0 / 1	5 / 6	con calor 2004
M 917		2 / 3	5 / 6	sin calor 2004, con calor 2005
M 665		1 / 2	muerto	
M 695		1 / 2	4 / 5	con calor 2004,2005
M 723		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
M 848		0 / 1	6 / 7	sin calor 2004
M 184		0 / 1	5 / 6	con calor 2004,2005
M 159		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 11		1 / 2	4 / 5	con calor 2004
M 751		0 / 1	5 / 6	sin calor 2004
M 681		1 / 2	muerto	
M 123			4 / 5	con calor 2004
M 732		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
M 60		1 / 2	5 / 6	sin calor
M 980		1 / 2	muerto	
M 97		1 / 2	muerto	
M 666		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
M 773		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
M 765		1 / 2	muerto	
M 718		1 / 2	muerto	
M 112		0 / 1	3 / 4	con calor 2004
M 121		0 / 1	5 / 6	sin calor 2004,2005
M 42		0 / 1	muerto	
M 10		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 102		1 / 2	muerto	
M 118		0 / 1	4 / 5	con calor 2004
M 657		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004, sin calor 2005
M 180		1 / 2	muerto	
M 769		0 / 1	3 / 4	sin calor 2004,2005
M 44		1 / 2	muerto	
M 656		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004

M 286		1 / 2	muerto	
M 696		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004,2005
M 98		0 / 1	muerto	
M 157		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004, con calor 2005
M 152		1 / 2	muerto	
M 702		1 / 2	7 / 8	con calor 2004,2005
M 739	1	1 / 2	7 / 8	sin calor 2004
M 739	2		6 / 7	sin calor 2004
M 133		0 / 1	muerto	
M 52		1 / 2	muerto	
M 796		1 / 2	6 / 7	con calor 2004,2005
M 471		0 / 1	4 / 5	sin calor 2004
M 158		1 / 2	muerto	
M 698		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 15		1 / 2	muerto	
M 53		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 279		0 / 1	muerto	
M 699		0 / 1	muerto	
M 154		1 / 2	muerto	
M 150		2 / 3	4 / 5	con calor 2004
M 918		1 / 2	4 / 5	con calor 2004,2005
M 55		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
M 51		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005
M 46	1	1 / 2	5 / 6	con calor 2004
M 46	2	1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 54		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
M 660		0 / 1	muerto	
M 708		0 / 1	4 / 5	con calor 2004
M 140		1 / 2	7 / 8	con calor 2004,2005
M 721		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005
M 21		1 / 2	7 / 8	con calor 2004,2005
M 246		0 / 1	4 / 5	con calor 2004
M 714		1 / 2	muerto	
M 130		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
M 156		2 / 3	muerto	
M 876		0 / 1	muerto	
M 86		1 / 2	5 / 6	con calor 2004, sin calor 2005
M 43		1 / 2	muerto	
M 200		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004, con calor 2005
M 71		1 / 2	3 / 4	con calor 2004
M 127		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
M 940		0 / 1	6 / 7	con clor 2004
M 119		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004,con calor 2005
M 153		1 / 2	6 / 7	con calor 2004,sin calor 2005
M 704	1	0 / 1	4 / 5	con clor 2004
	2	1 / 2	muerto	
M 13		0 / 1	muerto	
	3	1 / 2	4 / 5	sin calor 2004

M 916		1 / 2	muerto	
M 862	1	0 / 1	2 / 3	con calor 2004
	2	0 / 1	4 / 5	con calor 2004
M 861	1	0 / 1	5 / 6	sin calor 2004
	2	0 / 1	3 / 4	con calor 2004
M 697		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
m 697		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
MB 5	1	1 / 2	muerto	
	2	1 / 2	4 / 5	con calor 2004
	3	2 / 3	4 / 5	con calor 2004
MB 11		1 / 2	3 / 4	sin calor 2004
MB 38		1 / 2	5 / 6	con calor 2004
MB 83		0 / 1	3 / 4	con calor 2004
MB 7		0 / 1	4 / 5	sin calor 2004
MB 18		0 / 1	muerto	
MB 72		1 / 2	4 / 5	con calor 2004
MB 24		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004,2005
MB 70		1 / 2	5 / 6	sin calor 2004
MB 32		1 / 2	4 / 5	con calor 2004
MB 44		0 / 1	muerto	
MB 40		0 / 1	muerto	
MB 10	1	2 / 3	3 / 4	sin calor 2004
MB 10	2	1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
MB 10	3	3 / 4	muerto	
MB 10	4	1 / 2	4 / 5	
MB 10	5	1 / 2	muerto	
MB 10	6	1 / 2	muerto	
MB 12	1	2 / 3	muerto	
	2	2 / 3	muerto	
MB 97		1 / 2	4 / 5	sin calor 2004
MB 50		0 / 1	muerto	muerto

Inventario de bulbos del proyecto rhodophiala

luz continua, luz con interrupción nocturna, luz complementaria, testigo

Ensayo 2002

Ensayo 2002

Especie: R. Montana		Especie: R. splendens		Especie: R. rhodolirion	
Calibre	N° de bulbos	Calibre	N° de bulbos	Calibre	N° de bulbos
1 / 2		1 / 2	6	1 / 2	
2 / 3	3	2 / 3		2 / 3	
3 / 4	7	3 / 4	1	3 / 4	2
4 / 5	5	4 / 5	2	4 / 5	
5 / 6	8	5 / 6	1	5 / 6	2
6 / 7	5	6 / 7	8	6 / 7	1

7 / 8	6	7 / 8		7 / 8	
8 / 9	8	8 / 9	1	8 / 9	
9 / 10	7	9 / 10		9 / 10	
10 / 11	7	10 / 11		10 / 11	
11 / 12	4	11 / 12		11 / 12	
12 / 13	2	12 / 13		12 / 13	
Total	62		19		5

Ensayo 2003

Con luz artificial continua y, sin luz artificial

Especie: *R. montana*

Especie: *R. splendens*

Calibre	N° de bulbos	Calibre	N° de bulbos
1 / 2	12	1 / 2	2
2 / 3	39	2 / 3	27
3 / 4	33	3 / 4	37
4 / 5	22	4 / 5	18
5 / 6	8	5 / 6	10
6 / 7	4	6 / 7	2
7 / 8	1	7 / 8	
8 / 9		8 / 9	
Total	119		96

NOTA Espacios vacíos indica que no hay bulbos de ese calibre

Cantidad de semillas en gramos existentes por especie y año de recolección

Especie	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<i>R. rhodolirion</i>				45.69	46.49	
<i>R. splendens</i>				101.59	160.68	39.95
<i>R. montana</i>	15.94		77.63		39.77	0.35
<i>R. bagnoldii</i>			8.53	13.1	2.15	
<i>R. phycelloides</i>			8.53	13.1	2.15	

Anexo 2
**Registro diario de temperatura invernaderos Campus Lircay y Estación
Experimental Panguilemo**

Año 2002
Enero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7	9,6	27,2		
8	10,3	23,6		
9	16	29,7		
10	11	29,5		
11	11,8	30,5		
12	11,8	30		
13	10,9	24,1		
14	8,3	26,6		
15	9,3	27,1		
16	10,1	26,5		
17	11,3	24,1		
18	14	25,3		
19	15,2	29,7		
20	14	29,6		
21	10,7	29,6		
22	9,3	29		
23	8,6	29,1		
24	11,2	30,4		
25	11,7	29,9		
26	10,9	27,1		
27	11,4	27,4		
28	11,6	26,7		
29	9,8	27,2		
30	9,4	24,1		
31	9,3	28,9		
Promedio	11,1	27,716		

Febrero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	10,6	29,6		
2	12,6	31,1		
3	11,2	29,1		
4	11,4	26,7		
5				
6	12,5	28,7		
7	12,7	27,9	11	39
8	11,6	27,1		
9	12,6	26		
10	10,1	27,2		
11	10,1	27,4	10	42
12	10,3	27,5	11	38
13	9,9	27,7	10	35
14	11,1	26,7	11	39
15	10	27,5	12	35
16	9,3	27,3		
17	7,8	26,6		
18	8,4	27	12	26
19	9,4	29,2	13	29
20	10,9	27,7	14	34
21	13,3	26,1	13	29
22	11,2	29,8	13	35
23	12,3	27,5		
24	9,8	27		
25	8,2	26	11	39
26	8,5	23	10	38
27	6,2	19,9	13	32
28	7,6	25,3	11	30
29				
30				
31				
Promedio	10,356	27,133	11,67	34,67

Marzo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	8,7	26,5	9	29
2	9,9	22,5		
3	7,3	22,8		
4	11	24,3		
5	9	23,7		
6	8,1	24,5		
7	10,3	26,7	12	37
8	10,9	23,4		
9	9,5	24		
10	9,4	26,3		
11	7	24,1	11	31
12	9,6	24	12	30
13				
14	12,3	21,8		
15	14	15,6		
16	13,2	22,7		
17	11,3	17		
18	10,8	21,5	16	30
19	10,4	25,8		
20	8,8	26,3		
21	9	26,3	11	28
22	10,7	23,4		
23	6,6	23,9		
24	7,3	23,5		
25	6,9	23,8	9	27
26	10,4	24,6	11	26
27	11,9	21,6	10	28
28	7,1	23,4	12	25
29	7,3	24,7		
30	7,1	24,1		
31	12,4	20,8		
Promedio	9,607	23,453	11,3	29,1

Abril

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	8,9	24,5	10	32
2	11,8	21		
3	9,4	24,8	9	26
4	9,3	24,5	10	28
5	4,7	25,6		
6	9,4	22,6		
7	5,6	24,7		
8	7,3	18,7	11	26
9	5,9	24,2	9	22
10	8,3	19		
11	9,2	20,2	11	23
12	7	20,1	9	24
13	7,4	23,1	10	22
14	6,4	24,8		
15	6,7	20,9	9	28
16	10	23,3	6	26
17	7,1	23,4	9	25
18	2,2	20,9	7	27
19	3,5	23,1	7	26
20	2,8	24,1	9	24
21	0,7	21,9		
22	5,9	19	9	23
23	3,7	24,8	9	24
24	9,8	20,1		
25	6,1	21,6	10	24
26	3	21,6	10	26
27	3,4	20	5	25
28	2,4	19		
29	7,9	20	8	24
30	2,4	20,6	7	22
31				
Promedio	6,27	22,07	8,76	25,10

Mayo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1				
2			5	21
3			6	17
4				
5				
6	4,5	14,4	5	15
7	3,5	15,4	10	19
8			5	20
9			4	17
10			9	18
11			7	26
12				
13			11	22
14			13	22
15			13	22
16			10	20
17	4,6	25,8		
18	4,3	19	4	31
19	6,7	26,5		
20	2	20,1		
21			8	26
22			11	20
23		26,8	10	23
24	7,1	17,4	2	19
25	10	14		
26	9,1	17,2		
27	7	22,1		
28	0,2	20,3	3	20
29	0	22,3	2	24
30	0,2	18,1	2	19
31	6,2	11,7	18	8
Promedio	4,67	19,41	7,52	20,43

Junio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	0,1	18,8		
2	7,1	14,6		
3	9,1	12,5	7	16
4	7,5	15,8	10	18
5	6,1	22,9	8	8
6	5,1	19		
7	6,1	15,5	7	16
8	0,1	16,9		
9	6,3	19,8		
10	0	19	1	21
11	0,3	20	0	22
12	0	10		
13	0,6	5,5	-1	19
14		12	3	8
15		7,1		
16	1,1	10,3		
17		9,1		
18	2,3	10,6	1	11
19			6	10
20				
21			3	14
22				
23				
24			-1	21
25				
26	1,9	21,2	5	22
27			11	22
28	1,7	15,7	4	13
29	0	20,2		
30	0,1	17,4		
31				
Promedio	2,92	15,90	4,27	16,07

Julio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	0	10	-2	18
2	0,1	17,3		
3	0	14,6	1	11
4	0,6	21,5		
5	0	19,9		
6	0,1	21,1		
7	1,4	9,7		
8	2,5	14,9	3	30
9	0	13	2	15
10	2	7,8	4	16
11	2,4	22,2		
12	1,6	24,4	5	25
13	5,4	19		
14	1	13		
15	4,7	17,4	4	15
16	2,2	20,8	5	15
17	1	20,1		
18	4,3	21,6	7	23
19	7,1	11,4		
20	8,4	14,5		
21	6,4	24,1		
22	6	12,2	8	29
23	6	24,5		
24	0,2	23		
25	0	24,9		
26	2,6	20	3	29
27	0	23,4		
28	0	25,1		
29			5	30
30		24,4		
31	1,5	24	8	26
Promedio	2,33	18,66	4,08	21,69

Agosto

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	1,3		5	29
2				
3				
4	0	20		
5	3,2	7,6	4	24
6			3	10
7			9	22
8		25,9		
9	1,4	25,8	5	31
10	2,6	26,7		
11	6,4	26,1		
12	1,9	23,7	4	34
13	2,3	26	6	33
14	2,2	25,4		
15	6	28,5		
16	8,1	26,6	11	35
17	9,2	27,3		
18	6	13,2		
19	6,6	21,1	9	34
20	0,3	23,2	4	10
21	3,1	24,6	6	27
22	7	24,7	10	27
23	7,9	11,1	9	31
24	9,7	17,1		
25	0,3	16,4		
26	9,2	21,9	11	19
27	9,2	21,5	11	20
28	8,1	24,5		
29	5,5	24,1		
30	0,1	24,3		
31	0	24,6		
Promedio	4,52	22,38	7,13	25,73

Septiembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	1,5	27,2		
2	5	25,1	4	38
3	6,2	20	8	33
4	6,1	17,2	10	16
5	5	24,5	7	19
6	0,2	27,3	3	27
7	4,5	22,9		
8	6	24,7		
9	7,5	23,1	3	30
10	8,3	25,5	9	25
11	2	29	5	26
12	6,1	22,7	5	30
13	2,2	30,1	7	20
14	8,7	23,2		
15	2,6	30		
16	9,9	10	6	36
17	4,9	24	7	17
18	1,4	27,5		
19	3,3	26,9		
20	1	27		
21	4,1	27,6		
22	8,1	27,2		
23	2	31,4	5	34
24			9	32
25			10	34
26		27	11	30
27	9,2	23,4		
28		25,8		
29	2,9	26,5		
30	4,5	26,3	5	41
Promedio	4,7	25,1	6,7	28,7

Octubre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	5,6	26,3	7	31
2	11,1	25,3	11	30
3	6	23,3	7	31
4	6,7	26,3	11	30
5	5,2	24,4		
6				
7		26	7	30
8	2,2	24,5	5	32
9	9	26,9		
10			5	31
11			10	33
12				
13				
14			11	39
15			5	19
16			7	29
17			8	30
18			11	34
19			9	25
20				
21			6	26
22			6	30
23		24,5	11	34
24	8,1	34	11	32
25	10,4	26,7	11	30
26	8,7	19		
27	8,5	29,2		
28	3,9	30,7	10	34
29			6	30
30		37,9	10	35
31	8,9	35,1	11	34
Promedio	7,1	27,0	8,4	30,7

Noviembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	8,2	20,7		
2	10,4	25,7		
3	3,2	32,4		
4			5	32
5			9	24
6				
7			10	37
8			9	31
9				
10				
11			8	31
12			9	32
13				
14			10	35
15			12	34
16				
17	11	30,3		
18	5,8	27	11	37
19	5,7	31,4	8	31
20	5,5	32,4		
21	8,1	34,7	8	31
22	9,3	33,9	11	33
23	11,9	32,3		
24				
25	9,1	34,9	12	34
26	6,2	26,2	10	36
27	4,3	30,2	8	28
28	7,4	34,7	11	30
29	10,2	33,5	10	34
30				
31				
Promedio	7,8	30,7	9,5	32,4

Diciembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1				
2	8,3	36,3	10	33
3	10	34,9	12	34
4	10,2	36,6		
5	12,5	27,7	12	38
6	11,6	30,6	13	31
7				
8				
9			11	39
10			12	34
11			11	36
12			14	34
13			14	36
14				
15				
16	10,7	30,5	14	39
17	8,7	30	10	38
18	7,6		12	34
19			12	26
20			12	34
21				
22				
23			9	32
24			12	34
25				
26			13	30
27				
28				
29				
30			11	38
31			14	36
Promedio	10,0	32,4	11,9	34,4

**Año 2003
Enero**

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	10,7	32,3		
2	9	32,3	14	36
3	10,2	30,5	12	37
4	9,2	30,9		
5				
6		33,7		
7	10	30,4	14	38
8		30,4	12	36
9	11	31,9	12	36
10	10,2	31,4	14	38
11	10	32,9		
12	9,3	32,7		
13	15,3	32,7		
14	13,1	33,1		
15	12,7	34,3		
16	10,7	33,6		
17	14,1	27,9		
18	8,3	30,4		
19	7,2	23,6		
20	14,6	21,6		
21	14,5	24,4		
22	13,4	28,7		
23	8,6	30,4		
24	9,2	32,6		
25	13,4	32,6		
26				
27			14	24
28			14	32
29	11,9	29,7	16	36
30	11,6	32,1	16	34
31				
Promedio	11,2	30,7	13,8	34,7

Febrero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	8,6	31,7	12	36
2	10,3	32,7		
3		34,1		
4	11	31,2	13	35
5	11,6	31,4	15	37
6	10	28,7	14	35
7	7	29,1	10	34
8	9,1	30,2		
9	9	30,8		
10			10	35
11	10,2	31	13	20
12	10	30,9	12	34
13	8,6	31,7	13	36
14	9	26,7	10	33
15	4,9	25,8		
16	6,5	27,7		
17	6,6	28,9	12	35
18	8,5	26,6	11	26
19			10	31
20	2,9	29,1	9	18
21	5,4	28,9	10	26
22	6	37,4		
23				
24	8,3	29,6	10	29
25	8,1	22,7	10	40
26	8,9	28,8	9	26
27	8,3	27,4	11	37
28	7,1	27	8	34
29				
30				
31				
Promedio	8,2	29,6	11,1	31,9

Marzo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6,4	28,6		
2	8	29,7		
3	9,6	30	9	36
4	10,2	27,6	12	36
5	12,4	26,6	13	34
6	11,3	30,7	12	30
7	11	25,1	12	39
8	10,9	28,8		
9	10,9	28,4		
10	9,6	29,3	12	37
11	11,3	28,5	12	34
12	9	26,2	10	38
13	7,2	25,6	9	34
14	7,6	22,4	10	31
15	7	25,7		
16	7,9	28,4		
17	11,4	34	9	35
18	8,1	27,1	10	39
19	9,6	26,2	11	34
20	8,6	26,7		
21	7,7	26,7	10	38
22	10,5	26,5		
23	10	26,6		
24			8	36
25			12	35
26				
27				
28			9	34
29				
30				
31			6	34
Promedio	9,4	27,6	10,3	35,2

Abril

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7	2,7	9	35
2	6,6	26,4	8	36
3		29	8	30
4	6,4	26	8	30
5	6	25,8		
6		32,5		
7	6,8	25,5	6	32
8	6,1	25,1	5	30
9	9,8	25,8	10	30
10	6	25,2	5	29
11	7,2	26,6	5	34
12	6,5	25,1		
13	4,3	24,8		
14	10,3	17,3	6	35
15	8,7	25	6	15
16	9,5	26,6		
17	4	24		
18	3,1	24,4		
19	3	24		
20	6	23,3		
21	10,5	23,7		
22	2,5	26	5	26
23	3,4	25,2		
24	4,1	24,8		
25	3,5	22,7		
26	3,5	25,2		
27	2,4	25,1		
28	2,4	24,4		
29				
30				
31				
Promedio	5,8	24,4	6,8	30,2

Mayo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7,5	25,3		
2	2,2	25,5		
3	3,8	24,4		
4	3,7	25,1		
5	4,1	24,9	5	30
6	1,7	24,4	6	31
7	2,6	25,2	5	29
8	9,6	16,1	6	30
9	6,6	23,5	5	30
10	8,7	23,5		
11	4,5	24,1	6	28
12	3,2	23,3	8	29
13	1,2	15	9	29
14	1,4	23,5	6	31
15	1,7	22,6	6	31
16	1	22,3		
17	3,4	21,4		
18	1,3	19,4	6	30
19	7,6	13	5	31
20	5,5	11,3	5	30
21	8,4	21,4		
22	7,6	22,6	6	18
23	4,4	23	5	17
24	3,6	23,9		
25	2,5	22,9		
26		23,6	3	32
27	2	24,4	2	33
28		24,9	4	33
29	6,1	16,9	5	32
30	7,5	14,7	7	27
31	5,3	14,7		
Promedio	4,4	21,5	5,5	29,1

Junio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7	13,3		
2	4	22,5	6	17
3	4,6	23	3	18
4	1,7	12,3	4	28
5	7	19,3	4	16
6	3,2	21,7	5	19
7	1,1	21,5		
8	1,5	16,3	4	21
9	8,7		2	30
10		14,2	6	25
11	8,7	17,4	6	26
12	9,4	25,1	4	16
13	8,2	14,1	6	14
14	8	11,9		
15	6,5	24,7		
16	2,4	24,4		
17	3,7	15,3	4	28
18	7,4	17,7	5	20
19	9	21,1	7	24
20	11,3	19,5	11	32
21	9,9	17,9		
22	12	21		
23	8,7	22,7	5	26
24	1,9	20,6	6	20
25	0,1	22,7	1	30
26	0,6	14,1	4	32
27	5,6	22,7	5	24
28	8,1	14,4		
29	6	13,4		
30	7,6	15	4	33
31				
Promedio	6,0	18,6	4,9	23,8

Julio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6,7	19,3	6	14
2	6,9	11	8	22
3	9,7	14	7	16
4			5	21
5				
6				
7	9,7	14	6	24
8	10,2	23,4	5	16
9	0,9	21,9	-2	30
10	0	22,9	0	26
11	0	13,7	0	30
12	0	16,6		
13	7	23,3		
14	3,9	22,3	4	33
15	0	23,7	0	32
16	1,2	20	-2	30
17	1,7	17	3	22
18	6,1	21,9	5	21
19	3	23		
20		23		
21	12,5	24,4	2	32
22	0,4	23,5	3	29
23	0	23,2	1	22
24	0,7	23,3	2	21
25	1		2	22
26				
27		23,1		
28	1,9	23,7	4	29
29		22,4	1	24
30	11,3		14	26
31				
Promedio	4,1	20,6	3,4	24,6

Agosto

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	11,6	23,7	6	29
2				
3	10	20,6		
4	7,2	22,5	1	29
5	7,2	23,5	1	21
6	6,5	20,5	-2	30
7	6,8	19,7	4	30
8	3,9	21,2	1	33
9	6,8	20	3	30
10				
11			0	31
12	10		7	17
13		23,7	5	21
14	6,5	25,1	8	28
15	1,1	25,1		
16	6,8	24,1		
17	3,9	24,8		
18	6,5	20,7	5	35
19	9,1	24,1	4	26
20	1,1	24,4	4	30
21	0	23,9	2	27
22	0	23,9	2	28
23	0	25,4		
24	0	24,9		
25	0,9	25,6	1	33
26	4,9	24,5	8	26
27	0,9	24,9	4	32
28	8,7	27,2	4	28
29	12	25	7	26
30	10,6	24,5		
31	11,3	23,9		
Promedio	5,7	23,6	3,6	28,1

Septiembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6,3	26	6	33
2	8,2	27,2	5	34
3	10,2	19	10	40
4	4,2	23	7	23
5	1,7	22,1	10	36
6	6	26,1		
7	6,3	20,1		
8			1	34
9			0	33
10			2	34
11			4	37
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				
Promedio	1,8	23,4		33,8

Octubre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1			10	20
2			5	36
3			7	34
4				
5				
6			7	30
7			8	26
8			7	30
9			5	34
10			7	40
11				
12				
13			5	40
14	7,1	27,4	9	42
15	11,4	27	11	41
16		32,9	10	42
17	8,4	27,6	9	40
18	5,1	33,8		
19	11,3	26,1		
20	4,5	25,3	5	38
21	6	27,2	7	34
22	6,8	27,1	9	38
23	6,5	27,4	7	34
24	10,4	27,4	8	39
25	10,2	19,1		
26	9	26		
27	4,5	27,1	7	39
28	6,4	30,7	8	35
29	9,1	29	10	39
30	9,5	25,1	7	36
31	3,7	26,7	6	32
Promedio	5,4	27,4	7,6	35,6

Noviembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6	31,1		
2	7,9	18,8		
3	7,1	30,3	7	42
4	8,7	31,2	10	40
5	10	32,5	11	40
6	10,9	29,2	10	42
7	10,5	29,6	11	26
8				
9	7,9	29,7		
10	7,6	32	10	40
11	8,7	26,7	10	40
12	7,2	30,2	11	30
13	8,4	31,1	10	40
14	9,8	30,4	12	39
15	11,6	28,6		
16	10,6	18,5		
17	9,1	27,3	11	34
18	7	30,2	10	35
19	8	32	10	38
20	9,5	31,9	11	36
21	8,7	31,6	11	36
22	11	32,3		
23	8,3	30,2		
24	10,3	32,1	12	36
25	7,9	30,9	9	32
26	8	32,2	8	36
27	9,4	29,3	11	36
28	8,3	32,3	10	38
29	9,5	31,1		
30	7,6	31,7		
31				
Promedio	10,6	29,8	6,8	36,8

Diciembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	9	29,3	9	36
2	10	29,9	12	33
3	10	26,7	13	32
4	10,6	31,1	11	36
5	6,8	31,3	8	36
6	10,9	31,9		
7	9,1	28,9		
8	8,7	30,7		
9	7,5	31	8	34
10	13,2	31	10	34
11	7,2	30,7	13	33
12	7,8	33,4	12	34
13	7,9	33,1		
14	12	30,3		
15	5,3	29,5	8	36
16	6,7	40,1	9	34
17	8,7	33,4	14	42
18	11	33,2	12	42
19	10,6	30,1	16	44
20	10,5	33,1		
21	7,3	29,2		
22	6	29,9	9	42
23	7,6	32,3	10	42
24	8,7	32,4	12	43
25	11,1	32,4	10	39
26	10,7	29,7		
27	7,1	26,3		
28	6	29,1		
29	9,4	32,1	10	39
30	10,5	31,6	12	45
31	9,9	32,1	10	42
Promedio	11,6	31,2	7,4	37,8

Año 2004
Enero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	9	32,6		
2	11,4	33,9	13	45
3	11,3	33,8		
4	12,4	35,4		
5	8,3	30,2	10	40
6	10,6	32,6	13	38
7	12,7	33,3	13	39
8	10,6	33,1	10	38
9	9	31,7	11	37
10	9,1	30,9		
11	9,1	34,2		
12	11	33,3	12	35
13	11,7	34	12	40
14	12,7	32,7	13	38
15	12	31,1	10	38
16	13,6	32,6	14	40
17	11,1	33,5		
18	11,4	33		
19	10,9	30,7	15	41
20	12,2	33,2	12	39
21	10,3	33,2	12	38
22	11,3	33,3	10	37
23	10	32,6	10	35
24	9,9	33,3	12	38
25	11,7	34		
26	13,6	32,5		
27	10,6	32,8		
28	11,6			
29				
30				
31				
Promedio	12,9	32,9	6,5	38,6

Febrero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1		31,2		
2	10,7	31,7		
3	9,4	31,4		
4	9,4	34		
5	9,5	35,3		
6	11,3	3,9		
7	11,4	31,9		
8	8,9	30,7		
9	10,4	31,7	12	39
10	9,9	34,8	12	38
11	11	30,4	13	42
12	10,1	33	10	40
13	9,9	34,2	12	41
14	8,5	32		
15	8,4	32,3		
16	14,4		13	42
17	6,6	31,7	9	33
18	7,9	30,2	11	32
19	9,5	34,9	11	36
20	11,3	30,7	12	40
21	10,6	32,4		
22	11,1	33,9		
23	13,2	33,8	10	39
24	11,7	35	10	38
25	10,6	34,3	10	39
26	9	33,7	11	32
27	10,2	33,7	10	
28	9,7	33,4		
29	9	33,7		
30				
31				
Promedio	11,8	31,8	5,9	37,9

Marzo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	11,3	20	10	21
2	10,4	29,3	9	30
3	9,4	32,7	10	29
4	9,6	33	10	28
5	12,9	29,3	10	29
6	11,2	25,5		
7	10,9	27,1	12	30
8	8,7	28,2	12	3
9	9,2	26,8	12	39
10	9,9	28,2	12	40
11	12,4	19,6	12	40
12	11,5	26,2	12	36
13	12	22,4		
14	13,3	41,9		
15	9	28,2	11	33
16	8,4	28,4	11	36
17	10,6	25,6	12	39
18	5,9	27,1	8	34
19	7,1	27	9	35
20	9,5	32,1		
21	8,7	27,8		
22	9,8	27,8	8	36
23	7,9	27,4	9	35
24	9,8	25,8	10	36
25	9	26,4	9	34
26	9	25,7	8	33
27	6,9	26,2		
28	10	18,2		
29	9,9	23,2	8	35
30	9,9	24,1	12	30
31	12,4	31,4	14	35
Promedio	12,8	27,2	8,1	32,3

Abril

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	11,4	24,5	10	30
2	9	25,4	12	38
3	6,8	27		
4	9,4	24,9		
5	10,6	24,5	6	32
6	10,5	25,3	12	29
7	7,2	22,6	8	30
8	11,2	25,7	11	33
9	8,1	22,6	9	32
10	7,9	26,3		
11	10	22,8		
12	10	16	5	32
13	9,6	17,3	9	28
14	6,9	23,7	9	26
15	5,6	21,4	5	26
16	4,5	24,4	6	25
17	7,9	21,3		
18	5	31,8		
19	3,3	21,5	5	26
20	4,1	15,3	8	24
21	7,7	17,5	7	20
22	7	22,7	6	22
23	4,7	22,1	5	22
24	5,2	22,6		
25	24,2	4,5		
26	20,5	4,5	6	27
27	15,5	8,5	5	30
28	20,3	6,9	5	28
29	22,9	5,6	4	22
30	20,4	3	4	26
31				
Promedio	12,8	19,4	5,2	27,6

Mayo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	2.5	23.1		
2	10	23.4		
3	4.9			
4	0.4	23.6		
5	7.5	25.4	5	28
6	2.9	22.6	5	30
7	7.5	12.4	5	26
8	6.5	21.7		
9	7.1	14		
10	8.8	15.4	4	26
11	6.4	14.9	5	14
12	1.2	22.8	4	21
13	1.2	22.9	5	21
14	0	23.4	1	22
15	0	20.2		
16	3.8	23.1		
17			1	23
18	7	16.9	7	19
19	6.1	21.1	7	27
20	6.7	13.7	4	25
21	6.7	15.3	5	22
22	1.2	24.8		
23	1.1	21.4		
24	3	22.2	5	29
25	2	21.8	4	22
26	4.6	10.3	6	20
27	4.1	21.7	5	22
28	7.1	16.1	6	22
29	7.5	22.7		
30	3.3	22.3		
31	3.4	22.2	5	25
Promedio	4.5	19.4	4.7	23.4

Junio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	3.7	21.9	6	19
2	2.6	15.4	6	22
3	3.6	14.8	8	15
4	3.7	22.1	9	22
5	2.2	10.3		
6	0.3	23.7		
7	4.1	24.3	2	23
8			2	23
9	7.4	19.7	5	21
10	3.7	10	4	15
11	0.2	19.5	2	18
12	2	18.1		
13	2.9	15.2		
14	4.4	17	-1	16
15	10	19.5	7	19
16	6	20.2	10	20
17	4.9	14.5	8	20
18	8.3	19.7	7	19
19	8.3	17.4		
20	4.4	19.5		
21	1.4	13.9	4	26
22	5.6	20	5	18
23	2.6	15.5	4	19
24	4.5	10.7	8	19
25	7.5	18.9	4	10
26	8.5	17.5		
27	6	21.9		
28	2.2	17.4		
29	2.5	19.7	5	26
30	0	20.1	0	25
31				
Promedio	4.3	17.9	5.0	19.8

Julio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	0.9	19.3	3	22
2	0	17.4	3	14
3	7.2	21.6		
4	6.4	20.4		
5	7	20.4	8	28
6	7.6	20.4	7	23
7	1.3	19.9	6	22
8	5.7	17.9	0	21
9	3	15.9	4	22
10	0	16.6		
11	0	14.7		
12	6.2	11.1	-1	17
13	8.9	21.7	8	16
14	3.7	25	2	22
15	4.1	20.3	1	22
16	2.5	16.3	2	16
17	2.9	17.3		
18	1.7	22		
19	7.1	23.6	2	24
20	9.1	21.1	5	14
21	6	17.1	3	10
22	6.8	11.6	4	13
23	6.5	21.6	7	
24	2.7	15.2		
25	6.7	11.6		
26	6.4	16.9	5	23
27	7.9	21.7	9	15
28	3.3	22.9	5	20
29	0	20.4	2	22
30	0	19.6	5	15
31	6.7	16.3		
Promedio	4.5	18.6	4.1	19.1

Agosto

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
--	------------------------	--	---------------------------	--

Fecha	Temperatura Mínima °C	Temperatura Máxima °C	Temperatura Mínima °C	Temperatura Máxima °C
1	6.7	16.5		
2	7.3	12.3	8	13
3	5.8	18.2	8	13
4	3.7	18.7	5	16
5	5.7	21.2	8	22
6	1.4	21.2	4	20
7	0	22.7		
8	1	14		
9	7.8	15.8	1	22
10	3.7	21.7	8	16
11	6.4	19	5	14
12	1.6	22	4	15
13	5.1	18.6	10	22
14	6.1	18.7		
15				
16	5.6	19.1	4	21
17	0.2	21	2	17
18	4.4	20	1	22
19	1.3	21.7	4	16
20	0.2	20.8	5	22
21	0.2	21.9		
22	0.3	20.2		
23	0	23.6	4	18
24	2.2	24.4	5	21
25	4.2	24.8	7	25
26	7.7	16.5	8	24
27	7.1	20.1	1	23
28	9.3	25.2		
29				
30	8.6	23.3	8	
31	5.3	23.9	8	30
Promedio	4.1	20.2	5.4	19.6

Septiembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura

	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	5.7	23.8	5	22
2	7	22.8	11	26
3	11.7	15.4	9	24
4	9.1	22.1		
5	7.6	16		
6	8.1	21.9	10	16
7	4.5	23.2	11	24
8	0	22.6	1	24
9	0	22.1	1	20
10	0	22.2	2	22
11	0.3	24.3		
12	1.9	25.8		
13	3.6	25.8	4	32
14	4.6	24.1	6	34
15	2.6	24.8	6	26
16	2.9	26.7	5	30
17			11	29
18	6	21		
19	0.7	25		
20	1.1	20.3	4	30
21	0.2	23.7		
22	0.4	20.9		
23	1.1	26.3		
24	3	23.9		
25	4.6	26.4		
26	5.8	20.5		
28				
29	6.1			
30				
Promedio	3.8	22.9	6.1	25.6

Octubre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C

1	4.3	2.4	7	34
2	4.9	25.9	12	39
3	5.9	25.2	12	33
4	9.9	24.4	12	28
5	7.3	19	10	27
6	10.3	21	12	26
7	7.6	23.6	12	28
8	11.3	26.1	11	27
9	6.6	25.2		
10	3.3	20.2		
11	8.7	10.4	6	23
12	8.8	20.5	8	26
13	4.3	22.4	8	23
14	7.7	23.5	10	26
15	4.5	21.8	8	24
16	7	15.2		
17	5.3	23.2		
18	2	24.9	8	26
19	4	25.5	10	30
20		26.8	10	30
21	9.6	21.9	14	30
22	6.4	21.9	11	22
23	2	23.2		
24	3.8	25		
25	9.2	18.7	6	30
26	10	25.9	8	30
27	6.6	25.8	10	26
28	7.9	25.1	12	26
29	7.9	25.2	11	26
30	7.6		10	24
31	7.3	23.7		
Promedio	6.7	22.1	9.9	27.7

Noviembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6	31.1		

2	7.9	18.8	11	28
3	7.1	30.3	14	14
4	8.7	31.2	8	23
5	10	32.5	10	25
6	10.9	29.2		
7	10.5	29.6		
8	10	29	11	35
9	7.9	29.7	11	24
10	7.6	32	10	26
11	8.7	26.7	15	34
12	7.2	30.2	16	24
13	8.4	31.1		
14	9.8	30.4		
15	11.6	28.6	8	26
16	10.6	18.5	11	26
17	9.1	27.3	10	26
18	7	30.2	12	32
19	8	32	10	33
20	9.5	31.9		
21	8.7	31.6		
22	11	32.3	14	32
23	8.3	30.2	15	34
24	10.3	32.1	12	34
25	7.9	30.9	15	30
26	8	32.2	14	30
	9.4	29.3	15	28
28	8.3	32.3		
29	9.5	31.1	15	33
30	7.6	31.7	15	35
Promedio	11.2	29.8	12.4	28.7

Diciembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	9	29.3	15	36
2	10	29.9	15	19
3	10	26.7	17	30

4	10.6	31.1	14	26
5	6.8	31.3		
6	10.9	31.9	15	34
7	9.1	28.9	14	34
8	8.7	3.7	16	34
9	7.5	31	15	36
10	13.2	31	14	39
11	7.2	30.7		
12	7.8	33.4		
13	7.9	33.1	14	39
14	12	30.3	15	35
15	5.3	29.5	14	37
16	6.7	40.1		
17	8.7	33.4	14	36
18	11	33.2	11	35
19	10.6	30.1	14	36
20	10.5	33.1	14	34
21	7.3	29.2	11	37
22	6	29.9	14	34
23	7.6	32.3	14	38
24	8.7	32.4	14	37
25	11.1	32.4		
26	10.7	29.7		
27	7.1	26.3	15	40
28	6	29.1	18	38
29	9.4	32.1	14	32
30	10.5	31.6	16	34
	9.9	32.1		37
Promedio	9.0	30.3	14.5	34.7

Año 2005

Enero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	12	34.1	14	40
2	13.1	33		
3	10.3	32.4		

4	10.9	36.2	15	40
5	10.3	31.9	16	40
6	9.3	28.7	12	36
7	9.4	31.7	15	40
8	10.2	46.5	16	34
9	11.2	39.3		
10	9.7	30.2	15	36
11	10.2	30.4	14	36
12	11.5	29.2	15	32
13	8.6	31.2	15	34
14	9.1	26.5	14	39
15	9.6	27.3		
16	10.6	32.9		
17	10.7	32.7		
18	11	30.5		
19	10	30.9		
20	11	30.5		
21	11.3	25.5		
22	9.1	30.3		
23	9.2	29.8		
24	9.2	29	15	40
25	7.6	30.1	12	36
26	7.8	29.1	12	37
27	9.5	27.3	15	37.8
28	9.3	29.1	12	34
29	10.9	22.7		
30	6.2	23.8		
	4.9	28.1	11	34
Promedio	9.8	30.7	14.0	36.8

Febrero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6.8	30.2	11	36
2	7.7	30	13	40
3	7.7	29.9	14	44
4	8.7	30.2	13	39
5	9.4	28.9		
6	9.5	28.5		
7	8.7	28.5	14	36

8	10	29.1	14	34
9	9.8	32	16	42
10	11.2	30.5	16	43
11	11.6	20.7		
12	14.3	26		
13	11.2	20.1		
14	9	27.6	14	36
15	9	26.6	14	33
16	9.9	29	14	34
17	11.1	27.3	14	36
18	10.7	26.6	15	35
19	10.2	28.3		
20	9.5	27.5		
21	9	29.1	15	38
22	9.3	28.8	15	40
23	11.3	28.4	15	40
24	10.3	27.7	16	38
25	9.5	29.1	16	40
26	12.3	26.2		
27	11.4	20.5		
28	15.8	20.9	16	39
29				
30				
31				
Promedio		10.2	27.4	14.5
				38.1

Marzo

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	13.4	24.7	14	38
2	9.6	27.9	16	36
3	11.4	30.1	15	34
4	13.4	26.8	20	40
5	7.3	25.5		
6	5.5	22		
7	7.8	21.2	10	32
8	6.4	24	11	26
9	4.3	24.8	9	31

10	5.3	28.5	13	33
11	9.3	23	14	31
12	13.6	25.5		
13	9.7	29.6		
14	10.2	28.6	16	34
15	9	25.1	14	30
16	9.3	26	12	32
17	9	26.5	12	32
18	6.3	24.9	12	35
19	7.3	23.3		
20	13.9	27.3		
21	6	25.1	11	32
22	7.2	27.1	11	27
23	7.2	25.7	10	26
24	7	26.9	11	28
25	11.3	22.6		
26	7	23.7		
27	5.5	24.3		
28	5.6	23	10	32
29	4.5	23.1	10	28
30	5	22.7	10	26
31	9	23.2	10	28
Promedio	8.3	25.2	12.3	31.4

Abril

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	5.6	24.1	10	27
2	4.5	24.5		
3	4.2	24.9		
4	3.7	25	6	30
5	6	23.9	5	27
6	2.3	24.1	6	28
7	7.9	23.1	7	25
8	2.7	24.7	5	26
9	3.1	23.6		
10	3.3	24.9		
11	8.2	24.3	4	30

12	3.5	24.1	5	31
13	4.6	24.4	5	26
14	6.1	24.1	6	25
15	4	23.5	5	29
16	5.9	24.4		
17	5.4	23.2		
18	4.3	23.9	12	32
19	5.3	22.3	10	30
20	3.6	23.5	8	29
21	2	23	7	28
22	2.2	24	7	29
23	7	17.5		
24	3.7	23		
25	3	24	5	26
26	4.7	23	5	26
27	5.4	22	4	24
28	7.2	23.3	4	25
29	3.2	23	4	22
30	1.2	23.4		
31				
Promedio	4.5	23.6	6.2	27.4

Mayo 2005

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1				
2			3	25
3			5	22
4			5	21
5			5	18
6			5	25
7				
8				
9	10.3	13.9	6	30
10	8.7	16.9	4	25
11	1.4	10.9	7	20
12	6.1	9.4	4	19
13	4	14	5	19

14	0	15.7		
15	4.1	16		
16	4.5	14.7	4	18
17	6	10.6	3	18
18	6.1	10.5	5	20
19	7	11.5	6	19
20	4.9	10.6	4	25
21	1.3	8.6		
22	1	9.4		
23	6.7	11		
24	6.1	13.1	4	25
25			6	29
26			5	22
27			6	20
28				
29				
30			6	21
31			5	17
Promedio	4.9	12.3	4.9	21.8

Junio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1			3	18
2	6.7	20	4	13
3	6	22	4	
4	1.7	23.9		
5	0.3	20.4		
6	3.3	24	4	15
7	9	10	3	14
8	1.7	12	3	12
9	6	20.5	5	10
10	7	23.7	5	11
11				
12				
13	5.2	20.1	4	13
14	2	4.2	2	14
15	0.4	10.4	3	15

16	7	10	5	11
17	8.3	12.4	8	10
18	6.4	14.3		
19	9.4	16		
20	10	17	9	12
21	9	17	6	12
22	6.5	16	4	10
23	7	17	5	12
24	7	11.3	4	13
25	9	14.9		
26	7.1	10.1		
27	9.4	12.1		
28	6.8	10.4	4	12
29	7	22.7	2	12
30	7	13.3	1	13
31				
Promedio	6.2	15.8	4.2	12.6

Julio

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	10	16.7	4	22
2	9	24		
3	6.1	17.1		
4	4.9	20.7	2	25
5	5.1	14.7	6	15
6	4.2	16	5	16
7	0.1	15.3	4	14
8	6.4	19.4	4	10
9	6.6	20.6		
10	3.7	23		
11	4	14	2	11
12	4.1	21.4	2	11
13	4.1	13	5	10
14	0.7	12	4	9
15	2	14	3	12
16	1.9	15		
17	6	18.7		

Proyecto FIA código Biot 01-A-71

“Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de cuatro especies de
Rhodophiala chilenas”

18	7	15.3	5	14
19	1.7	16	6	10
20	3.4	19	6	11
21	4.7	19.2	5	13
22	5	15.5	7	12
23	4.2	20		
24	7.5	17		
25	4.2	15	8	10
26	5.6	12	7	9
27	6.1	15	2	10
28	4.9	13.4	8	15
29	6.7	14	4	14
30	6.8	15.4		
31	6.6	15.4		
Promedio	4.9	16.7	4.7	13.0

Agosto

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7	14	5	18
2	6.7	15.7	5	19
3	5.8	18.1	6	20
4	4.5	19.3	8	22
5	6.7	20.2	7	25
6	6.9	17.5		
7	5.5	17.8		
8	8	16	4	20
9	7.5	18	3	22
10	7	19	4	25
11	7.9	18.6	7	20
12	9	19.4	4	19
13	7	20		
14	6.6	19.7		
15	7.6	22.1		
16	6	10.9	2	16
17	10	16	2	14
18	8	17	5	13
19	10.3	22.1	4	18

20	9	20.3		
21	9.6	19		
22	7.8	20.5	3	19
23	9.5	18.5	5	20
24	6.6	19	7	21
25	7.8	19.7	8	20
26	7.7	21	8	24
27	7	20		
28	8.1	18		
29	9.2	17	4	20
30	10	18.2	4	21
31	9.5	18.5		
Promedio	7.7	18.4	5.0	19.8

Septiembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura Mínima °C	Temperatura Máxima °C	Temperatura Mínima °C	Temperatura Máxima °C
1			5	17
2			5	25
3				
4				
5			6	25
6			6	20
7			7	21
8			8	18
9			9	21
10				
11				
12			7	25
13	7.8	20.2	5	24
14	6.4	21	6	26
15	6.6	24.8	5	27
16	6	23	6	28
17	4	25		
18	7	23		
19	9.9	21.4		
20	6.9	22.3	7	25
21	7.1	24.4	5	28

22	10	24.7	6	30
23	10.5	25.1	5	30
24				
25				
26	5.2	26.2	10	32
27	6.1	21.1	15	30
28	11.9	19.7	10	25
29	7.3	23		
30	4.3	22.6		
31				
Promedio	7.3	23.0	7.0	25.1

Octubre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura		Temperatura	
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7.4	20.3		
2	6.3	15.1		
3	2.9	21.3		
4	7.5	23.7		
5	9	23		
6	7.5	21		
7	9.3	18.8		
8	9.4	17.4		
9	9.1	14		
10	8.1	15		
11				
12				
13				
14	11	25		
15	13	20.1		
16	5.9	25.1		
17	7	24.7		
18	7.1	25.9		
19	9	28.9		
20	8.8	35.7		
21	9.5	25.6		
22	10.3	26.8		

23	4.3	28.5		
24	6.4	19.4		
25	7.3	25.8		
26	6.5	24.9		
27	5.6	24.1		
28	8.2	22.6		
29	2.6	17		
30	5.4	26.1		
31	6	26.2		
Promedio	7.5	22.9	#iDIV/0!	#iDIV/0!

Noviembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	6.5	22.1		
2	7.5	25.9		
3	9.5	23		
4	5.1	24.1		
5	6.7	25.4		
6	5.3	24.8		
7	6.9	24.5		
8	10	22.2		
9	5.5	25.6		
10	7.7	29.8		
11	9.6	24.5		
12	7.1	26.8		
13	6.1	24.9		
14	7.4	21.4		
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				

25				
26				
27				
28				
29	7.3	26.2		
30	7.1	29.1		
31				
Promedio		7.2	25.0	#iDIV/0!

Diciembre

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura	Temperatura	Temperatura	Temperatura
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	7	27.9		
2	10	28.4		
3	7	25.3		
4	9	24.4		
5	5.4	26		
6	6.9	27.5		
7	6.5	27.3		
8	10	29.5		
9	9.3	28.7		
10	9.5	32.7		
11	10.6	33.4		
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				

28				
29	7.3	26.2		
30	7.1	29.1		
31				
Promedio	8.1	28.2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

Año 2006
Enero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura		Temperatura	
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	12.4	30.1		
2	10.5	30.2		
3	10.5	28.6		
4	12.4	30.6		
5	9.8	33.6		
6	10	32.6		
7	9.5	27.6		
8	9.9	27.6		
9	9.9	31.1		
10	10	27.8		
11	9.4	29.2		
12	11	29.6		
13	10.1	32.1		
14	9	26.7		
15	7.1	30.2		
16	8.1	30.1		
17	10.7	28.8		
18	10.1	29.5		
19	10	26.3		
20	9.3	29.6		
21	10	34.3		
22	9.6	31.3		
23	10	30.4		
24	12	29.3		
25	11.8	32.7		
26	11.5	30.2		
27	11.6	33.9		
28	10.5	30.2		

29	12.5	27.6		
30	11.5	32.7		
31	8.8	30.4		
Promedio	10.3	30.2	#¡DIV/0!	#¡DIV/0!

Febrero

	Invernadero Panguilemo		Invernadero Campus Lircay	
Fecha	Temperatura		Temperatura	
	Mínima °C	Máxima °C	Mínima °C	Máxima °C
1	11.1	229.3		
2	10.7	26.9		
3	10	33		
4	11.6	36.9		
5	8.6	35.4		
6	10	36.5		
7	12.4	32.4		
8	11.6	33.5		
9	9.5	35.3		
10	10.6	36.5		
11	12.1	31.1		
12	12.2	32		
13	12	32.7		
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				
31				

Promedio	11.0	48.6		
----------	------	------	--	--