



BIOT-01-A-071

CONCURSO NACIONAL DE PROYECTOS DE DESARROLLO E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA 2001

9/09

FORMULARIO DE PRESENTACIÓN DE PROPUESTAS

La propuesta de proyecto deberá presentarse en este formulario, en tres ejemplares (un original y dos copias) y en disquet. Aquellos postulantes que no cuenten con medios computacionales, pueden transcribir el contenido del proyecto directamente a este cuadernillo.

Antes de iniciar la preparación del proyecto y el llenado del formulario se solicita leer con detención todos los puntos del "Instructivo para la Presentación de Propuestas", a fin de evitar errores que dificultarán posteriormente la evaluación de la propuesta por parte de la Fundación, o que puedan ser motivo de rechazo de la propuesta en las etapas de admisión o evaluación.

El formulario está dividido en secciones, que incluyen cierto espacio para la presentación de la información. Si el espacio en una sección determinada no es suficiente, se podrán agregar hojas adicionales, identificando la sección a la cual pertenecen. Podrá adjuntarse además cualquier otro tipo de información adicional o aclaratoria que se considere importante para la adecuada descripción de la propuesta.





FOLIO DE
BASES

098

CÓDIGO
(uso interno)

BIOT-01-A-71

1. ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO

NOMBRE DEL PROYECTO:

BID-PI-C-2001-1-A-07

Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas

Línea Temática:

Agricultura y
ganadería

Rubro:

Floricultura

Región(es) de Ejecución:

VII y X regiones

Fecha de Inicio:

15 Enero 2002

DURACIÓN:

48 meses

Fecha de Término:

15 Enero 2006

AGENTE POSTULANTE:

Nombre : Universidad Austral de Chile (UACH)
Facultad de Ciencias Agrarias

Dirección : Independencia 641 Ciudad y Región: Valdivia, X región

RUT : 81380500-6

Teléfono : 56 -63 -221960 Fax: 56 - 63 - 221765 e-mail rectoria@uach.cl

Cuenta Bancaria:

AGENTES ASOCIADOS: Universidad de Talca

REPRESENTANTE LEGAL DEL AGENTE POSTULANTE:

Nombre: Manfred Max Neef
Cargo en el agente postulante: Rector

RUT:

Dirección: Independencia 641

Fono: 56 - 63 - 221765

Firma:

Ciudad y Región: Valdivia, X Región

Fax y e-mail: rectoria@uach.cl

COSTO TOTAL DEL PROYECTO

(Valores Reajustados)

:

\$

FINANCIAMIENTO SOLICITADO

(Valores Reajustados)

:

\$

%

APORTE DE CONTRAPARTE

(Valores Reajustados)

:

\$

%

26.16.2

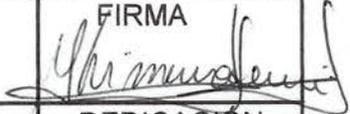


2. EQUIPO DE COORDINACIÓN Y EQUIPO TÉCNICO DEL PROYECTO

2.1. Equipo de coordinación del proyecto

(presentar en Anexo A información solicitada sobre los Coordinadores)

COORDINADOR DEL PROYECTO

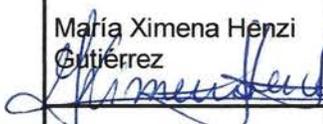
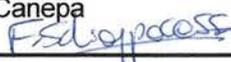
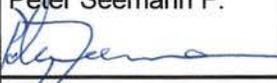
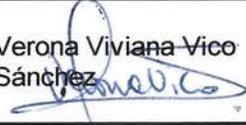
NOMBRE María Ximena Henzi G.	RUT	FIRMA 
AGENTE Universidad Austral de Chile	DEDICACIÓN PROYECTO (%/año) 30	
CARGO ACTUAL Profesor auxiliar, genética y mejoramiento de plantas, Facultad de Ciencias Agrarias.	CASILLA 567 Valdivia	
DIRECCIÓN Independencia 641 Valdivia	CIUDAD Valdivia	
FONO 63 - 293070	FAX 63 - 221233	E-MAIL xhenzi@uach.cl

COORDINADOR ALTERNO DEL PROYECTO

NOMBRE Flavia Schiappacasse Canepa	RUT	FIRMA 
AGENTE Universidad de Talca	DEDICACIÓN PROYECTO %/AÑO 30	
CARGO ACTUAL Docente, M.S., Floricultura	CASILLA 747, Talca	
DIRECCIÓN 2 Norte 685	CIUDAD Talca	
FONO 71 - 200214	FAX 71 - 200212	EMAIL fschiap@pehuenc he.otalca.cl



2.2 . Equipo Técnico del Proyecto
(presentar en Anexo A información solicitada sobre los miembros del equipo técnico)

Nombre Completo y Firma	RUT	Profesión	Especialidad	Función y Actividad en el Proyecto	Dedicación al Proyecto (%/año)
María Ximena Henzi Gutiérrez 		Ing. Agrónomo Ph. D.	Biotecnología	Coordinador	30
Flavia María Schiappacasse Canepa 		Ing. Agrónomo M.S.	Floricultura	Coordinador Alterno	30
Peter Seemann F. 		Ing. Agrónomo Dr. Rer. Hort.	Floricultura, Propagación vegetal	Co- investigador	30
Patricio Humberto Peñailillo Brito		Biólogo, Dr.	Biología Vegetal	Co - investigador	20
Manuel Andrés Muñoz David 		Ing, Agrónomo	Producción vegetal	Administración, investigación, difusión	75
Verona Viviana Vico Sánchez 		Ing. Agrónomo	Hortofruticultura	Investigación, difusión	35

GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA
UNIDAD DE ESTUDIOS Y PROYECTOS
DIRECTOR DE INVESTIGACION Y DESARROLLO



3. BREVE RESUMEN DEL PROYECTO

(Completar esta sección al finalizar la formulación del Proyecto)

En nuestro país las especies nativas han sido poco valoradas y aún menos estudiadas; han sido otros países los que han extraído material para su estudio, mejoramiento y posterior utilización comercial.

Existen plantas bulbosas o geófitas que presentan un claro potencial ornamental, como son las especies de *Rhodophiala* representadas por *R. bagnoldii*, *R. montana*, *R. rhodolirion* y *R. splendens*. Sin embargo, en floricultura se busca que las plantas cultivadas posean grandes flores y fuertes tallos. Esto ha llevado a la creación de individuos poliploides, que, de no estar disponibles en la naturaleza, son inducidos por medios artificiales. Las especies mencionadas de *Rhodophiala* presentan varias características que las hacen atractivas (hábito de crecimiento, altura de tallo, color de floración, etc), sin embargo el aumentar el tamaño de la flor, intensidad de color, altura de tallo, etc., las haría más atractivas para diferentes mercados.

Con el mejoramiento y la creación de nuevos cultivares se busca dar mayor valor al material genético nativo para un amplio uso paisajístico, un posible desarrollo de producción de bulbos para uso en maceta o para flor de corte, además de un considerable potencial como producto de exportación y la posibilidad de patentar los cultivares obtenidos producto de tal mejoramiento genético.

El mejoramiento de estas especies de *Rhodophiala*, como también el de otras especies nativas con posible uso ornamental, implica enormes ventajas comerciales futuras, por lo que, aumentando el nivel de ploidía de estas especies, en estos casos particulares la obtención de genotipos poliploides permitirá alcanzar características genéticas superiores que se requieren para transformarlas en flores de corte con posibilidades de mercado, o flores para maceta y jardín.

El presente proyecto sería realizado en un período aproximado de 4 años, e incluye en primer lugar la inducción de poliploidía en las cuatro especies mencionadas, para lo cual es necesario determinar los cariotipos de las cuatro especies, establecer un protocolo para la inducción de poliploidía en esas especies, la inducción de poliploidía y la evaluación del grado de poliploidía logrado. Posteriormente se realizará la multiplicación masiva del material in vitro y el material será sometido a condiciones que favorezcan un crecimiento vegetativo rápido en invernadero, ambos procesos aplicando protocolos establecidos durante el primer año de desarrollo del proyecto, con el fin de disponer de suficiente material que permita hacer florecer en el menor tiempo posible los bulbos para su evaluación ornamental.

En resumen este proyecto propone tomar especies endémicas chilenas, evitando su extinción, aprovechar sus características ornamentales, e induciendo la poliploidía sobre ellas, para obtener finalmente clones poliploides con características ornamentales mejoradas, los cuales podrían traducirse en un nuevo cultivo comercial, no sólo de interés para la exportación, sino que también a nivel nacional, de vital uso para paisajistas, como para ser disfrutado por los amantes de la jardinería.



4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA A RESOLVER

A nivel mundial la floricultura presenta un potencial de desarrollo interesante, es por ello que todos los esfuerzos se concentran en una intensa búsqueda de nuevas especies con potencial florícola, para su posterior producción a nivel comercial.

La biotecnología aporta hoy en día las herramientas necesarias para alcanzar características tanto agronómicas, como ornamentales superiores. Para lograr esto se debe contar con material que presente un potencial interesante a ser investigado y mejorado. El mejoramiento o la creación de nuevos cultivares se ve favorecido en países sudamericanos, constituyéndose éstos en potenciales de nuevas características genéticas. Es así como al patrimonio nacional pertenecen, entre otras, 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. El estudio de material nativo busca analizar un material genético único, evitándose la extinción de especies endémicas.

Recientemente en Chile se han realizado trabajos de investigación orientados a la recolección y multiplicación de especies geófitas chilenas con potencial ornamental. Estos trabajos han generado importantes conocimientos, como por ejemplo la definición de las especies geófitas que presentan un potencial ornamental definido. Dentro de ellas se encuentran especies de *Rhodophiala*.

El género *Rhodophiala*, perteneciente a la familia Amaryllidaceae, posee especies chilenas que se distribuyen mayoritariamente desde la III a la X región. Son plantas geófitas, que producen hermosas flores de destacados colores, presentan órganos de almacenamiento que les permiten permanecer en estado de dormancia o receso, cuando las condiciones de humedad o temperatura no son las adecuadas. Dentro del género *Rhodophiala* existen una serie de especies con características que las hacen aptas para producir flores de corta, con un tallo floral suficientemente largo y robusto y con un número de flores individuales adecuado para producir una inflorescencia atractiva. Cuatro de estas especies: *Rhodophiala bagnoldii*, *R. montana*, *R. rhodolirion* y *R. splendens* han sido colectadas dentro del marco del proyecto "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial", financiado por la Fundación para la Innovación Agraria y la Universidad de Talca, y existe material disponible para los inicios de un programa de mejoramiento, de modo de obtener inflorescencias de mejor calidad para su uso como flores de corta y también como plantas de jardín.

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. Según MEEROW



(2000), en *Hippeastrum*, planta muy cercana filogenéticamente a *Rhodophiala*, casi todos los híbridos en cultivo son tetraploides, y la tetraploidía se asocia con plantas y flores más grandes y de mayor longitud de tallo.

En general se ha observado que las plantas poliploides pierden fertilidad. Por otro lado, las plantas del género *Rhodophiala*, al presentar principalmente polinización cruzada, muestran variabilidad y no mantienen las mismas características, si son propagadas por semillas (si las presentan), por lo cual es necesario propagar los individuos tetraploides obtenidos, por medio de propagación vegetativa. El mejor método de multiplicación intensiva, que permite la obtención de gran cantidad de material en el menor tiempo posible, es el cultivo de tejidos *in vitro*.

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. Además las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* están suficientemente desarrolladas para una multiplicidad de especies cultivadas, incluidas 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. Sin embargo se desconoce la aplicación de estas técnicas para el caso específico del género *Rhodophiala*. No obstante lo anterior, trabajos recientes han demostrado la factibilidad de producir microbulbillos *in vitro* a partir de bulbos de *Rhodophiala montana* (BASOALTO, 2001, comunicación personal) así como también la investigación realizada por MUÑOZ (2001, tesis en publicación) ha dejado de manifiesto la visualización de la dotación cromosómica perteneciente a la especie *Rhodophiala rhodolirion*, la cual permite una clara visualización no sólo de la cantidad de cromosomas, sino que también de la morfología de los mismos.



5. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Antecedentes generales

El rubro de las flores de corte y producción de bulbos, es en la actualidad uno de los negocios más rentables y con mayor potencial de crecimiento en el mundo, prueba de ello es que existen países como Holanda y Nueva Zelanda que basan gran parte de su economía en este rubro. Sin embargo, las exigencias del mercado son cada vez mayores, es por ello que todos los esfuerzos se concentran en una intensa búsqueda de nuevas especies con potencial florícola, para su posterior producción a nivel comercial.

La producción de bulbosas no hubiese podido alcanzar su potencial sin los avances biotecnológicos de las últimas dos décadas. El estudio de la fisiología in vitro, la micropropagación y la eliminación de patógenos, el rescate de embriones y los avances genéticos en relación a la biodiversidad, han contribuido a la producción comercial de geófitas y continuarán haciéndolo en el futuro. Sistemas de propagación a través del desarrollo de ramillas axilares, organogénesis y embriogénesis somática han sido utilizadas aún para las especies más resistentes (ZIV, 1997).

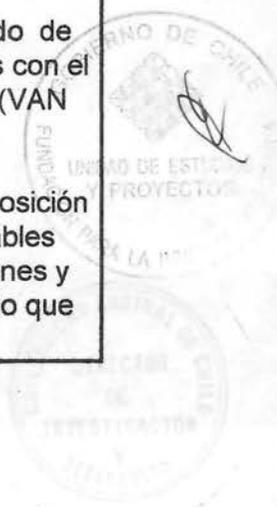
La biotecnología vegetal es definida como la actividad científica que integra el cultivo de células y la manipulación de genes, para mejorar las plantas y generar variedades comerciales, incluyendo dos disciplinas interrelacionadas: el cultivo de tejido y la biología molecular (ZIV, 1997).

La contribución de la biotecnología a la producción de geófitas incluye: propagación clonal y eliminación de virus, mejoramiento y avances del cultivo a través de rescate de embriones, fertilización in vitro, variación somaclonal, aislamiento de protoplastos, hibridación somática y producción de haploides (ZIV, 1997) y poliploides (MEEROW, 2000).

Holanda es, mundialmente, el país número uno en producción de liliium; este éxito se atribuye a la investigación en relación al cultivo y mejoramiento, en combinación con una organizada industria florícola. La investigación realizada ha traído consigo mejoramiento para resistencia y caracteres de calidad como por ejemplo: longevidad de la flor, hibridación entre especies y nuevas técnicas de mejoramiento. La investigación sobre hibridación entre especies resultó en nuevos grupos híbridos de liliium. Métodos de modificación genética y otras nuevas técnicas, como por ejemplo transformación y fusión protoplasmática se encuentran en investigación y prometen avances en el mejoramiento a futuro (VAN TUYL & VAN HOLSTEIJN, 1996).

Holanda hoy en día mantiene su propia producción de bulbos de liliium, no dependiendo de las importaciones provenientes de Japón; quince años atrás, los problemas existentes con el cultivo, indicaron la necesidad de investigación para el mejoramiento de esta especie (VAN TUYL & VAN HOLSTEIJN, 1996).

Una gran ventaja de Chile en el mercado internacional de las flores está dado por la posición geográfica de Chile en el hemisferio Sur, sumada a condiciones climáticas muy favorables (frío y con heladas durante el invierno, principalmente importante para especies perennes y bulbosas, que permite un mejor desarrollo de flores de buena calidad que ha permitido que



el país se haya transformado en un importante centro de producción de flores de diversas especies cuyo destino es principalmente Estados Unidos, Argentina y Japón. Con ello se ha desarrollado además, la industria de la producción de bulbos y semillas, constituyéndose en una fuente de ingresos y trabajo para los agricultores nacionales, de especialización para los profesionales y de generación de divisas para el país. Así, en la actualidad, la producción de flores en Chile es una actividad que genera importantes divisas y utiliza una gran cantidad de mano de obra. Según registros del Banco Central, solamente por el concepto de exportaciones de flores ingresan al país anualmente alrededor de US\$ 3.000.000. Las exportaciones de bulbo, por otro lado, van en claro aumento, según datos de ODEPA el volumen exportado se triplicó entre los años 1998 y 2000; y llegó en este último año a un valor de US\$ 6.006.000.

Países como Holanda, Nueva Zelanda y Estados Unidos han desarrollado cultivares mejorados de especies nativas de Sudamérica y especialmente chilenas (como es el caso de *Alstroemeria*, *Salpiglossis*, *Schizanthus* y *Leucocoryne*) existiendo entonces un gran potencial en el germoplasma nativo hasta el momento no aprovechado por el país, y aún más, se encuentra amenazado por causas antropogénicas.

En el plano internacional, en las décadas recientes ha habido un gran aumento en la cantidad de cultivos de flores de corte. Se han evaluado muchas especies de flores nuevas para la producción comercial, y ha sido necesario emprender trabajos de investigación básica, pues algunas no son bien conocidas y el mercado exige cada vez más variedad (CHRISTIE Y NICHOLS, 1996).

HOFFMANN (1989) enfatiza el gran potencial ornamental de las geófitas chilenas señalando que muchas especies han sido mejoradas y cultivadas en Europa y los Estados Unidos, como por ejemplo, diferentes variedades de *Alstroemeria*, *Rhodophiala* y *Leucocoryne*. Además agrega que especies como *Zephyra elegans*, *Leontochir ovallei*, *Pasithea coerulea*, *Conanthera*, *Herbertia*, *Calydorea xyphioides* o *Tigridia philippiana* constituyen un valioso material genético que puede contribuir a desarrollar la horticultura ornamental en el futuro.

Entre las especies chilenas que han tenido proyección internacional debido al trabajo realizado en países extranjeros se encuentran las pertenecientes al género *Alstroemeria*, las cuales han llegado a ser muy populares como especies de flor de corte, flor de jardín y plantas de maceta en países tales como Inglaterra, Holanda, Estados Unidos y Japón. La mayoría de los cultivares han sido originados desde la poliploidización e hibridación de varias especies parentales (TSUCHIYA & HANG, 1987). El género *Alstroemeria* consta de 60 especies nativas de Sudamérica, de las cuales *A. aurea* y *A. pelegrina* (nativas de Chile) son intensamente usadas en mejoramiento genético como especies parentales para la producción de cultivares de flor de corte (LU & BRIDGEN, 1997).

Otras especies chilenas que han despertado interés en el extranjero son *Zephyra elegans* y las pertenecientes al género *Leucocoryne*. La primera ha sido estudiada en Japón (KIM et al., 1996; Kim et al., 1997, Kim y Ohkawa, 1997; Kim et al., 1998) y dichos autores estiman que *Z. elegans* posee un gran potencial como planta ornamental comercial debido a la belleza de sus flores, atractiva escencia y larga vida de postcosecha (sobre 10 días). En el caso del género *Leucocoryne*, sus especies han sido estudiadas (KIM & OHKAWA, 1998; Kim et al., 1998) y mejoradas en el extranjero existiendo empresas como Green Harvest de Nueva Zelanda que ofrece cultivares comerciales para la temporada 1999-2000.



Estudios previos han permitido identificar grupos de especies que presentan un potencial a mediano plazo por sus colores, tamaño de flor, forma, etc. Dentro de las especies que se destacan se encuentran *Rhodophiala bagnoldii* (Figuras 1 y 2), *Rhodophiala splendens* (Figura 3), *Rhodophiala rhodolirion* (Figura 4) y *Rhodophiala montana* (Figura 5) y que han sido seleccionadas para este estudio.

En Israel se ha trabajado en este género y se cultiva comercialmente como flor de corta una "variedad" que han denominado *Rhodophiala chilensis*; este hecho permite destacar que existe interés por el género y que Chile debe hacer grandes esfuerzos en el sentido de desarrollar otras variedades.

Lo anterior, sumado a la necesidad de la agricultura chilena por diversificarse e incursionar en nuevos rubros y cultivos que puedan incrementar las alternativas productivas del país, hace necesario el desarrollo de especies para el mercado aprovechando el germoplasma nativo. Para esto, las plantas geófitas son una buena alternativa ya que se trata de especies endémicas que representan un recurso único que debe ser estudiado.

Es importante además destacar que en el país, el paisajismo es un área que está tomando importancia, y existe la tendencia hacia el diseño de jardines y áreas verdes utilizando especies endémicas que se encuentren en equilibrio con el medio ambiente.

BORTOLAMEOLLI (1999) señala que es muy importante realizar trabajos en el resguardo de especies nativas. Actualmente existe un tráfico de plantas que se hace recolectando directamente de los bosques nativos, deteriorando el hábitat, existiendo el riesgo de afectar su dinámica, además del peligro de extinción de especies por su extracción sin control.

El mismo autor indica que es primordial abrir el espectro productivo tradicional explorando nuevas alternativas en la región, más aún si existe potencial de exportación.

Taxonomía del género *Rhodophiala*

El tratamiento taxonómico de las especies chilenas de *Amaryllidaceae* es aún confuso, no existiendo una revisión moderna de los taxones específicos y genéricos. Así, clásicamente, muchas de las especies chilenas de *Rhodophiala* o *Phycella* han sido tratadas bajo el género *Hippeastrum* (MARTICORENA Y QUEZADA, 1985). Por otra parte, *Hippeastrum* y *Rhodophiala* son dos géneros muy relacionados filogenéticamente, es decir, muy emparentados, siendo las especies e híbridos del género *Hippeastrum* (*Hippeastrum x hybridum*) las más estudiadas y utilizadas comercialmente de la familia *Amaryllidaceae*. Debido a la cercanía taxonómica y a las características morfológicas y florales similares entre *Hippeastrum* y *Rhodophiala*, los estudios realizados en la primera nos sirven de modelo para diseñar estudios de mejoramiento en la segunda.

El género *Rhodophiala* Presl. pertenece a la familia *Amaryllidaceae*. Cuenta con 31 especies nativas de Chile, Bolivia, Argentina y Uruguay (Traub (1963) citado por MUÑOZ, 1966). Dentro de las especies más comunes de la Familia *Amaryllidaceae* presentes en Chile se encuentran *Brodiaea violacea* (KTH) ENGL., Mapolita azul, amapolita; *Hippeastrum advenum* HERB., añañuca; *Hippeastrum bicolor* (R et PAV.) BAKER, amancay, añañuca, azucena del diablo, corral del cerro, chupapoto; *Hippeastrum phycelloides* (HERB.) BAKER, revienta ojos; *Leucocoryne alliaceae* LINDL., huilli de San Francisco; *Leucocoryne purpurea*

GAY, cebollín; *Leucocoryne ixioides* LINDL., huille, huilli; *Nothoscordum inodorum* (AIT.) ASCHERS et GRAEBN., lágrima; *Nothoscordum striatum* (JACQ.) KUNTH., huilli de perro, cebolleta; *Placea ornata* MIERS, lagañosa; *Placea arzae* PHIL., macaya, macalla (MUÑOZ, 1966).

Este género se caracteriza por presentar plantas con bulbos tunicados que se entierran profundamente en el suelo; hojas lineares estrechas de 3-13(22) mm de ancho; escapo (pedúnculo floral) hueco, delgado; inflorescencia con 2 brácteas libres o raramente 1; umbela 1-7-flora; flores cigomórficas, perigonio estrecho o ancho en forma de embudo, de variados colores; pedicelos florales delgados, ovario tricarpelar muchos óvulos por lóculo; tubo del perigonio corto, con 6 segmentos (tépalos 6); paraperigonio, si presente, compuesto de escamas o 'bristles' en la base de los segmentos; estambres 6, insertados en la garganta del tubo del perigonio; estambres y estilo fasciculado, encorvado hacia arriba; estambres de 4 sets de largo; anteras linear-oblongas, versátiles; estigma trifido o capitado (obscuramente trilobado); fruto una cápsula, trilocular, trígona, loculicida; numerosas semillas por celda, aplanadas, aladas y de color negro (TRAUB, 1963).

Características de las especies en estudio

Rhodophiala bagnoldii (= *Hippeastrum bagnoldii*). Llamada vulgarmente "añañuca" es una hierba de 40-60 cm de alto, con bulbo tunicado, pardo oscuro de hasta 7 cm de diámetro. Hojas 2-4, lineares, de 20-30 cm de largo por 0,3-0,4 cm de ancho. Flores 4-8 en una umbela. Perigonio de 4,5-5,5 (6) cm de largo, en forma de embudo, formado por 6 tépalos oblanceolados, los 3 externos mucronados en la punta de color amarillo hasta anaranjado por líneas de este color siempre con la base verdosa. Estambres 6, encurvados hacia arriba, como apoyados en el tépalo inferior y de menor largo que los tépalos. Ovario ínfero, tricalpelar, estilo 1 terminando en un estigma cortamente trifido, más largo que los tépalos. Fruto una cápsula globosa, trilocular, que contiene muchas semillas aplanadas y negra brillantes. Vive en las zonas arenosas de litorales e interiores desde el S de la II Región hasta la IV Región. Florece en primavera. Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 40-60 cm
Follaje	: Verde-glaucoso
Tipo de inflorescencia	: Umbela
Nº inflorescencia por vara	: 1
Nº de flores por vara	: 4-8
Tamaño de la flor	: Mediano
Color de las flores	: 1ario : amarillo, 2dario : líneas anaranjadas
Posición de las flores	: Hacia afuera

Rhodophiala montana (= *Hippeastrum bakeri*) Conocida con el nombre vulgar de "añañuca de las montañas". Hierba de 22,5-40 cm de alto, provista de un bulbo tunicado, pardo brillante, de 1,9-5,4 cm de diámetro. 3-8, lineares, de 11-21 cm de largo por 0,4-0,8 cm de ancho. Flores, amarillas, de 2-7 (11) dispuestas en una umbela. Perigonio en forma de embudo, formado por 6 tépalos oblanceolado-angostos, 3-4,2 cm de largo por 3-5,5 cm de ancho. Paraperigonio presente de 0,05 cm de largo, escamoso y fimbriado. Estambres 6 algo desiguales, ocupando 2/3 del largo de los tépalos. Gineceo tricarpelar, de ovario ínfero, estilo monoliforme rematando en un estigma trifido. Fruto una cápsula tricoca, de dehiscencia valvívida, con numerosas semillas de color negro brillante, aplanadas y portando un ala papirácea. Endémica de los Andes de la VII región. Florece en el verano, fructifica en marzo y entra en receso en otoño.

Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 21-43 cm
Follaje	: Verde glauco
Tipo de inflorescencia	: Umbela
Nº inflorescencia por vara	: 1 (2)
Nº de flores por vara	: 3-7 (11)
Tamaño de la flor	: Mediano
Color de las flores	: 1ario : amarillo, 2dario : -
Posición de las flores	: Hacia afuera

Rhodophiala rhodolirion (= *Hippeastrum rhodolirion*). Vulgarmente conocida como “añañuca de cordillera”. Hierba de bulbo tunicado, pardo brillante, de 1-4,1 cm de diámetro. Hojas lineares de 10-18 cm de largo por 0,25-0,35 cm de ancho. Flor cigomorfa, solitaria. Perigonio ampliamente acampanado de 4-6 cm de largo, formado por 6 tépalos rosados con líneas de color carmín y un tubo corto verde amarillento. Fruto una cápsula tricoca, de 2,3-3,0 cm de diámetro, dehiscente, conteniendo 9-49 semillas negras, planas aladas. Habita las laderas secas y soleadas de la Cordillera de los andes y de la Costa en las provincias centrales (V-VII Región). También en Argentina. Florece en el verano, fructifica ocurre en marzo, para luego entrar en receso. Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 9-18 cm
Follaje	: Verde
Tipo de inflorescencia	: Flor solitaria
Nº inflorescencia por vara	: 1
Nº de flores por vara	: 1
Tamaño de la flor	: Grande
Color de las flores	: 1ario : rosado, 2dario : carmín
Posición de las flores	: Hacia afuera

Rhodophila splendens (= *Hippeastrum splendens*). Su nombre vernáculo es “añañuca esplendorosa”. Hierba de 27-48 cm de alto, con un bulbo tunicado, pardo oscuro, de 1,4-3,3 cm de diámetro. Hojas lineares, de 15-90 cm de largo por 0,7-1,3 cm de ancho. Flores de color rojo intenso, dispuestas en una umbela. Perigonio formado por 6 tépalos, reflejos de 8 cm de largo por cm de ancho; tubo del perigonio corto. Paraperigonio presente formado por escamas fimbriadas de 0,05-0,07 cm de largo. Estambres 6, de filamento rojo brillante y anteras dorsifijas, amarillas. Gineceo tricarpelar, ovario ínfero estilo monoliforme y estigma trífido. Tanto los estambres como el estilo se curvan hacia arriba. Fruto una cápsula tricoca, pardo rojiza, de 1,1-2,3 cm de diámetro, conteniendo 16-42 semillas, de color negro brillante, aplanadas y aldas. Habita la precordillera de los andes de san Fernando a Talca (Vi y VII Región). Florece en el verano, fructifica en marzo y entra en receso en otoño. Las características ornamentales de esta planta son las siguientes:

Largo de la vara	: 27-48 cm
Follaje	: Verde
Tipo de inflorescencia	: Umbela
Nº inflorescencia por vara	: 1
Nº de flores por vara	: 2-4(7)
Tamaño de la flor	: Mediano a Grande
Color de las flores	: 1ario : rojo intenso, 2dario : -
Posición de las flores	: Hacia afuera



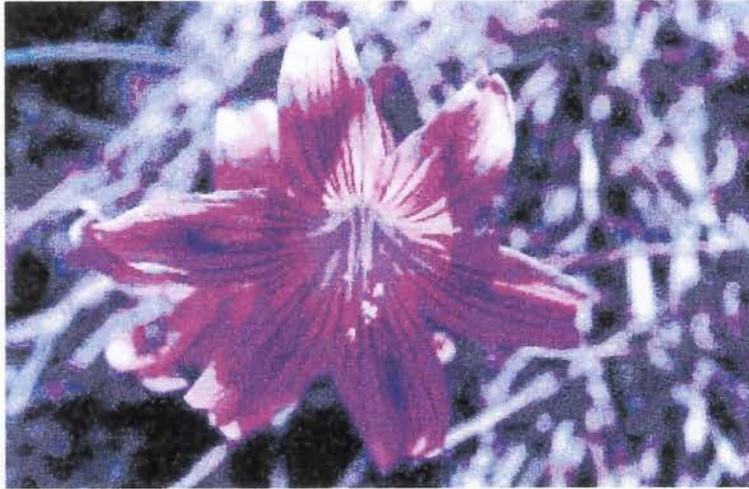


Rhodophiala bagnoldii



Rhodophiala montana





Rhodophiala rhodolirion



Rhodophiala splendens



Los datos para cada una de las especies caracterizadas son originales y corresponden a los resultados del proyecto FIA: Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial (SCHIAPPACASSE & PEÑAILILLO, 1998-2001).

FIGURAS 1-2-3-4-5

Caracterización citogenética del género *Rhodophiala* Presl y géneros afines de Amaryllidaceae

Los recuentos cromosómicos realizados en especies chilenas de la familia Amaryllidaceae arrojan un $2n=16$ y 18 . Estas especies son del supragrupo de hojas angostas (TRAUB y MOLDENKE, 1949), por lo cual pertenecen a los géneros *Rhodophiala* Presl. o *Phycella* Lindl. PALMA-ROJAS (1999) establece las características citogenéticas de los géneros *Rhodophiala* Presl y *Phycella* Lindl. determinando y comparando los cariotipos de *Rhodophiala phycelloides*, *R. bagnoldii*, *R. advena*, *R. laeta*, *Phycella ignea* y *Phycella* sp. El autor llega a la conclusión que *Rhodophiala* Presl posee un cariotipo $2n=18$ y un número básico $x=9$ y con una zona NOR en el brazo largo del par 7. Los cariotipos básicos para las especies estudiadas son los siguientes:

<i>Rhodophiala phycelloides</i>	$2n=18, 2m+1sm+6st$, NOR par 7
<i>Rhodophiala bagnoldii</i>	$2n=18, 2m+1sm+6st$, NOR par 7
<i>Rhodophiala advena</i>	$2n=18, 2m+1sm+6st$, NOR par 7

En cambio, *Rhodophiala laeta* presenta un cariotipo $2n=16$ y el cariotipo básico está formado por $4m+1sm+3st$ y zona NOR par 7. Este cariotipo es cualitativamente y cuantitativamente a las especies anteriores.

UHLEMANN en colaboración con PEÑAILILLO han realizado conteos cromosómicos en dos poblaciones de *Rhodophiala montana* de la VII Región (Laguna de la Invernada y ca. Laguna del Maule, Cuesta Los Cóndores) encontrando un cariotipo $2n=18$ y para una población de *Rhodophiala splendens* de la VII Región (Altos de Vilches) un cariotipo de $2n=18$ (se adjuntan fotografías). En ambos casos, el cariotipo concuerda con los citados por los autores anteriores para el género *Rhodophiala*. Estos estudios fueron realizados en el marco del convenio Universidad de Talca-Dresden y proyecto FIA (SCHIAPPACASSE, F. y PEÑAILILLO, P. 1998-2001; "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas con valor comercial").

Trabajos de estudios citológicos de la especie *Rhodophiala rhodolirion* (tesis de pregrado MUÑOZ, 2001, en publicación) utilizando la técnica de GRANT et al. (1984) indican que es una especie diploide con un número cromosómico de $2n=16$ (Figura 6). Por presentar un bajo número de cromosomas esta especie sería buena candidata para la producción de poliploides.

En resumen, se cuenta con antecedentes cariológicos de las especies *Rhodophiala bagnoldii* (PALMA-ROJAS, 1999), *Rhodophiala montana*, *R. splendens* (UHLEMANN & PEÑAILILLO, datos no publicados) y *R. rhodolirion*. Las primeras tres especies citadas poseen un cariotipo $2n=18$, siendo el número básico $x=9$. Además, son entidades diploides. También es diploide la especie *R. rhodolirion*, pero su cariotipo corresponde a $2n=16$.

FIGURA 6

Mejoramiento genético



El mejoramiento genético reviste vital importancia por cuanto los cultivares mejorados poseen ventajas comerciales y de cultivo sobre el germoplasma silvestre. En el mejoramiento de especies florícolas, la búsqueda de la poliploidía ha determinado grandes avances en el desarrollo de variedades comerciales debido a que estos individuos poliploides pueden presentar características ornamentales superiores como pétalos y flores más grandes o tallos más gruesos que den un mejor sustento a la inflorescencia, entre otras ventajas. La inducción de poliploidía representa una herramienta útil para mejoradores de cultivos florales, especialmente en la búsqueda de características ornamentales superiores.

El énfasis de los esfuerzos del mejoramiento comercial en el caso de *Amaryllis*, tradicionalmente ha sido el aumento en el tamaño de la flor, característica atribuible a los genes provenientes de *Hippeastrum leopoldii* e *H. pardinum*. Los esfuerzos del mejoramiento comercial subsecuente se concentraron en los híbridos mismos, alcanzando un parentesco complejo, con una consecuente desaparición de características únicas de las especies originales (MEEROW, 2000).

El resultado de los avances en el mejoramiento comercial de *Amaryllis* fue similar al de muchos cultivares híbridos modernos. Las flores grandes tendieron a alcanzar un tipo más ancho y plano, en forma de plato, con pequeñas variaciones de forma y limitada variación de color, a pesar de repetidos llamados para renovar los programas de hibridación entre especies (MEEROW, 2000).

Los híbridos de *Amaryllis* pudiesen ser mejorados a través de diferentes vías, incluyendo nuevos atributos de formas florales (en forma de trompeta o perianto tubuliforme alargado e incluso nuevos parámetros de pigmentación), reintroducción de fragancia, follaje siempre verde, repetición de floración, como también mejoramiento en el estricto sentido del cultivo (resistencia a virus del mosaico de *Hippeastrum* o a *Stagonospora curtisii* quemadura roja (hongo imperfecto) (MEEROW, 2000) .

Hay distintas etapas involucradas en el mejoramiento, entre estas están la colecta del material, su observación, selección, propagación, estudios de fitotecnia, sanidad, fisiología, mejoramiento genético y estudios de mercado, todo lo cual se integra para transferir esta tecnología a la industria y así acceder al mercado con un cultivo nuevo

OKUBO (1993) destaca que en el mejoramiento genético son características buscadas la tolerancia al frío en las plantas y el color amarillo en las flores (que aún no se ha logrado). De las especies escogidas para el presente proyecto, dos crecen en alta cordillera (*R. montana* y *R. rhodolirion*) y una crece en precordillera y también se ha encontrado en alta cordillera (*R. splendens*), y dos poseen flores de color amarillo (*R. bagnoldii* y *R. montana*).

El mejoramiento genético a través de la producción de poliploides requiere primeramente del conocimiento exacto del cariotipo de una determinada especie, para ello se cuenta con técnicas citológicas que permiten determinar tanto el número, como la morfología de los cromosomas y como se mencionó anteriormente se cuenta con estos antecedentes. Luego es necesario contar con material vegetal suficiente, sobre el cual posteriormente inducir la duplicación cromosomal, para ello se utilizan técnicas de cultivo de tejido in vitro ampliamente conocidas, las cuales permiten multiplicar el tejido, obteniendo tejido

meristemático sobre el cual inducir la poliploidía, el cual además se caracteriza por encontrarse en condiciones asépticas. Finalmente hoy en día se cuenta con diferentes técnicas para inducir la poliploidía sobre el tejido en estudio, las cuales deben ser estudiadas, y seguramente modificadas para las diferentes especies.

Determinación del cariotipo

Previo al inicio de inducción de poliploidía es necesario realizar estudios citológicos que permitan determinar el número cromosomal y el nivel de ploidía en el que se encuentran estas especies en su estado natural.

El procedimiento estándar para poder observar los cromosomas en plantas se lleva a cabo en tejidos meristemáticos en división celular muy activa. Por esta razón es muy importante la selección del tejido que se utiliza y la condición en que se encuentran creciendo las plantas de las cuales se extraen los tejidos a utilizar. Generalmente se utilizan extremos de raicillas o meristemas de hoja. Estos pequeños segmentos se someten a un tratamiento que involucra las etapas de pretratamiento, fijación, maceración e hidrólisis, tinción, aplastamiento ("squash") y observación. El tiempo y la concentración de los reactivos utilizados para efectuar los tratamientos antes mencionados dependen de la especie vegetal y del tipo de tejido empleado.

Propagación vegetativa in vitro

Para poder contar con el material necesario para realizar los estudios de inducción de poliploidía y multiplicar aquellos clones que presenten una poliploidía estable se hace necesario el poder contar con un sistema eficiente de multiplicación.

La multiplicación clonal es la aplicación comercial más utilizada de la biotecnología. Las técnicas del cultivo de tejido han sido usadas extensivamente para micropropagación de la mayoría de las geófitas que se desarrollan comercialmente. La micropropagación es factible, alcanzando desarrollo axilar, organogénesis y formación de raicillas adventicias o por embriogénesis somática. La regeneración in vitro se basa en la totipotencia de la planta: la habilidad de aislar células vegetales en cultivo para desdiferenciarlas y regenerar una nueva planta. La organogénesis envuelve la regeneración de meristemas unipolares sobre los cuales se puede inducir la formación de raicillas y brotes. La embriogénesis somática envuelve el desarrollo de meristemas bipolares, los cuales se pueden desarrollar en una planta completa, o en geófitas, directamente órganos perennes (ZIV, 1997).

Para cultivar células, tejidos u órganos in vitro se siguen una serie de principios básicos. Primeramente es necesario seleccionar y separar de la planta el material que se desea cultivar. El siguiente paso consiste en eliminar los microorganismos que se encuentran contaminando el material vegetal. Por último, se debe proporcionar a las células, tejidos u órganos un medio ambiente apropiado a través de medios de cultivo sintéticos y condiciones de incubación adecuadas. Tanto la asepsia como la inoculación del material vegetal se lleva a cabo en ambiente estéril (OCHOA, 1990).

Las etapas del método de cultivo de tejidos son: Etapa de establecimiento de un cultivo aséptico, Etapa de multiplicación de propágulos y Etapa de preparación para el reestablecimiento de la planta en el suelo.



El medio nutritivo utilizado en las tres etapas de cultivo in vitro debe presentar una composición química y calidad física adecuadas. El medio frecuentemente debe ser enriquecido con sustancias para favorecer la ontogénesis, especialmente la formación de vástagos. El medio de la tercera etapa debería contener sustancias rizogénicas si es deseada la iniciación radicular (MURASHIGE, 1974).

La práctica observada generalmente ha sido mantener el cultivo en un ambiente en que la temperatura se mantiene constante, la cual ha correspondido a la cercana a los 25 ° C. Los máximos beneficios a través de la propagación a través de cultivo de tejido es posible alcanzarlos sólo otorgándole a la planta las necesidades térmicas requeridas. Los bulbos y las plantas que se desarrollan producto del cultivo de escamas de o trozos de bulbos adquieren dormancia con la transferencia al suelo. La dormancia puede ser prevenida estableciendo plantas vigorosas en el suelo, cuando en la etapa III, el cultivo es colocado en oscuridad a 5° C durante 4 semanas. El comportamiento del cultivo de liliun y gladiolos ejemplifica la importancia de satisfacer los requerimientos de temperatura estacionales de algunas plantas. Es así como cormos y plantas obtenidas de cultivo de tejidos pertenecientes a la especie *Gladiolus hortulans* no son capaces de desarrollarse en plantas en el suelo, sin antes haber sido expuestos a temperaturas de 2° C por un período de 4 a 6 semanas previo a ser transferidas al suelo (MURASHIGE, 1974).

En el caso de *Hippeastrum*, según OKUBO (1993), la forma de propagación que permite la más rápida multiplicación de las plantas es el cultivo in vitro, utilizándose principalmente "escamas" (más bien bases de hojas). Se ha realizado extensivamente la propagación por el método de las "escamas gemelas", que consiste en la división del bulbo en secciones verticales, con la posterior subdivisión en trozos de dos escamas. (Huang et al. 1990, citados por OKUBO, 1993) descubrieron que la necesidad de utilizar dos escamas está en la existencia de conexiones vasculares entre ambas, que permiten el desarrollo de bulbillos en el punto de unión de las escamas.

Amaryllis puede ser multiplicada a través de técnicas asépticas de cultivo de tejido usando medios especiales. El típico material de micropropagación incluye escamas dobles y tejido de tallos florales desarrollados, para este caso los escapos son cosechados al momento de emergencia desde el bulbo, donde una pequeña sección de tejido de la base del pedicelo se coloca bajo condiciones estériles. Por razones desconocidas este tejido presenta el potencial de desarrollar bulbillos, pero se ha visto más propicio a mutaciones espontáneas, en comparación con explantes del tipo escama doble (MEEROW, 2000).

En el caso de *Rhodophiala*, la propagación a partir de bulbos en forma natural no es eficiente, ya que este produce ninguno o muy pocos bulbillos hijos. Los métodos vegetativos artificiales, como "vaciado", "corte en cruz", "seccionamiento y subdivisión en trozos de tres a cuatro escamas", y "escamas gemelas" han sido probados en el proyecto "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial" en bulbos de diferentes especies de *Rhodophiala*., demostrando ser mas eficientes. El método de propagación por escamas gemelas resultó ser el más exitoso en cuanto a número de bulbos nuevos a partir de un bulbo inicial.

BASOALTO, 2001 (en publicación) propagó *R. montana* por medio de escamas gemelas in vitro. Se utilizaron bulbos de 10 a 11 cm de circunferencia y se obtuvo el mayor número de bulbillos por bulbo madre al dividir el bulbo en 8 secciones verticales y posterior separación de escamas gemelas o dobles, que fueron cultivadas en medio MS sin hormonas, con evaluaciones realizadas a los tres meses. Se logró obtener 57 bulbillos por





cada bulbo madre (de tamaño 10 a 11 cm de circunferencia), en comparación a 8 bulbillos obtenidos en propagación ex vitro por medio del método de dividir bulbos (de tamaño 7 a 9 cm de circunferencia) en 4 secciones, que fue el tratamiento de mejor resultado en diferentes temporadas de evaluaciones.

Poliploidía

En la naturaleza las primeras ventajas de la poliploidía, se cree que son una gran habilidad para responder a un amplio rango de stresses ambientales (POLIPLDIDY: MORE IS BETTER -BOTANY).

Las enzimas son proteínas responsables de todas las reacciones celulares que suceden dentro de la célula y esencialmente determinan la respuesta de la planta al ambiente. En especies tetraploides hay 4 genes para cada enzima o unidad enzimática, lo que significa que un poliploide tiene el potencial no sólo de producir mayor cantidad de determinadas llaves enzimáticas, sino también mayor cantidad de diferentes tipos de una determinada enzima en el mismo tiempo. Producir diferentes tipos de una misma enzima significa potencialmente ser capaz de responder a un amplio rango de condiciones ambientales, las cuales esencialmente otorgan la capacidad de sobrevivir y reproducirse mejor. Así obtenemos plantas más robustas y con mayores producciones de campo, lo cual sin lugar a dudas es de interés agrícola (POLIPLDIDY: MORE IS BETTER-BOTANY).

Especies poliploides producen flores de mayor tamaño y tallos más firmes; estos aspectos positivos de las especies poliploides han preponderado en muchos casos sobre el lento desarrollo, la baja fertilidad y el aumento en el crecimiento vegetativo (SPAARNAIJ, 1979). Es sabido que los individuos tetraploides exhiben multivalentes durante la meiosis, lo cual está típicamente asociado a la autotetraploidía. Estos multivalentes producen una segregación cromosómica desigual y la formación de gametos con números cromosómicos irregulares, esto da como resultado la formación de gametos no viables o que participen en la formación de cigotos que posteriormente aborten. Por ejemplo, en *Eustoma grandiflorum*, las plantas tetraploides presentan una reducción del 80% de la viabilidad del polen con respecto al polen originado desde plantas diploides (GRIESBACH & BHAT, 1990), sin embargo esta baja fertilidad puede ser una ventaja en especies de multiplicación vegetativa para su posterior comercialización.

Ejemplos de tetraploidía en especies agronómicas:

Las razones del uso de poliploidía en el mejoramiento del liliom son las flores de gran tamaño y los tallos de mayor firmeza. En hibridaciones entre especies, la esterilidad de la F1 a nivel diploide es restituida a nivel tetraploide. Los individuos tetraploides pueden ser obtenidos a través de tratamiento de colchicina u oryzalina sobre células mitóticas (VAN TUYL & VAN HOLSTEIJN, 1996).

Los efectos positivos de la tetraploidía han quedado de manifiesto en muchas especies. Un ejemplo clásico es el caso de la tetraploidía en *Anemone* con el cultivar "Tetranemona" (de 6 colores). Esta variedad sintética presenta marcadas características en términos estéticos y de comportamiento agronómico. Los objetivos de mejoramiento perseguidos en este caso



son: calidad y productividad respectivamente. Varias combinaciones híbridas fueron identificadas en términos de balance estético/agronómico. El nivel tetraploide incrementó el tamaño de la mayoría de los órganos vegetales y reproductivos, entre ellos: tamaño de cotiledones, tamaño de tallo, diámetro y rigidez, largo y diámetro de pedúnculo floral, diámetro de flor, relación largo-ancho de tépalo y grosor de tépalo (JACOB et al., 1997).

Otro ejemplo importante son los nuevos cultivares de trigo sarraceno tetraploides, que presentan un sistema radicular bien desarrollado, tallos más gruesos y firmes y hojas más anchas. Las inflorescencias y semillas han sido incrementadas notablemente en número y además las semillas han aumentado su tamaño. Es probable que la buena relación de coordinación y balance, entre origen de flujo y almacenaje es una de las razones por las que estas especies presenten mayor productividad por planta en comparación con especies diploides (ZHAO et al., 1995).

El trigo sarraceno tetraploide presenta características superiores. Los contenidos de proteínas, grasas, vitaminas, como los de aminoácidos son todos más altos que los que se encuentran en especies diploides, en los cuales la vitamina es la que se presenta en mayor cantidad. Es por ello evidente que el trigo sarraceno tetraploide es una fuente de alimento sana, alta en calidad y rica en nutrición (ZHAO et al., 1995).

Inducción de poliploidía en especies vegetales

La inducción de poliploidía puede lograrse a través de métodos artificiales mediante el uso de compuestos químicos o por la aplicación de tratamientos de frío, calor o frecuentes cortes de tallo. El compuesto químico más comúnmente utilizado es la colchicina, el cual es aplicado en tejidos merestematicos activos para interrumpir la formación de las fibras del huso mitótico y evitar la división de la célula. Las células resultantes tienen el doble del número cromosomal original (NORTH, 1979 y WELSH, 1981). Otro compuesto químico inductor de poliploidía y utilizado en varios cultivos ornamentales ha sido el uso del herbicida Oryzalina.

Numerosos autores han inducido poliploidía en especies ornamentales a través del uso de colchicina, entre éstos están los trabajos realizados en *Alstroemeria* spp., y *Sandersonia aurantiaca*, entre otras.

Las semillas, ápices caulinares o esquejes se mojan en una solución de colchicina. La colchicina se disuelve primero en agua y debido a su termolabilidad debe ser esterilizada por filtración para su empleo in vitro (Griesbach (1981), citado por PIERIK, 1990). No se debe tener en cuenta sólo la concentración usada sino también el tiempo de acción: si se realiza un tratamiento prolongado se debe usar una baja concentración de colchicina, mientras que si el tratamiento es corto se utilizan concentraciones más altas (PIERIK, 1990).

La colchicina presenta la ventaja de encontrarse activa en un amplio rango de temperaturas. El período necesario para la manifestación de los efectos varía en diferentes grupos de plantas y animales. El rango de concentración a usar también es amplio entre 0,001 y 1 %. Sobre tejidos vegetales se aplica a través de sumergido o por inyección. También puede ser aplicada en pastas de lanolina o agar. En cultivo in vitro la colchicina es aplicada al medio de cultivo. En general la colchicina es excepcionalmente útil en el estudio de estructuras cromosomales y en la detención de la metafase manteniendo controladas las concentraciones a usar y los períodos de tratamiento (SHARMA Y SHARMA, 1994).



Williams (1982, citado por MEEROW, 2000) describe un protocolo para el tratamiento de semillas de *Amaryllis*, con una solución acuosa de 0.05% de colchicina mezclada con 7 g/L de Agar. La solución es calentada para disolver el Agar y colocada en pequeños contenedores. Las semillas, 3 a 4 días después de germinadas son sumergidas en la solución, hasta el nivel de ser cubiertas las raicillas, donde son dejadas por 24 horas. Luego son lavadas y cultivadas en un medio de crecimiento. De las semillas que sobrevivieron al tratamiento (muchas veces la colchicina presenta un efecto fatal sobre semillas de *Amaryllis*), algunas alcanzaron el nivel tetraploide.

Métodos para comprobar duplicación cromosómica

Según NORTH (1979), no siempre se conseguirá duplicar el número cromosomal en los tejidos tratados, por lo cual el material debe ser evaluado. Una forma segura de cerciorarse de que se ha tenido éxito en duplicar el número cromosomal es mediante el conteo de los cromosomas.

Este proceso envuelve la tinción y aplastado de tejido en división celular para su posterior examen en el microscopio óptico. Esta técnica involucra gran cantidad de tiempo y requiere entrenamiento y experiencia en la preparación y aplastado de las células. En especies en que los cromosomas son pequeños un conteo seguro y rápido resulta a menudo difícil. En años recientes, la técnica conocida como citometría de flujo ha emergido para la determinación de ploidía y es reconocida como superior al conteo de cromosomas. Es importante destacar que en estudios previos en *Rhodophiala rhodolirion* el conteo de cromosomas no ha sido laborioso pues la técnica no ha mostrado problemas en la especie y los cromosomas de esta especie son lo suficientemente grandes para ser visualizados (Figura 6).

Crecimiento o engorda de bulbos

De estudios morfológicos en *Hippeastrum hybridum* se sabe que el volumen del bulbo está compuesto en su totalidad por el engrosamiento de bases de hojas, y no por escamas verdaderas, como ocurre en muchas otras especies (OKUBO, 1993). Lo mismo ocurre en *Rhodophiala* (SCHIAPPACASSE & PEÑAILILLO, observaciones no publicadas).

Los bulbos deben alcanzar un tamaño (o peso) determinado para que sean capaces de florecer; ese tamaño lo alcanzan al cabo de una o varias temporadas de crecimiento, según la especie y condiciones ambientales (DE HERTOUGH Y LE NARD, 1993). Dado que en el presente proyecto es fundamental lograr hacer florecer el material transformado genéticamente y multiplicado *in vitro*, el cual es muy pequeño, para la posterior evaluación de la floración, este punto es abordado desde el primer año de ejecución del proyecto.

Según VAN LEEUWEN (2000, comunicación personal), para que los bulbos alcancen lo más luego posible el tamaño floral, son importantes los siguientes factores: sanidad del material (plantas libres de plagas y enfermedades, suelo desinfectado), nutrición (principalmente N, P y K) y periodo de crecimiento (el cual debe ser lo más largo posible).

En el caso de *Rhodophiala*, debido a la morfología del bulbo, en el cual cada "escama" corresponde a una base de hoja, se piensa que el método que permita obtener el mayor número de hojas posible es el que va a proporcionar bulbos de tamaños mayores.



En *R. montana* son florales los bulbos de diámetro superior a 2,5 cm; en *R. rhodolirion* florecen los bulbos de diámetro superior a 2 cm, y en *R. splendens* son florales los de diámetro mayor a 1,6 cm (datos de terreno, proyecto Rescate y multiplicación de bulbos nativos de valor comercial). En *R. bagnoldii* no se conoce con exactitud el calibre floral, pero se estima que es superior al de cualquiera de las otras tres especies.

Según OKUBO (1993), en estados tempranos la planta no presenta altos requerimientos nutricionales, pero éstos aumentan cuando se observa crecimiento activo. Es deseable utilizar sustratos con materia orgánica, de buen drenaje y pH entre 6 y 7. En el proceso de "forzado" para producir bulbos en maceta, al sacar los bulbos del suelo se les elimina todas las hojas y se realiza un "curado" por 2 semanas a 23-25°C con buena ventilación. El objetivo de ese procedimiento es reducir la humedad de los bulbos para su mejor conservación en almacenamiento. Luego se almacenan a 13° C y a 80% de humedad relativa por 8 a 10 semanas o a 5-9° C por periodos más largos. Se plantan en las macetas con la parte superior sobresaliendo de la superficie del sustrato, y son deseables temperaturas de 24 a 27° C, para florecer en 3 a 6 semanas.

Muchos bulbos presentan un periodo de receso o dormancia, periodo en el cual el crecimiento visible es nulo. Para que los bulbos puedan crecer lo más rápidamente posible es deseable evitar el receso, o que sea lo más corto posible. Según OKUBO (1993), *Hippeastrum* es una planta siempreverde que no presenta receso bajo condiciones climáticas óptimas, pero sí las presenta al ser cultivada en lugares con amplias fluctuaciones climáticas estacionales, y prácticas hortícolas determinadas. Por el hecho de tener un bulbo, la planta necesariamente tuvo que haberse enfrentado en su evolución a condiciones ambientales desfavorables, y el bulbo sirvió para sobrevivir tales condiciones. Según algunos estudios hormonales, habría una periodicidad interna en *Hippeastrum*, que no responde a condiciones externas.

En el caso de la cuatro especies de *Rhodophiala* en estudio, en su ambiente natural presentan receso a comienzos de invierno (excepto *R. bagnoldii*, que presenta receso estival), pero bajo invernadero frío en Talca mostraron comportamientos diferentes, según la especie. Por ejemplo, *R. bagnoldii*, originaria de Huasco, mostró un follaje siempreverde y floración periódica, sin receso. Las otras tres especies, que crecen en la cordillera, en algunos años mostraron receso a partir de Diciembre, pero en la temporada 2000/2001 plantas pequeñas no mostraron receso.

Cabe destacar que se piensa que es muy probable que las plantas de *Rhodophiala montana* y *R. rhodolirion*, ambas cordilleranas, necesiten frío para emitir el tallo floral. Esto se fundamenta en experiencias realizadas con escasa cantidad de material durante la ejecución del proyecto mencionado anteriormente.





BIBLIOGRAFÍA

- BASOALTO, A. 2001. Propagación vegetativa in vitro de *Rhodophiala montana* (Phil.) Traub. Memoria de título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca, Talca. Chile. (en publicación).
- BORTOLAMEOLLI, G. 1999. Ornamentales para adornar el mundo. Visiones del sur. 2(5):10-11.
- CHRISTIE, B. y NICHOLS, M. 1996. Flores de corte para el siglo XXI. Agricultura de las Americas. Noviembre/ Diciembre.
- DE HERTOUGH, A. and LE NARD, M. 1993. The physiology of flower bulbs. Elsevier Science Publishing Co., Inc. Amsterdam, Holanda. 840 p.
- GRANT, J., BROWN, A. Y GRACE, J. 1984. Cytological and Isozyme Diversity in *Glicine tomentella* Hayata (Leguminosae). Australian Journal of Botany. 32:665-677.
- GRIESBACH, R. and BHAT, R. 1990. Colchicine-induced polyploidy in *Eustoma grandiflorum*. HortScience. 25(10): 1284-1286.
- HOFFMANN, A. 1989. Sinopsis taxonómica de las Geófitas Monocotiledóneas Chilenas y su estado de conservación. In: El libro rojo de la flora terrestre de Chile. Benoit, I.L. (Editor) CONAF. Santiago de Chile. p147-157.
- JACOB, Y.; BARRADE, R.; MARQUIER, M.J.; BOTTON, E.; 1997. Breeding of *Anemone coronaria* tetraploid hybrids. Proc. Int'l Symp. on flower bulbs. Eds. H. Lilien-Kipnis, A. H. Halevy, A. Borochoy. Acta Horticulturae. 430, ISHS 1997.
- KIM, H., OHKAWA, K. Y SAKAGUCHI, K. 1996. Effects of storage temperature and duration of flower bud development, emergence and flowering of *Zephyra elegans* D. Don. Scientia Horticulturae. 67: 55-63.
- KIM, H., SAKAGUCHI, K. Y OHKAWA, K.. 1997. *Zephyra elegans* D. Don, a potencial new cormous crop. Acta Horticulturae. 430: 133-137.
- KIM, H. Y OHKAWA, K. 1997. *Zephyra elegans* D. Don as a cut flower. Herbertia 52: 26-30.
- KIM, H. Y OHKAWA, K. 1998. Studies on the growth cycle and flowering control of *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil. Herbertia. 53: 64-71.
- KIM, H., OHKAWA, K. Y NITTA, E. 1998. Effects of bulb weight on growth and flowering of *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil. Acta Horticulturae 454: 341-346.
- LU, C. y BRIDGEN, M. 1997. Chromosome doubling and fertility study of *Alstroemeria aurea* x *A. caryophyllaea*. Euphytica. 94:75-81.
- MARTICORENA, C. y QUEZADA, M. 1985. Catálogo de la Flora Vasculare de Chile. Gayana Botanica 42(1-2): 1-157.

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

MURASHIGE, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

MUÑOZ, C. 1966. Flores silvestres de Chile. Ediciones de la Universidad de Chile. Santiago, Chile. 245 p

MUÑOZ, M. 2001. Recuento cromosómico en especies nativas de Chile con potencial ornamental. Tesis Lic. Agr. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 87 p. (en publicación)

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

OCHOA, N. 1990. Establecimiento de cultivos in vitro. In: Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 112 p.

OKUBO, H. 1993. Hippeastrum (Amaryllis). En: The physiology of flower bulbs. Elsevier Science Publishing Co., Inc. Amsterdam, Holanda. p. 321-334.

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 Dirección de Investigación, Universidad de Talca (DIUT). Talca. 79p.

PIERIK, R.L.M., 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 326 p.

POLIPLOIDY: MORE IS BETTER-BOTANY

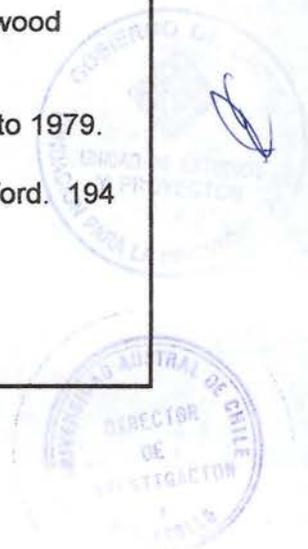
<wysiwyg://77/http://botany.about.com/science/botany/library/weekly/aa032598c.html> - 3/25/98 21 Noviembre 2000 18:29 hrs

SCHIAPPACASSE, F. y PEÑAILILLO, P. 1998-2001. Informes del proyecto "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial". Financiamiento: FIA y Universidad de Talca.

SHARMA, A. K.; SHARMA, A., 1994. Chromosomes techniques- A Manual. Harwood Academic Publishers. 368 p.

SPARNAAIJ, L. D., 1979. Poliploidy in Flower Breeding. HortScience 14(4):Agosto 1979.

TRAUB, H.P. y MOLDENKE, H.N. 1949. Amaryllidaceae: Tribe Amarylleae. Stanford. 194 pp.





TSUCHIYA, T. Y HANG, A. 1987. A chromosome studies in genus *Alstroemeria*. *Acta horticulturae*. 205: 281-287.

VAN TUYL, J. and VAN HOLSTEIJN, C. 1996. Lily breeding research in the Netherlands. *Acta Horticulturae* 414: 35-45.

WELSH, J. 1981. *Fundamentals of plant genetics and breeding*. Ed. John Wiley & Sons. New York. 290p.

ZIV, M. 1997. The contribution of biotechnology to breeding, propagation and disease resistance in geophytes. *Acta Horticulturae* 430.

ZHAO, G.; TANG, Y.; QIU, S.H.; 1995. 316315 Current Advances in Buckwheat research (1995) 313-321 <<http://soba.shinsu-u.ac.jp/contents/40.html>> 21 Noviembre 2000 18:39 hrs



6. MARCO GENERAL DEL PROYECTO

La introducción, junto al cultivo de nuevas especies, y la incorporación de nuevas zonas a la producción florícola, que anteriormente abarcaba sólo la V región y la región metropolitana constituyen la realidad imperante hoy en día en el ámbito florícola nacional. Dentro de las nuevas especies se incluyen las plantas bulbosas (liatris, liliium, tulipán, iris, entre otras). Las plantas bulbosas, además de cultivarse para la exportación de flores de corta, también se han cultivado para la producción y exportación de bulbos; según datos de ODEPA, entre los años 1998 y 2000 el valor de las exportaciones creció de US\$ 2,381,000 a US\$ 6,006,000, y se espera que se incremente en los próximos años.

Deben ser consideradas las excelentes características edafo-climáticas imperantes en el país, las cuales otorgan a Chile una ventaja comparativa en la producción de especies bulbosas. Las especies nativas presentan resistencia a las enfermedades presentes en el medio, condición favorable para su producción comercial a nivel nacional. Cabe destacar al respecto que la demanda de especies nativas en Chile, hoy en día, se encuentra en aumento, no encontrándose productores dedicados al rubro, muy por el contrario, se observan a menudo extracciones desmesuradas, las cuales de continuar, sólo aportarán al patrimonio nacional nuevas especies en extinción. Estas especies presentan un potencial económico interesante, pudiendo constituir una alternativa innovadora para la agricultura chilena, además de un rubro de exportación a considerar.

Por lo general en nuestro país las especies nativas han sido poco valoradas y aún menos estudiadas, han sido países extranjeros los que han extraído material para su estudio y mejoramiento, y finalmente han creado nuevas variedades, las cuales se comercializan a nivel mundial.

Es por esto importante fomentar el estudio de las especies nativas, hacer de éstas un cultivo de índole comercial, para finalmente promover la utilización de las mismas a nivel nacional. El presente proyecto promueve estos aspectos al continuar con el estudio de plantas de *Rhodophiala* nativas y al iniciar el mejoramiento genético por medio de la creación de plantas poliploides, para finalmente obtener variedades que respondan a las necesidades tanto paisajísticas, como comerciales.



7. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL PROYECTO

(Anexar además un plano o mapa de la ubicación del proyecto)

El cultivo de los bulbos se realizará en el invernadero de Floricultura del Campus Lircay perteneciente a la Universidad de Talca, y en el invernadero de la Estación Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca, ubicado en Panguilemo (6 km al norte de la entrada norte de Talca).

La inducción de tetraploidía y la multiplicación in vitro se realizarán en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, y la aclimatación de plántulas se hará en el invernadero perteneciente a la Universidad Austral de Chile, en el Campus Isla Teja, en la ciudad de Valdivia.



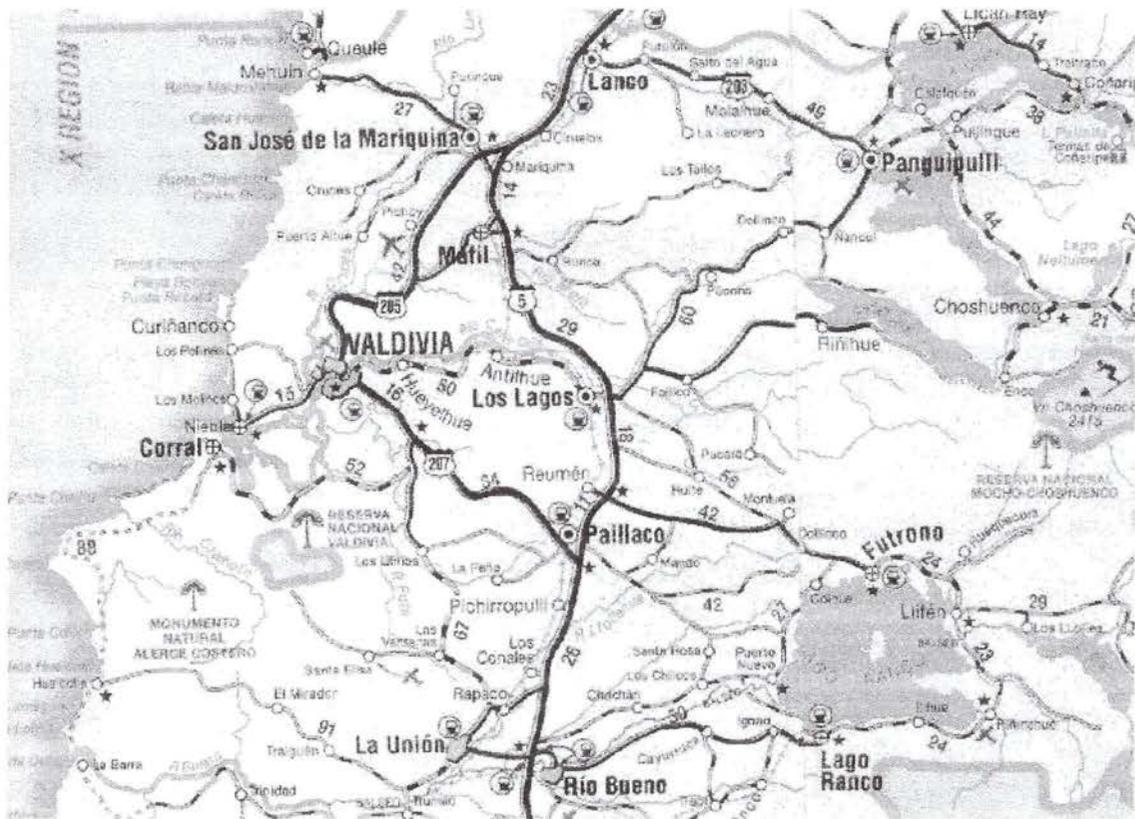


FIGURA 5: Mapa área geográfica en donde se realizará el proyecto (X Región Norte)

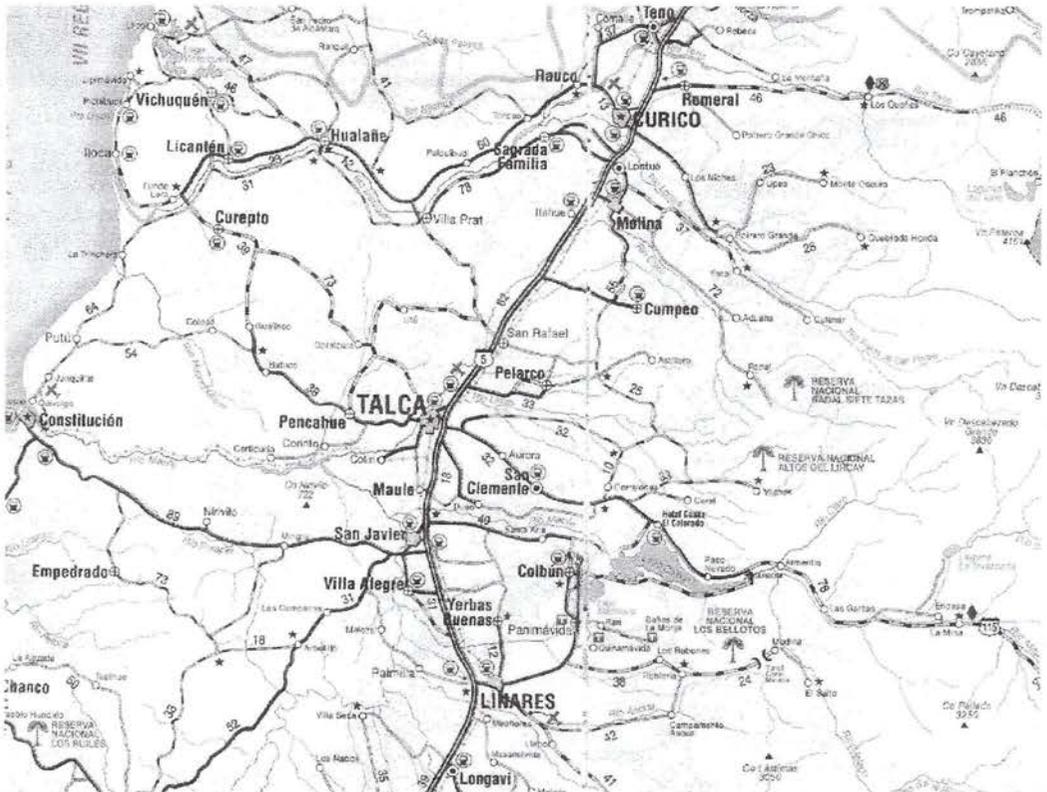


FIGURA 6: Mapa área geográfica en donde se realizará el proyecto (VII Región).





8. OBJETIVOS DEL PROYECTO

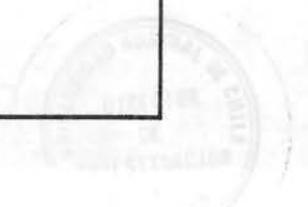
8.1. GENERAL:

A través de la aplicación de técnicas biotecnológicas inducir poliploidía en cuatro especies del género *Rhodophiala*: *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*

8.2. ESPECÍFICOS:

Para cada una de las cuatro especies de *Rhodophiala*:

1. Determinar cariotipos
2. Establecer un protocolo para la inducción de poliploidía
3. Inducir poliploidía
4. Evaluar el grado de poliploidía logrado
5. Desarrollar un eficiente sistema de multiplicación de material in vitro
6. Desarrollar protocolos de micropropagación y multiplicar el material in vitro
7. Evaluar métodos de crecimiento rápido de bulbos
8. Cultivar las plantas poliploides
9. Evaluar las plantas poliploides, esperándose evaluar también la floración
10. Realizar publicaciones en revistas especializadas





9. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTOS

(Describir en detalle la metodología y procedimientos a utilizar en la ejecución del proyecto)

MATERIAL VEGETAL

El material vegetal a utilizar serán bulbos de *Rhodophiala bagnoldii*, *R. montana*, *R. rhodolirion* y *R. splendens*, recolectados y multiplicados durante la ejecución del proyecto "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial". También se recolectarán semillas para promover la variabilidad genética de las especies, para disponer de más material, para realizar estudios de crecimiento de bulbos a partir de semillas y como parte de los estudios cromosomales, los cuales se harán principalmente con bulbos.

1. DETERMINACIÓN DEL CARIOTIPO DE DIFERENTES ESPECIES DE *Rhodophiala*

Para determinar el número cromosomal se utilizará la técnica citológica propuesta por Grant et al. (1984), la cual ha sido modificada en una de sus etapas finales, reemplazando el uso de orceína acética por orceína láctico propiónico, según trabajos adelantados realizados en *Rhodophiala rhodolirion* y que muestra una mejor visualización de los cromosomas. Si es necesario se valuarán los distintos parámetros de manera de ajustar la técnica a cada una de las especies en estudio.

La metodología a seguir se describe a continuación:

- Obtención de meristemas radicales desde raíces jóvenes en activo crecimiento o bien extracción del ápice radicular de semillas en germinación
- Colocación de la punta de raíz (3 a 6 cm) en hielo durante 24 horas
- Fijación del tejido: inmersión de la raíz en solución cloroformo: etanol : ácido acético glacial (4:3:1) durante 1 hora
- Descarte del fijador y traslado del tejido a solución de alcohol 70% (donde el tejido puede ser mantenido por tiempo indefinido)
- Descarte del alcohol e hidrólisis (inmersión de la punta de la raíz) con HCl 1N a 60°C durante 4-16 minutos
- Descarte de HCl y tinción con Reactivo de Schiff durante 30 minutos
- Digestión con pectinasa *Aspergillus niger* 5% durante 1 hora
- Lavado con agua destilada, evitando la deshidratación
- Corte del extremo distal del trozo de raíz (más intensamente teñido), bajo la lupa
- Montaje del tejido en portaobjeto previo remojo de éste en ácido acético al 45%
- Colocación de una gota de orceína láctico propiónico al 2% sobre el tejido
- Cubrimiento con cubreobjeto
- Percusión reiterada de la preparación con la punta de un bisturí hasta disgregar las células
- Aplastado de las células ("Squash"). Esto se realiza aplastando la preparación envuelta en toalla absorbente con la palma de la mano, sin realizar movimientos horizontales.
- Examen de la preparación al microscopio óptico
- Finalmente se obtendrán microfotografías de las preparaciones

Para llevar a cabo el método anterior se deben tener presentes los siguientes reactivos:

Preparación del reactivo de Schiff:

- a) Calentar hasta ebullición 200 ml de agua destilada
- b) Agregar 1 g de fucsina básica diamante
- c) Bajar la temperatura a 50° C y agregar 20 ml de HCl 1N



d) Enfriar a 25° C y agregar 1 g de metabisulfito de sodio o potasio y tapar. Se debe dejar en un frasco oscuro en refrigerador durante 24 horas

e) Agregar carbon activado, filtrar y dejar en un frasco oscuro en el refrigerador, el cual puede ser usado varias veces, no exponer a la luz

Preparación de orceína láctico propiónica al 2%:

a) Preparar solución de 20 ml de ácido láctico y 20 ml de ácido propiónico

b) Agregar 1 ml de orceína

c) Agitar durante dos horas y esperar 3 días

d) Agregar 10 ml de agua destilada y filtrar

Duración:

La determinación del cariotipo de las especies se realizará durante Enero y Marzo del año 2002.

2. ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE POLILOIDÍA EN 4 ESPECIES DE *Rhodophiala*

En esta etapa se procederá a inducir la tetraploidía en las diferentes especies de *Rhodophiala* estudiadas. Se trabajará tanto con los bulbos, como con las semillas de *Rhodophiala*, sobre los cuales se aplicaran diferentes tratamientos en base a colchicina .

2.1 Inducción de tetraploidía en semillas germinadas de *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*:

Las semillas de las diferentes especies de *Rhodophiala* serán colectadas en los sitios naturales de desarrollo de cada una, correspondientes a diferentes comunas de la VII Región del Maule y en las respectivas épocas de fructificación, las cuales se concentran en los meses de febrero y marzo.

Las semillas recolectadas serán desinfectadas, para lo cual serán sumergidas durante 5 segundos en Etanol al 70% primeramente, para luego ser mantenidas durante 10 minutos en una solución de Hipoclorito de Sodio.

Luego se someteran a tratamientos de frio necesarios para estimular la germinación de acuerdo a los estudios realizados en el proyecto "Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial". Para el caso de semillas de *Rhodophiala rhodolirion*, éstas se sumergirán en agua durante 48 horas, después de lo cual se mantendrán 3 semanas bajo 8°C de temperatura, para luego ser mantenidas a 20 °C, ya que esta especie presenta un requisito de frío de 3 semanas para su germinación, Las semillas de *Rhodophiala montana* serán sometidas a un tratamiento de 4 semanas de frío. Posterior a la desinfección, se inducirá la germinación de las semillas sumergiéndolas en agua destilada estéril, una vez germinadas se sumergirán en una solución de colchicina acuosa.

Se aplicarán diferentes dosis de colchicina:

- una concentración de colchicina al 0.05%
- una concentración de colchicina al 0.2%
- control: solo con agua destilada estéril

Se utilizarán además tres tiempos diferentes de acción de:

- 4 horas de tratamiento
- 12 horas de tratamiento



Los diferentes tratamientos serán los siguientes:

CUADRO 1: Método de inducción de poliploidía sumergiendo semillas germinadas en una solución de colchicina

CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE ACCIÓN	
	4 Horas	12 Horas
0.05 % Colchicina	1*	2
0.2 % Colchicina	3	4
Agua desionizada	5	6

*Los números representan el tratamiento respectivo

Se utilizarán 20 semillas por tratamiento con 2 repeticiones. Una vez finalizados los tratamientos, las plántulas serán transferidas a macetas con sustrato arena turba 1:1 previamente esterilizado o a medios de cultivo *in vitro*, dependiendo de los resultados obtenidos en ensayos realizados de cultivo *in vitro* en etapa paralela. Una vez que la planta haya experimentado un crecimiento considerable, se evaluará la efectividad del tratamiento de colchicina aplicado. El nivel de ploidía que presente cada individuo quedará determinado a través de la técnica citológica propuesta por Grant et al. (1984) (véase: Determinación de cariotipo), la cual permitirá la clara observación de los cromosomas.

2.2 Método de inducción de tetraploidía sumergiendo las plántulas en una solución de colchicina

En este ensayo se utilizarán plántulas desarrolladas *in vitro* las cuales se sumergirán en una solución de colchicina acuosa, a diferentes concentraciones y por diferentes tiempos de acción. Se realizarán tratamientos con:

- una concentración de colchicina al 0.05%
- una concentración de colchicina al 0.2%
- control: solo con agua destilada estéril

Utilizándose además dos tiempos diferentes de acción de:

- 4 horas de tratamiento
- 12 horas de tratamiento

Se probará el total de combinaciones posibles y de este modo se generarán 6 tratamientos, para cada uno de los cuales se realizarán 2 repeticiones con 20 explantes cada repetición. Finalmente los diferentes tratamientos quedarán esquematizados como lo expresa el siguiente cuadro: CUADRO 3:

Esquema del: "Método de inducción de poliploidía sumergiendo las plántulas en una solución de colchicina"

CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE ACCIÓN	
	4 Horas	12 Horas
0.05 % Colchicina	7*	8
0.2 % Colchicina	9	10
Agua desionizada	11	12

*Los números representan el tratamiento respectivo



El medio de cultivo a utilizar corresponde al propuesto por Murashige y Skoog (1962), el cual comprende:

MACROELEMENTOS:

1. NH_4NO_3 : 1650 mg/L
2. $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$: 332.2 mg/L
3. $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$: 180.7 mg/L
4. KNO_3 : 1900 mg/L
5. H_2KPO_4 : 170 mg/L

MICROELEMENTOS:

1. H_3BO_3 : 6.2 mg/L
2. $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$: 0.025 mg/L
3. $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$: 0.025 mg/L
4. $\text{Na}_2 \text{EDTA}$: 37.26 mg/L
5. $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$: 16.9 mg/L
6. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$: 0.25 mg/L
7. KI : 0.83 mg/L
8. $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$: 8.6 mg/L

SUPLEMENTACIÓN ORGÁNICA:

- M-inositol: 100 mg/L
Ácido nicotínico: 0.5 mg/L
Piridoxina-HCl: 0.5 mg/L
Tiamina-HCl: 0.1 mg/L

Además se le agregará al medio 20 g/L de Sacarosa y fitohormonas en dosis a determinar según protocolo optimizado en ésta investigación en forma paralela.

Las plántulas tratadas serán incubadas *in vitro* en una cámara de crecimiento, bajo las siguientes condiciones ambientales: 21°C de Temperatura, 3500 lux de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas luz.

El medio de crecimiento se producirá en base a una solución de sales Murashige-Skoog enriquecida con una dosis de fitohormonas a determinar, se agregará además al medio 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de Agar 'Merck'.

Se analizarán finalmente los meristemas de las raicillas en crecimiento, para determinar el nivel de ploidía que han alcanzado, cuya evaluación se medirá a través de una modificación de la técnica citológica utilizada por Grant et al. (1984).



2.3 Método de inducción de poliploidía agregando colchicina al medio de cultivo

A partir de plántulas desarrolladas *in vitro* en etapa paralela, se colocarán los meristemas en un medio de cultivo en base a la solución de sales MS, enriquecido con 20 g/L de sacarosa, al cual se adicionará 8 g/L de Agar 'Merck', sobre esta solución base se adicionarán diferentes dosis de colchicina:

- una concentración de colchicina al 0.05%
- una concentración de colchicina al 0.2%
- tratamiento control solo con agua destilada estéril

Aplicándose además diferentes tiempos de acción según lo siguiente:

- 4 horas de tratamiento
- 12 horas de tratamiento

Se probará el total de combinaciones posibles y de este modo se generarán 6 tratamientos para cada uno de los cuales se realizarán 2 repeticiones con 20 explantes cada repetición. Finalmente los diferentes tratamientos quedarán esquematizados como lo expresa el siguiente cuadro: CUADRO 4: Esquema del "Método de inducción de tetraploidía agregando colchicina al medio de cultivo".

CONCENTRACIÓN	TIEMPO DE ACCIÓN	
	4 Horas	12 Horas
0.05 % Colchicina	13	14
0.2 % Colchicina	15	16
Agua desionizada	17	18

*Los números representan el tratamiento respectivo

Los explantes tratados luego se cultivarán *in vitro* hasta alcanzar el crecimiento deseado. El medio de crecimiento óptimo se determinará en otros ensayos en forma paralela en esta investigación(ver más adelante).

Para finalizar se realizará la evaluación: se observarán las raicillas desarrolladas *in vitro*, determinando si éstas presentan o no nivel de poliploidía, a través de una modificación de la técnica citológica utilizada por Grant et al. (1984).

Los datos obtenidos como resultado de estos ensayos serán analizados estadísticamente.





Duración

Los cuatro ensayos para establecer un método óptimo de inducción de poliploidía tendrán una duración de 10 meses.

3. APLICACIÓN DE PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA LA INDUCCIÓN DE POLIPLOIDÍA en *Rhodophiala bagnoldii*, *Rhodophiala montana*, *Rhodophiala rhodolirion* y *Rhodophiala splendens*:

Con los resultados obtenidos de los ensayos anteriores se establecerá un protocolo que será ocupado en la inducción de poliploidía en las 4 especies en estudio. En todos los tratamientos de estos ensayos se incluirá controles con los cuales se comparan los posibles poliploides producidos.

Duración

Esta etapa comenzará a mediados de Agosto de 2002 y terminará a mediados de Abril de 2005.

4. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PLOIDÍA

El nivel de ploidía de los individuos tratados se analizará utilizando meristemas de las raicillas en crecimiento, a través de una modificación de la técnica citológica utilizada por Grant et al. (1984) (ver inicio metodología). Los resultados obtenidos en esta etapa serán comparados con los cariotipos originales de las especies en estudio.





Duración

Estas valuaciones comenzarán con los primeros poliploides producidos que se estima será a comienzos de 2003 y se extenderá hasta Junio de 2005.

BIBLIOGRAFIA

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

5. CULTIVO IN VITRO

Los ensayos de micropropagación serán realizados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Universidad Austral de Chile, en base a material vegetal correspondiente a bulbos de diverso calibre de cada especie en estudio, suministrado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Talca.

El procedimiento para el montaje de los estudios consta de las etapas de lavado y esterilización del material vegetal, la selección de los explantes más adecuados para lograr una buena tasa de regeneración, las condiciones de incubación y finalmente las condiciones para la aclimatación de los nuevos propágulos. Además se considera el procedimiento para la preparación de medios de cultivo variables según el objetivo a lograr.

1-Limpieza y esterilización de material vegetal

Los bulbos de las diferentes especies, una vez ingresados en el laboratorio, serán lavados con agua corriente y unas gotas de detergente, para romper la tensión superficial. A continuación serán sometidos a una desinfección con fungicidas (Captan 80 + Benomylo) en agitación durante 20 a 30 minutos, antes del tratamiento en cámara de flujo laminar. En ésta, los bulbos serán desprendidos de 2 o 3 catáfilos exteriores para ser desinfectados en Etanol 70% por 5 segundos, seguido de una solución de Na ClO al 2% de Cl activo por 10 minutos, antes de cortar los explantes.

2-Obtención de explantes

Finalizado el proceso de esterilización externa de los bulbos, se cortarán en 4, 8 o 16 partes, según el tamaño, para obtener cuñas de bulbos, a partir de los cuales se obtengan los explantes. Estos consistirán de catáfilos individuales o gemelas, unidas por un segmento de disco basal, con presencia de meristemas, que serán insertados en los medios de cultivo. Los explantes podrán variar en tamaño, según la especie o calibre de bulbo disponible y según el grosor de las catáfilas. Estas eventualmente también podrán ser segmentadas, utilizando sólo la parte basal o también la porción apical del bulbo, para estudiar la potencialidad de regeneración a partir de diferentes tipos de explantes de escamas. Una vez obtenidos los brotes neoformados, se repicarán a medio fresco para su aumento de tamaño y la inducción de bulbillos. Además se pretende utilizar semillas para germinarlas in vitro e inducir a partir de estas plántulas nuevos brotes y bulbillos.

En función de lo anterior surgirán diversos grupos de ensayos de tamaño y tipo de explante, difícil de planificar a priori, en tanto no se conozca la exacta disponibilidad de material vegetal y calibre de bulbos. Se estima, sin embargo, que por cada especie se podrá desarrollar un ensayo de tamaño de segmento de bulbos: 1/4, 1/8 y 1/16, combinado con catáfilas simples y gemelas, resultando un experimento de tipo factorial 3 x 2, con al menos 10 repeticiones por tratamiento.



Un segundo grupo de ensayos se referirá a la ubicación del explante en la catáfila: base de catáfila vs. ápice de catáfila, 2 tratamientos con 10 a 12 repeticiones, para cada especie. En cada ensayo se determinarán los siguientes parámetros: % de sobrevivencia, % de brotación, % de bulbificación, % de enraizamiento, número de brotes por explante, número de bulbillos por explante, número de raíces por explante (a los 30 días post siembra de explantes). Eventualmente se podrá determinar tamaño de brotes y bulbillos y longitud de raíces, como parámetros importantes de determinar en el transcurso de los ensayos.

Como sustrato para estos ensayos se utilizará un medio de cultivo standard de MS más los suplementos orgánicos necesarios para una organogénesis equilibrada, 0,1 mg/L de ANA y 1,0 mg/L de BAP, 20 a 30 g/L de sacarosa y 2 g/L de gelrite, regulando el pH a 5,8.

3-Composición de medios de cultivo

Previo o paralelo a los ensayos anteriores, es necesario determinar el tipo y concentración de reguladores de crecimiento para cada respuesta organogénica. Para ello será necesario comparar las fuentes de auxinas, ANA y AIB (u otras) en concentraciones de 0, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 mg/L en presencia de una citocinina (BAP, 1,0 mg/L). Las dosis podrán variar en función de los resultados observados en los ensayos paralelos con las fuentes de explante sobre un medio standard, y podrán variar también de acuerdo a la disponibilidad de material vegetal.

Otro grupo de experimentos comparará las fuentes y concentraciones de citocininas, BAP u Kinetina, en concentraciones de 0, 0,05, 0,1, 0,2 y 0,4 mg/L en presencia de una auxina (ANA, 0,1 mg/L).

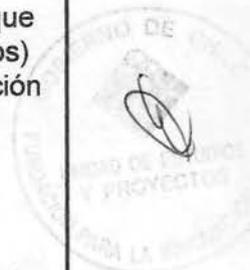
Un tercer grupo de ensayos combinará los tipos y las concentraciones óptimas de ambos grupos de fitorreguladores con el fin de lograr un protocolo de organogénesis óptima para cada especie en estudio. En los ensayos planteados no se podrá considerar, en esta etapa, el factor genotipo, que podría ser una importante fuente de variación de los resultados que se obtengan. Una vez obtenido un genotipo definido y adecuado, deberán afinarse los protocolos de micropropagación para cada caso.

Estos experimentos, independientes para cada especie en estudio, se establecerán en un diseño completamente al azar, ordenados como experimentos factoriales en que los factores estarán dados por los respectivos fitorreguladores, auxinas o citocininas, y sus respectivos niveles o concentraciones, estableciéndose con un mínimo de 10 repeticiones por tratamiento. Los parámetros que se determinarán son los mismos indicados anteriormente.

Adicional a lo anterior, será necesario estudiar el efecto de diferentes carbohidratos y sus respectivas concentraciones, en especial sobre la intensidad de bulbificación, de modo que se establecerán ensayos comparando sacarosa, glucosa y fructosa (u otros carbohidratos) en concentraciones de 2, 3, 6 y 8%, utilizando un medio standard (MS) con la combinación de fitorreguladores más adecuada para cada especie.

4-Incubación

Todos los experimentos que se lleven a cabo se incubarán en una sala ad hoc con condiciones reguladas de fotoperíodo, intensidad y calidad de luz y temperatura. El fotoperíodo que se proporcionará será un ciclo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, con una intensidad lumínica de 2500 a 3000 lux provenientes de tubos fluorescentes de luz día con





longitudes de onda con peaks de luz azul, 440 nm, y luz roja, 660 nm. La temperatura de la sala de incubación será de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la fase de iluminación. De ser necesario, el material vegetal podrá ser previamente sometido a vernalización a 4°C durante algunas semanas, previo al inicio de algún ensayo en particular.

5-Aclimatación

Este proceso suele ser el más crítico en la fase de micropropagación, por cuanto implica maximizar la tasa de sobrevivencia del material micropropagado, al transferirlo a condiciones no asépticas como las que se tendrán en un invernadero con substratos hortícolas normales. Para ello es necesario someter las plántulas desarrolladas bajo condiciones in vitro. A un proceso de aclimatación gradual a las nuevas condiciones, consistentes en aumentar la intensidad luminosa a unos 10.000 lux, disminuir la temperatura a unos $15-18^{\circ}\text{C}$, y disminuir la humedad relativa a valores cercanos a 50%. Posterior a ello, las plántulas serán transplantadas a substratos de turba/arena (1:1), perlita o vermiculita, para su desarrollo posterior y aumento de calibre de bulbillos. Este proceso se llevará a cabo en invernaderos de la Universidad Austral de Chile, en Valdivia. La última etapa, o engorda del material, se llevará a cabo en Talca, bajo condiciones de invernadero frío en instalaciones de la Universidad de Talca.

Duración: el establecimiento del protocolo del cultivo in vitro tendrá una duración de 8 meses,

Quem

6. CULTIVO EN INVERNADERO

1. Elección de mejores condiciones térmicas para el crecimiento y desarrollo de los bulbos

En enero de 2002 se sacarán 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 separarán por calibre y se dejará una parte en el invernadero de la Estación experimental de la UTALCA y otra parte en el invernadero de Floricultura del Campus Lircay. En el invernadero de la Estación experimental se mantendrán sin calefacción y con enfriamiento del aire en verano por medio de paneles evaporativos y extractores. En el invernadero de Floricultura se mantendrán también sin calefacción y sin climatización en verano. Esto permitirá ver si hay diferencias en la emisión de hojas (y, por lo tanto, en el tamaño de los bulbos) y en la inducción del receso en las plantas. Para esto se elegirá, para cada especie, un mínimo de 20 bulbos de un mismo calibre, tomando al menos un calibre, para ser puesta la mitad en un invernadero y la mitad en el otro, en bolsas individuales. En el mes de julio se registrarán los tamaños de bulbos alcanzados y número de hojas. Se harán las comparaciones y en el lugar donde se obtuvieron los mejores resultados se harán los siguientes experimentos.

Se analizará el pH del sustrato a utilizar (tierra de hojas y arena en proporción 1:1) y se ajustará entre 6 y 7, si fuere necesario. También se realizará un análisis mineral completo, más una medición de la conductividad eléctrica y pH, previo a la plantación. Los bulbos serán plantados en contenedores y el sustrato se regará con un fertilizante soluble completo con microelementos, de 'Soquimich', elaborando una solución de 80 ppm de nitrógeno.

En este caso y en todos los experimentos siguientes con los datos obtenidos se efectuará el análisis de varianza y, cuando corresponda, para la separación de medias se aplicará un test, en principio el test LSD.

2. Experimentos de duración y calidad de la luz



En enero de 2002 se realizarán siembras con todas las semillas disponibles de cosechas realizadas en años anteriores. Las siembras se realizarán en el invernadero de la Estación experimental.

En marzo de 2002 y de los años siguientes se realizarán nuevas colectas, principalmente de semillas, pero también se coleccionarán nuevos bulbos en todas las especies en estudio, a excepción de *R. bagnoldii*, que se coleccionará en noviembre. Las semillas se sembrarán en el invernadero de Floricultura en un sector de doble capa de polietileno.

Se utilizarán calibres pequeños, de entre 0,5 a 5 cm de circunferencia para los ensayos de crecimiento de bulbos, que comenzarán en agosto de 2002. Se utilizarán un mínimo de 15 bulbos (idealmente 25 bulbos) de un mismo calibre por repetición, con un total de 4 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos serán la exposición a condiciones de 12 horas de luz (con ampolletas incandescentes que se programarán para encenderse en la mitad de la noche con un timer o reloj programador) y la exposición a fotoperiodo natural. Las plantas iluminadas serán rodeadas de polietileno grueso negro para evitar iluminar a las otras plantas.

En otro grupo de bulbos, en igual número de bulbos por repetición y número de repeticiones se evaluará el crecimiento bajo dos condiciones de luz; luz natural y luz artificial complementaria a la luz natural, por medio de tubos fluorescentes o luces incandescentes.

En los dos experimentos mencionados se evaluará el número de hojas (evaluación mensual) y el peso y calibre inicial y final de los bulbos en abril de 2003.

3. Experimentos de exposición al frío

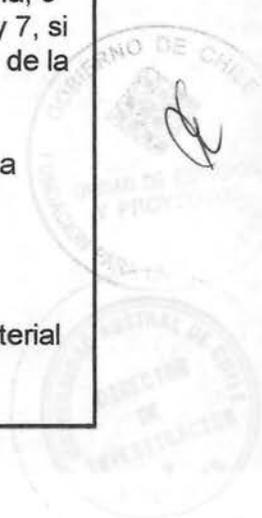
En diciembre de 2002 (o en el periodo de dormancia de cada especie, que puede o no coincidir con ese mes) se seleccionarán un mínimo de 20 bulbos de similares calibres capaces de florecer (tamaños grandes) y se expondrá la mitad a temperaturas de 7°C y 80% de humedad por 8 semanas (según la metodología descrita por Okubo, 1993) y la otra mitad a temperatura ambiental. Se evaluará la capacidad de florecer de los bulbos, registrándose el número de inflorescencias, número de florecillas por inflorescencia y longitud del escapo floral, en el periodo comprendido entre febrero y noviembre de 2003.

4. Manejo de bulbos poliploides

A comienzos del año 2003 se espera recibir los primeros individuos con aumento de poliploidía y multiplicados in vitro y se pondrán en la situación más favorable para el crecimiento que se haya logrado en los experimentos de los meses anteriores.

Se plantarán los bulbos poliploides en un sustrato compuesto por tierra de hojas y arena, o turba y arena en proporción 1:1. Se analizará el pH de la mezcla y se ajustará entre 6 y 7, si fuere necesario. También se realizará un análisis mineral completo, más una medición de la conductividad eléctrica y pH, previo a la plantación. Los bulbos serán plantados en contenedores y el sustrato se regará con un fertilizante soluble completo con microelementos, de 'Soquimich', elaborando una solución de 80 ppm de nitrógeno en la primera fase de crecimiento de las plantas, y luego con una solución de 150 ppm de nitrógeno en la fase de crecimiento activo.

El material no poliploide disponible se continuará cultivando y se hará crecer bajo las condiciones más favorables para tener material suficiente a la hora de comparar el material poliploide con el no poliploide.





5. Registros del comportamiento de material poliploide y no poliploide

Desde el año 2003 en adelante en el material poliploide y no poliploide de bulbos de similares tamaños se irá registrando mensualmente el número de hojas y el ancho promedio de las hojas maduras. Cuando las plantas emitan la flor, se medirá la longitud del escapo floral cuando abra la primera florecilla, se contará el número de florecillas por inflorescencia, se determinará el color por medio de la tabla de colores de la Royal Horticultural Society y se medirá la longitud y el ancho promedio de los tépalos de las florecillas, así como la longitud del pistilo y de los estambres. Cada registro se relacionará con el tamaño del bulbo. También se registrarán datos fenológicos, como fecha de inicio de brotación y de senescencia del follaje (si ocurre), fecha de floración y de fructificación.

Las semillas de las plantas poliploides se sembrarán para evaluar su fertilidad.





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO

2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
1	1	Obtención de raicillas a partir de bulbos, obtención de raicillas a partir de semillas germinadas, para posterior adaptación de protocolo para determinar el cariotipo	01/01/2002	31/03/2002
1	2	Adaptación de protocolo existente para determinar cariotipo	01/01/2001	31/03/2002
1	3	Aplicar protocolo adaptado- observación de cromosomas – determinación de cariotipo – fotografías de cariotipos	01/02/2001	31/03/2002
2	1	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: germinación de semillas para posterior aplicación de colchicina	01/01/2002	31/11/2002
2	2	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: ingreso in vitro de explantes de bulbo para posterior aplicación de colchicina	01/01/2002	31/11/2002
2	3	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: ingreso de explantes en medio que contenga colchicina	01/01/2002	31/11/2002
2	4	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado sobre semillas germinadas	01/01/2002	31/11/2002
2	5	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado a explantes sumergidos en colchicina y desarrollados posteriormente in vitro	01/03/2002	31/11/2002
2	6	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado sobre explantes desarrollados en medio de cultivo conteniendo colchicina	01/04/2002	31/11/2002
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	01/11/2002	31/12/2002
5	1	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo diferente tamaño de explantes para las 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	01/01/2002	31/06/2002



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
5	2	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo del efecto de la posición del explante para las 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	01/01/2002	31/06/2002
5	3	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo de utilización de fuente de carbohidratos para las 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	01/01/2002	31/06/2002
5	4	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo de composición del medio de cultivo para las 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	01/01/2002	31/08/2002
5	5	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación sobre explantes de las 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	01/05/2002	31/08/2002
5	6	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de diferente tamaño de explante	01/01/2002	31/03/2002
5	7	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de la posición del explante	01/01/2002	31/04/2002
5	8	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de utilización de fuente de carbohidratos	01/01/2002	31/04/2002
5	9	Evaluar resultados de multiplicación in vitro ensayo de composición del medio de cultivo	01/01/2002	31/05/2002
5	10	Evaluar resultados de multiplicación in vitro ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación	01/05/2002	31/08/2002
6	1	Desarrollar protocolos de micropropagación en base a ensayos de multiplicación in vitro realizadas	01/09/2002	31/10/2002
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	01/10/2002	31/12/2002
7	1	Evaluación de crecimiento y desarrollo de bulbos en invernadero climatizado versus no climatizado, y siembra de semillas	03/01/2002	31/07/2002



		antiguas		
1,2,3,5,6,7	1	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	01/01/2002	31/12/2002

10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO 2002

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
7	2	Experimentos de duración y calidad de luz en bulbos diploides	15/08/2002	31/12/2002
7	3	Experimentos de exposición al frío de bulbos	01/12/2002	31/12/2002
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides	01/08/2002	31/12/2002



10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO

2003

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	01/01/2003	31/12/2003
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado- Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo	01/03/2003	31/12/2003
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	01/01/2003	31/12/2003
1,2,3,5,6,7	1	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	01/01/2003	31/12/2003
7	2	Experimentos de duración y calidad de luz en bulbos diploides	01/01/2003	31/04/2003
7	3	Experimentos de exposición al frío de bulbos	01/01/2003	31/11/2003
8 y 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	01/03/2003	31/12/2003
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides	01/01/2003	31/12/2003





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO

2004

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	01/01/2004	31/12/2004
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado- Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo	01/01/2004	31/12/2004
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	01/01/2004	31/12/2004
1,2,3,5,6,7	1	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	01/01/2004	31/11/2004
8 y 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	01/01/2004	31/12/2004
8	2	Ensayos complementarios de composición de medios y/o condiciones de incubación con genotipos poliploides con problemas de regeneración	01/01/2004	31/12/2004
8	3	Multiplicación y aclimatación de poliploides selectos	01/08/2004	31/12/2004
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides	01/01/2004	31/12/2004
9	1	Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides inducidas	01/09/2004	31/12/2004





10. ACTIVIDADES DEL PROYECTO (adjuntar Carta Gantt mensual para la totalidad del proyecto)

AÑO

2005

Objetivo Especif. N°	Actividad N°	Descripción	Fecha Inicio	Fecha Término
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre semillas germinadas, explantes sumergidos en solución colchicina y explantes desarrollados en medio conteniendo colchicina	01/01/2005	31/07/2005
4	1	Evaluación del grado de poliploidía logrado- Aplicación de protocolo modificado para determinar cariotipo	01/01/2005	31/11/2005
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de <i>Rhodophiala</i> e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	01/01/2005	31/04/2005
8 y 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	01/01/2005	31/11/2005
8	3	Multiplicación y aclimatación de poliploides selectos	01/01/2005	31/10/2005
8	5	Establecimiento de banco de germoplasma de <i>Rhodophiala</i>	01/01/2005	31/10/2005
9	1	Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides inducidas	01/01/2005	31/11/2005
10	1	Publicación en revista divulgativa	01/01/2005	31/12/2005
10	2	Publicación en revista especializada	01/01/2005	31/12/2005



11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
1	Determinación de cariotipo	Fotografías	Cariotipo de las 4 especies	Cariotipo	31/03/2002
2	Protocolo inducción de poliploides en <i>Rhodophiala</i>	Numero de individuos poliploides producidos	Protocolo desarrollado	Protocolo desarrollado	31/11/2002
3	Clones de posibles poliploides de las 4 especies	Número de posibles clones poliploides	15 clones de cada especie	15 clones de cada especie	31/07/2005
4	Determinación de cariotipo de los poliploides	Numero de cromosomas	Determinación cariotipo	Determ. cariotipo	31/11/2005
5	Montaje de sistema de cultivo in vitro de 4 especies de <i>Rhodophiala</i>	Explantos de las 4 especies sembrados	60 explantes por especie	Explantos sembrados	01/06/2002
5	Cultivos asépticos de las 4 especies	Plántulas o brotes libres de bacterias u hongos obtenidos	1 cultivo de cada especie establecido	Cultivos limpios	31/08/2002
5	Ensayos de tamaño de explante, posición de explante, composición de medios y concentraciones de auxinas y citocininas montados	Plántulas de material diploide de las 4 especies establecidas	6 ensayos por especie	Plántulas producidas	31/08/2002
6	Multiplicación intensiva de materiales poliploides	Posibles modificaciones al cultivo de poliploides establecidas	1 protocolo para poliploides desarrollado	Plántulas obtenidas	31.12.03
6	Aclimatación de plántulas en invernadero	Sistema de aclimatación de plántulas desarrollado	100 plántulas o bulbillos de cada especie entregadas	Plántulas o bulbillos	31.08.- 31.10.03





11. RESULTADOS ESPERADOS E INDICADORES

11.1. Resultados esperados por objetivo

Obj. Esp. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
				Meta	Plazo
6	Ensayos de afinamiento de técnicas para genotipos selectos	Modificaciones de protocolos para diferentes genotipos desarrolladas	20 plántulas de cada genotipo de calidad mejorada	Plántulas producidas	31.12.04
6	Entrega masiva de plántulas de cada especie o genotipo	Sistema de envío y entrega de plántulas o microbulbillos desarrollados	100 o más plántulas o bulbillos por cada genotipo producidas	Plántulas o bulbillos producidos	31.08.05
6	Establecimiento de banco de germoplasma de <i>Rhodophiala</i>	Sistema de almacenaje a mediano plazo establecido	15 tubos por genotipo incorporado	Plántulas sembradas en el banco	31.08.05.
7	Evaluación de crecimiento en invernaderos diferentes	Cuadros comparativos	4 cuadros	4 cuadros	31/07/2002
7	Evaluación de crecimiento bajo fotoperiodo natural vs días largos	Cuadros comparativos	4 cuadros	4 cuadros	31/04/2003
7	Evaluación crecimiento bajo luz artificial vs luz natural	Diámetro bulbo / n° hojas	Análisis datos	Cuadro comparativo	31/04/2003
7	Determinación de requerimientos de frío de bulbos para florecer en 3 especies	% de bulbos que florecen	Definir en 3 especies si existe requerimiento de frío	Definir en 3 especies si existe requerimiento de frío	30/11/2003
8	Floración de plantas poliploides	Sobrevivencia y floración de plantas	Floración del 80% de las plantas en cada especie	R. bagnoldii: 60%; otras 90%	31/11/2005
9	Evaluación plantas poliploides	Mediciones / fotografías	1 evaluación por cada individuo diploide	Confección de fichas	31/11/2005
10	Publicación en revistas especializadas	4 Artículos enviados para su revisión y	2 artículos divulgativos; 2 artículos en revista	4 Borradores	31/12/2005





		publicación	especializada		
--	--	-------------	---------------	--	--

11.2. Resultados esperados por actividad						
Obj. Esp. N°	Activid. N°	Resultado	Indicador	Meta Final	Parcial	
					Meta	Plazo
1	1-3	Determinación del nivel de ploidía de las especies	Fotografías de cariotipo	4 cariotipos	4 cariotipos	31/03/02
2	1-8	Protocolo de Inducción de poliploidía	Individuos poliploides	15 individuos poliploides	15 individuos poliploides	31/11/02
3	1	Clones de posibles poliploides	N° de clones poliploides	15	15	31/07/05
4	1	Determinación nivel de ploidía en clones	N° cromosomas	15 clones evaluados	15 clones evaluados	31/11/05
5	1-5	Siembra de explantes bajo diferentes ensayos y establecimiento de cultivo aséptico	Explantes sembrados y limpios	6 ensayos por especie	Expl. Sembr. Y limpios	01/03/01 01/07/02
5	6-10	Resultados evaluación ensayo	Sistema de ind. de brotes y raíces establecido	1 protocolo final por especie listo	Plántulas producidas	31/08/02
6	1	Protocolo establecido	Protocolo escrito	Protocolo escrito	Protocolo escrito	31/09/02
6	2	Multiplicación intensiva de material diploide	Sistema implementado	Individuos ingresados	Plántulas obtenidas	31/04/05
7	1	Evaluación de crecimiento en invernaderos diferentes	Cuadros comparativos	4 Cuadros	4 cuadros	31/07/02
7	2	Evaluación de crecimiento bajo fotoperiodo natural vs días largos	Cuadros comparativos	4 cuadros	4 cuadros	31/04/03
7	2	Evaluación de crecimiento bajo luz artificial vs luz natural	Cuadros comparativos	4 cuadros	4 cuadros	31/11/03
7	3	Determinación de requerimientos de frío de bulbos para florecer en 3 especies	% de bulbos que forecen	Definir en 3 especies si existe requerimiento de frío	Definir en 3 especies si existe requerimi	31/11/03





					entos de frío	
8	1-4	Floración de plantas poliploides	Sobreviviencia y floración	Floración del 80% de las plantas en cada especie	R. <i>bagnoldii</i> 60%, otras 90%	31/11/0 5



CARTA GANTT DEL PROYECTO AÑO 2002			MESES											
Obj	Act	Descripción	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
1	1,2,3 5,6,7	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
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									
1	2	Adaptación de protocolo existente para determinar cariotipo	X	X	X									
1	3	Aplicar protocolo adaptado – observación de cromosomas – fotografías de cariotipo		X	X									
2	1	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	
2	2	Determinar protocolo de inducción de poliploidía: ingreso in vitro de explantes de bulbo para posterior aplicación de colchicina	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	3	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	4	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: Aplicado sobre semillas germinadas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	5	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado a explantes sumergidos en colchicina y desarrollados posteriormente in vitro			X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2	6	Evaluar protocolo de inducción de poliploidía: aplicado sobre explantes desarrollados en medio de conteniendo colchicina				X	X	X	X	X	X	X	X	
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre 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						
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						
5	3	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: 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				



AÑO 2002			E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
5	5	Determinación de un sistema eficiente de multiplicación de material in vitro: montar ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación sobre explantes					X	X	X	X				
5	6	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de diferente tamaño de explante	X	X	X									
5	7	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de la posición del explante	X	X	X	X								
5	8	Evaluar resultados de multiplicación in vitro de ensayo de utilización de fuente de carbohidratos	X	X	X	X								
5	9	Evaluar resultados de multiplicación in vitro ensayo de composición de medio de cultivo	X	X	X	X	X							
5	10	Evaluar resultados de multiplicación in vitro ensayo del efecto de concentraciones evaluadas de auxina y citoquinina en combinación					X	X	X	X	X			
6	1	Desarrollar protocolos de micropropagación en base a ensayos de multiplicación in vitro realizadas									X	X		
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de Rhodophiala e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía										X	X	X
7	1	Evaluación de crecimiento y desarrollo de bulbos en invernadero climatizado versus no climatizado, siembra de semillas antiguas	X	X	X	X	X	X	X					
7	2	Experimentos de duración y calidad de la luz en bulbos diploides								X	X	X	X	X
7	3	Experimentos de exposición al frío												X
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides								X	X	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
1,2,3, 5,6,7	1	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre 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
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
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de Rhodophiala e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	2	Experimentos de duración y calidad de luz en bulbos diploides	X	X	X	X								
7	3	Experimentos de exposición al frío de bulbos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
8, 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides	X	X	X	X	X	X	X	X	X	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
1,2,3,5,6,7	1	Colecta de material en ambiente natural y siembra de semillas nuevas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
3	1	Aplicación de tratamiento de inducción de poliploidía en base a colchicina sobre 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
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
6	2	Multiplicar material de diferentes especies de Rhodophiala e ingreso in vitro para posterior inducción de poliploidía	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8, 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	4	Aclimatación de plántulas poliploides	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	2	Ensayos complementarios de composición de medios y/o condiciones de incubación con genotipos poliploides con problemas de regeneración	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	3	Multiplicación y aclimatación de poliploides selectos								X	X	X	X	X
9	1	Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides inducidas									X	X	X	X



Carta GANTT DEL PROYECTO AÑO 2005			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 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	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, 9	1	Plantación y cultivo de bulbos poliploides junto con diploides	X	X	X	X	X	X	X	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		
8	3	Multiplicación y aclimatación de poliploides selectos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
9	1	Evaluación de características ornamentales de plantas poliploides inducidas	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





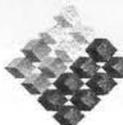
12. IMPACTO DEL PROYECTO

12.1. Económico

El proyecto se espera que tenga un impacto económico al permitir la obtención de genotipos mejorados de las cuatro especies de *Rhodophiala*. Este material, posteriormente, y después de un período de evaluación mayor podrá dar origen a nuevos cultivares, que deberán ser inscritos en el Registro de Variedades del SAG y que serán puestos a disposición de los floricultores interesados, tanto del país como del extranjero.

El generar variedades cultivadas a partir de plantas nativas y endémicas de Chile, puede abrir las puertas a una actividad de mejoramiento de plantas ornamentales hasta ahora no realizada en Chile, complementando el trabajo iniciado en otros centros de investigación, con otras especies bulbosas. Por tratarse de especies de propagación vegetativa, la posterior multiplicación de estos materiales deberá hacerse con un criterio técnico y comercial que permita que el mejoramiento de estas especies sea una actividad económicamente sustentable.





12.2. Social

Inicialmente, el proyecto propuesto no tendrá un gran impacto social, por tratarse de una fase exploratoria en que se realizará investigación aplicada. Sin embargo, en el futuro, cuando se hayan desarrollado nuevos cultivares que puedan ser incorporados a la actividad florícola comercial, el impacto social será proporcional al número de empleos que se puedan generar.

La incorporación de geófitas nativas al entorno urbano de nuestro país, ya sea público (parques, bandejones, plazas, etc.) o privado (jardines de casas particulares) apunta a desarrollar valores estéticos por las plantas nativas y también ayuda a su conocimiento, valoración, propagación y conservación.





12.3. Otros (legal, gestión, administración, organizacionales, etc.)

Es importante considerar que la creación de nuevos cultivares constituye un patrimonio científico-técnico que es necesario proteger, por lo que hay que tomar las medidas de carácter legal que amerite esta creación, en términos de inscripción en los registros pertinentes, de gestión de comercialización de material vegetal, de cobro de royalties a eventuales propagadores, y todos los aspectos asociados a la liberación de nuevos cultivares.





13. EFECTOS AMBIENTALES

13.1. Descripción (tipo de efecto y grado)

El resultado de este proyecto en ningún caso podrá generar un impacto ambiental negativo, al quedar su producto inicialmente restringido al ámbito de laboratorios, invernaderos y campos experimentales. En todo caso, la creación de cultivares mejorados de las especies en estudio podría disminuir el interés por coleccionar material de la naturaleza, disminuyendo así la acción antrópica predatoria sobre los recursos genéticos de las especies en estudio. Se estima, por tanto, que el efecto ambiental sea mas bien positivo. El manejo posterior de eventuales plantaciones comerciales, en todo caso no diferirá significativamente de la situación de otros cultivos de especies bulbosas, como por ejemplo los cultivos de tulipanes, Liliium y otras geófitas ornamentales.





13.2. *Acciones propuestas*

Se desarrollará en este proyecto sistemas de multiplicación intensiva de los materiales previamente duplicados cromosomalmente, de modo de generar genotipos mejorados de las especies en estudio. El manejo que se haga de estos materiales se mantendrá en un ámbito restringido, en tanto no se registren los materiales genéticos que se obtengan.





13.3. Sistemas de seguimiento (efecto e indicadores)

Los materiales mejorados que se obtengan deberán ser evaluados por un tiempo mayor al del presente proyecto a fin de poder liberar nuevas variedades de *Rhodophiala*. Sólo después de una estricta selección de los materiales obtenidos se podrán presentar a registro de variedades e inscribirlas legalmente para iniciar su propagación comercial con fines de cultivo extensivo. En ese momento será necesario tomar las precauciones de seguimiento del eventual impacto que como cultivo pudiesen ejercer sobre el medio ambiente.



14. COSTOS TOTALES DEL PROYECTO: CUADRO RESUMEN

(resultado de la sumatoria de los cuadros 15.1 y 15.3)

AÑOS						
ITEM	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Recursos humanos						
Profesionales y obrero agrícola						
Especialistas y secretaria						
Equipos y Maquinaria						
Equipos						
Audiovisuales						
Infraestructura						
Movilización viáticos y combustibles						
Materiales e insumos						
Servicios a terceros						
aporte contraparte						
aporte solicitado						
Difusión						
Gastos Generales y de administracion						
Imprevistos						
TOTAL						

DE CHILE


SECRETARÍA EJECUTIVA
 DIRECTOR DE INICIATIVAS
 DE INNOVACIÓN



15. FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

15.1. Aportes de contraparte: Cuadro Resumen (Universidad de Talca)

Si hay más de una institución que aporta fondos de contraparte se deben presentar los valores en cuadros separados para cada agente

Ítem de Gasto						
ITEM	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
1. Recursos humanos						
Especialistas y secretaria						
2. Equipos y Maquinarias						
Equipos audiovisuales						
3. Servicios a Terceros						
Uso de Laboratorio						
Uso de Invernadero						
Campus Lircay						
Uso de oficinas						
Total						





APORTE UNIVERSIDAD DE TALCA 2002					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/unitario (\$)	Total/mes (\$)	Total/año
1. Recursos humanos					
Coordinador alterno	26	horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Sub total					
2. Equipos y Maquinarias					
Subtotal					
3. Servicios a Terceros					
Uso de Laboratorio	1	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Sub Total					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD DE TALCA 2003					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/unitario (\$)	Total/mes (\$)	Total/año
1. Recursos humanos					
Coordinador alterno	26	Horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Sub total					
2. Equipos y Maquinarias					
Subtotal					
3. Servicios a Terceros					
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Sub Total					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD DE TALCA 2004					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/unitario (\$)	Total/mes (\$)	Total/año
1. Recursos humanos					
Coordinador general	26	Horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Sub total					
2. Equipos y Maquinarias					
Subtotal					
3. Servicios a Terceros					
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Sub Total					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD DE TALCA 2005					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/unitario (\$)	Total/mes (\$)	Total/año
1. Recursos humanos					
Coordinador alterno	26	horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Sub total					
2. Equipos y Maquinarias					
Subtotal					
3. Servicios a Terceros					
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Sub Total					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD DE TALCA 2006					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/unitario (\$)	Total/mes (\$)	Total/año
1. Recursos humanos					
Coordinador alterno	26	horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Sub total					
2. Equipos y Maquinarias					
Subtotal					
3. Servicios a Terceros					
Sub Total					
Total					



15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración (Universidad de Talca)

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

1.- Recursos Humanos.

En el ítem Recursos Humanos, el valor hora del co-investigador se determinó según la escala utilizados por la Universidad para sus académicos. Este valor se multiplicó por el tiempo (horas/año) de dedicación del especialista al proyecto, a fin de complementar todas las áreas necesarias para su buen funcionamiento.

La escala de valores determinada por la Universidad es la siguiente:

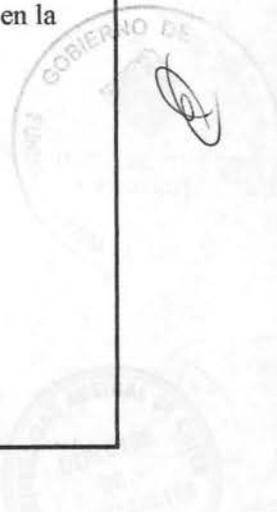
<u>Categoría académica</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Académico	15.883 (correspondiente a 1 UF)
Valor UF del día 11 de Mayo del 2001, \$ 15.883	

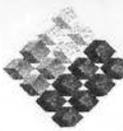
<u>Categoría Funcionarios</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Secretaria	4.000

2.- Servicios a terceros

- Uso de laboratorios y oficina: Esto se valoró considerando un laboratorio con equipamiento completo. El laboratorio es el lugar donde el Agrónomo contratado como asistente de investigación realizará sus labores.
- Uso de invernadero: Esto se valoró considerando depreciación, proporcionalmente al tiempo de uso y espacio ocupado.

Los valores se calcularon en base a estimaciones realizadas por la Facultad y que se utilizan en la elaboración de todos los proyectos presentados por la Facultad.





15. FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

15.1. Aportes de contraparte: Cuadro Resumen (Universidad de Austral)

Si hay más de una institución que aporta fondos de contraparte se deben presentar los valores en cuadros separados para cada agente

Ítem de Gasto	AÑOS					
	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
ITEM						
1. Recursos Humanos						
Especialistas y secretaria						
2. Equipamiento						
Equipos audiovisuales						
3. Servicio de Terceros						
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos						
Uso laboratorio de semillas						
Uso de Invernadero						
Uso de instalaciones estación Experimental						
Uso de oficinas						
TOTAL						





APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL 2002					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general		26 horas			
Co-investigador (Peter Seemann)		26 horas			
Secretaría		4 horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales		3 equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos		1 mes			
Uso laboratorio de semillas		1 mes			
Uso de Invernadero		1 mes			
Uso de instalaciones estación Experimental		1 mes			
Uso de oficinas		2 mes			
Subtotal					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL 2003					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general		26 horas			
Co-investigador (Peter Seemann)		26 horas			
Secretaria		4 horas			
Obrero agricola		14 horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)		3 equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos		1 mes			
Uso laboratorio de semillas		1 mes			
Uso de Invernadero		1 mes			
Uso de instalaciones estación Experimental		1 mes			
Uso de oficinas		2 mes			
Subtotal					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL 2004					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador General	26	horas			
Co-investigador (Peter Seemann)	26	horas			
Secretaria	4	horas			
Obrero agricola	14	horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)	3	equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos	1	mes			
Uso laboratorio de semillas	1	mes			
Uso de Invernadero	1	mes			
Uso de instalaciones estación Experimental	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Subtotal					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL 2005					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general		26 horas			
Co-investigador (Peter Seemann)		26 horas			
Secretaria		4 horas			
Obrero agricola		14 horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)		3 equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos		1 mes			
Uso laboratorio de semillas		1 mes			
Uso de Invernadero		1 mes			
Uso de instalaciones estación Experimental		1 mes			
Uso de oficinas		2 mes			
Subtotal					
Total					

ORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL 2006

	Cantidad/me	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
Recursos Humanos					
Coordinador general	26	horas			
Investigador (Peter Seemann)	26	horas			
Secretaria	4	horas			
Trabajador agrícola	14	horas			
Total					
Equipamiento					
Cursos audiovisuales (3 oportunidades/año)					
Total					
Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos					
Uso de laboratorio de semillas					
Uso de Invernadero					
Uso de instalaciones estación Experimental					
Uso de oficinas					
Total					



15.2. Aportes de contraparte: criterios y métodos de valoración (Universidad Austral)

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

1.- Recursos Humanos.

En el ítem Recursos Humanos, el valor hora del co-investigador se determinó según la escala utilizados por la Universidad para sus académicos. Este valor se multiplicó por el tiempo (horas/año) de dedicación del especialista al proyecto, a fin de complementar todas las áreas necesarias para su buen funcionamiento.

La escala de valores determinada por la Universidad es la siguiente:

<u>Categoría académica</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Académico	15.883 (correspondiente a 1 UF)
Valor UF del día 11 de Mayo del 2001, \$ 15.883	

<u>Categoría Funcionarios</u>	<u>Valor (\$/hora)</u>
Secretaria	4.000

2.- Equipos y Maquinarias.

- Uso de equipos audiovisuales: consistente en proyector de diapositivas, retroproyector de transparencias, valorado al precio de arrendamiento en el mercado que serán usados en las distintas reuniones y actividades de difusión del proyecto.

3.- Servicios a terceros

- Uso de laboratorio de Cultivo de tejidos y de semillas: Se considero un laboratorio con equipamiento completo, el cual se valoriza en \$ 330.000 mes, éste será utilizado en forma permanente
- Uso de oficinas: Se consideró el uso de dos oficinas correspondiente al coordinador del proyecto (Ximena Henzi) y al coinvestigador (Peter Seemann). Estas oficinas cuentan con computadores, teléfonos, etc. Y ha sido evaluado su aporte en \$ 30.000/mes.
- Uso de invernaderos y laboratorios de la Estación Experimental Sta. Rosa: En estas instalaciones se mantendrá material vegetal para los estudios de poliploidía y micropropagación. Esto ha sido valorizado en \$ 20.800 al mes.





15. FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

15.1. Cuadro Resumen Aportes de Contraparte y Asociado: (Universidad de Talca y Universidad Austral)

(utilizar valores reajustados por año según índice anual)

Si hay más de una institución que aporta fondos de contraparte se deben presentar los valores en cuadros separados para cada agente

Ítem de Gasto						
ITEM	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Recursos humanos						
Esoecialistas y secretaria						
Equipos y maquinaria						
Equipos audiovisuales						
Servicios a terceros						
Uso laboratorio de cultivo de tejido						
Uso de laboratorio de semillas						
Uso de invernadero						
Uso de instalaciones Est. Experim.						
Uso de laboratorio						
Uso de invernadero Campus Lircay						
Uso de oficinas (UTAL)						
Uso de oficinas (UACH)						
TOTAL						





APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL Y UNIVERSIDAD DE TALCA 2003					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general		26 horas			
Co-investigador (Peter Seemann)		26 horas			
Secretaria		4 horas			
Coordinador alterno	26	Horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Obrero agricola		14 horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)		3 equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos		1 mes			
Uso laboratorio de semillas		1 mes			
Uso de Invernadero		1 mes			
Uso de instalaciones estación Experimental		1 mes			
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Uso de oficinas		2 mes			
Subtotal					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL Y UNIVERSIDAD DE TALCA 2004					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador General	26	horas			
Co-investigador (Peter Seemann)	26	horas			
Secretaría	4	horas			
Coordinador general	26	Horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaría	4	Horas			
Obrero agrícola	14	horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)	3	equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos	1	mes			
Uso laboratorio de semillas	1	mes			
Uso de Invernadero	1	mes			
Uso de instalaciones estación Experimental	1	mes			
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Subtotal					
Total					



APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL Y UNIVERSIDAD DE TALCA 2005					
ITEM	Cantidad/mes	Unidad	Valor/Unitario	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general		26 horas			
Co-investigador (Peter Seemann)		26 horas			
Secretaria		4 horas			
Coordinador alterno	26	horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Obrero agricola		14 horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Equipos audiovisuales (3 oportunidades/año)		3 equipo			
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Uso de laboratorio de cultivo de tejidos		1 mes			
Uso laboratorio de semillas		1 mes			
Uso de Invernadero		1 mes			
Uso de instalaciones estación Experimental		1 mes			
Uso de Laboratorio	0,5	mes			
Uso de Invernadero Campus Lircay	1	mes			
Uso de oficinas	2	mes			
Uso de oficinas		2 mes			
Subtotal					
Total					

APORTE UNIVERSIDAD AUSTRAL Y UNIVERSIDAD DE TALCA 2006					
ITEM	Cantidad/me	Unidad	Valor/Unitari	Total/mes (\$)	Total/año (\$)
1. Recursos Humanos					
Coordinador general	26	horas			
Co-investigador (Peter Seemann)	26	horas			
Secretaria	4	horas			
Coordinador alterno	26	horas			
Co-investigador (Patricio Peñailillo)	10	Horas			
Secretaria	4	Horas			
Obrero agricola	14	horas			
Subtotal					
2. Equipamiento					
Subtotal					
6. Servicio de Terceros					
Subtotal					
Total					



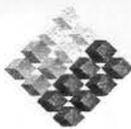


15.3. Financiamiento Solicitado a FIA: Cuadro Resumen (Universidad de Talca y Universidad Austral (utilizar valores reajustados por año según índice anual)

(desglosado por ítem y por año)

Ítem de Gasto	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Recursos humanos						
Equipamiento						
Infraestructura						
Movilización viáticos y combustible						
Materiales e insumos						
Servicios de terceros						
Difusión						
Gastos Generales						
Imprevistos						
TOTAL						





15.3. Financiamiento Solicitado a FIA: Cuadro Resumen (Universidad de Talca)
(utilizar valores reajustados por año según índice anual)

(desglosado por ítem y por año)

Ítem de Gasto						
Ítem	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Recursos humanos						
Equipamiento						
Infraestructura						
Movilización viáticos y combustible						
Materiales e insumos						
Servicios de terceros						
Difusión						
Gastos Generales						
Imprevistos						
TOTAL						





15.4. *Financiamiento solicitado a FIA: Universidad de Talca* *criterios y métodos de valoración*

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

1.- Recursos humanos

El Ingeniero Agrónomo será contratado por 35% de jornada con un sueldo bruto mensual de \$ 200.000. Esto equivale a una jornada de 15,4 horas semanales.

El Ingeniero Agrónomo estará encargado de desarrollar las actividades del proyecto llevadas a cabo en la Universidad de Talca, además estará encargado de parte de la administración del proyecto y logro de los objetivos 7, 8 y 9; elaboración de informes y preparación de actividades de difusión.

El obrero agrícola se consideró para realizar todas las actividades de apoyo como riego y labores culturales en general, mantenimiento de los invernaderos. Para estas actividades se consideró un valor bruto mensual de \$ 150.000.-

El coordinador alterno percibirá un estímulo de \$50.000 por las actividades que realizará en el proyecto.

2.- Equipamiento

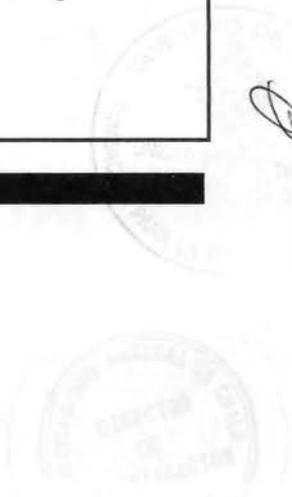
Se contempló la actualización y la compra de una impresora para la elaboración de informes, boletines divulgativos, publicaciones y otros.

En el año 2002 se comprará un equipo de riego por espaguete que es el recomendado para regar plantas en maceta. Este valor es un valor estimativo según consultas realizadas a un especialista en riego. Se adjunta cotización de espaguete. También en este año se comprará una cámara fotográfica digital para la obtención de fotografías de alta calidad y resolución de los diferentes estados de desarrollo de las plantas.

También se incluyó en este ítem el mantenimiento anual del sistema de riego.

franc

[Signature]



15.4. Financiamiento solicitado a FIA: Universidad de Talca criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

3.- Infraestructura tecnológica

Se consideró un valor de arrendamiento del invernadero según cotización entregado por el administrador de la Estación Experimental de la Universidad. El valor para el año 2001 es de alrededor de \$ 450.000.- anuales para un módulo de 320 m², pero para desarrollar las actividades se utilizarán 80 m². Se debe agregar el valor del consumo de electricidad que para el primer año es de alrededor \$ 55.- por KWH para 320² con un consumo promedio por mes de 600 KWH. A partir del segundo año el costo por arrendamiento es de \$600.000.-. Se adjunta cotización.

4.- Movilización, viáticos y combustibles

El subitem pasajes corresponde al costo de viajes realizados solo por el coordinador general fuera de la región a Valdivia o Santiago. El viaje a Valdivia en avión tiene un costo de \$ 80.000 aproximadamente ida y vuelta y un viaje a Santiago en bus tiene un costo de \$ 7000 ida y vuelta.

El subitem viáticos nacionales corresponde a los gastos del coordinador general del proyecto durante sus estadías en Valdivia o Santiago.

Para el cálculo de todos los viáticos se consideró el valor asignado por la Universidad que es de \$6000 por una salida a terreno de medio día y \$ 20.000 por una salida a terreno de día completo más alojamiento. Los valores son aproximados.

Para las salidas a terreno se consideró sólo el valor del combustible, ya que se utilizará la camioneta del proyecto Proteas. Se consideró un valor de combustible de \$400.- y un rendimiento de la camioneta de 8 kilómetros por litro de bencina.

5.- Materiales e insumos

En este ítem se consideraron valores aproximados de los insumos como material bibliográfico, pesticidas y papel filtro. En el caso de los fertilizantes se utilizarán fertilizantes solubles como los de la línea Ultrasol, que tienen un costo de \$ 15.000 el saco aproximadamente, la cantidad a utilizar dependerá del número de plantas que finalmente se logre establecer y las necesidades de cada especie.

15.4. Financiamiento solicitado a FIA: Universidad de Talca criterios y métodos de valoración

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

Para el cálculo de costos de materiales de librería se tomo como referencia el gasto mensual en este tipo de materiales que realizan otros proyectos que actualmente se desarrollan en la Facultad. El material de librería considera gastos en papel, carpetas, cuadernos, diskettes, etc. El mismo criterio anterior se utilizó para el cálculo de los gastos en material fotográfico donde se consideró la compra y revelado de rollos fotográficos para diapositivas.

El subitem herramientas contempla gastos en baldes o macetas, mangueras y otros utensilios necesarios para realizar las actividades.

En el año 2002 y 2004 se consideró un cambio de polietileno al invernadero del Campus Lircay. El valor del kilo de plástico es de aproximadamente \$1410.- y se requieren alrededor de 200 kilos. Se adjuntan cotizaciones.

En el año 2002 se instalará un sistema de iluminación al interior del invernadero para los diferentes ensayos de fotoperiodo y de luz complementaria a las plantas en crecimiento, además se instalará un timer para regular tiempo y frecuencia de iluminación. Todo esto tiene un costo de alrededor de \$100.000.-

6.- Servicio de terceros

Los costos de análisis de suelo y fitopatológicos se calcularon según los precios establecidos por los laboratorios de Suelo y de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad. El valor aproximado de un análisis de suelo completo es de \$ 20.000 y de un análisis fitopatológico es de \$ 10.000.

El subitem envíos corresponde a encomiendas que se deberán enviar desde Talca a Valdivia con semillas o bulbos obtenidos de cultivo en el invernadero del Campus Lircay, y de semillas colectadas en las diferentes salidas a terreno.

7.- Difusión

En el año 2003 se realizará un día de campo cuyo costo se estimó considerando la cantidad de asistentes y los materiales a utilizar (carpetas, lápices, material de apoyo, etc.).

En el año 2005 se realizarán publicaciones con un costo de \$ 680.000.- estimados de acuerdo a los valores promedio establecidos por las revistas con este objetivo.





15.3. Financiamiento Solicitado a FIA: Cuadro Resumen (Universidad Austral)
(utilizar valores reajustados por año según índice anual)

(desglosado por ítem y por año)

Ítem de Gasto	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
Ítem						
Recursos humanos						
Equipamiento						
Infraestructura						
Movilización viáticos y combustible						
Materiales e insumos						
Servicios de terceros						
Difusión						
Gastos Generales						
Imprevistos						
TOTAL						



15.4. *Financiamiento solicitado a FIA: Universidad Austral* *criterios y métodos de valoración*

Detallar los criterios utilizados y la justificación para el presupuesto por ítem y por año, indicando los valores unitarios utilizados y el número de unidades por concepto.

(para cada uno de los ítems de gasto se deberán especificar los criterios y metodología de valoración utilizada)

1.- Recursos humanos

El Ingeniero Agrónomo será contratado por 75 % de jornada con un sueldo bruto mensual de \$ 400.000. Esto equivale a una jornada de 26 horas semanales.

El Ingeniero Agrónomo estará encargado de desarrollar las actividades del proyecto y objetivos propuestos, además estará encargado de la administración del proyecto, elaboración de informes y preparación de actividades de difusión.

Se considera un Técnico de Laboratorio por 75% de jornada con un sueldo bruto mensual de \$ 200.000. Esto equivale a una jornada de 33 horas semanales.

El Técnico de Laboratorio estará encargado de apoyar y desarrollar todas las actividades de laboratorio (de Cultivo de Tejido y de Semillas).

El Auxiliar de Laboratorio será contratado por un 75% de jornada, que equivale a 33 horas semanales con un sueldo bruto de \$70.000.- El Auxiliar estará encargado de apoyar las labores y actividades del Técnico.

El coordinador *general* percibirá un incentivo de \$100.000 por las actividades a realizar en el proyecto. *2 personas*

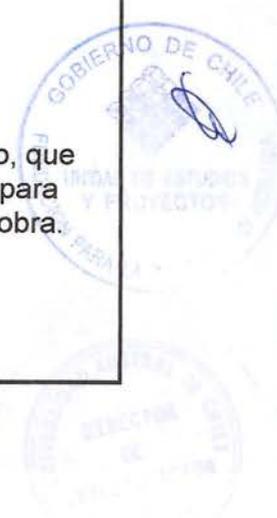
2.- Equipamiento

En el año 2002 se consideró la compra de tres equipos fundamentales para el desarrollo del proyecto como un Microscopio binocular necesario para las actividades de laboratorio, una balanza analítica para conocer de manera exacta el peso de semillas y bulbos y un refrigerador para almacenar y mantener el material vegetal. Se adjuntan cotizaciones.

3.- Infraestructura tecnológica

En el año 2002 y 2003 se contempla el acondicionamiento de un invernadero, que incluye cambio de plástico, polines, tablas o maderas y otros elementos necesarios para mantener el invernadero en óptimas condiciones. También se incorporó la mano de obra.

4.- Movilización, viáticos y combustibles



Para el cálculo de todos los viáticos se consideró el valor asignado por la Universidad que es de alrededor de \$40.000 por una salida a terreno de día completo más alojamiento.

Los viáticos nacionales corresponden a los costos de alojamiento de los viajes realizados por los coordinadores a Santiago para participar de las reuniones en FIA o a Talca para participar en las salidas a terreno. El subitem Pasajes incluye el valor del pasaje en avión desde Valdivia a Santiago y el valor de los pasajes en bus desde Santiago a Talca.

Se consideran viajes cada año del proyecto en donde se programarán y discutirán con los investigadores e integrantes del proyecto los avances y las distintas actividades a realizar y la programación trimestral

5.- Materiales e insumos

En este ítem se consideraron valores estimativos de insumos como medios de cultivo, reactivos, esterilizantes, material bibliográfico.

6.- Servicio de terceros

Los costos de los análisis bacteriológicos se calcularon según los precios establecidos por la Universidad. El valor aproximado de un análisis es de \$8.750.

El subitem envíos corresponde a encomiendas que se deberán enviar desde Valdivia a Talca con semillas o bulbos para ser plantados en el invernadero del Campus Lircay.

7.- Difusión

En el año 2004 se realizará un seminario donde participarán algunos expositores. Los gastos del seminario incluyen la estadía de los expositores en Valdivia, la organización y un resumen con las diferentes charlas dictadas en el seminario que se les entregará a todos los asistentes. Los valores se calcularon en base a otros seminarios dictados por la Universidad.

En el año 2005 se hará una publicación con los resultados finales del proyecto para lo que se consideró un costo de \$ 120.000.- estimados de acuerdo a los valores promedio establecidos por las revistas con este objetivo.

8.- Gastos generales y de administración

El material de fotocopias se estimó en base a las necesidades. Los gastos en mantenimiento de equipos incluye el mantenimiento anual que se debe realizar a los equipos de aire acondicionado y las cámaras de flujo laminar. Además se consideró la reposición de elementos de algunos equipos menores (electrodo para pehachímetro, instalaciones eléctricas, cámaras de incubación y revisión del destilador de agua) y mantenciones rutinarias del resto de los equipos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

También en este ítem se incluyen los gastos en administración que realiza la universidad. Este ítem no supera el 10% de los costos del proyecto.



9.- Imprevistos

Se calcularon en base a la reglamentación de FIA donde este item no supera el 5% de los gastos totales del proyecto.



16. ANÁLISIS ECONÓMICO DEL PROYECTO

16.1. Criterios y supuestos utilizados en el análisis

Indicar criterios y supuestos utilizados en el cálculo de ingresos (entradas) y costos (salidas) del proyecto

Dada la naturaleza de la presente propuesta, en que todos los esfuerzos se concentran en crear material poliploide, multiplicarlo y evaluarlo, y no existen beneficios en el corto plazo, no corresponde realizar un análisis económico de rentabilidad.



17. RIESGOS POTENCIALES Y FACTORES DE RIESGO DEL PROYECTO

17.1. Técnicos

Aunque el género *Rhodophiala* está estrechamente emparentado a *Amaryllis* (incluso antiguamente las especies de *Rhodophiala* estaban incluidas en *Amaryllis*), se estima que la obtención de tetraploides no debiera ser un problema, mas aún, la metodología propuesta es la generalmente aplicada para duplicación cromosomal.

Sin embargo, no se puede descartar *a priori* el riesgo de que no resulte la inducción de tetraploides o bien que estos no sean estables y reviertan a individuos diploides, y que por ello no se logre uno de los objetivos principales del proyecto. En ese caso, se continuaría desarrollando la fase de micropropagación de los genotipos sembrados, incluso se podría pensar en una siembra de semillas bajo condiciones estériles, a fin de multiplicar intensivamente los individuos resultantes y someterlos a un proceso de selección de aquellos que demuestren las mejores características.

En cuanto a la fase de micropropagación, es posible que se presenten fallas en el protocolo, para lo cual se realizarán diversos ensayos en donde se evaluarán un adecuado número de parámetros que afectan la micropropagación, de manera de garantizar un protocolo adecuado.

En la etapa de aclimatación y engorda de bulbos el riesgo radica en una posible baja sobre vivencia de las plantas, o bien, condiciones ambientales desfavorables para su desarrollo. Para la prevención de esta situación se contará con personal para mantener un adecuado control de las condiciones ambientales existentes en invernaderos e instalaciones en donde se mantenga el material vegetal.

17.2. Económicos

Entre los riesgos económicos que se corren es que se produzca un alza desmedida del valor del dólar que impida la adquisición de los equipos que se solicitan o que no permita contar con todos los insumos necesarios para realizar los trabajos comprometidos en la propuesta.

En ese caso, no quedaría otra alternativa que disminuir la intensidad de trabajos y reducir costos, especialmente en recursos humanos, para continuar con una alternativa de proyecto reducida.



17.3. Gestión

No se corre riesgos de gestión por cuanto la investigadora principal dispone de una vasta experiencia en el manejo de proyectos FIA. Adicionalmente, todos los investigadores involucrados también disponen de la suficiente experiencia como para asumir el liderazgo del proyecto en caso de producirse algún problema que lo pudiese poner en situación de riesgo.

Mas aún, ambas universidades involucradas en esta propuesta, dan suficiente garantía de solvencia como para permitir una adecuada gestión del proyecto.

17.4. Otros

No se vislumbran otras situaciones que pudiesen poner en riesgo la realización o concreción de este proyecto, por cuanto existe el suficiente nivel de conocimiento sobre el tema, implementación de laboratorios e instalaciones experimentales como para garantizar el éxito del presente proyecto.





17.5. Nivel de Riesgo y Acciones Correctivas

Riesgo Identificado	Nivel Esperado	Acciones Propuestas
Falla en obtención de poliploides en alguna especie	Medio	Realizar selecciones de material diploide en aquella especie problema
Fallas en el protocolo de micropropagación	Bajo	Realizar mayor número de ensayos para afinar las técnicas específicas para cada especie.
Aclimatación	Medio	Adecuado control de condiciones ambientales de invernadero
Engorda de bulbos	Bajo	Ensayos de engorda debidamente planificados
Alza en el valor del dólar que indirectamente cause un aumento en los costos	Bajo	Disminuir la intensidad de trabajos comprometidos. Ajustar el equipo de colaboradores.
De gestión	Muy bajo	Realizar ajustes en las responsabilidades de cada miembro del equipo.



18. ESTRATEGIA DE TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

Durante el tercer año del proyecto, probablemente en octubre o noviembre de 2003. Se realizará un día de campo para floricultores y para profesionales y técnicos interesados, a fin de dar a conocer los avances logrados en términos de inducción de poliploidía, de establecimiento de protocolos de micropropagación, de aclimatación de materiales y del proceso de cultivo de los mismos.

Adicionalmente, se considera la publicación de al menos dos trabajos en revistas de carácter científico con comité editor y otras dos en revistas de divulgación. Aparte se dará a conocer los alcances del proyecto mediante reportajes de periodistas de revistas del agro (Revista del Campo, Revista del Campo Sureño, etc.)





19. CAPACIDAD DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

19.1. Antecedentes y experiencia del agente postulante y agentes asociados

(Adjuntar en Anexo B el Perfil Institucional y documentación que indique la naturaleza jurídica del agente postulante)

Tanto el agente postulante (Universidad de Talca) como el agente asociado (Universidad Austral de Chile) son instituciones de educación superior con una trayectoria tal que no debiera arrojar dudas sobre la capacidad institucional de llevar a cabo proyectos de esta naturaleza. Los investigadores a cargo, por su parte, todos con estudios de posgrado, poseen la suficiente experiencia para llevar a cabo el proyecto propuesto. La documentación probatoria se anexa a la presente propuesta.

RESUMEN DE LA EXPERIENCIA DE LA UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE EN INVESTIGACION Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AGROPECUARIA

La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile fue creada junto con la fundación de la Universidad en 1954, habiendo desarrollado desde entonces una fructífera labor de docencia, de investigación y de extensión agraria. La Facultad está actualmente compuesta por la Escuela de Agronomía que ha graduado a más de 1200 Ingenieros Agrónomos, la Escuela de Ingeniería en Alimentos de más reciente creación, con varias generaciones de titulados y la Escuela de Graduados, creada en 1982, y que ofrece 4 programas de Magister, 8 programas de Especialización en diversas áreas y el primer Programa de Doctorado en Ciencias Agrarias que se ha comenzado a ofrecer en el país, y que actualmente cuenta con 9 estudiantes matriculados.

El cuerpo académico de la Facultad de Ciencias Agrarias está compuesto por 43 académicos a jornada completa, la mayoría de ellos con estudios de postgrado a nivel de Doctorado o Magister y que en su devenir han desarrollado numerosos proyectos de investigación nacionales e internacionales. Inserta en ella, está el Instituto de Producción y Vegetal, donde se desarrollará parte del presente proyecto. Esta unidad académica cuenta con un cuerpo de 13 profesores en diversas especialidades y para llevar a cabo las actividades de investigación y docencia posee cinco laboratorios bien equipados en el Campus Isla Teja, además de las instalaciones respectivas en la Estación Experimental Santa Rosa, ubicada en las afueras de la ciudad de Valdivia.

La actividad científica desarrollada por medio de proyectos y convenios de investigación, llevada a cabo durante el año 2000 por los miembros del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal en sus respectivas áreas de competencia de indica a continuación:

Proyectos de investigación realizados en el Instituto de Producción y Sanidad Vegetal durante el año 2000

S – 98 – 23: Fitopatógenos asociados a murtilla (*Ugni molinae* Turcz.) y rosa mosqueta (*Rosa Eglanteria* L.)

Investigador principal: Prof. Nancy Andrade S.
Co – investigador: Prof. Peter Seemann F.



S – 98 – 21 Determinación de resistencia a virus: PVX, PVY, PVS, y PLRV en acciones del germoplasma chileno de papas y poblaciones dihaploides de *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* y spp. andígena.

Investigador responsable: Prof. Andrés Contreras M.

S – 97 – 16 Aceites esenciales y ácidos de cadena corta en el control de *Varroa jacobsoni* Oud., que parasita en *Apis mellifera* L.

Investigador principal: Prof. Juan Fuentealba A.

PE F – 99 – 01 Biodisponibilidad temporal de sulfonilureas en suelos agrícolas del sur de Chile

Investigador principal: Prof. Ricardo Fuentes

S – 199914 Transformación genética de papas (*Solanum tuberosum*) mediante *Agrobacterium tumefaciens* para introducir resistencia a bacterias fitopatógenas

Investigadores responsable: rof. Ximena Henzi
Co – investigador: Prof. Andrés Contreras M.

S – 199949 Mejoramiento genético cultural de hortalizas y leguminosas de grano.

Investigador Principal: Prof. Aage Krarup H.

F – 97 – 10 Desamargado de harina de lupino amargo utilizando extracción de fluidos supercríticos.

Investigador responsable: Tec. Académico Nimia Manquián T.

S – 97 – 03 Multiplicación de Gesneriáceas nativas con potencial de cultivo, mediante micropropagación (ampliado a 4 años).

Investigador principal: Prof. Peter Seemann F.

FONDECYT 1990135: Potencialidad productiva de espárrago (*asparagus officinalis* L.) en Chile.

Co – investigador: Prof. Aage Krarup

CIMM 1999 – 2001 Encapsulación of copper based compounds: a new delivery sistem for the development of new fungicides to control soil borne plant pathogens. 1999- 2001.

Investigador principal: Prof. Luigi Ciampi P.
Co – investigador: Prof. Ricardo Fuentes P.

FIA 96 –1 A – 060 Introducción tecnológica y producción de especies bulbosas ornamentales en la XI Región de Aysén. Desarrollado en el Centro Universitario de la Trapananda. Coyhaique. (Finalizado en enero 2000).





Co – investigador: Prof. Peter Seemann F.

Fondo SAG 71 Acciones Sanitarias de prospección, control y vigilancia como bases para un programa de manejo integrado de enfermedades en abejas para incrementar la producción de miel en la región de la Araucanía y de Los Lagos.

Investigador responsable: prof. Miguel Neira C.
Co – investigador: Prof. Nancy Andrade S.
Co – investigador: Tec. Académico Nimia Manquían T.
Colaborador: Tec. Académico Ramón Mansilla T.

Convenios de investigación o desarrollo realizados en 2001.

LEVADURAS COLLICO S.A.: Reciclaje de efluentes de industria de levadura como fertilizante forestal.

Co – investigador: Prof. Laura Böhm S.

BAYER/UACH: Estudio de la eficacia de los preparados Gaucho 70% WS y otros insecticidas cloronicotilinos desinfectantes de semilla para el control de áfidos en remolacha.

Investigador responsable: Prof. Roberto Carrillo LI.

INIA/CRI/REMEHUE: Mc KNIGHT FOUNDATION/UACH. Obtaining Potatoes Less Dependent on Insecticides Through a Type of Broad Spectrum Resistance Mediated by Glandular Trichomes and Leptines.

Investigador responsable: Prof. Roberto Carrillo LI.

FONDEF Uso de probióticos en ostión *Argopecten purpuratus*. Universidad de Antofagasta.

Co – investigador: Prof. Luigi Ciampi P.

FONTEC Detección y control de *Botrytis cinerea* y diseño de un sistema productivo de infección del hongo en un huerto de arándano alto en Gorbea, X Región.

Investigador responsable: Prof. Luigi Ciampi P.

UACH/EAA Cooperación Mutua entre la Universidad Austral de Chile y Estudios Agrarios Ancud.

Investigador responsable: Prof. Andrés Contreras M.

NESTLE/UACH Multiplicación y estudio de variedades de papa con aptitud industrial.

Investigador responsable: Prof. Andrés Contreras M.

UACH/FNDR/BIP/20111608-0. Capacitación a la producción silvoagropecuaria para 10 comunidades indígenas de San Juan de la Costa.

Investigador responsable: Prof. Andrés Contreras M.



UACH/SEMILLAS SZ. Estudio de técnicas de laboratorio y de campo para establecer parámetros de calidad en papa certificada.

Investigador responsable: Prof. Andrés Contreras M.

DOW AGROSCIENCES UACH. Evaluación de la eficiencia de herbicidas port – emergentes en el control de malezas latifoliadas y su selectividad en praderas.

Co – investigador: Prof. Ricardo Fuentes P.

SOC. VETERINARIA TRESVET LTDA/UACH Cuantificación de la Materia Grasa en Músculos de Salmón y Análisis proximal de Alimentos.

Investigador responsable: tec. Académico Nimia Manquián T.
Colaborador: Tec. Académico Ramón Mansilla T.

JUNAEB/UACH Convenio de Raciones servidas. Dirección de Asuntos Estudiantiles.

Investigador colaborador: Tec. Académico Nimia Manquián T.
Colaborador: Tec. Académico Ramón Mansilla T.

Semillas SZ S.A. / UACH 2000 – 079 – E – DID – A Micropropagación y conservación de cultivares comerciales de papa.

Investigador responsable: Prof. Peter Seemann F.
Colaborador: Sra. Sandra Ascencio H.

RESUMEN DE LA EXPERIENCIA DE LA UNIVERSIDAD DE TALCA EN INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AGROPECUARIA:

La universidad de Talca es producto del funcionamiento de los entonces Campus Talca de la Universidad de Chile y la Universidad Técnica del Estado.

Desde entonces se le otorga a esta institución la calidad de Universidad por Decreto Ley N° 36, el 3 de Octubre de 1981. Es así como se desarrollan las carreras de ingeniería Forestal y Agronomía, respaldadas por una fuerte investigación y docencia en el área biológica, generando la Licenciatura en Biología.

La universidad participa de la mayoría de los comités de desarrollo regional y de un sinnúmero de proyectos realizados en conjunto con los organismos privados y gubernamentales del sector silvoagropecuario, tomando en cuenta que en la región se cataloga como eminentemente agrícola. Dentro de esos organismos, se destaca la cooperación en proyectos conjuntos como el INDAP y actualmente con el FIA, secretaria regional ministerial de agricultura, la intendencia regional, etc.

El Cuerpo Docente de la Facultad de Ciencias Agrarias, ha presentado propuestas de proyectos con las cuales a obtenido fondos nacionales públicos provenientes principalmente de los siguientes organismos: del Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP), la Secretaría Regional Ministerial de Agricultura, la Intendencia Regional (F.N.D.R.), la Oficina de Estudios



y Políticas Agrarias (ODEPA), FONDECYT, Ministerio de Agricultura, etc. Del mismo modo, ha obtenido financiamientos privados de proyectos que han permitido desarrollar algunas líneas de investigación y de transferencia tecnológica, de instituciones como Corporación de Desarrollo del Maule, DOLE S.A., Unifruitti, AGREVO, SHELL Chile, SOQUIMICH, Berries La Unión, ABBOTT Chile, Fundación Chile, CHILEVID, entre otros; y de organismos internacionales como FULBRIGHT, Certified Pure Ingredients Inc., U.S. Agency for International Development, etc.

Además, cabe destacar que la universidad de Talca, como parte de las universidades del país, es una de las instituciones de educación superior y de investigación más importante del país, con una de las proporciones más altas de postgraduados, considerando sólo sus 70 académicos-investigadores de jornada completa.

ALGUNOS DE LOS PRINCIPALES PROYECTOS EJECUTADOS O EN EJECUCIÓN POR LA UNIVERSIDAD DE TALCA.

Entre los proyectos en el área de producción agrícola, los de áreas afines a la del presente proyecto y que presentaron mayor relevancia son los siguientes:

1. *“Desarrollo de nuevas oportunidades de negocios en el sector agrícola”.*

Financiamiento : \$83.598.506

Entidad : ODEPA

Duración : 17 meses

2. *“Estrategias de Desarrollo Agrícolas del AREA”*

Financiamiento : \$8.000.000

Entidad : INDAP

Duración : 12 meses

3. *“Desarrollo de Tecnología para mejorar la calidad de la fruta de exportación en pomáceas”*

Financiamiento : \$317.400.000

Entidades : FONDEF, Sector Privado Frutícola y Universidad de Talca

Duración : 48 meses

3. *“Estudio del Potencial productivo y desarrollo agroindustrial y comercialización de los pequeños productores agrícolas del Valle de Péncahue”*

Financiamiento : \$7.000.000

Entidad : INDAP

Duración : 12 meses

4. *“Centro de Gestión Empresarial”*

Financiamiento : \$180.000.000

Entidad : INDAP

Duración : 48 meses

5. *“Desarrollo de tecnologías para mejorar la competitividad de la vitivinicultura de exportación”*

Financiamiento : \$433.000.000

Entidades : FONDEF, CHILEVID, Universidad de Talca

Duración : 48 meses



6. "Desarrollo y Ejecución de un sistema de validación y transferencia de tecnologías de riego, en el sector regado por el Canal Melado, Provincia de Linares, VII Región".

Financiamiento :\$ 237.141.000

Entidad : ODEPA

Duración : 54 meses

Otros estudios, proyectos y asesorías pueden encontrarse detalladamente en las **Memoria Anuales** que publica la universidad, que son de conocimiento público en general, ya que se trata de una institución del estado.

19.2. Instalaciones físicas, administrativas y contables

1. Facilidades de infraestructura y equipamiento importantes para la ejecución del proyecto.

1.1. Universidad de Talca.

Posee instalaciones docentes y de investigación en su Facultad de Ciencias Agrarias y en el Instituto de Biología Vegetal que garantizan el desarrollo del proyecto. Destacan las facilidades de laboratorio con el equipo correspondiente para realizar las determinaciones que se requieren. Posee además, invernaderos en el campus Lircay y en su Estación Experimental Panguilemo, que permiten el cultivo de plantas sin restricción.

Se cuenta con el laboratorio de Análisis de Suelo y Foliar, para los análisis de suelo requeridos, y del Laboratorio de Fitopatología, para determinación de patógenos que ataquen a los cultivos y recomendación de control.

1.2. Universidad Austral de Chile.

Dependiente del Instituto de Producción y Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias, posee un Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales muy bien implementado que permite hacer los estudios de micropropagación y de análisis y transformaciones genéticas que se requieren. Este está equipado con destilador y desionizador de agua, dos autoclaves, dos cámaras de flujo laminar, tres salas de incubación, agitadores orbitales, equipamiento de preparación de medios de cultivo, lupas estereoscópicas y demás implementación necesaria para la micropropagación de plantas y análisis genéticos. Igualmente, se hará uso parcial de las instalaciones del Laboratorio de semillas, incubadoras de diverso tipo para análisis de germinación y equipamiento para análisis de pureza de semillas. Además, se hará uso del invernadero de la Facultad, para el proceso de aclimatación de plántulas.

Como complemento a lo anterior, se cuenta con el Laboratorio de Fitopatología, equipado para hacer determinaciones bacteriológicas, entre otros, y del apoyo del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias. Se cuenta también con los servicios del Laboratorio de Suelos para eventuales análisis químico o físico de sustratos.

