



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA

INFORME TECNICO FINAL

**Unidad Especializada de Propagación In Vitro en Especies
Ornamentales de Difícil Multiplicación
FIA-PI-C-2005-1-A-67**

Coordinador de Proyecto: Eduardo A. Olate Muñoz

OFICINA DE PARTES 2 FIA RECEPCIONADO
Fecha 26 OCT 2009
Hora 1650
Nº Ingreso 824 f

FECHA DE ENTREGA

26 Octubre de 2009

I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código: **FIA-PI-C-2005-1-A-67**
- Nombre del Proyecto:
“Unidad especializada de propagación in vitro en especies ornamentales de difícil multiplicación”
- Región o Regiones de Ejecución (Originalmente planteadas en la propuesta y las efectivas):
V, XII, RM
- Agente Ejecutor: **Pontificia Universidad Católica de Chile**
- Agente(s) Asociado(s) (Originalmente planteados en la propuesta y los efectivos)
 - “Jardín y Vivero Pumahuida Ltda.”
 - “Flores del Fynbos”
 - “Flores de la Patagonia”
- Coordinador del Proyecto: **Eduardo Alejandro Olate Muñoz**
- Costo Total (Programado y Real)
 - Programado:
 - Real:
- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (Programado y Real)
 - Programado:
 - Real:
- Período de Ejecución (Programado y Real)
 - Programado y real

FECHA DE INICIO (dd/mm/aaaa):

03/10/05

FECHA DE TÉRMINO (dd/mm/aaaa):

30/09/09

DURACIÓN (meses)

48

II. RESUMEN EJECUTIVO

La producción de flores en Chile representa un rubro de gran potencial. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta está relacionado con la obtención de material vegetal de alta calidad genética y sanitaria. Esta dificultad radica en parte importante en la baja o nula tasa de propagación que se obtiene en vivero, y también a que en condiciones de cultivo in vitro convencional presentan complejidades dadas por el alto grado de contaminación, producción de compuestos fenólicos y vitrificación, baja de respuesta y tasa de multiplicación, requisitos específicos de temperatura e iluminación. Recogiendo estas necesidades, y con la certeza de impulsar la actividad de investigación aplicada en ornamentales, la Pontificia Universidad Católica de Chile a través del profesor Eduardo Olate y equipo, se planteó el presente proyecto para desarrollar nuevas metodologías de cultivo in vitro para especies vegetales ornamentales de alto impacto económico y difícil de propagación denominado "Unidad especializada de propagación in vitro en especies ornamentales de difícil multiplicación".

Para el logro de este objetivo se definieron cuatro líneas de trabajo: 1) Fase Experimental en la que se desarrollaron protocolos y metodologías no convencionales para las distintas etapas del cultivo in vitro; 2) Fase Modelo Técnico Precomercial, en la que se realizará una integración de los resultados experimentales; 3) Fase Modelo Escalamiento Comercial para implementar en un laboratorio comercial los desarrollos de protocolos, y establecer los parámetros comerciales de operación como volúmenes óptimos, precios, presentaciones, etc., y la generación de un servicio de propagación para los productores; 4) Unidad de transferencia tecnológica, que se encargará de la difusión y desarrollo de servicio, y de estructurar la demanda de los productores para integrarla a esta unidad especializada de propagación in vitro. Para el desarrollo de esta iniciativa se han seleccionado tres grupos de especies modelo debido a su alto interés económico, que están en una etapa inicial de establecimiento comercial en el país (peonías y proteas), o enfrentando problemas de desarrollo serios (alstroemerias). Es en la etapa de establecimiento en la cual más se requiere de material de vegetativo, y justamente en estas especies se han presentado graves dificultades de propagación. Las proteas representan al grupo semileñosas y cubren zonas agroecológicas con pocas alternativas de producción (secano costero central); alstroemerias, son especies de importancia económica mundial cuyo centro de origen es Chile, por lo cual el país presenta ventajas de adaptación productiva que no ha podido utilizar; y peonías, al igual que proteas, cubre una zona agroecológica extrema donde las alternativas productivas intensivas son escasas (extremo sur y patagonia).

Los productores asociados a la iniciativa han estado directamente involucrados en la producción y búsqueda de soluciones a la problemática ornamental, lo cual contribuye a enriquecer el proyecto. Ellos son Cristina Gregorczyk (productora de proteáceas y especies exóticas), Mónica Musalem (productora de alstroemerias y especies nativas) y Consuelo Sáez (Asesor de Productores de Peonías), los cuales en conjunto aportaron M\$32.286. Paralelamente, otros productores como representantes del rubro de viveristas han manifestado su interés en el desarrollo del proyecto: Fernando Toledo (Vivero San Enrique), Carlos Titze (Vivero Las Brujas) y René Cueva (Vivero La Querencia).

Mediante este proyecto y mediante la selección de especies modelo, tanto por su interés comercial, como por su dificultad de ser propagadas de forma tradicional y con problemas en la implementación de tecnologías tradicionales de propagación in vitro, se generó una plataforma de conocimiento y tecnología destinada al fortalecimiento del sector florícola nacional.

El proyecto fue planificado para realizarse en 48 meses, con un costo total de \$183.007.301.- solicitando a FIA un aporte de \$ 99.918.674.

INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

Objetivo General

Desarrollar nuevas metodologías de cultivo intensivo *in vitro* para especies vegetales ornamentales de alto impacto económico y complejas de propagar.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar e implementar técnicas intensivas de cultivo *in vitro* a nivel experimental, que permitan solucionar las dificultades de propagación de productores de especies ornamentales de alto impacto económico, estableciendo con esto, una plataforma base de conocimiento y transferencia tecnológica para la propagación de plantas y el desarrollo de nuevos protocolos.
2. Integrar, adaptar y evaluar las etapas y metodologías no convencionales a un modelo técnico precomercial de propagación *in vitro*.
3. Transferir y difundir los resultados a todos los componentes del sector productivo y red de biotecnología nacional.

2. Metodología del Proyecto:

- **Descripción de la metodología efectivamente utilizada (aunque sea igual a la indicada en la propuesta de proyecto original).**
- **Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad (se pueden incluir como anexos).**

Para el desarrollo de técnicas intensivas de cultivo *in vitro* a nivel experimental, que permitan solucionar las dificultades de propagación de productores de especies ornamentales de alto impacto económico, se escogieron tres grupos de especies o familia botánica que sirvan de modelo para el desarrollo de esta plataforma de conocimiento para la propagación de plantas.

- *Alstroemeria* cv. Sweet Laura (Alstroemeriaceae). La incorporación de técnicas de multiplicación en la producción de *Alstroemeria*, permite elevar el número de plantas obtenidas en un menor tiempo, asegurando una calidad sanitaria y nutricional óptima. Lo anterior, permite a los productores iniciar el cultivo comercial con material vegetal que asegure su establecimiento, esto constituye grandes ventajas debido a que este cultivo es de tipo perenne. Por otra parte, el desarrollo de esta técnica corresponde a una necesidad al momento de iniciar un programa de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades comerciales, tanto a nivel nacional como internacional. No existía un programa de estas características para *Alstroemeria* en nuestro país, por lo que los productores nacionales han debido abastecerse con variedades producidas en otras partes del mundo (principalmente europeas), teniendo que pagar royalties además de los elevados costos de importación que esto conlleva. Este programa será de vital apoyo para el programa de mejoramiento que se inició en esta especie nativa, catalogada dentro de las 10 especies de corte de importancia mundial, y que presenta la mayor diversidad de especies existentes en su centro de origen. Así, aprovechando las ventajas antes mencionadas a partir del año 2006 se dio inicio al primer programa de mejoramiento genético en *Alstroemeria* en Chile, en la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la PUC a cargo del profesor Eduardo Olate Muñoz.
- *Paeonia lactiflora*, Peonía (Paeoniaceae) (3 cultivares): El aumento en la superficie plantada de esta especie, debido al interés del mercado internacional y nacional a acceder a las flores de peonías, hacen necesaria la búsqueda de alternativas tecnológicas que permitan a los productores abastecerse de material vegetativo con la cantidad y calidad necesarias para competir en el mercado.
- *Banksia coccinea*, Protea 'Lady Di', y *Leucospermum* 'High Gold' (Proteaceae): La creciente importancia del cultivo de proteas en nuestro país hace necesario superar la dificultad de propagación que varias especies de la familia poseen. De esta forma se ha seleccionado a *Banksia coccinea* por el aumento en el interés de los productores por aumentar su superficie de cultivo debido a la demanda por las atractivas flores de esta especie, su larga vida en poscosecha y su exclusivo color rojo dentro del género. Protea 'Lady Di' por el atractivo de sus flores, similares a las de Protea 'Pink Ice' pero con cabezas florales mas pequeñas, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista de la exportación ya que es posible aumentar el volumen de exportación sin incrementar el costo de este. Se ha incluido el género *Leucospermum*, debido al atractivo de sus flores las que poseen tonalidades que van desde el naranja al amarillo y floración primaveral la que permite acceder al hemisferio norte con productos de apariencia otoñal en la

época de mayor demanda en esos mercados de destino. El cultivar seleccionado para esto es 'High Gold', debido a su productividad y buenas características como flor de corte.

Los criterios de selección de estos grupos modelos se resume a continuación:

Criterios de Selección	Especies seleccionadas				
	Alstroemeria (<i>Alstroemeria spp.</i>)	Peonía (<i>Paeonia lactiflora</i>)	Proteaceae		
			<i>Banksia coccinea</i>	Protea "Lady Di"	Leucospermum "High Gold"
Estructura de propagación	Rizoma	Raíz Tuberosa	Estacas Semileñosas		
Importancia en el mercado nacional viveristas	Flor de corte: media a alta Planta en maceta: media y en aumento Planta para parques y jardines: baja y en aumento	Alta	Media -Alta		
Importancia en el mercado nacional flores	Flor de corte: media a alta Planta en maceta: media y en aumento Planta para parques y jardines: baja y en aumento	Media a baja	Baja y en aumento		
Importancia en el mercado para exportación	Baja Puede llegar a ser alta para el mercado de genética a partir del Programa de Mejoramiento	Alta	Media y en aumento		

1.1. Preparación y selección de material de propagación: Obtención de material donante en estado nutricional, sanitario y fisiológico óptimo. Las actividades de realizarán para Alstroemeria, Peonía y Proteaceae.

1.1.1. Implementación de invernadero y sombreadero PUC

Contratación de servicios

Limpieza

Habilitación de estructura de aislamiento

Habilitación de riego basal (goteo)

Habilitación de mesones o separación del suelo (caso de plantas madres de mayor envergadura)

Adquisición de sustratos

Mezcla sustrato crecimiento normal (mezcla maceta o similar)

Macetas

Sustrato inerte en caso de geófitas (perlita)

Adquisición de insumos

Fertilizantes solubles

Insecticida amplio espectro

Fungicida y bactericida de amplio espectro

1.1.2. Implementación de cámara de crecimiento ex vitro PUC

Contratación de servicios

Limpieza y despeje de área
 Realización de trabajos
 Inspección de avances
 Verificación de requisitos técnicos
 Operación de prueba
 Arreglos de puesta en marcha
 Operación a régimen

1.1.3. Obtención de Colección de plantas madres como material de multiplicación:

- Selección de plantas madres utilizando pruebas fitopatológicas (indexing) y nutricionales.
- Selección de plantas: adquisición de plantas y/o gestión para su obtención desde Productores Asociados.
- Mantenimiento de una colección de material inicial (CMI).
 Esto corresponde a la mantención de la colección de plantas madres en invernaderos PUC y/o en terreno según sea el caso de cada especie. La necesidad de mantener una colección de material inicial, bajo condiciones de invernadero, surge del requerimiento permanente de material vegetal para iniciar los diversos ensayos durante todo el periodo de desarrollo del proyecto, especialmente para el establecimiento del protocolo de iniciación y multiplicación, con plantas en las mejores condiciones posibles desde el punto de vista sanitario y de la mayor producción de explantes para in vitro posibles. Por otra parte, se requiere mantener plantas de los cultivares seleccionados en terreno (productores asociados), con el fin de realizar un seguimiento comparativo del estado fenológico que las plantas poseen bajo condiciones naturales de producción. Además cabe señalar que tanto peonías como los distintos géneros de proteáceas, poseen requerimientos ambientales que no se encuentran en Santiago, por lo que de esta forma se logra minimizar el riesgo de no contar con material vegetal para los distintos ensayos.

La Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la PUC, cuenta con cuatro nuevas naves de invernaderos, con una superficie de 104 m² cada una, de estructura de metal galvanizado y aluminio con cubierta de policarbonato doble. La colección de material inicial constará de plantas dispuestas en macetas, sobre mesones en altura con el fin de proporcionar un aislamiento de la superficie.

Las plantas mantenidas por los distintos productores constarán de plantas en terreno, con un área de mantención debidamente señalada.

	Especies seleccionadas				
	Alstroemeria (<i>Alstroemeria spp. cv. Sweet Laura</i>)	Peonía (<i>Paeonia lactiflora</i>)	Proteáceas		
			<i>Banksia coccinea</i>	Protea "Lady Di"	Leucospermum "High Gold"
	Rizoma	Raíz Tuberosa	Especies leñosas		
Número de plantas a mantener	20 plantas por año (80 plantas en total)	30 plantas o material equivalente (trozos de raíz tuberosa) de cv. Top Brass. 10 plantas de cultivar 2 (a determinar). 10 plantas de cultivar 3	5 plantas disponibles para coleccionar material de iniciación, durante todo	5 plantas disponibles para coleccionar material de iniciación, durante todo	10 plantas disponibles para coleccionar material de iniciación, durante todo

		(a determinar).	el transcurso del proyecto.	el transcurso del proyecto	el transcurso del proyecto
Fuente de obtención	Vivero Pumahuida	Flores de la Patagonia u otro productor de la Asoc. de Productores de Peonías.	Flores del Fynbos	Flores del Fynbos	Flores del Fynbos
Fecha de establecimiento de CMI	26.12.05	cv. Top Brass 30.04.2006. Cultivares 2 y 3 durante 2007.	26.12.05	26.12.05	26.12.05
Lugar de mantención	10 plantas anuales en invernadero FAIF-UC	cv. Top Brass: 5 plantas en Invernadero o sombreadero FAIF-UC, Cvs. 2 y 3: 2 plantas de cada en Invernadero o sombreadero o cámara de frío FAIF-UC.	Todas las plantas se mantendrán en el predio de Flores del Fynbos	Todas las plantas se mantendrán en el predio de Flores del Fynbos	Todas las plantas se mantendrán en el predio de Flores del Fynbos
Forma específica de mantención	Plantas en maceta, en invernadero o sombreadero según época del año	Plantas FAIF-UC en macetas en invernadero o sombreadero o cámara de frío (rizomas).	Plantas al aire libre, en iguales condiciones que el resto del cultivo, marcadas en terreno para su fácil identificación y monitoreo.	Plantas al aire libre, en iguales condiciones que el resto del cultivo, marcadas en terreno para su fácil identificación y monitoreo.	Plantas al aire libre, en iguales condiciones que el resto del cultivo, marcadas en terreno para su fácil identificación y monitoreo.

1.1.1 Desarrollo de un programa de Limpieza y Sanitización intensiva del germoplasma

1.1.2.1 Análisis fitopatológicos:

- Recolección y preparación de muestras sólo en el caso de presentar problemas de tipo visibles, lo cual no fue necesario dada la buena condición sanitaria de las plantas madres.

1.1.2.2 Análisis nutricionales

- Recolección y toma de muestras
- Toma muestras análisis nutricional plantas invernadero
- Toma muestras análisis nutricional plantas campo
- Búsqueda de parámetros nutricionales, forma y momento fenológico óptimo de análisis.

- Análisis nutricional completo

1.1.2.3 Disminución de carga de patógenos superficiales en plantas madres

- Aplicación de tratamientos fitosanitarios a plantas madres (fungicidas de contacto y sistémicos)

1.1.3 Evaluación del estado fenológico óptimo para iniciación de explante *in vitro*.

- Descripción de los estados fenológicos de la planta.
- Determinación del momento óptimo para la iniciación del explante *in vitro*.

- Utilización de invernadero habilitados para obtener condiciones ambientales que permitan un estado fenológico apropiado para el crecimiento *in vitro*.

1.1.4 Mantenimiento y Manejo de plantas Madres

Durante el periodo de duración del proyecto se realizó mantenimiento de plantas madres, tanto en condiciones de invernadero (PUC), como en terreno (asociación con productores).

1.2. Iniciación del cultivo: Obtención de explantes asépticos *in vitro*.

1.2.1 Selección del explante apropiado para el objetivo de propagación

1.2.1.1 Evaluación de distintos tipos de explantes de iniciación

1.2.1.2 Revisión bibliográfica de cada caso, siguiendo una secuencia priorizada para obtener propagación clonal (brotes axilares, otras partes de la planta para organogénesis directa o indirecta).

1.2.1.3 Brotes aéreos (Protea), Rizomas (Alstroemeria), Raíz tuberosa (Peonía), Otras estructuras.

1.2.2 Establecimiento de un programa de esterilización

Los experimentos serán realizados en forma de secuencial de acuerdo al orden aquí establecido, hasta alcanzar las metas de desinfección propuestas para cada especie.

1.2.2.1 Evaluación de alternativas previas de desinfección previa a la iniciación *in vitro*. Debido a las características de las especies utilizadas (geófitas y leñosas, con alta carga patogénica) y con el fin de obtener explantes con menor carga de patógenos, al momento de iniciar el cultivo *in vitro*, se desarrollaran alternativas de manejo previas, conducentes a una limpieza mas profunda de los explantes.

contacto

- Lavado en agua corriente: distintos tiempos de

- Etanol 75%: dipping de explantes

- Etanol 90%: flameo de explantes

- Baño en solución fungicida y/o bactericida: distintos tiempos de contacto y/o aspersiones

1.2.2.2 Agentes esterilizantes: Distintos tipos, tiempos y concentraciones de NaOCl.

Tiempos y concentraciones

- Experimentos combinados para tipos, tiempos y concentraciones de agentes esterilizantes

- Evaluación de resultados

- Repetición de los mejores tratamientos en combinación con pre-tratamientos.

- Evaluación de resultados

1.2.2.2.2 Uso de antibióticos en el medio de cultivo

- Selección de los mejores tratamientos de 1.2.2.2.1
- Evaluación de antibióticos tales como ácidos orgánicos.

1.2.2.2.3 Secuencia de desinfección

- Desinfección doble
 - Selección de tres lapsos de tiempo, entre desinfecciones

1.2.2.3 Disminución del tamaño del explante

1.2.2.3.1 Evaluación de distintos tamaños de explantes.

- Prueba de diferentes tamaños de explante hasta definir tamaño crítico mínimo
- Tres tamaños de explante en combinación con los 3 mejores tratamientos de la etapa 1.2.2.2 (incluyendo pre-tratamientos químicos).
- Réplica del experimento con los mejores tratamientos.
- Evaluación parcial de resultados.
- Determinar metodología en cada caso (antecedentes bibliográficos)
- Habilitación instrumental: lupa, pinzas y bisturí especiales
- Afinamiento de técnica, pruebas preliminares
- Evaluación de pruebas preliminares y determinar protocolo a seguir

1.2.3 Control de reacciones de hipersensibilidad

Dados los antecedentes de la literatura, es posible que ciertas Proteáceas, presenten este tipo de problema en condiciones in vitro, debido a esto se preverán experimentos, los que serán realizados en la medida que se presente el problema de hipersensibilidad en la especie, siendo estos realizados en forma secuencial de acuerdo al orden aquí establecido, hasta alcanzar un porcentaje de control adecuado.

1.2.3.1 Uso de compuestos quelantes u antioxidantes

- Evaluación de compuestos quelantes y antioxidantes en el medio (carbón activado, PVP, ácido cítrico y ascórbico).
- Evaluación de resultados

1.2.3.2 Evaluación de cultivo en medio líquido

- Diferentes medios de cultivo
- Evaluación de diferentes concentraciones de medios de cultivo (sólido, líquido y puente)
- Evaluación de resultados

1.2.3.3 Evaluación aumento de frecuencia de traspaso

- Determinar frecuencia de traspaso crítica, evaluación de tres frecuencias.
- Evaluación de resultados.
- Replicación de mejores tratamientos preliminares combinados.

1.3. Multiplicación: Aumento de las tasas de crecimiento, proliferación y sobrevivencia del material vegetativo aséptico.

Los experimentos denominados convencionales, serán realizados en forma simultánea para las tres especies en estudio, con el fin de obtener un parámetro comparativo, de efectos de estos tratamientos para las especies mencionadas, del mismo modo, nos permitirán evaluar compuestos utilizados en etapas no convencionales.

- 1.3.1 Implementación de estrategias convencionales de multiplicación *in vitro*
- 1.3.1.1 Reguladores de crecimiento vegetal: Evaluación de distintos tipos y concentraciones
Tipo y concentraciones
- Diseño factorial por cada tipo de RCV: 4 fuentes de RCVs x 3 concentraciones (12 tratamientos)
 - Evaluación de resultados
 - Replicación de los mejores 4 tratamientos.
 - Evaluación de resultados
- 1.3.1.2 Medio basal: Evaluación de distintos tipos y concentraciones
Tipos y concentraciones
- Diseño factorial por cada medio basal: 3 tipos de medio basal x 3 concentraciones (9 tratamientos)
 - Evaluación de resultados
 - Replicación de los mejores 3 tratamientos.
 - Evaluación de resultados

1.3.2 Implementación de estrategias no convencionales de multiplicación *in vitro*

Los experimentos serán realizados sólo para las especies señaladas.

1.3.2.1 Embriogénesis somática (Peonía). La evaluación de la técnica de embriogénesis somática, utilizada como una herramienta para la multiplicación masiva, otorga un parámetro comparativo para el sistema de manejo de temperaturas, también propuesto para Peonía, de este modo, la evaluación de las tasas de multiplicación y proliferación pueden ser mejor ajustadas al momento de establecer un modelo masivo de multiplicación.

- 1.3.2.1.1 Establecimiento de explantes *in vitro*
- Revisión literatura
 - Selección de explantes
 - Desinfección de explantes

1.3.2.2.2 Inducción de Callo

- Evaluación de dos tipos de explantes embriogénicos
- Evaluación de dos tipos de explantes somáticos
- Evaluación de 2 tipos y 3 concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (auxinas)
- Cultivo utilizando fotoperíodo
- Cultivo en condiciones de oscuridad
- Evaluación de resultados

1.3.2.2.3. Formación de embriones somáticos

- Evaluación del desarrollo embriogénico en medio sin RCVs y con RCVs en diferentes concentraciones
- Evaluación de distintas concentraciones de carbohidratos y aminoácidos
- Cultivo en condiciones de oscuridad

1.3.2.2.4 Germinación de embriones

- Uso de reguladores de crecimiento vegetal (GA_3)
- Manejo de la intensidad de luz
- Manejo del fotoperíodo
- Condiciones de temperatura y deshidratación

1.3.2.2 Inmersión temporal (utilización de brotes formados en la etapa anterior). (Alstroemeria). Esta técnica ha sido seleccionada para Alstroemeria, debido a su adecuación a las condiciones de cultivo líquido, de acuerdo a esto, Alstroemeria, debiera presentar mejores resultados en la implementación de ésta metodología. Por otra parte las peonías, se someterán a este sistema dada la necesidad creciente de aumentar en forma rápida la disponibilidad de material para el país, especialmente considerando que existe una gran diversidad varietal y adaptativa, lo que impide que una, o algunas pocas variedades, resuelvan el problema de material inicial para los productores.

1.3.2.3.1 Implementación de SIT

- Diseño de equipo
- Accesorio de Ing. Electrónico
- Puesta en marcha de equipo

1.3.2.3.2 Ajuste de parámetros de SIT

- Frecuencia de inmersión (3-6-12-18 o 24 horas)
- Tiempo de inmersión (1-3-5 minutos)
- Volúmenes de inmersión (250-500-750 mL)
- Tamaño de frasco (1 – 2 – 10 – 20 L)
- Número de explantes (5-25-100)

1.3.2.3.3. Sub-etapa de elongación

- Uso de diferentes concentraciones de AG_3 (0,1 – 0,5 - 1,0 $mg \cdot L^{-1}$)

1.4. Pretransplante o Enraizamiento: Los tratamientos, tanto de inducción de raíces como de formación de órganos de reserva, se realizarán de acuerdo a cada especie, de esta

forma, se fomentará el desarrollo de estructuras de reserva y la inducción de raíces adventicias, esta última será finalizada durante aclimatación. Para el caso de las Proteáceas solo se llevarán a cabo los experimentos conducentes a la generación de raíces adventicias.

1.4.1 Formación de órganos de reserva en especies geófitas

1.4.1.1 Técnicas no convencionales de producción de órganos de reserva *in vitro*

Los experimentos serán realizados en forma paralela, con el fin de encontrar la mejor metodología que permita alcanzar un aumento en el calibre en el menor tiempo posible hasta lograr las metas de formación de órganos de reserva propuestas para cada especie.

1.4.1.1.1 Medio basal: evaluación de distintos medios y sustratos

Tipos y concentraciones

- Diseño factorial por cada medio basal: 3 tipos de medio basal x 3 concentraciones (9 tratamientos)
- Evaluación de resultados
- Replicación de los mejores 3 tratamientos.
- Evaluación de resultados

1.4.1.1.2 Hormonas no convencionales: evaluación de distintos tipos y concentraciones en el medio basal

Tipo y concentraciones

- Diseño factorial por cada tipo de regulador de crecimiento vegetal: 4 fuentes de regulador de crecimiento vegetal x 3 concentraciones (12 tratamientos)
- Evaluación de resultados
- Replicación de los mejores 4 tratamientos.
- Evaluación de resultados

1.4.2 Formación de raíces adventicias

Los experimentos serán realizados con el fin de alcanzar las metas de enraizamiento propuestas para cada especie, en el menor tiempo posible.

1.4.2.1 Medios y condiciones de cultivo para la inducción de raíces adventicias

1.4.2.1.1 Reguladores de crecimiento vegetal: distintos fuentes y concentraciones.

Tipo y concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal

- Diseño factorial: 2 fuentes de auxina x 3 concentraciones (6 tratamientos)
- Evaluación de resultados.
- Replicación de los mejores 3 tratamientos.
- Evaluación de resultados.

1.5. Aclimatación: Transferencia y establecimiento de las plantas a condiciones ex vitro.

Los experimentos serán realizados en forma simultánea para las especies en estudio con el fin de maximizar las tasas de aclimatación de las especies en estudio.

1.5.1 Estrategia de control ambiental para maximizar el proceso de aclimatación de plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

1.5.1.1 Evaluación de sustratos

1.5.1.2 Evaluación de contenedores

1.5.1.3 Evaluación de control ambiental

Cuatro métodos de aclimatación variando el tamaño del contenedor y lugar de aclimatación.

Evaluación de resultados.

- Sistema 1: contenedor pequeño en cámara de crecimiento *ex vitro*
- Sistema 2: contenedor grande (bandeja) en cámara de crecimiento *ex vitro*
- Sistema 3: contenedor grande (bandeja o celdillas) en sistema multinivel en invernadero sur.
- Sistema 4: en bandejas de celdillas en mesón con microaspersión (mist)
- Evaluación en base a sobrevivencia y presencia de patógenos.

1.5.2 Aplicación de diferentes tratamientos fitosanitarios y mejoradores del proceso de aclimatación.

- Tratamientos fitosanitarios según evaluación 1.5.1
- Replica de mejores tratamientos 1.5.1 en 3 tratamientos con 2 frecuencias de aplicación.
- Tratamientos mejoradores del proceso de aclimatación

1.6 Análisis de nuevas opciones (especies y/o cultivares) potenciales de ingresar a la unidad de multiplicación. Según los resultados preliminares obtenidos en esta etapa experimental, se analizará la opción de incluir dentro de los plazos del proyecto, nuevas especies y/o cultivares que puedan ser interesantes para el mercado. Este análisis se realizará en conjunto con otros agentes del mercado interesados en el desarrollo de esta Unidad.

2. Fase Modelo Técnico Pre comercial:

Integrar, adaptar y evaluar las etapas y metodologías no convencionales a un modelo técnico precomercial de propagación *in vitro*.

En esta fase los asociados continuarán siendo proveedores de material vegetal para los ensayos, con el fin de validar y adecuar los protocolos a mayor escala, además participarán de las evaluaciones tanto a nivel de volúmenes de manejo de plantas como de la selección de los productos a ofrecer en el mercado, en conjunto se desea. Por otra parte, los productores asociados participarán de manera activa en la recepción de plantas aclimatadas, para así evaluar en conjunto con ellos lo referente al manejo y recepción por parte de ellos del producto final.

2.1 Desarrollo de definición estratégica del modelo pre-comercial

Se hará un desarrollo inicial de un eventual modelo de negocios pre-comercial a través de un diagnóstico preliminar de las capacidades del equipo de trabajo, del nivel

institucional, de la situación nacional a nivel tecnológico y de las condiciones imperantes del mercado de los productos intermedios y finales.

2.2. Prospección de demanda a nivel nacional de productos potencialmente desarrollables por la Unidad

Esta prospección a nivel nacional se refiere a la recopilación de información secundaria del sector productivo potencialmente demandador de esta tecnología. Se intentará pesquisar los intereses de laboratorios del sector que estuviesen interesados en adoptar este tipo de tecnologías, así como viveristas o propagadores de especies complejas.

2.3. Desarrollo de imagen técnica para sitio Web de difusión

Este desarrollo de imagen tiene como objetivo lograr un adecuado posicionamiento del laboratorio como unidad de servicios de desarrollo en el medio. La idea principal es que a través de un sitio web se genere una activa difusión de los logros y capacidades logradas por esta unidad, de modo de ir autogenerando la demanda por nuevas iniciativas o servicios para el sector privado. Esta imagen debe transmitir los conceptos esenciales y diferenciadores que generen impacto en los grupos de interés de esta iniciativa.

2.4 Ajustes teóricos por desarrollo a mayor escala

2.4.1. Ajuste de selección de material de propagación

Los ajustes corresponden a un aumento en la tasa de producción para llevar el sistema de protocolos desarrollados a un nivel que permita la sustentación económica de la unidad. Es decir, se debiera pasar del óptimo técnico logrado al óptimo económico en una escala de producción mayor. Esto se hará inicialmente a nivel teórico, para después implementar los puntos críticos en relación a su aumento de escala, en las mismas dependencias.

2.4.2. Ajuste de iniciación del cultivo

Determinación de requisitos mínimos del material para entrar a proceso. Por ejemplo, estándar sanitario de ingreso.

Estandarización de material inicial recibido de acuerdo a parámetros de calidad y condición de llegada.

Condiciones de almacenamiento o procesamiento secuencial de material de colección de plantas iniciales al trabajar con mayor cantidad de material vegetal.

2.4.3. Ajuste de multiplicación

Optimización del uso de mano de obra a través de la modificación de equipamiento e infraestructura y flujos de operación. Esto consistirá en la maximización de la productividad de la mano de obra en función de la determinación y cálculo de la modificación de la integración de equipos e infraestructura.

Desarrollo de un sistema de programación de tareas que permita complementar de la mejor manera posible el uso de recursos productivos con la multiplicación de diferentes especies en el tiempo.

Especialización en la utilización de recursos. Identificación de distribución y asignación de tareas en función de días de trabajo más convenientes o estratificación del flujo de producción de acuerdo a la relación volumen de producción esperado y capacidad de los recursos para operar en forma continua. Definición de capacidad de personal de

alternar roles o labores según favorezca la eficiencia general prevista o determinación de roles exclusivos.

Diseño, manejo y minimización de fallas.

Optimización de recursos críticos y de alta incidencia en costos de operación.

2.4.4. Ajuste de pretransplante

Optimización de infraestructura y uso de la mano de obra. En general, actividades muy similares a la etapa de multiplicación.

2.4.5. Ajuste de aclimatación

En esta etapa se deben probar sistemas significativamente diferentes a las condiciones de laboratorio. Para esto se realizarán evaluaciones a nivel de invernaderos y/o sombreaderos, tanto en la PUC como directamente con los productores.

Evaluar la capacidad real de transferencia de la tecnología de aclimatación a los productores, directamente en sus condiciones productivas. Esto con el objetivo de mejorar los resultados de establecimiento del cultivo y abaratar los costos de producción de las plantas in Vitro, al vender plantas no aclimatadas.

2.5 Determinación de infraestructura y equipamiento requerido

Esta determinación se refiere a los cambios requeridos para aumentar la escala de producción. Se pasará de una escala de laboratorio a una escala que permitirá reproducir más masivamente las plantas indicadas.

2.5.1 Adaptación de laboratorio y cámaras, e invernaderos

Adaptación de cámaras:

- Subdivisión de cámara de crecimiento 1: La FAIF-PUC cuenta con un Laboratorio de Biotecnología, el que en la actualidad dispone de dos cámaras de crecimiento, estando una destinada en su totalidad al desarrollo de investigación por parte del profesor Eduardo Olate M., esta cámara requiere ser cerrada para lograr un mayor aislamiento y así reducir los efectos del paso continuo de gente (ver esquema adjunto)

- Implementación de cámara de crecimiento 2: La FAIF-PUC cuenta con una segunda cámara aislada, la que se destinará como cámara de crecimiento, para esto, se requiere la instalación de luces, estantería y un equipo de control de temperatura.

2.5.2 Adquisición de insumos

2.6 Implementación precomercial de sistema de propagación:

2.6.1 Integración de etapas: preparación, iniciación, pretrasplante y aclimatación".

Esta etapa tiene como objetivo integrar todas las etapas realizadas a la fecha en una sola unidad de producción masiva y continua en el tiempo. Esto dado que al establecer los protocolos, no se trabaja necesariamente con cada una de las etapas de la multiplicación en una secuencia completa.

2.6.2 Laboratorio

2.6.3 Cámara de crecimiento

2.6.4 Invernadero

2.7. Validación operativa del sistema integrado

Esta etapa se refiere a la puesta en marcha y operación del punto 2.8 anterior, funcionando a régimen. Esto con el objetivo de realizar las determinaciones de las próximas etapas en condiciones reales, especialmente referido a los factores críticos de éxito que cambian durante el escalamiento a nivel piloto o pre-comercial.

2.8 Evaluación de volúmenes, costos y tiempos de obtención de productos comercializables

En esta etapa se cuantifica el uso de recursos humanos y aspectos de tiempo de operación y ciclos de producción para determinar luego la eficiencia de operación y costos.

2.9 Rediseño de protocolos en base a resultados precomerciales

2.10 Análisis requisitos SAG

2.11 Desarrollo Unidad de Servicios Desarrollo protocolos multiplicación

2.11.1.1 Definición de productos pre-comerciales (Protocolo para Plantas in vitro, protocolo para plantas aclimatadas ex vitro, servicio de desarrollo de nuevos protocolos)

2.11.1.2 Definición ámbito del servicio

2.11.1.3 Política de confidencialidad

2.11.1.4 Estrategia de protección de resultados

2.11.1.5 Posicionamiento en el mercado tecnológico

2.11.1.6 Estrategia para el desarrollo de nuevos protocolos y/o servicios

2.11.1.7 Implementación y evaluación imagen técnica-corporativa

2.11.1.8 Desarrollo de plan de negocios para mantención de competitividad técnica.

Este plan de negocios básico que se desarrollará permitirá delinear la futura operación de la unidad, de modo que esta sea sustentable en el tiempo en términos de poder seguir desarrollando nuevos protocolos que sean transferibles al sector de flores y ornamentales del país. Este plan de negocios comprende los elementos habituales de cualquier plan de este tipo, con la consideración que requiere el desarrollo de herramientas biotecnológicas para un sector de amplio y dinámico crecimiento. Además de incluir los aspectos relacionados con el Mercado, incluirá un análisis FODA, de Fuerzas de Porter, análisis, análisis financiero y de riesgos, un plan de puesta en marcha y una estrategia de desarrollo.

3. Extensión o difusión:

Transferir y difundir los resultados a todos los componentes del sector productivo y red de biotecnología nacional.

3.1. Preparación y realización de Charla y taller de difusión anual

- Presentación formal
- Coffee break
- Visita a laboratorio y muestra de avances de experimentos
- Apuntes de apoyo de la actividad

- 3.2. Preparación de Sitio Web de difusión
 - Diseño gráfico y programación del sitio con imagen técnico-corporativa de la Unidad
 - Habilitación de dominio en servidor PUC
 - Actualización interna de contenidos (avance del proyecto, galería fotográfica, links relacionados, noticias, etc.)
- 4.3. Preparación y Asistencia a congresos nacionales de distinta índole.
- 4.4. Preparación y Asistencia a congresos internacionales (incluido como actividad pero se considera la postulación a otro tipo de fondo para su realización).
- 4.5. Preparación y Asistencia a simposios o convenciones en el área de la micropropagación tanto en el país como en el extranjero (incluido como actividad pero se considera la postulación a otro tipo de fondo para su realización).
- 4.6. Preparación de Publicaciones:
 - Extensión
 - Científica
- 4.7. Preparación y realización de Seminario cierre Proyecto
 - Presentación formal
 - Apuntes o Libro resumen del Proyecto

- **Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.**

Debido a las dificultades técnicas que se presentaron en el aspecto metodológico, que se resumen en el punto siguiente, la metodología original tuvo que ser modificada, principalmente eliminando algunos puntos que requerían de la solución de una etapa previa. Sin poder resolver una etapa inicial de propagación in vitro, difícilmente es posible avanzar en la siguiente. Sin embargo, lo anterior no es posible de conocer hasta enfrentarse a dichas dificultades, ya que no se podía prever por la falta de antecedentes previos tanto de literatura como de condiciones particulares de nuestro laboratorio. Esto significó que en algunos puntos más iniciales de las investigaciones, se ahondará más, extendiéndose en el tiempo y en la cantidad de trabajos previamente planificados para esa etapa en particular. La ventaja más relevante de esta modificación, es que se contó con la posibilidad de generar nuevas hipótesis de trabajo, mejorar la calidad de análisis de nuestro equipo profesional, y perfeccionar la estrategia de trabajo en general, para enfrentar especies de difícil multiplicación clonal, lo cual es el objetivo principal del proyecto.

- **Principales problemas metodológicos enfrentados.**

En cada grupo de especies los problemas metodológicos fueron diferentes, por lo cual a continuación se detallan para cada caso.

Alstroemeria

1. Aumento de la tasa de multiplicación in vitro. Esta fue un constante desafío, de tal forma de lograr niveles de multiplicación altas en corto tiempo, y que fueran, por lo tanto, competitivas con la multiplicación tradicional. La amplia base genética que presenta los cultivares y sus diferencias propias, hacen que los protocolos de multiplicación in vitro, sean específicos, y que deban variarse cuando se trata de ampliar el trabajo a nuevos cultivares o a especies nativas.
2. Contaminación por bacterias endógenas. La especie, al igual que en otros casos de geófitas y leñosas, presenta un tipo de colonización bacteriana interna que se mantiene sin provocar daños de tipo patológico. Sin embargo, en condiciones in vitro, estas bacterias se expresan con mayor intensidad, dada la condición ambiental favorable que enfrentan. Lo anterior puede provocar o no un efecto detrimental sobre los explantes de Alstroemeria en condiciones in vitro, lo cual en algunos casos, provocó la pérdida sucesiva de cultivos, y la generación de una nueva línea de investigación en el proyecto, sobretodo en el área del Sistema de Inmersión Temporal (SIT).
3. Enraizamiento y aclimatación. Aunque fue uno de los puntos previstos en el proyecto original como posibles riesgos, la falta de enraizamiento en algunas situaciones y cultivares, provocó un retraso importante en el resto de la metodología propuesta, incluyendo además pérdidas importantes en la aclimatación. Esto provocó que se analizara con mayor detalle las formas tradicionales de salida a condición ex vitro, generándose conocimiento muy relevante, tales como limitar el período de multiplicación y exposición a citoquininas, mayor importancia del control ambiental de aclimatación que el previsto (temperatura y humedad relativa), y la planificación de las épocas de salida a condiciones ex vitro durante las épocas de menor temperatura.

Peonía

1. Mantenimiento de plantas madres. Aun cuando fue un problema menor, la lejanía con la fuente de plantas madres para su uso como fuente de explantes, requirió de un esfuerzo logístico mayor. Lo anterior fue subsanado con la mantención de plantas en estado de receso en cámaras de frío en vez de mantenerlas en invernadero, como era la idea inicial. El resultado de lo anterior fue una modificación interesante y apropiada para esta especie.
2. Contaminación de explantes iniciales. Fue la especie que presentó los mayores problemas de limpieza aséptica superficial. No respondió tan eficientemente como Alstroemeria al cultivo en sustrato inerte (perlita), de forma de originar yemas subterráneas con menor carga de patógenos. Las características morfológicas que presentan los rizomas de peonía, mucho más rugosos, y el efecto de la edad de las plantas, no era un hecho que nuestro equipo manejara previamente, y definitivamente es un dato que se debe tener en cuenta al momento de replicar estos protocolos.
3. Selección de los explantes más apropiados. La fenología natural de peonía hace que el tipo de yemas que se presentan sobre distintos puntos del rizoma, en distintas épocas del año, sean de tipo vegetativas (apropiadas) o reproductivas (menos apropiadas). Esto se debió correlacionar con el punto anterior, ya que los rizomas de esta especie, se mantuvieron casi constantemente en condiciones de cámara de frío (5 a 10 °C) y se debió asegurar que la producción de estas yemas fuera la apropiada en el momento que se requerían.

4. Etapas intermedias de embriogénesis. Las primeras etapas de inducción de callo y embriogénesis somática no presentaron grandes problemas. Sin embargo, fue casi imposible lograr una diferenciación a estado embrionario inicial, lo cual provocó la generación de nuevas alternativas de ensayos, hipótesis y trabajos adicionales, y análisis como los de tipo histológico, los que nos llevaron a etapas finales de los plazos del proyecto. No obstante lo anterior, se logró generar un conocimiento inédito para nuestro equipo en los aspectos relevantes de esta técnica avanzada de propagación clonal in vitro, que no teníamos previamente.

Proteáceas

1. Oxidación de compuestos fenólicos (*browning*). Este problema se presentó con mayor importancia en el género *Protea*, el cual en un inicio, sólo alcanzaba una sobrevivencia en condiciones in vitro de menos de 12 hrs. También se verificó en *Banksia*, y en menor medida en el género *Leucospermum*. Lo anterior provocó la generación de alternativas de manejo de plantas madres con el fin de lograr brotación de tipo juvenil y así obtener los explantes necesarios. También la definición de un sistema de transporte de los explantes en condiciones muy hidratadas, lo cual se verificó es vital para la sobrevivencia de los explantes de estas especies, en las primeras etapas in vitro, aun cuando se trata de especies que poseen sistemas morfológicos de adaptación a bajos contenidos de humedad.
2. Brotación lateral y proliferación. En todas las especies, pero en particular en *Banksia*, la brotación lateral fue una limitante para la proliferación de los explantes en condiciones in vitro. Lo anterior provocó la generación de un estudio más acabado de las últimas alternativas de reguladores de crecimiento vegetal (RCVs) disponibles y que pudieran servir en estos casos. El uso de tiadiazurón (TDZ) fue un hito importante en nuestro proyecto, lo que permitió avanzar significativamente a las etapas posteriores de multiplicación, sobretodo en *Leucospermum*.
3. Enraizamiento. Sólo en el caso de *Leucospermum* se pudo lograr a esta fase de cultivo, la cual no se logró alcanzar del todo. Lo anterior también generó nuevas hipótesis, consultas con especialistas extranjeros con experiencia en propagación tradicional, y es posible que se logre este objetivo en el corto plazo, fuera de los plazos del proyecto. La mayor contribución en este aspecto, fue el uso de niveles diferentes de auxinas y el manejo ambiental (temperatura y oscurecimiento) el que presenta auspiciosos resultados.

3. Actividades del Proyecto:

- **Carta Gantt o cuadro de actividades comparativos entre la programación planteada en la propuesta original y la real.**
- **Razones que explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas.**

Las principales razones por las cuales se explican las discrepancias entre las actividades programadas y las efectivamente realizadas, se pueden resumir en las dificultades enfrentadas a nivel metodológico, intrínsecas a actividades de investigación, en las cuales el conocimiento y el desarrollo de alternativas metodológicas, requieren de un proceso flexible, que no es por lo tanto previsible en sus detalles. No obstante lo anterior, las líneas de acción generales que se diseñaron y postularon en el proyecto original fueron abordadas en su totalidad, tanto a nivel de grupo de especies, como de problemas a ser abordados y resultados generales esperados.

El detalle de cada una de las actividades que se realizaron en la forma programada se explican en el cuadro de carta Gantt que se detalla a continuación.

Project: Proy FIA microp UCmodif3 de
Date: Mon 26/10/09

Critical



Critical Split



Critical Progress



Task



Split



Task Progress



Baseline



Baseline Split



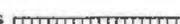
Baseline Milestone



Milestone



Summary Progress



Summary



Project Summary



External Tasks



External Milestone



Deadline



4. Resultados del Proyecto:

- Descripción detallada de los principales resultados del proyecto, incluyendo su análisis y discusión utilizando gráficos, tablas, esquemas, figuras u otros, que permitan poder visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones relevantes del desarrollo del proyecto.

Alstroemeria

Iniciación a partir de rizomas para la multiplicación clonal de Alstroemeria.

El objetivo de este conjunto de experimentos fue la modificar el protocolo de esterilización descrito por Pedersen y Brandt, disminuyendo el número de cortes al ápice del rizoma como método de obtención de explante de iniciación. El número de cortes efectuados no influyeron en los resultados de desinfección, pero sí el tamaño de la yema pareció ser un factor determinante en la brotación.

Frecuencia de desinfección de ápice de rizoma según número de cortes que se realizaron a los explantes de *Alstroemeria spp.* Tiempo de cultivo de 8 semanas.

	Sobrevivencia (%)	Contaminación por Bacterias (%)	Contaminación por Hongos (%)
1 Corte	80% a ⁽¹⁾	20%	0%
2 Cortes	50% a	40%	10%

(1)Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P= 0,05$).

Como se observa en el cuadro anterior, no existen diferencias significativas entre realizar uno o dos cortes a los ápices del rizoma de *Alstroemeria spp.* Las contaminaciones que se observaron fueron principalmente por colonias de bacterias. Las colonias de hongos eran blanco-rosado algodonosas y nacían desde el explante. La contaminación por bacterias sólo se pudo observar después que los explantes fueron traspasados desde los tubos de ensayos a frascos en la semana 6 - 7. Las colonias de bacterias nacieron a partir del explante y de color blanco y amarillo.

Resultados de desinfección alcanzados por los explantes de los cultivares de *Alstroemena* cv. Freedom y cv Sweet Laura, al cumplir 11 semanas desde su iniciación.

	A. cv. Freedom	A. cv. Sweet Laura
Explantos limpios y vivos (%)	71 a ⁽¹⁾	71 a
Yemas apicales limpias (%)	67 b	70 b
Yemas laterales limpias (%)	80 c	75 c

Los dos cultivares utilizados no presentaron diferencias significativas en los niveles de sobrevivencia al ser sometidos al protocolo modificado de Pedersen & Brandt. Todas las yemas de ambos medios respondieron al medio aumentado de tamaño y desarrollando un brote y/o rizoma. Las yemas laterales difícilmente llegaron a formar rizoma en ambos cultivares, por lo general este tipo de yema sólo formó el tallo con hojas o simplemente se estancaban hasta marchitarse.

Sólo las yemas del cultivar Freedom se contaminaron con patógenos, principalmente bacterias. Las colonias se originaban en el explante. Las yemas del cultivar Sweet Laura no presentaron contaminaciones por patógenos, pero algunas yemas murieron por causa de la desinfección.

Resultado de sobrevivencia de *Alstroemeria* cv Sweet Laura a tres niveles de NaOCl, al cumplir 5 semanas *in vitro*.

	Sobrevivencia (%)
Nivel 1 (bajo)	73 a
Nivel 2 (medio)	47 b ⁽¹⁾
Nivel 3 (alto)	33 b

(1)Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P= 0,05$).

Frente altas concentraciones de NaOCl, las yemas apicales y laterales presentaron una oxidación de color café del área externa de la yema que retardó su crecimiento en varias semanas, que incluso les causó la muerte.

La respuesta fue progresiva a medida que se aumentó la concentración de NaOCl. Como muestra el cuadro anterior se puede apreciar que hubo diferencias significativas entre el tratamiento mas bajo y los niveles intermedio y alto. No hubo contaminaciones por patógenos, así que las muertes solo se debieron a la toxicidad del desinfectante.

Resultado a los diferentes niveles de NaOCl en las yemas apicales y laterales del rizoma de *Alstroemeria* cv. Sweet Laura, al cumplir cinco semanas en cultivo *in vitro*.

	Sobrevivencia	
	Yema apical (%)	Yema lateral (%)
Nivel 1 (bajo)	75 a	70 d
Nivel 2 (medio)	40 b ⁽¹⁾	60 d
Nivel 3 (alto)	35 b	30 d

(1)Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P= 0,05$).

Como se puede ver en el cuadro anterior las yemas laterales no presentaron diferencias significativas al ser expuestas a los tres niveles de desinfección.

Comparación entre los cultivares Freedom, Liberty y Sweet Laura al ser sometidos al tratamiento inicial de desinfección.

Cultivar	Explantos vivos (%)	Contaminación Bacterias (%)	Contaminación Hongos (%)
<i>Alstroemeria</i> cv. Sweet Laura	100a	0	0
<i>Alstroemeria</i> cv. Liberty	69 b ⁽¹⁾	24	7
<i>Alstroemeria</i> cv. Freedom	57 b	28	14

(1)Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P= 0,05$).

Se determinó que existe diferencia entre los cultivares para el efecto de los tratamientos a plantas madre en la iniciación *in vitro*. Los cultivares Liberty y Freedom respondieron con bajas niveles de contaminación *in vitro* cuando las plantas madre fueron tratadas previamente, pero cv. Sweet Laura no presentó diferencia significativa.

Organogénesis directa in vitro de *Alstroemeria* cv. "Freedom" y cv. "Liberty" a partir de botón floral.

Frecuencia de desinfección de explantes de botón floral inmaduro de *Alstroemeria* cv. Freedom y A. cv. Liberty iniciados *in vitro*.

Cultivar	Explantes (N°)	Explantes Contaminados		Explantes Etiolados		Explantes Necrosados	
		(N°)	(%)	(N°)	(%)	(N°)	(%)
Freedom	15	4	26,7	8	53,3	3	20,0
Liberty	15	3	20,0	5	33,3	7	46,7

Al cabo de dos semanas de cultivo la frecuencia de desinfección de los brotes florales fue de 73.3% y 80.0% para Freedom y Liberty, respectivamente. La contaminación fue de tipo exógeno. Aparentemente, los botones florales inmaduros del cultivar Liberty son más sensibles al corte con bisturí y a la acción del cloro como agente de desinfección.

Frecuencia de desinfección de la iniciación de explantes de botón floral inmaduro de 15 mm de diámetro de *Alstroemeria* cv. Freedom y A. cv. Liberty, sin haber sido cortados con bisturí.

Botón floral inmaduro	Explantes (N°)	Explantes contaminados		Explantes etiolados		Muertos	
		(N°)	(%)	(N°)	(%)	(N°)	(%)
Freedom	12	7	58,3	4	33,3	1	8,3
Liberty	12	8	66,7	2	16,7	2	16,7

Al cabo de dos semanas de cultivo la frecuencia de desinfección fue de 41.7% y 33.3% para Freedom y Liberty, respectivamente. La contaminación fue de tipo exógeno lo que indicaría que el tamaño de explante es excesivo y provoca una mayor contaminación.

Frecuencia de desinfección de la iniciación de explantes de botón floral inmaduro de 5 mm de diámetro de *Alstroemeria* cv Freedom y A. Liberty.

Cultivar	Frecuencia de desinfección			
	Explante iniciados (N°)	Explantes desinfectados		Explantes con brotes (N°)
		(N°)	(%)	
Freedom	10	3	30	0
Liberty	10	2	20	1

Ambos cultivares presentaron una frecuencia de desinfección de un 50%. Freedom presentó 20% de contaminación endógena y 30% de exógena, de igual forma Liberty presentó un 10% y un 40%, respectivamente.

Validación y perfeccionamiento técnicas iniciación in vitro a partir de brotes florales.

Tratamientos con diferentes dosis de bencil amino purina (BAP).

- T1 control (0 mg L⁻¹ BAP)
- T2 (3 mg L⁻¹ BAP)
- T3 (6 mg L⁻¹ BAP)

Los resultados obtenidos fueron analizados separadamente por cultivar y luego entre cultivares para facilitar su entendimiento.

Alstroemeria cv. Liberty

Luego de una semana de cultivo *in vitro*, el tratamiento T1, en el cual se usó como explante un botón floral individual (A1), el 66,7% de los explantes murió y el 33,3% presentó etiolación, por lo que se dio por terminada la evaluación de este tratamiento. Como muestra el cuadro siguiente, de los tres tratamientos probados (T1, T2 y T3), sólo en T3 se obtuvo resultados en cuanto a diferenciación. De un total de 10 ápices iniciados, el 10% presentó diferenciación. Se realizó una ensayo más (T3R) el cual es una repetición del mejor tratamiento, en este caso T3, sin obtener resultados exitosos en cuanto a diferenciación de los ápices. Al utilizar distintos tamaños de ápices florales inmaduros del cultivar Liberty no existen diferencias estadísticas significativas.

Resultado de los distintos tratamientos en la iniciación de ápices florales inmaduros de A. cv. Freedom.

Tratamientos	Ápices (Nº)	Muertos (%)	Etiolados (%)	Diferenciados (%)
T1	15	46,7 a	53,3 a	0,0 a ⁽¹⁾
T2	12	66,7 a	33,3 a	0,0 a
T3	10	60,0 ab	30,0 a	10,0 ab
T3R	10	60,0 ab	0,0 b	40,0 c

(1) Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones (P = 0,05).

Alstroemeria cv. Freedom

En el siguiente cuadro se muestran los resultados alcanzados por los distintos tratamientos. En T1, luego de una semana de cultivo, el 46,7 % murió y el 53,3% se etioló por lo que dio por terminada la evaluación. En los tratamientos en los cuales el explante utilizado poseía mayor tamaño (T1 y T2) no se logró diferenciación. Sin embargo, en T3 sólo se alcanzó un 10% de diferenciación de los ápices. No se observó diferencia estadística significativa entre estos tres tratamientos (T1, T2 y T3). En el ensayo de repetición (T3R) se obtuvo un 40% de diferenciación, un 0% de etiolación y un 60% de muerte. Entre T1, T2 y T3 no existen diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, al realizar un cuarto ensayo, repitiendo el mejor tratamiento y hacer el análisis estadístico este se presentó diferencias significativas.

Resultados de la comparación entre los 3 cultivares utilizados en el Experimento 1.

Tratamientos	Cultivar	Ápices (Nº)	Muertos (%)	Etiolados (%)	Diferenciados (%)
T1	Freedom	15	47	53	0 a ⁽¹⁾
	Liberty	15	67	33	0 a
T2	Freedom	12	67	33	0 a
	Liberty	12	83	17	0 a
T3	Freedom	10	60	30	10 ab
	Liberty	10	80	10	10 a
T3R (validación)	Freedom	10	60	0	40 b
	Liberty	6	83	17	0 a
	S. Laura	10	80	0	20 b

(1) Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones (P = 0,05).

Al comparar los tres tratamientos más el ensayo de repetición, el mayor valor se obtiene en el cultivar Freedom con un 40% de diferenciación, seguido del cv. Sweet Laura con un 20%. Existen diferencias significativas entre los cultivares Freedom y Liberty del tratamiento T3R y los demás tratamientos.

Luego se realizaron tres mediciones en las cuales varios parámetros del explante fueron medidos, sin embargo sólo se muestran los relativos al largo y peso seco del rizoma, ya que las características de este son fundamentales para la sobrevivencia en las etapas siguientes de la micropropagación. Los resultados obtenidos fueron analizados separadamente por cultivar.

Alstroemeria cv. Freedom

Luego de 8 semanas de cultivo *in vitro*, el tratamiento que logró una mayor tasa de crecimiento del rizoma fue T3, alcanzando en promedio 13,6 mm de longitud, T1 (Control) y T2 alcanzaron 9,2 y 11,8mm respectivamente. Sin embargo no existen diferencias significativas al utilizar distintas concentraciones del RCV.

Al considerar el peso seco, T3 fue el tratamiento que obtuvo mayores resultados alcanzando 64,1 mg ante 18, 3 y 42, 4 de T1 y T2, respectivamente. Existen diferencias estadísticas significativas al comparar T3 (6 mg L⁻¹ BAP) con T1 control (0 mg L⁻¹).

Se consideraron como explantes muertos a todos aquellos que presentaran necrosis o signos de contaminación. El principal patógeno causante de la contaminación fue un hongo el cual no fue identificado. En ninguno de los tres tratamientos el porcentaje de muerte por contaminación o por necrosis fue significativo. En los tres tratamientos se indujo el desarrollo de raíces espontáneamente.

Resultado de distintas concentraciones de BAP en *Alstroemeria* cv. Freedom, luego de 8 semanas de cultivo in vitro.

Tratamientos	Muertos (%)		Largo (mm)	Preso seco (mg)
	Necrosis	Contaminación		
T1 Control	0	13	9,2 a	18,3 a ⁽¹⁾
T2	13	7	11,8 a	42,4 ab
T3	20	7	13,6 a	64,1 b

(1) Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones (P = 0,05).

Alstroemeria cv. Liberty

En el siguiente cuadro, se observa que en este cultivar no existen diferencias significativas al utilizar distintas concentraciones de BAP. El tratamiento con el que se obtuvo mayor peso seco fue T3, con 30,5 mg. En cambio, al analizar el largo del rizoma, es T2 el tratamiento con el que se obtuvo el mayor resultado, alcanzando 11,3 mm de longitud. En los tres tratamientos el principal causante de muerte de los explantes fue la contaminación por hongos, el cual no fue identificado. En los tres tratamientos se indujo, espontáneamente el desarrollo de raíces.

Resultado de distintas concentraciones de BAP en *Alstroemeria* cv. Liberty, luego de 8 semanas de cultivo in vitro.

Tratamientos	Muertos (%)		Largo (mm)	Preso seco (mg)
	Necrosis	Contaminación		
T1 control	20	40	6,5 a	15,7 a ⁽¹⁾
T2	0	17	11,3 a	22,3 a
T3	14	14	11,0 a	30,5 a

(1) Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones (P = 0,05).

Alstroemeria cv. Sweet Laura

El mejor tratamiento para los dos parámetros considerados fue T2, con el que se obtuvo en promedio una longitud de 52,1 mm y un promedio de peso seco de 139,4mg. Con T3 aunque se alcanzaron valores menores de 38,8 mm y de 96,3 mg no existe

diferencia significativa. Al comparar el mejor tratamiento, T2, con el control (T1), sí existen diferencias significativas.

El porcentaje de muertes por necrosis o por contaminación en los tres tratamientos es muy bajo. El agente causante de la contaminación fue un hongo no identificado.

Resultado de distintas concentraciones de BAP en *Alstroemeria* cv. Sweet Laura, luego de 8 semanas de cultivo in vitro.

Tratamientos	Muertos (%)		Largo (mm)	Preso seco (mg)
	Necrosis	Contaminación		
T1 control	7	0	21,5 a	62,9 a ⁽¹⁾
T2	0	7	52,1 b	139,4 b
T3	0	13	38,8 b	93,6 ab

(1) Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones (P = 0,05).

Distintos sistemas y condiciones de cultivo en Alstroemeria in vitro

En el siguiente cuadro se muestra la tasa de esterilización de yemas del rizoma para tres cultivares de *Alstroemeria* spp. Varió en un rango de 38 y hasta 72% en promedio. Sin embargo, cabe destacar que las tasas menores correspondieron cuando se comenzó con este ciclo de iniciaciones y fueron producto de la poca expertise de quien las realizó. A medida que fue depurando la técnica los porcentajes se acercaron al 75 – 80% normal para esta fase.

Tasa de esterilización de explantes (%) de tres cultivares de *Alstroemeria* spp. Cultivados in vitro en dos temperaturas de cámara de crecimiento.

Cultivar	T° cultivo (° C)	Explantes iniciados	Explantes vivos	Tasa esterilización (%)
Freedom	21	102	61	59,8
Liberty	21	40	15	37,5
Sweet Laura	21	85	61	71,8
Sweet Laura	25	35	17	48,6

El tiempo de cultivo requerido para la fase de iniciación y brotación se pudo acortar al disminuir el tamaño de explante necesario para iniciar la fase de multiplicación. Durante la iniciación 1 se observan tiempos de 50 días los cuales fueron acortados a 21 y 31 días (cv. Freedom y cv. S. Laura) en la iniciación 3.

Disminución del tiempo de cultivo necesario en la fase de iniciación y brotación *in vitro* de yema del rizoma de tres cultivares de *Alstroemeria* spp.

Cultivar	T° cultivo (°C)	Iniciación 1	Iniciación 2	Iniciación 3
Freedom	21	50	22	21
Liberty	21	50	---	---
Sweet Laura	21	50	36	31
Sweet Laura	25	38	---	---

Cuadro 8. Tiempo de cultivo y Tasa de multiplicación en tres cultivares comerciales de *Alstroemeria* spp. cultivados en dos condiciones de temperatura de cámara de crecimiento.

Cultivar	T° Cultivo (° C)	Primer Ciclo			Segundo Ciclo		
		Días de cultivo	Explantos iniciales	Tasa	Días cultivo	Explantos iniciales	Tasa
Sweet Laura	21	19	23	1,0	29	14	1,4
Sweet Laura		36	11	1,0	30	21	1,9
Freedom		37	24	1,0	26	32	1,3
Sweet Laura		50	24	1,5			
Liberty		63	8	1,1			
Freedom	25	26	18	1,5			
Liberty		29	18	1,4			
Sweet Laura		36	19	1,7	30	36	1,9

Como se observa en el cuadro anterior, durante el primer ciclo de multiplicación Freedom no presenta aumento en el número de rizomas con brote en cámara de crecimiento con $21 \pm 1^\circ \text{C}$ y presenta una tasa de multiplicación de 1,0 rizomas por cada rizoma iniciado. Liberty por su lado presentó una tasa de 1,1, similar a la tasa de cv. Freedom. Sweet Laura en su primer ciclo a 25°C presentó una tasa de multiplicación de 1,7. En resumen para este primer ciclo se puede constatar que Freedom y Sweet Laura presentaron una mayor tasa cuando se desarrollan en cámara de crecimiento a 25°C .

En un segundo ciclo, consecutivo del primero, se observa que Sweet Laura, tanto a 21 como a 25° C, presentó una tasa de 1,9. Sin embargo cuando se toma un periodo de 66 días (36 días del ciclo 1 y 30 días del ciclo 2) la tasa a 21° C permanece en 1,9 y la tasa de multiplicación en cámara de crecimiento a 25° C fue de 3,3 rizomas por cada rizoma iniciado.

La tasa de multiplicación de cv, Freedom a 21 ° C en un segundo ciclo consecutivo alcanzó una tasa de 1,3 la cual todavía es menor que la tasa de cv. Freedom a 25° C.

Implementación Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

Experimento 1. Comparación de la tasa de multiplicación de Alstroemeria cv. Sweet Laura, utilizando el SIT con 6, 12 y 20 explantes por contenedor.

Los resultados obtenidos utilizando el SIT se detallan en el siguiente cuadro. La tasa de multiplicación tiende a aumentar a medida que los explantes llevan más ciclos en el sistema. Además se ha observado que los rizomas provenientes desde iniciación aumentan de tamaño en los primeros ciclos, siendo esto más importante que el aumento en la tasa de multiplicación.

El crecimiento de brotes vegetativos es mucho mayor en los explantes cultivados en el SIT, en comparación con aquellos explantes cultivados en medio líquido estacionario tradicional.

Los rizomas proveniente de subcultivos anteriores (20 explantes /contenedor) fueron los que presentaron la tasa mas alta de multiplicación. Si bien la tasa de multiplicación bajó en el segundo ciclo, ésta presentó una nueva alza en el ciclo siguiente.

Resumen de los experimento realizados utilizando el SIT.

Explantes /frasco	Ciclo	Inicio	Días cultivo	Explantes			Tasa Multiplicación
				iniciales	vivos	finales	
6	1	24/01/2008	27	60	33	34	1,0
	2	20/02/2008	41	34	29	35	1,2
	3	01/04/2008	20	41	0	0	Contaminado
6 (Rep2)	1	08/05/2008	35	36	30	30	1,0
12	1	08/05/2008	40	72	50	50	1,0
20	1	12/03/2008	29	100	80	174	2,2
	2	10/04/2008	29	174	76	107	1,4
	3	09/05/2008	34	107	75	111	1,5

Cultivo control.

Rizomas de Alstroemeria cv. Sweet Laura, cv, Freedom y cv. Liberty cultivados en medio líquido estacionario.

Luego de realizado 3 subcultivos al tratamiento control, se obtuvo recién en el tercer ciclo un aumento en la tasa de multiplicación. El tamaño de los rizomas, en su mayoría, es menor comparado con aquellos obtenidos en el SIT, así mismo estos rizomas desarrollan menos cantidad de brotes aéreos.

Resumen del cultivo de control de cultivo in vitro de *Alstroemeria Sweet Laura*.

Ciclo	Total Exp.	Explantes			Días cultivo	Tasa multiplicación
		por contenedor	Vivos totales	Total final		
1	46	3	40	40	38	1
2	40	3	36	36	33	1
3	36	3	33	40	32	1,2

Evaluación tasa de crecimiento SIT.

Efecto del número de rizoma iniciales por contenedor sobre la tasa de multiplicación de *Alstroemeria cv. Sweet Laura* en sistema de inmersión temporal (SIT).

Tasa de multiplicación y puntos de crecimiento logrados en *Alstroemeria cv. Sweet Laura* en Sistema Inmersión Temporal con seis explantes iniciales por contenedor en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP.

Frasco SIT-6	nº rizomas iniciales	nº rizomas divididos	puntos crecimiento	Tasa multiplicación	Puntos de crecimiento
1) 20/08	6	9	25		
2) 20/08	6	10	39		
4) 20/08	6	15	24		
6) 20/08	6	14	37		
<i>Total</i>	<i>24</i>	<i>48</i>	<i>125</i>	<i>2,0</i>	<i>2,6</i>

Tasa de multiplicación y puntos de crecimiento logrados en *Alstroemeria cv. Sweet Laura* en Sistema Inmersión Temporal con 12 explantes iniciales por contenedor en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP.

Frasco SIT-12	nº rizomas iniciales	nº rizomas divididos	puntos crecimiento	Tasa multiplicación	Puntos de crecimiento
1) 20/08	12	22	64		
2) 20/08	12	24	71		
3) 20/08	12	13	31		

4) 20/08	12	17	63		
<i>Total</i>	<i>48</i>	<i>76</i>	<i>229</i>	<i>1,6</i>	<i>3,0</i>

Efecto del número de rizoma iniciales por contenedor sobre la tasa de multiplicación de *Alstroemeria* cv. Freedom en sistema de inmersión temporal (SIT).

Tasa de multiplicación y puntos de crecimiento logrados en *Alstroemeria* cv. Freedom en Sistema Inmersión Temporal con 12 explantes iniciales por contenedor en medio MS suplementado con 2 mg L⁻¹ de BAP.

	Explan.	Días	Ex. vivos		Explantos	Tasa	
Ciclo	iniciales	cultivo	iniciales	Contam	Muertos	finales	multiplicación
1	36	30	36	6	15	19	1,3

Alstroemeria cv. Freedom presentó una menor tasa de multiplicación que A. cv. Sweet Laura ya que estaba en su primer ciclo después de iniciación.

Enraizamiento y Aclimatación de Alstroemeria cv. Sweet Laura.

Con el fin de determinar la efectividad de distintos sistemas y ambientes de aclimatación se diseñó un ensayo utilizando explantes del cv. Sweet Laura y de un clon híbrido nuevo promisorio.

Caracterización de los tratamientos y resultados obtenidos en dos cultivares de *Alstroemeria* realizados en dos sistemas de aclimatación.

		Nº Rizomas	Plantas finales	%	Nº días
Ciclo 1	Cama				
S. Laura	caliente	15	12	80	63
Ciclo 2	Cama				
S. Laura	Caliente	98	54	55 *	23
Ciclo 1	Sistema				
Clon J7	multinivel	26	0	0	29

Se completó el protocolo de micropropagación para el cultivar Sweet Laura, incluyendo la fase de tratamientos a las plantas madre, adaptación de protocolo para la iniciación *in vitro*, fase de multiplicación convencional y en sistema de inmersión temporal, como de enraizamiento y de aclimatación a condiciones ex vitro.

Determinación bacteria endógena en Sistema de Inmersión Temporal para Alstroemeria

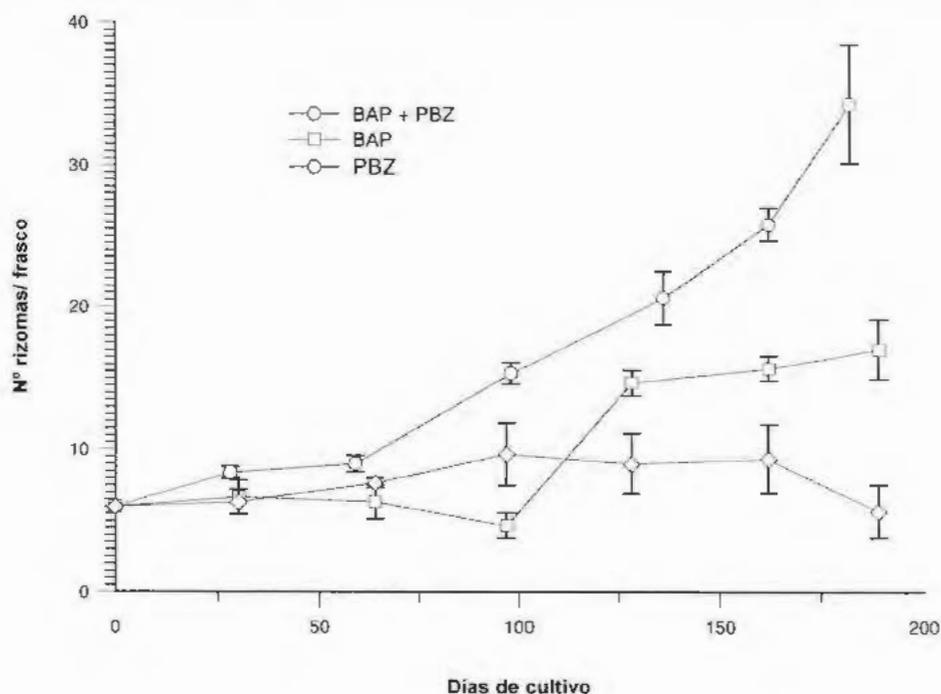
Dada la presencia de contaminación de tipo bacteriana en el SIT, se procedió a realizar un muestreo y cultivo del medio para determinar su origen.

Crecimiento de patógenos de medios en las placas ya se observaron a los cuatro días a 27°C, los cuales están en la siguiente tabla, indicando las características del crecimiento.

Frasco muestrados de SIT que presentaron desarrollo de microorganismos y descripción de los mismos.

Frasco muestreado	Observaciones
SIT-6 nº3	pequeño crecimiento bacterial, sin color
SIT-6 nº5	pequeño crecimiento bacterial, sin color
SIT Freedom nº1	pequeño crecimiento bacterial, sin color
SIT Freedom nº3	pequeño crecimiento bacterial, sin color
SIT SL nº3	no presentó crecimiento
SIT SL nº5	no presentó crecimiento
SIT 12 nº3	crecimiento parecido al de bacterias, sin color
SIT 12 nº4	crecimiento de colonias grandes de micelios, color blanco amarillento

Luego del cultivo se pudo definir que se trata de una especie de bacteria nno patogénica, Gram+ pero no fue posible la determinación de su género.



Fase de multiplicación de *Alstroemeria* cv. Sweet Laura en Sistema de Inmersión Temporal suplementados con diferentes RCVs: 2 mg L-1 BAP + 0.1 mg L-1 PBZ; 2 mg L-1 BAP y PBZ 0.1 mg L-1. Tiempo de cultivo 182 - 189 y 189 días, respectivamente.

Paeonia.

Los resultados obtenidos del primer experimento de iniciación, fueron los siguientes:

C1: 20% NaOCl

C0,5: 10% NaOCl

T3: 10 min

T5: 20 min

Resultados tras una semana de la iniciación		Total explantes	Explantes contaminados	Nº Explantes iniciados	% Sobrevivencia
Planta 1	C1-T3	5	4	1	20,00
	C0,5-T5	5	5	0	0,00
Planta 2	C1-T3	6	5	1	16,67
	C0,5-T5	5	4	1	20,00
Total		21	18	3	14,29

Se obtuvo una sobrevivencia promedio de los explantes del 14.29%

A continuación se presentan detalles de los resultados de pruebas consecutivas de iniciación de peonía a cultivo *in vitro* utilizando diferentes cultivares y fechas de iniciación.

Resultado de iniciación de *Paeonia* cv. Immaculee, tras 60 días de cultivo *in vitro*.

Fecha	Iniciados	Eliminados		Sobrevivientes	% Supervivencia
		Contaminados	No brotados		
07/11/06	24	8	6	10	41,7

Resultado de iniciación de *Paeonia* cv. Gardenia, tras 30 días de cultivo *in vitro*.

Fecha	Iniciados	Contaminados (eliminados)	Sobrevivientes	Esterilizados		% Supervivencia
				Brotados	No brotados	
07/11/06	16	4	12	8	4	50,0

Resultado de iniciación de *Paeonia* cv. Immaculee, tras 30 días de cultivo *in vitro*.

Fecha	Iniciados	Contaminados (eliminados)	Sobrevivientes	Esterilizados		% Supervivencia
				Brotados	No brotados	
10/12/06	20	5	15	12	3	60,0

La frecuencia de desinfección lograda para el cultivar 'Immaculee' a los 60 días de cultivo fue 41,6% y a los 30 días en un segundo ensayo fue de 60,0%. Para el cultivar Gardenia la frecuencia de desinfección a los 30 días fue de 50,0%. En conclusión se ha alcanzado un grado de descontaminación 40 y 60%, pero depende mucho del cultivar.

La frecuencia de brotación, con un tiempo de cultivo de 30 días, de los explantes esterilizados fue de 66,7% (8/12) para cultivar gardenia y de 80,0% (12/15) para cultivar Immaculee.

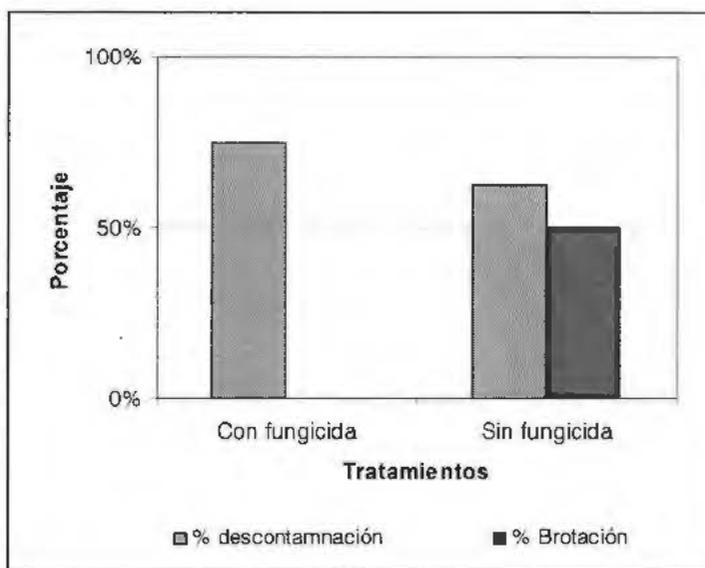
Iniciación de explantes in vitro de diferentes cultivares de Paeonia cvs. Immaculee, Gardenia, Festiva Maxima y Monsieur Jules Elie.

La mayor tasa de descontaminación fue de 100% para los cultivares Festiva Maxima y Monsieur Jules Elie, en la sexta semana de cultivo, siendo significativamente distintos de los cultivares Gardenia e Immaculee, con un 75% y 64,5% de descontaminación, respectivamente, no presentando diferencia estadística entre ellos. Cabe mencionar que los porcentajes de brotación y descontaminación fueron calculados sobre el total de los explantes iniciados para cada cultivar. La contaminación fue causada

principalmente por hongos y bacterias, además algunos explantes presentaron exudación de fenoles al medio de cultivo. El mayor porcentaje de brotación, a la misma fecha de evaluación, lo presentó el cultivar Gardenia con un 43,8%, seguido de 'Immaculee' con 42,1% y finalmente por 'Festiva Maxima' y 'Monsieur Jules Elie' con 33,0% y 30,0%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los cultivares.

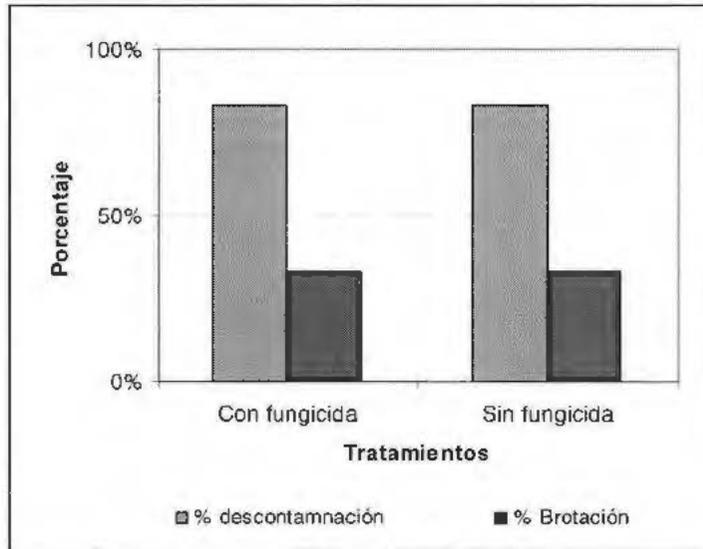
Efecto del tratamiento fitosanitario realizado al plantel madre de los cultivares Immaculee, Festiva Maxima y Gardenia en la descontaminación de los explantes iniciados en condiciones in vitro.

Se puede observar en la siguiente Figura, que del total de explantes iniciados del cultivar Immaculee, se obtuvo un 75% de descontaminación con la aplicación de fungicidas a la planta madre y un 62,5% sin la aplicación. No se encontró diferencia significativa entre ambos tratamientos. Sólo se observó brotación de los explantes cuando no se aplicó fungicida y esta fue de un 50% del total de explantes iniciados. Para la brotación el análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre ambos tratamientos fitosanitarios, posiblemente por que el cultivar Immaculee puede ser susceptible a la acción del NaOCl.



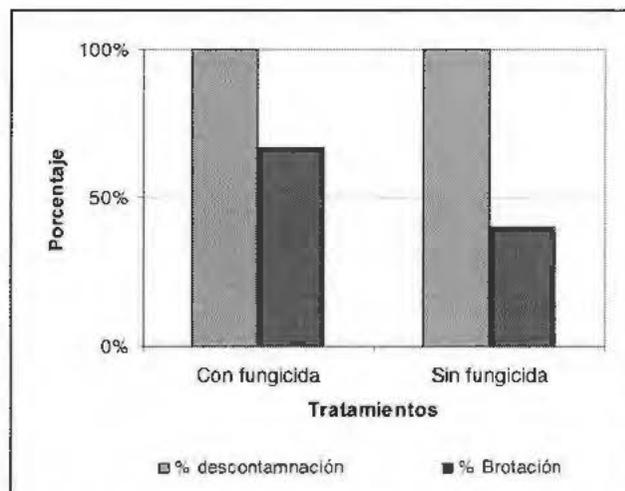
Porcentaje de explantes descontaminados y brotados correspondientes a cada tratamiento fitosanitario, para el caso de *Paeonia* cv. Immaculee a la sexta semana de evaluación.

En el caso del cultivar Festiva Maxima, como se indica en la siguiente Figura, se obtuvo una descontaminación de un 83% y una brotación de un 33% (del total de explantes iniciados) en ambos tratamientos, no presentando diferencias significativas.



Porcentaje de explantes descontaminados y brotados correspondientes a cada tratamiento fitosanitario, para el cultivar Festiva Maxima, a la sexta semana de evaluación.

El cultivar Gardenia presentó un 100% de descontaminación (Figura 3), no obstante el porcentaje de brotación fue mayor en el tratamiento con fungicida que presentó un 66,67%. Sin aplicación de fungicida la brotación fue de un 40%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos fitosanitarios.



Porcentaje de explantes descontaminados y brotados correspondientes a cada tratamiento fitosanitario, para el caso del cultivar Gardenia, a la sexta semana de evaluación.

Efecto de diferentes concentraciones de BAP (benzilaminopurina) sobre la proliferación de brotes de Paeonia cv. Immaculee y Top Brass.

La concentración de 2 mg L⁻¹ BAP, para el cultivar Immaculee, presentó los mejores resultados en cuanto a tamaño del explante y número de brotes aéreos y laterales. En promedio se alcanzó una longitud de explantes de 2,45 cm para el Tratamiento 1 (2 mg L⁻¹), 1,7 cm para el Tratamiento 2 (1 mg L⁻¹) y 1,03 cm para el Tratamiento 0 (control). Además el número de brotes laterales en el caso del Tratamiento 1 después de tres meses de cultivo fue de 0,64 y el número de brotes aéreos fue de 0,38. Sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas para la longitud de los brotes, número de brotes aéreos y número de brotes laterales de los distintos tratamientos.

Para el caso del cultivar Top Brass, se determinó que en cuanto a longitud de explantes y número de brotes aéreos, la concentración de 2 mg L⁻¹ BAP presentó los mejores resultados. Sin embargo, para el caso del número de brotes laterales, el medio basal sin suplemento de regulador de crecimiento fue el que obtuvo el mayor porcentaje. En el caso de este cultivar no se produjo diferencias significativas para ninguno de los parámetros evaluados.

Inducción de callo como fase inicial de Embriogénesis somática en Paeonia.

En el siguiente cuadro se observa que la mejor inducción de callo se alcanzó en explante de primordio foliar con 2,0 mg L⁻¹ 2,4-D lográndose un 87,5% de los explantes que formaran callo. Sin embargo, concentraciones menores de la auxina indujeron callo en un valor cercano a 75% de los explantes. En ápice caulinar el 87,5% de los explantes formaron callo en medio MS suplementado con 1 mg L⁻¹ 2,4-D.

Efecto de medio MS suplementado con distintas concentraciones de 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido de callo en explantes de primordio foliar y ápice caulinar de *Paeonia* cv. Top Brass. Tiempo de cultivo de 113 días.

Explante	Tratamiento	Nº Explantes iniciados	Nº explantes contaminados	Inducción de callo (%)
	2,4-D (mg L ⁻¹)			
Primordio foliar	0,0	34	34	0,0
	0,5	36	25	75,0
	1,0	21	18	76,2
	2,0	16	14	87,5
Ápice caulinar	0,0	13	13	0,0
	1,0	8	8	87,5

En el siguiente cuadro se puede observar los resultados de la inducción de callo utilizando ápice radical, donde la mayor inducción se alcanzó con medio MS suplementado con 0,8 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Efecto de medio MS suplementado con 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido de callo en explante de ápice radical de *Paeonia* cv. Top Brass. Tiempo de cultivo de 108 días.

Explante	Tratamiento (2,4-D mg L ⁻¹)	Nº Explantes iniciados	Nº explantes contaminados	Inducción de callo (%)
Ápice radical	0,0	19	4	0,0
	0,1	18	0	11,1
	0,2	18	3	5,6
	0,4	18	3	38,9
	0,8	18	3	50,0
	1,6	20	0	25,0
	2,0	19	0	15,8

Para el cultivar Immacule, tanto para primordio foliar como para ápice caulinar, la mayor inducción de callo ocurrió con concentraciones de 1,0 mg L⁻¹ de 2,4-D.

Efecto de medio MS suplementado con 2,4-D en la inducción *in vitro* de tejido de callo en explantes de primordio foliar y ápice caulinar de *Paeonia* cv. Immacule. Tiempo de cultivo de 110 días.

Explante	Tratamiento (2,4-D mg L ⁻¹)	Nº Explantes iniciados	Nº explantes contaminados	Inducción de callo (%)
Primordio foliar	0	10	7	0,0
	0,5	11	0	81,8
	1,0	17	1	64,7
	2,0	14	2	42,9
Ápice caulinar	0,0	11	11	0,0
	0,5	11	1	72,7
	1,0	12	5	83,3
	2,0	7	0	71,4

Respuesta del tejido de callo, inducido a partir de diferentes tipos de explantes iniciales (primordio foliar y ápice caulinar) de Paeonia lactiflora cv. Top Brass y cv. Immacule, y subcultivo a medio MS sin suplemento de reguladores de crecimiento.

Los callos evaluados presentaron una notable heterogeneidad en cuanto a sus características morfológicas y grado de compactación, existiendo incluso diferencia entre distintos sectores de un mismo callo.

En general, las zonas más juveniles se distinguían por un color blanco a amarillo, pero a medida que el tiempo de cultivo aumentaba, los callos se tornaban

progresivamente más oscuros, pasando por la gama de los cafés hasta el negro. En algunos casos este proceso se vio acelerado por una excesiva producción de fenoles, los que se acumularon en el medio de cultivo, provocando la degeneración y muerte de los tejidos.

En cuanto a la estructura y su evolución en el tiempo, fue posible destacar dos tipos de callo: (1) el primero se caracteriza por una consistencia más compacta y crecimiento moderado. Es de aspecto más seco, con una superficie granular organizada formando lóbulos de color crema a amarillo oscuro. Hacia su base puede presentar distintos grados de oxidación, llegando al color café oscuro; (2) el segundo, se distinguió por ser muy disgregable y de crecimiento rápido, de color blanco a plomizo, semi-transparente y presentar un aspecto suave y húmedo. En primera instancia su superficie fue irregular, pero luego mostró un cambio progresivo hacia una forma más estructurada, formando nódulos de centro más denso y oscuro. En algunos casos estos últimos tomaron una forma esférica pronunciada que se destacó por sobre el cuerpo del callo y que se desprendieron fácilmente al manipularlas, llegando incluso a escindirse naturalmente del callo. Posteriormente se observó que de estas estructuras dieron origen a formas radiculares que han seguido su crecimiento de forma independiente a su tejido de origen.

Mediante cortes histológicos se pudo evidenciar la presencia de zonas con fuerte actividad mitótica, caracterizados por células pequeñas, con un núcleo grande y citoplasma denso. Éstas se presentaron en todas las muestras tomadas, aunque con distintos grados de organización. En el caso de las estructuras nodulares descritas, se encontraron centros meristemáticos claramente globulares, rodeados por células altamente vacuoladas y frágiles, con gran contenido de almidón.

Respuesta del tejido de callo, inducido a partir de distintos tipos de explantes (ápices radicuales, petaloides) de Paeonia lactiflora cv. Top Brass y cv. Immacule, a subcultivo en medio MS sin suplemento de reguladores de crecimiento.

En el siguiente cuadro se observa que la mejor inducción de callo se produjo en presencia de 1,6 mg L⁻¹ 2,4-D alcanzándose un 88,2% de formación de callo y coincidiendo con una mayor cobertura de estos respecto al explante. Tanto el número de callos inducidos como el tamaño relativo de los mismos disminuyeron al disminuir la concentración de 2,4-D.

En los tratamientos con TDZ se obtuvo una producción reducida de callo, con un máximo de 23 % cuando la concentración de TDZ fue de 0,2 mg L⁻¹ y una cobertura que no supera el mínimo.

Efecto de distintas concentraciones de 2,4-D y TDZ en la inducción de callo en explantes de petaloides de *Paeonia lactiflora* cv. Top Brass. Tiempo de cultivo de 104 días.

Tratamiento	2,4-D (mg L ⁻¹)	TDZ (mg L ⁻¹)	Nº Explantes activos	% Explantes con Callo	Puntuación Promedio*
T1	0,4	-	45	46,7	1,7
T2	1,0	-	57	78,9	1,8
T3	1,6	-	51	88,2	2,2
T4	-	0,02	54	9,3	1
T5	-	0,2	51	23,5	1
T6	-	2	54	14,8	1

* Puntuación según cobertura en relación al explante según la siguiente escala:

Cobertura	Puntuación
0 a 25%	1
25 a 50%	2
50 a 75%	3
75 a 100%	4
100%	5

En los otros tipos de explantes iniciados (petaloides y filamentos provenientes de botones primarios) no se obtuvieron resultados significativos, principalmente debido a toxicidad por fenoles. En los segmentos radicales no se evidenció respuesta alguna.

Evolución de callos embriogénicos de Paeonia lactiflora cv. Top Brass y cv. Immacule en medio sin RCVs, y respuesta de estructuras tipo embrión (ETEs) a distintos factores ambientales y reguladores de crecimiento.

Los callos mantenidos en medio de cultivo de maduración (sin RCVs), continuaron su evolución hacia formas nodulares cada vez más marcadas. La elongación de estos nódulos dio origen a más estructuras de tipo radicular, similares a la ya observadas y capaces de seguir su desarrollo de manera independiente al callo que le dio origen. Esto último hizo suponer su posible naturaleza embrionaria por lo que se les denominó “estructuras tipo embrión” (ETEs) en el caso de las formas globulares y “estructuras tipo embrión radicales” cuando había presencia d estructura tipo radícula.

Las ETEs demostraron mantener su integridad frente a estados avanzados de oxidación. Luego de la renovación del medio de cultivo, éstas crecieron y destacaron por encima del tejido necrosado, negro y suelto, por su apariencia maciza y su coloración crema. Este proceso fue especialmente notorio cuando se realizó un cambio entre medio de cultivo semisólido a líquido, lo cual se reflejó en una profusa generación de estructuras radiculares. Finalmente, una vez transcurridos 8 meses de cultivo, se obtuvieron ETEs radiculares a partir de callos provenientes de todos los orígenes y tipos evaluados. Los callo de cv. Immacule se destacaron por formar nódulos muy marcados y generar una alta cantidad de raíces.

La prueba realizada para evaluar la respuesta de ETEs radiculares frente condición e cultivo de luz u oscuridad, mostró que aquellas estructuras expuestas a la luz mostraron un crecimiento notoriamente menor respecto al control, mantenido en oscuridad. Además, la presencia de luz pareció acelerar procesos de oxidación o muerte del explante. Sin embargo, en dos de las 16 repeticiones de este tratamiento, se observó la sobrevivencia del explante junto con el engrosamiento y cambio coloración verde del el polo apical de la estructura.

Por otro lado, adición de 0,3 mg L⁻¹ de carbón activado al medio de cultivo, no arrojó resultados significativos en el desarrollo de las ETEs radiculares. Lo mismo ocurrió en el caso del experimento destinado a romper una posible dormancia del epicotilo, en el

cual se probó un pretratamiento de frío a 0°C por cuatro semanas, y la adición al medio de cultivo de 2 mg L⁻¹ BAP, 3 mg L⁻¹ GA3 o la combinación de ambos RCVs, sin que en ninguno de estos tratamientos se registrara diferencia significativa respecto control.

El análisis histológico de las ETEs radiculares permitió verificar la naturaleza radicular de estas estructuras. Sin embargo, no fue posible identificar un meristema apical bien diferenciado, por lo cual hasta el momento no he sido posible identificar a estas estructuras como un embrión propiamente tal.

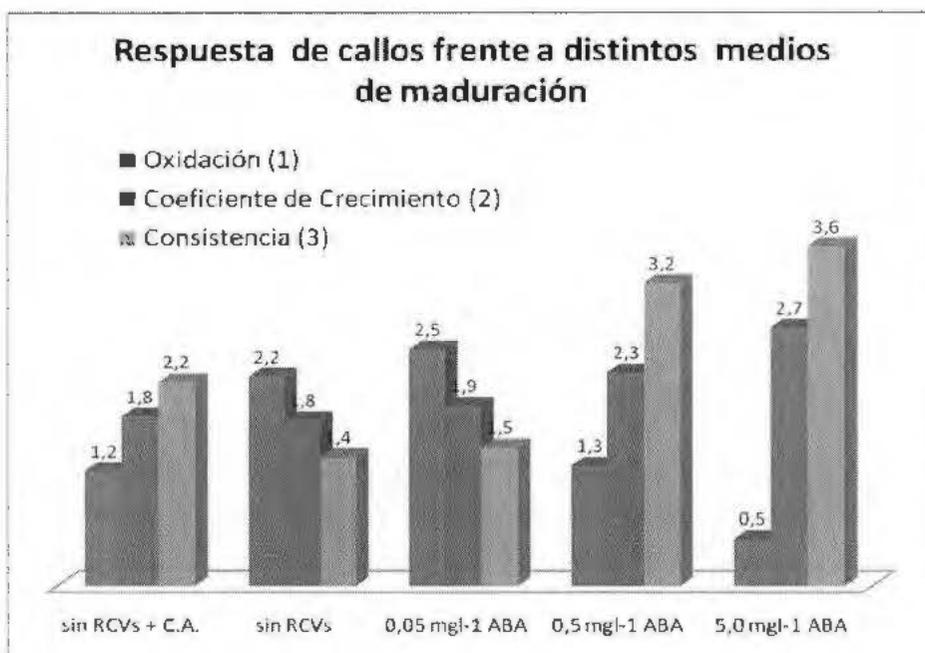
Etapa de maduración embriogénesis somática

Durante la etapa de maduración el material proveniente de la fase de inducción, realizada en medio suplementado con 1,6 mg L⁻¹ de 2,4-D, fue transferido a distintos medios para favorecer la expresión de su posible carácter embriogénico y la consiguiente maduración de embriones en formación.

Luego de 30 días de cultivo, los callos traspasados a medio sin reguladores de crecimiento, presentaron un crecimiento moderado, sin presentar grandes cambios morfológicos. Existió sí, la tendencia a la formación de nuevos grupos nodulares, y a una mayor demarcación de estos mismos. En aquellos nódulos de mayor tamaño fue posible distinguir un centro amarillo opaco. Entre estos últimos, se vio un aumento en la presencia de células blancas y destacó la aparición, en 3 de los 19 casos estudiados, de estructuras globosas de superficie lisa y brillante. La consistencia de estos callos era friable, por lo que se disgregaron con facilidad frente a la manipulación. Se presentó además un grado variable de oxidación que afectó a todos los casos estudiados. El efecto oxidativo se vio reflejado en una coloración heterogénea, principalmente grisácea pero también café, mezclados con sectores blancos y crema.

El efecto del carbón activado se reflejó en una menor oxidación y una mayor estructuración del callo nodular, con una mayor presencia de las estructuras globosas brillantes antes descritas, aun así no existieron cambios drásticos en cuanto a los rasgos morfológicos generales. Además, resultaron algo más firmes durante la manipulación. Se observaron pequeñas estructuras globulares que, desprendidas de la masa del callo, crecieron para tomar una morfología de posible naturaleza radicular.

La aplicación de ácido abscísico (ABA) al medio de cultivo, produjo cambios en la morfología de los callos tratados. A medida que aumentó la concentración de la hormona, se acentuaron cambios en cuanto a la firmeza, tasa de crecimiento y su aspecto general. Los callos tratados con la dosis mínima de ABA (0,05 mg l⁻¹) mantuvieron características similar al control (sin RCVs). Cuando la concentración aplicada aumentó a 0,5 mg L⁻¹ de ABA se hicieron evidentes cambios morfológicos, pero sin que la morfología de callo friable nodular se halla perdido por completo, como fue en el caso de los callos tratados con 5,0 mg L⁻¹ de ABA, el cual cambió a una coloración amarilla homogénea con algunos tintes blancos, aspecto seco y superficie formada por pequeños nódulos irregulares. En comparación a los tratamientos sin RCVs y con 0,05 mg L⁻¹ ABA, los callos con 0,5 y 5,0 mg L⁻¹ ABA tomaron una consistencia progresivamente más firme y compacta, que los hizo muy resistentes a la manipulación. Además presentaron el mayor crecimiento en superficie; los callos mantenidos 5,0 mg L⁻¹ ABA alcanzaron un coeficiente de crecimiento promedio de 3,6 comparado con un 1,4 del tratamiento sin RCVs. Al mismo tiempo tuvieron una menor tendencia a la oxidación.



Respuesta de callos embriogénicos después de 30 días de cultivo en distintos medios de maduración, en cuanto a oxidación, crecimiento y consistencia.

- (1) Oxidación. Medida según escala valorativa del 0 al 4, donde 0 corresponde a un nivel de oxidación no relevante, y 4 a un nivel grave de oxidación, con más del 75 % del tejido oxidado.
- (2) Coeficiente de crecimiento. Calculado como la superficie final dividida por a superficie inicial, con la superficie medida como el área del callo proyectada sobre el plano, determinada en píxeles a través del programa ImageJ.
- (3) Consistencia. Medido según escala valorativa de 1 a 4, donde 1 corresponde a la menor consistencia o "fríasle" y 4 corresponde a la mayor consistencia o "firme".

Luego de 30 días de cultivo en sus respectivos medios de maduración, todos los tratamientos fueron transferidos a medio MS 100 sin reguladores de crecimiento. Al cabo de 15 días se pudo observar, en los callos del tratamiento con 0,5 y 5,0 mg L⁻¹ ABA, un retorno hacia una forma más fríasle y nodular, correspondiente a los callos cultivados sin reguladores de crecimiento. Se observaron además tres casos en que callos provenientes del tratamiento con carbón activado, mostraron la presencia de estructuras del tipo radicular, desarrolladas a partir de porciones nodulares, desprendidas previamente del callo de origen. Estas estructuras de asemejan a aquellas descritas previamente como ETEs para callos provenientes de *Paeonia lactiflora* cv. Top Brass y cv. Immaculee.

Histología

En muestras obtenidas a los 30 días en tratamientos de maduración del proceso de embriogénesis somática, la tinción con azul de toluidina muestra grupos de células pequeñas con núcleos grandes teñidos de azul intenso y pared gruesa y bien definida, que corresponderían a las características descritas para células embriogénicas. También en concordancia con la bibliografía, estos grupos celulares se encontraron rodeados a células elongadas, altamente vacuoladas, de paredes delgadas, con tinción débil. La organización de estas agrupaciones celulares solo alcanzó niveles iniciales de

estructuración, correspondientes a estados globulares como máximo, en todos los tratamientos.

Proteaceae.

Selección de tipo de explante para iniciación in vitro

Con el objetivo de determinar el efecto del tipo de explante (posición y edad) se diseñó un conjunto de experimentos en los que se analizó la sobrevivencia de los mismos luego del proceso de desinfección, en la cual también se analizó el efecto de la época del año (estado fenológico) sobre la sobrevivencia en el establecimiento in vitro de las distintas especies proteáceas utilizadas.

Resultado desinfección según tipo de explante en iniciado en la semana 52 del año y evaluado en las semanas 1 y 4 del año siguiente.

	<i>Banksia coccinea</i>		<i>Leucospermum</i> cv. High Gold		<i>Protea</i> cv. Lady Di	
	Semana del año					
	1	4	1	4	1	4*
Nº Explantes iniciados	18		11		15	
Tipo explante	Explantes esterilizados (%)					
A-J ⁽²⁾	40,35	24,56	46,35	30,77	61,11	---
M-J	27,78	0,00	27,27	9,09	50,00	---
B-J	22,22	5,56	50,00	33,33	40,00	---
Y- Lat	---	---	---	---	0,00	---
Promedio explantes desinfectados (%)	34,41	16,13	42,86	26,53	43,33	---

(1) Totalidad del plantel de *Protea* cv. Lady Di descartado en la semana 2 por muerte producto de fenoles.

(2) A-J: apical juvenil; M-J: tercio medio juvenil; B-J: basal juvenil; Y-Lat: yema lateral.

Los explantes que presentaron un mejor comportamiento en cuanto a desinfección, en general para las tres especies, fueron los ápices de los brotes (A-J), por lo cual los ensayos siguientes fueron realizados con este tipo de explante.

Estudio método de desinfección para Banksia coccinea

Resultado desinfección de brotes de *Banksia coccinea* iniciados *in vitro* durante la semana 52 del año y evaluado en la semana 2 del año siguiente.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO			Promedio (%)
	1%	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)			
3	11,1 (1/9)	22,2 (2/9)	11,1 (1/9)	14,8
5	22,2 (2/9)	11,1 (1/9)	33,3 (3/9)	22,2
10	7,7 (1/13)	7,7 (1/13)	30,8% (4/13)	15,4
Promedio (%)	12,9	12,9	25,8	17,2

Resultado de desinfección en *Banksia coccinea* iniciado *in vitro* durante la semana 2 y evaluado en la semana 4 del año.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO		Promedio (%)
	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)		
3	13,3 (2/15)	20,0 (3/15)	16,7
5	20,0 (3/15)	46,6 (7/15)	33,3
10	40,0 (6/15)	0,0 (0/15)	20,0
Promedio (%)	23,2	26,4	24,8

Resultado desinfección en *Banksia coccinea* iniciados *in vitro* la semana 5 y evaluado en la semana 9 del año.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO		Promedio (%)
	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)		
5	33,3 (5/15)	46,7 (7/15)	40,0
10	40,0 (6/15)	46,7 (7/15)	43,3
Promedio (%)	36,7	46,7	41,7

En el experimento arriba descrito el bajo porcentaje de descontaminación logrado, al parecer, se debe a la agitación mediante Vortex, por lo cual se continuó realizando la desinfección solo con agitación manual.

Para el control de bacterias endógenas, detectadas después de agitación con Vortex, los plántulos de *Banksia coccinea* y *Leucospermum* cv. "High Gold" fueron trasplantados a un medio con antibiótico en la semana 4. Sin embargo, no se logró erradicar la bacteria y los dos plántulos se debilitaron, a tal extremo, que fueron descartados en la semana 6 por muerte.

A partir del ensayo 3 se determinó que la concentración y tiempo de exposición que mejor se adecua para *B. coccinea* correspondió a una concentración de cloro de 5% por 5 min, considerando el porcentaje de desinfección y las características de los explantes (vigor y porcentaje de brotación del plántulo). Esta fue testada en el ensayo 4, que en conjunto a lo anterior, incluye tres tipos de reguladores de crecimiento vegetal (TDZ, ANA+BAP y BAP).

Resultado desinfección de ensayo 4 en *Banksia coccinea* iniciado *in vitro* en la semana 11 y evaluado en la semana 12.

Regulador de crecimiento	Total explantes desinfectados (%)
BAP	68,8 (11/16)
ANA + BAP	75,0 (12/16)
TDZ	87,5 (14/16)
Promedio	78,13%

Los resultados obtenidos en el Ensayo 4, en la primera semana de la iniciación, demuestran la eficacia del tratamiento de desinfección previa realizado, pero no permitieron concluir acerca del efecto que los reguladores de crecimiento pudiesen tener sobre el desarrollo de brotes.

Ensayo 6. Frecuencia de desinfección de explantes apicales de *Banksia coccinea* iniciado *in vitro* durante la semana 34 y evaluado en la semana 37.

Planta madre	Tipo de Explante	Número Explantes Iniciados	Explantes contaminados	Explantes desinfectados
1	A	15	15	0
	M	15	15	0
2	A	15	15	0
	M	15	15	0
3	A	15	15	0
	M	15	15	0
control	A	15	15	0
	M	10	10	0

La nula desinfección producida, a los 14 días de iniciado el cultivo, determinó el uso de PPM (Plant Preservative Media) con características de fungicida y bactericida para revertir la contaminación. El lavado y agitado en esta solución no revirtió la situación, debido principalmente a la gran concentración de patógenos presentes en el cultivo.

Resultado desinfección de Ensayo 7 en *Banksia coccinea* iniciado *in vitro* la semana 37 y evaluado en la semana 38.

Numero de Planta madre	Tipo de Explante	Número Explantes Iniciados	Explantes contaminados	Explantes desinfectados
4	A	7	7	0
	M	7	7	0
	Subtotal	14	100,00%	0,00%
5	A	10	10	0
	M	10	10	0
	Subtotal	20	100,00%	0,00%
7	A	15	15	0
	M	15	11	4
	Subtotal	30	86,67%	13,33%
control	A	15	15	0
	M	15	15	0
	Subtotal	30	100,00%	0,00%

Al igual que en ensayo 6 la desinfección fue casi nula. Al igual que en *Leucospermum* cv. High Gold, se evidenció un efecto de la época del año en la frecuencia de desinfección de explantes.

Frecuencia de desinfección de explantes nodales obtenidos de ápices de brotes de la temporada del Ensayo 8 en *Banksia coccinea* iniciados *in vitro* la semana 38 y evaluado en la semana 43.

Tipo de Explante	Número Explantes Iniciados	Explantes contaminados	Explantes desinfectados	Explantes muertos
Segmento nodal	60	0	60	0
Frecuencia		0,00%	100,00%	0%

Los explantes no contaminados del ensayo 7 que fueron divididos en entrenudos con 1–2 yemas e iniciados en medio MS más PPM presentaron una frecuencia de desinfección de 100%.

Resultados desinfección de Ensayo 8 en *Banksia coccinea* iniciados *in vitro* la semana 43 y evaluado en la semana 45.

Tratamiento	Tipo de Explante	Número Explantes Iniciados	Explantes contaminados	Explantes desinfectados
Control	Yema chica	15	1	14
	Yema grande	15	2	13
	Subtotal	30	10,00%	90,00%
TDZ	Yema chica	15	1	14
	Yema grande	15	4	11
	Subtotal	30	16,67%	83,33%

La frecuencia de desinfección se encontró entre 83,3 y 90,0%, se determinó que la diferencia se debe a la diferencia entre yema chica y yema grande para la desinfección de los explantes. Los explantes, fueron pasados a medios suplementados con TDZ, Kinetina y BAP más PPM, para ver resultados en la próxima evaluación.

Iniciación de Banksia coccinea in vitro a partir de diferentes tipos de yemas axilares.

El cultivo fue revisado semanalmente durante cuatro semanas, en donde se observó un 100% de descontaminación. Tampoco se observó cambio en las yemas cultivadas, por lo que se dejó por cuatro semanas más en el mismo medio de cultivo, se evaluó al final del periodo y se observó que el cultivo estaba muerto por desecación.

Efecto de diferentes tipos y concentraciones de citocininas (BAP, Kinetina, TDZ) sobre la brotación de yemas laterales en brotes apicales de Banksia coccinea.

El cultivo fue revisado semanalmente durante cuatro semanas, en donde no se observó contaminación como tampoco cambios en las yemas de los explantes, por lo que

se procedió a cortar los explantes y se observó que estos estaban muertos por desecación.

Brotación de Banksia coccinea a partir de brotes apicales con medio MS modificado.

Como se observa en el cuadro 3, a la octava semana de cultivo *in vitro*, el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de explantes vivos fue el sin hoja con un 66,7%.

Explantes vivos de *Banksia coccinea* en medio MS modificado con 1 mg L⁻¹ de TDZ, a partir de distintos tipos de explantes (hoja entera, media hoja y sin hoja), a la octava semana de iniciado el cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Nº Explantes Iniciados	Explantes contaminados (%)	Explantes necrosados (%)	Explantes vivos (%)
Hoja Entera	15	40,0	60,0	0,0 a
Media Hoja	15	33,3	46,7	20,0 b
Sin Hoja	15	13,3	20,0	66,7 b

A la tercera semana posterior a la iniciación *in vitro*, comenzó la brotación de los explantes, alcanzando en la octava semana una brotación de 88,3% el tratamiento de explantes sin hoja y de 48,2% para explante de media hoja, existiendo diferencia significativa entre ambas medias (cuadro 20).

Efecto de brotación de *Banksia coccinea* en medio MS modificado con 1mg L⁻¹ de TDZ a partir de diferentes tipos de explantes (hoja entera, media hoja y sin hoja), a la octava semana de iniciado el cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Nº Explantes Iniciados	Explantes vivos (%)	Yemas totales de explantes vivos	Porcentaje de brotación (%)
Hoja entera	15	0,0	0	0,0 c ⁽¹⁾
Media hoja	15	20,0	27	48,2 b
Sin Hoja	15	66,7	77	88,3 a

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

El tratamiento que tuvo mejor resultado fue desfoliando el explante antes de ser iniciado y también se observó cómo el color verde del tallo se fue intensificando a través del tiempo.

Efecto del medio basal, MS 100% y MS modificado sobre la brotación de Banksia coccinea a partir de brotes apicales.

La mejor brotación obtenida a la cuarta semana de iniciado el cultivo *in vitro*, fue de 77,42% en donde el explante fue transportado del predio al laboratorio en espuma de propagación húmeda, desfoliado y colocado en medio de cultivo modificado, versus 0%

obtenido en todos los otros tratamientos (figura 4). Todos los tratamientos se contaminaron en la cuarta semana. La figura 5 demuestra la brotación de las yemas axilares de los explantes.

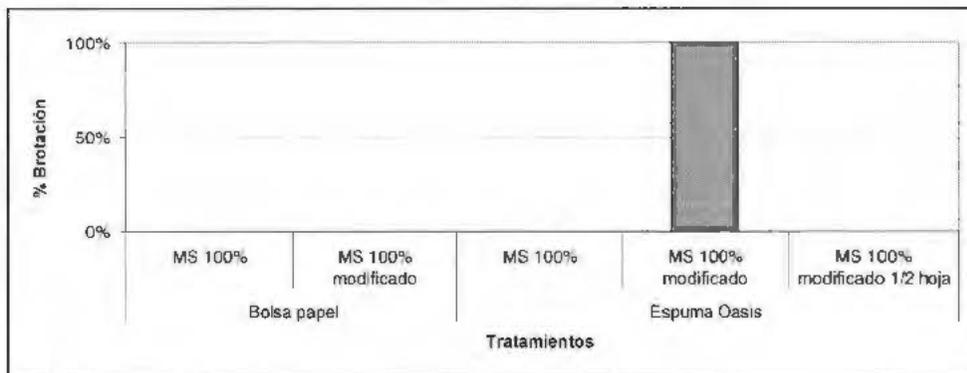


Figura 4: Porcentaje de brotación de *Banksia coccinea*, a la cuarta semana, a partir de los diferentes tratamientos (forma de transporte y medio de cultivo).

Evaluación de la brotación de yemas laterales de brotes apicales de B. coccinea iniciada in vitro.

En la primera iniciación, el 100% de los explantes se eliminaron en el transcurso de las tres semanas que siguieron al día de la iniciación, debido a la contaminación fúngica y bacteriana que sufrieron los explantes. La alta tasa de contaminación se debió a que los fungicidas usados en las plantas madres previo a la colecta de los explantes no fueron efectivos. Frente a lo anterior se cambiaron fungicidas y la también la frecuencia de aplicación para la siguientes aplicaciones.

En la segunda iniciación y tercera iniciación, disminuyó la tasa de contaminación a 80% del material iniciado, siendo considerado aún muy alto para lo ya obtenido en etapas anteriores del proyecto.

En la cuarta iniciación, se aumentó la concentración de NaOCl a 5%, nuevamente, y se incrementó la sobrevida de los explantes a la esterilización e iniciación in vitro, alcanzado una tasa de 58%.

Porcentaje de sobrevivencia de brotes apicales iniciados *in vitro* de *B. coccinea* con diferentes tratamientos previo en plantas madre y diferentes concentraciones de NaOCl en la esterilización.

Iniciación	Tratamiento	Nº de explantes iniciados	Nº de explantes eliminados por:			Sobrevivencia (%)
			Hongos	Bacterias	Fenoles	
1ª	Control	15	11	4	0	0,0
	T1	15	12	3	0	0,0
	T2	15	12	3	0	0,0
2ª	Control	15	5	0	7	20,0
	T1	15	0	0	11	26,7
	T2	15	4	1	10	0,0
3ª	Control	15	13	0	0	13,3
	T1	15	9	0	0	40,0
	T2	15	12	0	0	20,0
	T3	15	13	0	0	13,3
4ª	Control	15	7	0	0	53,3
	T1	15	1	0	0	93,3
	T2	15	6	0	0	60,0
	T3	15	11	0	0	26,7

Fue posible de obtener brotes laterales inducidos *in vitro* a partir del material de la segunda iniciación.

Porcentaje de brotación de yemas laterales de brotes apicales de *B. coccinea* iniciados *in vitro*.

Iniciación	Tratamiento	Nº de explantes sobrevivientes	Nº de explantes con brotes	Brotación (%)
1ª	Control	0/15	0	0,0
	T1	0/15	0	0,0
	T2	0/15	0	0,0
2ª	Control	3/15	1	33,3
	T1	4/15	2	50,0
	T2	0/15	0	0,0
3ª	Control	2/15	0	
	T1	6/15	0	
	T2	3/15	0	
	T3	2/15	0	
4ª	Control	8/15	0	
	T1	14/15	0	
	T2	9/15	0	
	T3	4/15	0	

Multiplicación de Banksia coccinea in vitro a partir de brotes laterales generados in vitro.

Se obtuvo brotes en los explantes de la segunda iniciación en los tratamientos control y el con medio modificado sin fósforo, los que han continuado expandiendo sus tejidos (hasta el momento sólo foliares). No se obtuvieron nuevos brotes laterales.

Porcentaje de sobrevivencia de explantes subcultivados *in vitro* de *B. attenuata*, *B. coccinea*, *B. ericifolia* y *B. menziesii* en diferentes tratamientos.

Especie	Tratamientos								
	Control			MS s/ Ca			MS s/ P		
	Inicial	Vivos	% Sobrevivencia	Inicial	Vivos	% Sobrevivencia	Inicial	Vivos	% Sobrevivencia
<i>B. attenuata</i>	10	5	50%	10	6	60%	14	10	71%
<i>B. coccinea</i>	0	0	0%	2	2	100%	4	4	100%
<i>B. ericifolia</i>	7	0	0%	2	0	0%	15	0	0%
<i>B. menziesii</i>	10	7	70%	16	6	38%	13	10	77%

Porcentaje de brotación de explantes subcultivados *in vitro* de *B. attenuata*, *B. coccinea*, *B. ericifolia* y *B. menziesii* en diferentes tratamientos.

Especie	Tratamientos											
	CONTROL				MS s/ Ca				MS s/ P			
	Inicial	Vivos	Brotación	% Brotación	Inicial	Vivos	Brotación	% Brotación	Inicial	Vivos	Brotación	% Brotación
<i>Banksia attenuata</i>	10	5	3	30%	10	6	0	0%	14	10	0	0%
<i>Banksia coccinea</i>	0	0	0	0%	2	2	0	0%	4	4	0	0%
<i>Banksia ericifolia</i>	7	0	0	0%	2	0	0	0%	15	0	0	0%
<i>Banksia menziesii</i>	10	7	2	20%	16	6	1	6%	13	10	2	15%

Leucospermum cv. "High Gold"

Resultado desinfección de Ensayo 1 en *Leucospermum* cv. "High Gold" iniciado *in vitro* la semana 52 y evaluado en la semana 2.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO			Promedio (%)
	1%	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)			
3	13,3 (2/15)	0,0 (0/15)	33,3 (5/15)	15,6
5	40,0 (6/15)	13,3 (2/15)	66,7 (10/15)	40,0
10	80,0 (12/15)	60,0 (9/15)	40,0 (6/15)	60,0
Promedio (%)	44,4	24,4	46,7	41,5

Resultado desinfección en *Leucospermum* cv. High Gold iniciado *in vitro* la semana 2 y evaluado en la semana 4.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO			Promedio (%)
	1%	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)			
5	38,5 (5/13)	66,7 (10/15)	30,8 (4/13)	46,3
10	38,5 (5/13)	60,0 (9/15)	38,5 (5/13)	46,3
Promedio (%)	38,5	63,3	34,6	46,3

Resultados desinfección en *Leucospermum* cv. High Gold iniciado *in vitro* la semana 5 y evaluado en la semana 9.

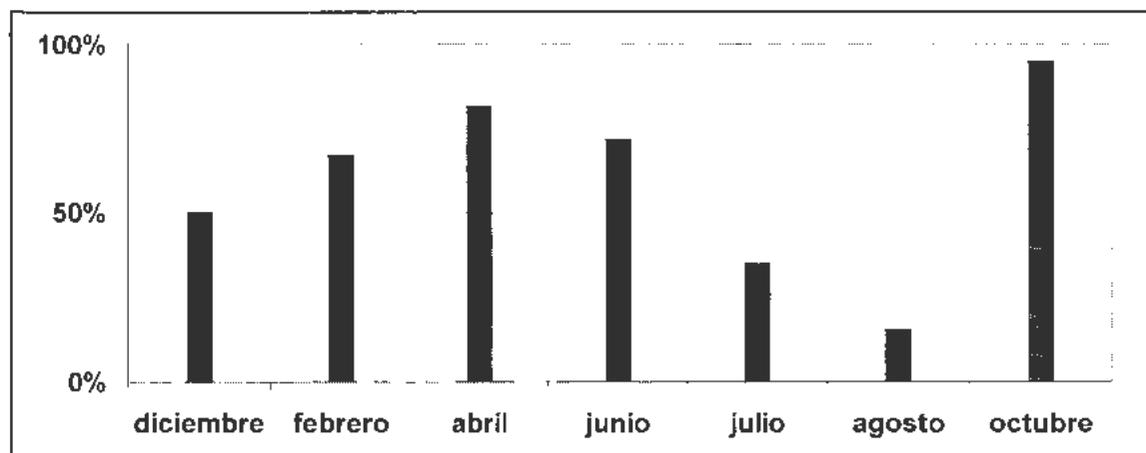
TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO		<i>Promedio</i> (%)
	1%	3%	
	Explantos desinfectados (%)		
5	20,0 (3/15)	46,7 (7/15)	33,3
10	26,7 (13/15)	20,0 (3/15)	23,3
<i>Promedio (%)</i>	20,0	33,3	28,3

El tratamiento empleado en el Ensayo 4 (concentración de cloro de 3% por 5 min) es aquel que arrojó el mayor porcentaje de desinfección manteniendo la viabilidad del explante. Si bien la brotación de los explantes en los Ensayos 1 y 3 ha sido satisfactoria, en el experimento 4 se probó la acción de diferentes reguladores de crecimiento (ANA, BAP y TDZ).

Resultado desinfección de Ensayo 4 en *Leucospermum* cv. High Gold iniciado *in vitro* en la semana 11 y evaluado en la semana 12.

Regulador de crecimiento	Explantos desinfectados (%)
BAP	91,7 (11/12)
ANA + BAP	100,0 (15/12)
TDZ	83,3 (10/12)
Control	75,0 (9/12)
<i>Promedio (%)</i>	87,5

Al igual que en *B. coccinea*, el tiempo de cultivo no permitió inferir acerca del efecto de los reguladores de crecimiento. Sin embargo, los altos porcentajes de descontaminación demostraron la efectividad del método de desinfección implementado.



Frecuencia de desinfección en iniciación *in vitro* de ápice de brotes de la temporada de *Leucospermum* cv. High Gold, evaluada en la cuarta semana de cultivo en cámara de crecimiento ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo de 16 horas luz. Variación estacional desde diciembre de 2005 hasta octubre de 2006.

Número de yemas por explante y efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la frecuencia de brotación *in vitro* sobre ápices de brotes de la temporada de *Leucospermum* cv. High Gold, evaluada en la semana 14 de cultivo en cámara de crecimiento ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo de 16 horas luz.

Regulador de crecimiento	Tipo explante	N° Explantes iniciados	N° yemas con brotes			Brotos/ explantes iniciados
			c/ápice	s/ápice	Total	
BAP	Ápice	12	12	9	21	1,8
ANA+BAP /TDZ	Ápice	12	18	13	31	2,6
TDZ	Ápice	12	4	8	12	1,0
CONTROL	Ápice	12	7	3	10	0,8

El uso de un pre-tratamiento de ANA+BAP por 7 días y luego subcultivado a TDZ presentó el mayor número de brotes (2,58 brotes) por explante iniciado luego de 94 días de cultivo. BAP presentó una tasa de 1,75 brotes/explante iniciado. Tratamiento con TDZ y Control presentaron una tasa de 1,0 y 0,83 brotes/explante. La cantidad de brotes formados desde yemas laterales de explantes con ápice fue mayor que los brotes formados desde explantes sin ápice, 55,4% y 44,6% respectivamente.

Número de yemas por explante y efecto de reguladores de crecimiento vegetal sobre la frecuencia de brotación *in vitro* sobre ápices de brotes de la temporada de *Leucospermum* cv. High Gold, evaluada en la semana 14 de cultivo en cámara de crecimiento ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo de 16 horas luz.

Regulador de crecimiento	Tipo explante	Nº Explantes iniciados	Yemas brotadas (%)
BAP	Ápice	15	75,7
ANA+BAP /TDZ	Ápice	15	81,5
TDZ	Ápice	15	91,7
CONTROL	Ápice	15	53,7

El uso de un pre-tratamiento de ANA+BAP por 7 días y luego subcultivado a TDZ y TDZ (sólo) presentaron el mayor porcentaje de yemas brotadas por explante iniciado luego de 94 días de cultivo, 81,5 y 91,7% respectivamente. BAP presentó un porcentaje de yemas brotadas de 75,7%.

Número de yemas por explante y efecto de reguladores de crecimiento vegetal en la frecuencia de brotación *in vitro* en ápice de brotes de la temporada de *Leucospermum* cv. High Gold, evaluada en la semana 5 de cultivo en cámara de crecimiento ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo de 16 horas luz.

Regulador de crecimiento	Tipo de Explante	Nº Explantes Iniciados	Explantes desinfectados	Explantes muertos	Nº Yemas	Nº Yemas Brotadas
BAP	Ápice	13	10 76,92%	3 23,08%	83 8,3	37 44,58%
ANA+BAP Kinetina	Ápice	13	12 92,31%	1 7,69%	70 5,8	5 7,14%
Kinetina	Ápice	13	10 76,92%	3 23,08%	75 7,5	38 50,67%
Control	Ápice	13	11 84,62%	2 15,38%	80 7,3	31 38,75%

El número de yemas laterales iniciales por explante se encontró entre 5,8 y 8,3 y la frecuencia de brotación se encontró entre 7,14% y 50,67%. El pre-tratamiento con ANA+BAP y subsiguiente traspaso a medio suplementado con Kinetina no tuvo efecto y el suplemento BAP o de Kinetina (sola) mostraron la mayor frecuencia de brotación de yemas laterales.

Ensayo iniciales de multiplicación de brotes en *Leucospermum* cv. High Gold mostraron que el mejor tratamiento para la elongación de brotes correspondió a medio MS suplementado con $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP + $2,0 \text{ mg L}^{-1}$.

Por otra parte, medio MS suplementado con BAP ó 2iP no mostró diferencias significativas con medio WPM suplementado con BAP ó 2iP, en iguales concentraciones de citocininas, alcanzando una tasa de formación de brotes de 1,0 brotes/explante inicial.

Esto contrasta con el resultado obtenido en el ensayo IV donde MS suplementado con 1,0 mgL⁻¹ BAP presentó una tasa de 1,75 brotes/explante inicial.

El último ensayo en desarrollo se desarrolló para comparar el medio MS y WPM con dos tipos de citocininas como son BAP y 2iP y a diferencia del anterior se usó un brote individual, éste fue medido en su altura para comparar su comportamiento en los medios de multiplicación ya descritos.

Largo de brotes iniciales de *Leucospermum* cv. High Gold, y efecto de dos medios de cultivo para multiplicación de brotes individuales (MS y WPM) suplementados con dos fuente de citocininas (BAP ó 2iP). Condiciones de cultivo en cámara de crecimiento (25±2°C) con fotoperíodo de 16 horas luz.

Medio de cultivo	Explantes iniciales	Largo promedio de brote	Explantes	
	Nº	mm	Contaminados	Necrosados
MS + BAP	15	13,1	0	1
MS + 2iP	15	13,6	0	1
WPM + BAP	15	19,3	0	0
WPM + 2iP	15	16,0	1	0

Efecto de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (BAP, ANA, Kinetina y TDZ) sobre la brotación in vitro de Leucospermum 'High Gold'.

A partir de los resultados obtenidos a la décima semana de iniciado el cultivo *in vitro*, se puede apreciar en el cuadro 21 que con excepción de Kinetina, el porcentaje de descontaminación se encontró en un rango desde 73% hasta 87%.

Efecto de BAP, Kinetina, TDZ y ANA+BAP en el número de yemas brotadas por explante y en el porcentaje de yemas brotadas de *Leucospermum* 'High Gold' luego de diez semanas de iniciado el cultivo *in vitro*.

RCV	Nº Explantes Iniciados	Explantes vivos (%)	Nº Yemas	Yemas Brotadas (%)	
BAP	28	78,6	190	21,6	b ⁽¹⁾
ANA+BAP Kinetina	13	77	58	8,6	b
ANA+BAP TDZ	15	73,3	126	48,4	a
Kinetina	13	38,5	37	62,2	a
TDZ	15	86,7	156	58,3	a
Control	28	85,7	216	18,5	b

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

El mejor tratamiento para la brotación de yemas axilares fue Kinetina (62,2%), sin embargo no difiere estadísticamente de TDZ (58,3%) como así mismo de ANA + BAP/TDZ (48,4%). No obstante se realizó un análisis cualitativo a los brotes de las yemas en donde sí se vio diferencia entre los brotes formados con Kinetina versus los formados con TDZ, ya que se observó un mayor y mejor desarrollo de los brotes que se formaron a partir de TDZ.

Efecto del subcultivo a medio MS basal suplementado con tiadiazuron (TDZ) sobre la multiplicación de brotes múltiples de Leucospermum 'High Gold'.

Luego de cuatro semanas de iniciado el subcultivo *in vitro*, el número de brotes múltiples vivos fue de 3,9 brotes/ explante. En los explantes iniciales se pudo observar un mayor desarrollo de las yemas axilares de la parte apical, y fueron estos brotes los cuales tuvieron una mejor estabilización en la etapa de multiplicación.

Efecto del subcultivo a medio MS basal suplementado con tiadiazuron (TDZ) sobre la multiplicación in vitro de brotes elongados de Leucospermum 'High Gold'.

Luego de cuatro semanas de iniciado el subcultivo *in vitro* no se observó aumento en el número de brotes elongados, los brotes se mantuvieron en iguales condiciones de desarrollo. Posterior a la evaluación los brotes fueron subcultivados a medio MS fresco.

Efecto del subcultivo a medio MS basal suplementado con BAP sobre la multiplicación in vitro de brotes elongados de Leucospermum 'High Gold'.

Luego de 7 semanas de iniciado el subcultivo *in vitro* a medio MS más BAP el número de brotes múltiples vivos fue de 2,8 brotes/ explante. Los brotes laterales fueron cortados y subcultivados a medio fresco para un nuevo ciclo de 7 semanas.

En resumen para las etapas del cultivo desarrolladas para *Leucospermum 'High Gold'*: iniciación, brotación y multiplicación de brotes múltiples y de brotes elongados se concluye que:

1. De la sub-etapa de iniciación se desprende que la tasa de brotación se encuentra entre 58 a 62% del total de yemas laterales por brote apical brotadas y que la tasa de formación de brotes múltiples es de 3,9 por explante, en cuatro semanas de cultivo.
2. De la sub-etapa de multiplicación de brotes múltiples se desprende una tasa de 2,3 brotes, en cuatro semanas de cultivo.
3. De la sub-etapa de multiplicación de brotes elongados se desprende una tasa de multiplicación de 2,8 brotes, en siete semanas de cultivo.

Otros ensayos no detallados en el presente informe demostraron que no existió diferencia, en la etapa de multiplicación, entre medio basal MS y WPM. Por otro lado tamaños de explante pequeños (primordios foliares unitarios con su yema correspondiente) no proliferaron tanto en medio basal MS como WPM suplementados con citocininas como 2iP o BAP.

Efecto de diferentes tipos de reguladores de crecimiento (BAP y Kinetina) sobre la brotación in vitro de Leucospermum 'High Gold'.

Los brotes apicales iniciados en el tratamiento con BAP produjeron un total de 16 brotes con una tasa de formación de 1,1 brotes/ brote apical. Para el caso de Kinetina la tasa fue 1,9 brotes/ brote apical. En comparación con TDZ que en iguales condiciones presentó una tasa de 3,9 brotes compactos/ brote apical.

Efecto de BAP y Kinetina sobre frecuencia de brotes apicales con yemas brotadas, porcentaje de brotación yemas y número de brotes formados *in vitro*.

Tratamientos	Ápices con yemas brotadas (%)	Nº yemas/ Nº brote	Brotación (%)	Nº brotes obtenidos
BAP	50,0	17,3	22,5 a	16 a
Kinetina	100,0	13,3	39,6 b	32 b

Se encontró que existe diferencia estadística, en la iniciación *in vitro* de brotes apicales de *L. 'High Gold'*, donde el mejor tratamiento correspondió a medio MS suplementado con Kinetina (39,6% de brotación de las yemas y 32 brotes).

A partir de la información de todos los experimentos, de iniciación y brotación realizados hasta la fecha, se determinó que el medio MS suplementado con 4,5 μM TDZ ó medio MS suplementado con 13,3 μM ANA + 13,3 BAP y luego subcultivo a medio MS suplementado 4,5 μM TDZ difieren estadísticamente de los otros tratamientos y presentaron un rango de brotación de yemas laterales entre 61 y 68% de las yemas. No existe diferencia entre los tratamientos con BAP y Kinetina, pero sí con el tratamiento control sin reguladores de crecimiento ($\alpha=0.05$).

Efecto de diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento en la brotación *in vitro* de yemas laterales de brotes apicales de *Leucospermum* 'High Gold'.

Tratamientos	Yemas totales (N°)	Yemas brotadas (N°)	Brotación (%)
Control	274	71	25,9 c
BAP	375	117	31,2 bc
Kinetina (KN)	191	84	44,0 b
TDZ	223	152	68,2 a
ANA+BAP/ KN	58	5	8,6 d
ANA+BAP/ TDZ	204	125	61,3 a

Efecto de TDZ + GA₃ y TDZ en la elongación *in vitro* de brotes en *L.* 'High Gold'. Tiempo de cultivo de 59 días.

Tratamientos	Día 0	Día 17	Día 44	Día 51	Día 58
	Largo Brote (cm)				
TDZ + GA ₃	0	0,38	0,462	0,446	0,481 a
TDZ	0	0	0,455	0,472	0,667 b

Efecto de TDZ + GA₃ y TDZ en el número de brotes producidos *in vitro* en *L.* 'High Gold'. Tiempo de cultivo de 59 días.

Tratamientos	Día 0	Día 17	Día 44	Día 51	Día 58
	N° de brotes				
TDZ + GA ₃	0	3,27	3,15	5,36	10,1 a
TDZ	0	0	5,1	8,55	11,1 b

Se determinó que el tratamiento de 4,54 μ M TDZ suplementado a medio MS presentó la mayor elongación de brotes con 0,67 cm y el mayor número de brotes con 11,1 brotes/ brote compacto, presentando diferencia significativa en ambos casos con respecto de TDZ + GA₃ suplementado a medio MS.

Efecto de TDZ en el aumento del número de brotes compactos formados in vitro en 28 días de cultivo.

Los brotes compactos mantenidos en medio MS + TDZ presentan una tasa de multiplicación de 1,0 brotes compactos cada 4 semanas. Pero aumenta el número de brotes y la elongación de los brotes unitarios.

Efecto de TDZ sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de brotes compactos en *L. 'High Gold'*. Tiempo de cultivo de 28 días.

Nº Ciclos multiplicación	Brotes iniciales	Brotes finales	Tasa multiplicación
1	38	40	1,1
2	29	32	0,9

Efecto del subcultivo a medio MS basal suplementado con BAP o sin RCVs sobre la multiplicación de brotes elongados de Leucospermum 'High Gold'.

La tasa de multiplicación de brotes elongados en promedio es de 2,6 brotes elongados cada 7 semanas de cultivo por cada brote elongado iniciado en cada ciclo. El rango obtenido varió entre una tasa de 2,8 y de 2,5 brotes cada 7 semanas.

Efecto de BAP sobre la tasa de multiplicación *in vitro* de brotes elongados en *L. 'High Gold'*. Tiempo de cultivo de 7 semanas.

Nº Ciclos multiplicación	Brotes iniciales	Brotes finales	Tasa multiplicación
1	14	39	2,8
2	37	99	2,7
3	36	90	2,5
4	45	112	2,5

Efecto de protocolo de iniciación y brotación in vitro desarrollado para L. 'High Gold' en brotes apicales de Leucospermum 'Sucesión II'.

Los brotes apicales de *Leucospermum* 'Sucesión II' fueron iniciados *in vitro* con el protocolo desarrollado para *L. 'High Gold'* (Errandonea, 2006 y Ríos, 2007) presentando una tasa de esterilización de 32% y el 71,4% de los brotes apicales iniciados en medio MS + TDZ presentaron al menos una de sus yemas laterales brotadas.

Efecto de TDZ y Kinetina sobre el porcentaje de brotación de yemas laterales de brotes apicales iniciados *in vitro* de *Leucospermum* 'Succession II'. Tiempo de cultivo de 4 semanas.

Tratamiento	Brotes apicales iniciados	Brotes apicales vivos (%)	Brotes apicales con yemas brotadas (%)
TDZ	15	46,7	71,4
Kinetina	16	18,8	0,0

Efecto de medio MS sin suplemento de reguladores de crecimiento en la inducción de raíces adventicias en brotes elongados de L. 'High Gold'.

Los brotes elongados, subcultivados a medio MS sin suplemento de reguladores de crecimiento, al cabo de 4 semanas de cultivo no presentaron formación de raíces adventicias.

Efecto de diferentes tipos de reguladores de crecimiento (TDZ, BAP y Kinetina) sobre la brotación in vitro de L. 'High Gold', suplementados a medio MS sin azúcar y con permeabilidad parcial a gases.

Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *Leucospermum* 'High Gold' iniciados *in vitro* y número de explantes eliminados debido a contaminación u oxidación de fenoles.

Tratamiento	N° de explantes	N° de explantes eliminados por:		N° total de explantes eliminados	Porcentaje de sobrevivencia (%)
		Hongos	Etiolación		
MS 100% + BAP (sin filtro)	15	1	0	1	93,3
MS 100% + TDZ (con filtro)	15	0	1	1	93,3
MS 100% + BAP (con filtro)	15	0	0	0	100,0
MS 100% + Kinetina (con filtro)	15	0	0	0	100,0

La frecuencia de sobrevivencia al cambiar a medio sin azúcar y contenedor con membrana permeable a gases se sitúa entre 93 y 100% de los explantes vivos y no difiere del control (MS 100% + azúcar + BAP, sin filtro).

Frecuencia de sobrevivencia de explantes de *Leucospermum* 'High Gold' subcultivados a medio MS sin azúcar y con membrana permeable parcialmente a gases.

Tratamiento	N° de explantes	Frecuencia de sobrevivencia	% explantes con brote	N° promedio de brotes/ explantes
Control	76	72/76	72	3,8
TDZ	16	14/16	93	10,9
BAP	17	16/17	100	8,4
KINETINA	16	14/16	57	3,0

Se observó que ya a las tres semanas de cultivo los brotes de *Leucospermum* cv. High Gold subcultivados a medio MS sin suplemento de azúcar y contenedor con membrana permeable a gases evidenciaban un mejor comportamiento en esta fase de multiplicación. En presencia de TDZ o BAP presentaron un mayor número de brotes con brotación de las yemas laterales, con un porcentaje de entre 100 y 93% respectivamente. Así también ocurrió con el número promedio de yemas laterales con brotación que fue de 11 y 8 yemas brotadas/ explante. Sin embargo, en medio suplementado con kinetina ocurre lo contrario, ambos parámetros son menores.

Leucospermum 'Succession II'

Efecto de un método de desinfección de explantes in vitro en brotes apicales de Leucospermum 'Succession II' y efecto de tres reguladores de crecimiento vegetal (TDZ, BAP, Kinetina) sobre el porcentaje de brotación de yemas axilares.

Porcentaje de sobrevivencia de explantes de *Leucospermum* 'Succession II' iniciados *in vitro* y número de explantes eliminados debido a contaminación u oxidación de fenoles.

Tratamiento	N° de explantes iniciados	N° de explantes eliminados por:		N° total de explantes eliminados	Sobrevivencia (%)
		Hongos	Oxidación fenoles		
TDZ	15	15	0	15	0,0
BAP	15	13	1	14	6,7
Kinetina	14	14	0	14	0,0

Los explantes iniciados de *Leucospermum* 'Succession II' debieron eliminarse por contaminación fúngica. A pesar de que se eliminó todo el material, se alcanzó a observar brotación lateral en el tratamiento con BAP.

Protea cv. Lady Di

Resultado desinfección de Ensayo 1 en *Protea* cv. Lady Di iniciado *in vitro* durante la semana 52 y evaluado en la semana 1.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO			Promedio (%)
	1%	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)			
3	0,0 (0/7)	42,8 (3/7)	71,4 (5/7)	38,1
5	14,3 (1/7)	42,9 (3/7)	71,4 (5/7)	42,9
10	0,0 (0/7)	85,7 (6/7)	71,4 (5/7)	50,0
Promedio (%)	5,0	55,0	70,0	43,3

La totalidad del plantel se descartó en la semana 2 debido a la muerte por oxidación de compuestos fenólicos. A partir de los resultados obtenidos en el Ensayo 1, el Ensayo 2 reprodujo los experimentos donde se lograron los más altos porcentajes de desinfección, esta vez agregando al medio ácido ascórbico en dos niveles (15 y 30 g L⁻¹) para el control de fenoles.

Resultado desinfección de Ensayo 2 en *Protea* cv. "Lady Di" iniciado *in vitro* la semana 2 y evaluado en la semana 3.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO		Promedio (%)
	3%	5%	
	Explantos desinfectados (%)		
5	53,9 (7/13)	66,7 (10/15)	60,7
10	61,5 (8/13)	40,0 (6/15)	50,0
Promedio (%)	57,7	50,0	55,4

El plantel de *Protea* cv. "Lady Di" del Ensayo 2 fue descartado completamente en la semana 4 por oxidación fenólica. Es por esto que en el Ensayo 3 se probaron la acción de tres antioxidantes: ácido ascórbico (50 mg L⁻¹), ácido cítrico (50 mg L⁻¹) y polyvinilpirrolidona (PVP, 7 g L⁻¹), además de la hidratación en una solución antioxidante (1500 mg L⁻¹ ácido cítrico y 100 mg L⁻¹ ácido ascórbico) por una hora antes del traspaso. También se disminuyó los niveles de cloro con el fin de evitar el deterioro que presentan los explantes producto de las altas concentraciones de cloro

Durante la visita al predio Flores del Fynbos, donde se mantuvo el plantel madre de estas especies, se realizó poda de rebaje a la mitad de las plantas madres dejando ramillas de madera de la temporada anterior de unos 15 cm de largo, lo anterior con el fin de favorecer el desarrollo de brotes jóvenes -menos lignificados- sobre éstas. Los resultados del Ensayo 3 no arrojaron diferencias entre los tres antioxidantes y el plantel nuevamente fue eliminado por la acción de fenoles luego de haber transcurrido dos semanas desde su iniciación. Sin embargo, esta vez sí se obtuvieron altos porcentajes de desinfección, lo cual se detalla en el siguiente cuadro.

Resultados de desinfección de Ensayo 3 en *Protea cv. Lady Di* iniciados *in vitro* durante la semana 5 y evaluados en la semana 6.

TIEMPO CONTACTO (min)	CONCENTRACION DE CLORO		Promedio (%)
	1%	3%	
	Explantos desinfectados (%)		
5	90,5 (19/21)	90,5 (19/21)	90,5 (19/21)
10	85,7 (18/21)	95,2 (20/21)	90,5 (19/21)
Promedio (%)	88,1	92,9	90,5

En el Ensayo 4 se experimentó con explantes más jóvenes, provenientes de la poda realizada a principios de febrero, utilizando bajos niveles de cloro (1% por 5 min) con el fin de mantener la viabilidad del plantel. Después de una semana desde la iniciación los explantes jóvenes no presentan oxidación por fenoles pero sí deterioro al parecer por acción del cloro.

Resultado desinfección de Ensayo 4 en *Protea cv. Lady Di* iniciado *in vitro* en la semana 11 y evaluado en la semana 12.

Regulador de crecimiento	Explantos desinfectados (%)
BAP	100,0 (25/25)
ANA + BAP	96,0 (24/25)
TDZ	92,0 (23/25)
Promedio (%)	96,0

Después de una semana desde la iniciación los explantes jóvenes no presentaron oxidación por fenoles pero sí deterioro al parecer por acción del cloro, por lo que la

totalidad del plantel fue eliminado después de la evaluación en la semana 12. De esto se infiere que los brotes más jóvenes son más adecuados para la micropropagación al no presentar exudación de fenoles. Sin embargo, experimentos posteriores debieron considerar menores concentraciones de cloro –o la posibilidad de otro desinfectante– debido a los problemas exhibidos por sensibilidad a éste.

No se observaron diferencias entre los dos tipos de explantes y entre los explantes colocados en medio con y sin antioxidantes; el deterioro en ambos fue concordante.

Tasa de sobrevivencia en explantes etiolados por medio de bolsa de papel café, bajo sombrero y control (ensayo 8) en *Protea cv. Lady Di* iniciado *in vitro* la semana 34 y evaluado al cuarto día de cultivo.

METODO	Tipo de Explante	Explantes Iniciados	Explantes muertos	% Sobrevivencia
Bolsa papel café	Ápice	15	11	26,7%
	Subapical	13	0	100,0%
Malla sombreadora	Ápice	5	3	40,0%
	Subapical	5	1	80,0%
Control	Ápice	10	10	0,0%
	Subapical	9	9	0,0%

Los explantes muertos corresponden a la acción de los fenoles exudados por lo explantes que producen rápidamente la necrosis de los tejidos. Los explantes etiolados mediante bolsa de papel café lograron una tasa de sobrevivencia de 60,7% y los explantes bajo malla rashell de 60,0%, no existiendo mayor diferencia. Sin embargo los explantes sub-apicales de los brotes de plantas etioladas alcanzaron un 100% de sobrevivencia. Ápices de brotes de la temporada sin tratamiento de etiolación de brotes presentaron una nula tasa de sobrevivencia. Esto compruebo que la metodología para obtener explantes iniciados *in vitro* requiere de la etiolación de los brotes por al menos 5 semanas, el corte y transporte de los brotes junto con la iniciación debe realizarse el mismo día y la desinfección de los brotes debe hacerse con cloro 5% (v/v) por cinco minutos y tres enjuagues con agua destilada.

Tasa de sobrevivencia en explantes nodales provenientes de explantes etiolados en *Protea cv. Lady Di* iniciado *in vitro* la semana 34 y evaluado al cuarto día de cultivo. Medio MS suplementado con TDZ en cuatro concentraciones (0 – 1 – 5 – 10 mg L⁻¹)

Concentración TDZ (mg/L)	Tipo de Explante	Nº Explantes Iniciados	% Sobrevivencia	Explantes contaminados	Explantes muertos	Nº Yemas hinchadas
0	Y-Subapical	15	13	2	13	4
	Frecuencia	15	86,67%	13,33%	86,67%	26,67%
1	Y-Subapical	15	14	1	14	4
	Frecuencia	15	93,33%	6,67%	93,33%	26,67%
5	Y-Subapical	15	11	4	11	7
	Frecuencia	15	73,33%	26,67%	73,33%	46,67%
10	Y-Subapical	15	11	4	11	0
	Frecuencia	15	73,33%	26,67%	73,33%	0,00%

La frecuencia de desinfección se encontró en un rango desde 73,3% y hasta un 93,3% para explantes nodales. TDZ en concentración de 27,25 µM presentó el mayor número de yemas ‘hinchadas’ aunque no se desarrollaron brotes propiamente tal. En este

caso el principal problema sigue siendo la oxidación por fenoles ya que los explantes nodales necrosaron finalmente por esta misma causa.

Efecto de la etiolación parcial de brotes como pre-tratamiento en plantas madre sobre la exudación de fenoles en el establecimiento in vitro de Protea 'Lady Di'.

Los resultados de este experimento se pudieron observar al tercer día de iniciado *in vitro* el cultivo. En el siguiente cuadro se puede observar el efecto de los tratamientos aplicados en las plantas madre y en el tipo de explante ocupado para el control de la oxidación del explante por fenoles. Se observó que el mejor método fue cubrir con bolsa de papel café utilizando como explante el segmento subapical, con 100% de explantes vivos. La descontaminación de los explantes fue de un 100%.

Efecto de sobrevivencia *in vitro* de *Protea* 'Lady Di' a partir de tres tratamientos en plantas madre.

Tratamiento	Tipo de Explante	Explantes Iniciados	Explantes vivos (%)
Bolsa papel café	Ápice	15	26,7 c ⁽¹⁾
	Subapical	13	100,0 a
Malla sombra	Ápice	5	40,0 bc
	Subapical	5	80,0 b
Control	Ápice	10	0,0 d
	Subapical	9	0,0 d

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

En el siguiente cuadro se observa que existen diferencias significativas en la comparación de medias entre distintos segmentos del explante, siendo subápice el que tuvo mejor respuesta al cultivo *in vitro*.

Efecto de sobrevivencia *in vitro* de *Protea* 'Lady Di' a partir de diferentes tipos de explante.

Tipo de Explante	Explantes Iniciados N°	Explantes vivos (%)
Ápice	30	20,0 b ⁽¹⁾
Subápice	27	62,7 a

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

A partir del subcultivo en medio MS 100% más TDZ en diferentes concentraciones, no se observó respuesta alguna del explante, sólo que este se iba deteriorando debido a la acción de fenoles, por lo que fue descartado a la cuarta semana de iniciado el cultivo *in vitro*.

Efecto de la etiolación parcial de brotes como pre-tratamiento en plantas madre, de reguladores de crecimiento y antioxidantes sobre la exudación de fenoles en el establecimiento de *Protea* 'Lady Di' *in vitro*.

Como se observa en el siguiente cuadro, a la cuarta semana de iniciado el cultivo *in vitro*, el tratamiento que presentó una mejor respuesta fue control - subapical con un 80% de explantes vivos, el cual no difiere estadísticamente con malla sombreadora - subapical. La desinfección obtenida fue de un 90,23%.

Efecto de sobrevivencia de *P. 'Lady Di'* a partir de tres tratamientos en plantas madre, durante la cuarta semana de iniciado el cultivo *in vitro*.

Tratamiento	Tipo de Explante	Explantes Iniciados	Explantes vivos (%)
Bolsa papel café	Ápice	14	0,00 c ⁽¹⁾
	Subapical	14	0,00 c
	Seg nodal	15	0,00 c
Malla sombra	Ápice	15	33,3 b
	Subapical	15	73,3 a
	Seg nodal	15	73,3 a
Control	Ápice	15	66,7 a
	Subapical	15	80,0 a
	Seg nodal	15	33,3 b

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

El cuadro 25 presenta cómo afecta el tipo de explante en la muerte de estos por la oxidación por fenoles, ya que se observa que el subápice tuvo un 57,3% de explantes vivos.

Efecto de sobrevivencia *in vitro* de *P. 'Lady Di'* a partir de diferentes tipos de explante.

Tipo de explante	Explantes Iniciados N°	Explantes vivos (%)
Ápice	44	34,1 b ⁽¹⁾
Subapical	44	52,3 a
Segmento nodal	45	35,6 b

⁽¹⁾ Valores seguidos de igual letra en cada columna no presentan diferencia significativa, según el procedimiento de comparación de medias de Scheffé modificado para proporciones ($P = 0,05$).

Organogénesis directa en *Protea* 'Lady Di'.

En las dos iniciaciones de *Protea* 'Lady Di', independiente del tipo de explante tratado, la principal causa de mortalidad de los explantes fue la oxidación de los fenoles exudados por los tejidos. Ningún explante alcanzó a exhibir alguna respuesta a cualquier concentración de TDZ antes de morir por la oxidación de fenoles.

Organogénesis indirecta en *Protea* 'Lady Di'.

En los experimentos realizados para inducir callo a partir de explantes de lámina foliar y segmentos nodales, la mayor parte de los explantes murió por oxidación de compuestos fenólicos. Los segmentos nodales, a pesar de haber muerto por oxidación de fenoles al completar la etapa que se estimó para conservarlos en oscuridad, mostraron respuesta a dos tratamientos con 2,4-D, a concentraciones de 3 y 6 μM , generaron callo después de tres semanas de haber iniciado los explantes. Los resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Número y porcentaje de explantes de *Protea* 'Lady Di' que generaron callo después de seis semanas desde la iniciación en medio MS suplementado con distintas concentraciones de 2,4-D y Picloram.

Iniciación	Tratamiento	N° de explantes iniciados	N° de explantes con callos	Porcentaje de generación de callo (%)
1 ^a	Control	16	0	0,0
	2,4-D 10 μM	16	0	0,0
	2,4-D 20 μM	16	0	0,0
	2,4-D 40 μM	16	0	0,0
	Picloram 10 μM	16	0	0,0
	Picloram 20 μM	16	0	0,0
	Picloram 40 μM	16	0	0,0
2 ^a	Control	12	0	0,0
	2,4-D 3 μM	12	3	25,0
	2,4-D 6 μM	12	1	8,3
	2,4-D 12 μM	10	0	0,0
	Picloram 3 μM	12	0	0,0
	Picloram 6 μM	10	0	0,0
	Picloram 12 μM	10	0	0,0

- Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.
- Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.

Resultados Esperados y Logrados por Objetivo

Obj. Esp. N°	Activ. N°	Resultado Esperado	Indicador	Meta Final	Resultado alcanzado	Razón que explican discrepancia
Alstroemeria (especie rizomatosa)						
1	1.1	Establecimiento de una colección de plantas madres en dependencias PUC y Vivero Pumahuida	Número de plantas madres por cultivar (6) por lugar	10 plantas en PUC y 10 en Pumahuida.	40 total	Superado
	1.2	Establecimiento de protocolos de iniciación in vitro	Número de cultivares iniciados in vitro	3	8	Superado
	1.3	Aumento de las tasas de crecimiento, multiplicación y proliferación	Tasa de multiplicación de explantes (cultivares iniciados)	4x cada seis semanas	1.5-3x cada seis semanas	Variabilidad genética y dificultades asociadas a ambiente más apropiado para cada una de ellas
	1.3.3	Control de vitrificación	Número de protocolos para control de vitrificación (1 cultivar)	1	0	No se presentó este problema en las especies estudiadas
	1.4	Aumento en el crecimiento estructuras de reserva	Porcentaje de incremento con respecto a protocolos convencionales	50%	50%	Logrado con uso de reguladores de crecimiento nuevo (paclobutrazol)

			(2 cultivares)			
	1.5	Establecimiento de plantas en condiciones ex vitro	Sobrevivencia de plantas provenientes de multiplicación (cultivares iniciados)	80%	30%	Dificultades en el control ambiental del lugar de aclimatación y fechas del año más apropiada
2		Inicio de alstroemeria como unidad de desarrollo tecnológico in vitro a escala precomercial	Proceso implementado	100%	80%	Falta desarrollar afinar el sistema de aclimatación según punto anterior.
Peonía (especie con raíz tuberosa)						
1	1.1	Establecimiento de una colección de plantas madres en dependencias PUC.	Número de plantas madres por cultivar (3) por lugar	10 plantas por cultivar	3 plantas por cultivar	Dificultad para obtener plantas madres apropiadas (jóvenes) en el momento adecuado (otoño) y en una cantidad suficiente (pocas yemas disponibles por planta)
	1.2	Establecimiento de protocolos de iniciación in vitro	Número de cultivares iniciados in vitro	2	3	Superado
	1.3	Multiplicación y proliferación de explantes	Tasa de multiplicación de explantes (cultivares iniciados)	3x cada ocho semanas	1,5x cada ocho semanas	Especies más recalcitrantes de lo esperado.
	1.4	Formación de raíces tuberosas y obtención de raíces adventicias	Frecuencia de formación de estructuras subterráneas (cultivares iniciados)	70%	0%	No se pudo superar la etapa de multiplicación vegetativa anterior.

	1.5	Establecimiento de plantas en condiciones ex vitro	Sobrevivencia de plantas provenientes de multiplicación (cultivares iniciados)	50%	0%	No se pudo superar la etapa de multiplicación vegetativa anterior.
2		Inicio de peonía como unidad de desarrollo tecnológico in vitro a escala precomercial	Proceso implementado	100%	50%	Se pudo lograr establecimiento a partir de yemas (varios cultivares) e inducción de estados embriogénicos, luego de lo cual no se pudo avanzar a etapas posteriores.
Proteáceas (especie leñosa)						
1	1.1	Establecimiento de una colección de plantas madres en dependencias predio Flores de Fynbos	Número de plantas madres por cultivar (3) por lugar	5 plantas por cultivar	5 plantas por cultivar	Logrado
	1.2	Establecimiento de un protocolo de iniciación in vitro	Número de cultivares iniciados in vitro	1	3	Superado
	1.3	Multiplicación y proliferación de explantes	Tasa de multiplicación de explantes (cultivares iniciados)	2x cada seis semanas	2x cada seis semanas (Leucospermum)	Logrado
	1.4	Formación de raíces adventicias	Frecuencia de enraizamiento de explantes (cultivares iniciados)	20%	0%	Especies muy recalcitrantes. Se espera que en el futuro próximo se logre esta etapa para Leucospermum
	1.5	Establecimiento de plantas en condiciones ex vitro	Sobrevivencia de plantas (explantes enraizados)	20%	0%	No se pudo superar la etapa de enraizamiento anterior.

2		Inicio de proteáceas como unidad de desarrollo tecnológico in vitro a escala precomercial	Proceso implementado	100%	100%	Se pudo lograr establecimiento a partir de yemas (varios cultivares) e inducción de estados de multiplicación en alguno de ellos, luego de lo cual no se pudo avanzar a etapas posteriores.
Difusión y Transferencia Tecnológica						
4	4.1	Realización de charlas y talleres de transferencia de avance de actividades	Número de charlas y talleres	2	2 (nacional e internacional)	Avance más lento del estimado provocó tener menos resultados interesantes a nivel nacional
	4.2	Realización de sitio Web de difusión	Sitio Web	100% habilitado	100%	Logrado
	4.3	Asistencia a congresos nacionales	Número de congresos	2	2	Logrado
	4.4	Asistencia a congresos internacional	Número de congresos	1	1	Logrado
	4.5	Asistencia a simposio o convención internacional	Número de simposios	1	1	Logrado
	4.6	Realización de publicaciones científicas	Número de publicaciones	3	1	Falta de resultados publicables en revistas científicas. Se logró publicar el trabajo resultante de proteáceas.
	4.6	Realización de publicaciones de extensión	Número de publicaciones	2	0	Resultados no aplicables a nivel comercial aún.
	4.7	Realización de seminario de cierre de proyecto	Número de seminarios	1	0	Pendiente a definir fecha próxima

5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

- Fichas técnicas y de costos del o los cultivos, rubros, especies animales o tecnologías que se desarrolló en el proyecto (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

Para efectos prácticos y representativos de los resultados del proyecto, uno de los valores relevantes para el mercado de los viveros y plantas ornamentales es el valor obtenido por cada planta final. En base a esto es que se ha definido como objetivo del cálculo económico, determinar el valor de la planta obtenida de la multiplicación in vitro en cada caso. Se han definido tres tipos de especies, según grado de complejidad, conocimientos técnicos de su cultivo in Vitro en Chile y el Mundo y su grado de avance dentro del proyecto. A continuación se presentarán las tres especies abordadas dentro del proyecto, desde la Alstroemeria, pasando por la Peonía herbácea, hasta la Protea, con sus respectivas fichas de costos estimadas en función de los avances logrados y esperados a futuro, pues en Peonía y Protea todavía se está avanzando en lograr resultados más efectivos y viables que los obtenidos hasta la fecha.

Supuestos utilizados:

El valor de las plantas madres y/o plantas originales no se considera dentro del cálculo de los productos del laboratorio porque son normalmente aportados por el cliente solicitante del servicio. De hecho se constituye en uno de sus activos de valor, por lo cual debe ser respaldado, según lo solicitado.

Se estandarizan procedimientos, dentro de especie, de modo de reflejar una situación promedio, a pesar de que se reconoce que cada cultivar o variedad pueden constituir un procedimiento nuevo.

Valor del dólar estimado para fines del año 2009.

No se considera el costo y tiempo de preparación de plantas madres para ingreso de explantes a condiciones de iniciación. Se planteará como un requisito y/o procedimiento previo para los potenciales clientes del servicio.

No se incluye diferenciación por técnicas especiales utilizables in Vitro, por estar todavía en proceso de validación (por ejemplo, embriogénesis somática).

Se incluyen valores de amortización de infraestructura y equipamiento, sin embargo en términos reales no constituirían un desembolso efectivo de caja para efectos de este laboratorio, o al menos no estarían directamente imputados a esta unidad, constituyéndose en costos indirectos o generales.

No se considera el efecto tiempo o época del año para el inicio del servicio del laboratorio. Es un aspecto a considerar en la aplicación real a los cultivos o especies potencialmente multiplicables in Vitro, pues existe un mejor o único momento del año para multiplicar algunas de ellas. Esto incide significativamente en los costos o incluso puede no reportar resultados positivos.

A continuación se presentan las fichas de costos reales/estimadas por especie evaluada:

Caso 1: Ficha equivalente especie Alstroemeria

ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,00%
Costo Medios	1.912	3,7%	12.621	12,5%	9.794	17,4%	24.328	11,64%
Costo RCVs	267	0,5%	1.353	1,3%	1.353	2,4%	2.973	1,42%
Uso Infraestructura	6.932	13,3%	60.718	60,4%	27.729	49,4%	95.380	45,63%
Costo Mano de Obra	43.182	82,6%	25.909	25,8%	17.273	30,8%	86.365	41,31%
		0,0%		0,0%		0,0%		
SUB-TOTAL COSTO	52.293	100,0%	100.601	100,0%	56.149	100,0%	209.045	100,00%
Nº Plantas Finales	356		339		322			
COSTO POR PLANTA FINAL	162,6		312,8		174,6	\$	649,91	649,9
	25,0%		48,1%		26,9%	US\$	1,25	
						Valor dólar:	520	

Caso 2: Ficha equivalente especie Alstroemeria sin fase de aclimatación.

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO								
ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	#¡DIV/0!	0	0,00%
Costo Medios	1.912	3,7%	12.621	12,5%	0	#¡DIV/0!	14.533	9,51%
Costo RCVs	267	0,5%	1.353	1,3%	0	#¡DIV/0!	1.620	1,06%
Uso Infraestructura	6.932	13,3%	60.718	60,4%	0	#¡DIV/0!	67.651	44,25%
Costo Mano de Obra	43.182	82,6%	25.909	25,8%	0	#¡DIV/0!	69.092	45,19%
		0,0%		0,0%		#¡DIV/0!		
SUB-TOTAL COSTO	52.293	100,0%	100.601	100,0%	0	#¡DIV/0!	152.896	100,00%
Nº Plantas Finales	356		339					
COSTO POR PLANTA FINAL	154,4		297,1		#¡DIV/0!	\$	451,58	#¡DIV/0!
	34,2%		65,8%		#¡DIV/0!	US\$	0,87	
						Valor dólar:	520	

Caso 3: Ficha equivalente especie Peonía

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO								
ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATAACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,00%
Costo Medios	1.771	3,8%	8.499	7,7%	9.893	13,5%	20.163	8,77%
Costo RCVs	267	0,6%	1.353	1,2%	1.353	1,8%	2.973	1,29%
Uso Infraestructura	12.366	26,4%	60.967	55,6%	27.729	37,7%	101.063	43,94%
Costo Mano de Obra	32.386	69,2%	38.864	35,4%	34.545	47,0%	105.797	46,00%
		0,0%		0,0%		0,0%		
SUB-TOTAL COSTO	46.790	100,0%	109.683	100,0%	73.521	100,0%	229.995	100,00%
Nº Plantas Finales	300		228		325			
COSTO POR PLANTA FINAL	144,0		337,6		226,3	\$	707,89	707,9
	20,3%		47,7%		32,0%	US\$	1,36	
						Valor dólar:	520	

Caso 4: Ficha equivalente especie Peonía sin fase de aclimatación

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO								
ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATAACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	#iDIV/0!	0	0,00%
Costo Medios	1.771	3,8%	8.499	7,7%	0	#iDIV/0!	10.270	6,56%
Costo RCVs	267	0,6%	1.353	1,2%	0	#iDIV/0!	1.620	1,04%
Uso Infraestructura	12.366	26,4%	60.967	55,6%	0	#iDIV/0!	73.334	46,87%
Costo Mano de Obra	32.386	69,2%	38.864	35,4%	0	#iDIV/0!	71.251	45,54%
		0,0%		0,0%		#iDIV/0!		
SUB-TOTAL COSTO	46.790	100,0%	109.683	100,0%	0	#iDIV/0!	156.474	100,00%
Nº Plantas Finales	300		228					
COSTO POR PLANTA FINAL	205,2		481,1		#iDIV/0!	\$	686,29	#iDIV/0!
	29,9%		70,1%		#iDIV/0!	US\$	1,32	
						Valor dólar:	520	

Caso 5: Ficha equivalente especie Protea

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO								
ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATAACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,00%
Costo Medios	2.125	1,1%	11.332	6,3%	13.191	14,0%	26.648	5,81%
Costo RCVs	267	0,1%	1.353	0,8%	1.353	1,4%	2.973	0,65%
Uso Infraestructura	10.897	5,9%	62.214	34,8%	27.729	29,5%	100.840	21,99%
Costo Mano de Obra	172.727	92,9%	103.636	58,0%	51.818	55,1%	328.183	71,56%
		0,0%		0,0%		0,0%		
SUB-TOTAL COSTO	186.016	100,0%	178.535	100,0%	94.091	100,0%	458.644	100,00%
Nº Plantas Finales	240		228		433			
COSTO POR PLANTA FINAL	429,4		412,1		217,2	\$	1.058,73	1.058,7
	40,6%		38,9%		20,5%	US\$	2,04	
						Valor dólar:	520	

Caso 6: Ficha equivalente especie Protea sin fase de aclimatación

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO								
ITEM	INICIACION		ENRAIZAMIENTO		ACLIMATACION		SUBTOTAL	
	MULTIPLICACION							
	\$		\$		\$		\$	
Costo Material Parental	0	0,0%	0	0,0%	0	# DIV/0	0	0,00%
Costo Medios	1.771	3,8%	8.499	7,7%	0	# DIV/0	10.270	6,56%
Costo RCVs	267	0,6%	1.353	1,2%	0	# DIV/0	1.620	1,04%
Uso Infraestructura	12.366	26,4%	60.967	55,6%	0	# DIV/0	73.334	46,87%
Costo Mano de Obra	32.386	69,2%	38.864	35,4%	0	# DIV/0	71.251	45,54%
		0,0%		0,0%		# DIV/0		
SUB-TOTAL COSTO	46.790	100,0%	109.683	100,0%	0	# DIV/0 	156.474	100,00%
Nº Plantas Finales	300		228					
COSTO POR PLANTA FINAL	205,2		481,1		# DIV/0 	\$	686,29	# DIV/0
	29,9%		70,1%		# DIV/0	US\$	1,32	
						Valor dólar:	520	

A continuación se presentan cuadros con el detalle operacional de cálculo por cada fase de la producción y desarrollo de multiplicación in Vitro de plantas:

Detalle de cálculo por etapa de Iniciación-Multiplicación. Ej. Caso 1

PLANILLA COSTO POR PLANTA				SECCION CALCULO RCVs POR TRATAMIENTO								
INICIACION Y MULTIPLICACION				TRATAMIENTO 1				TRATAMIENTO 2				
	N° Plantas-Semillas	Costo unidad	Costo Total	Subtotales		[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total		[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total
Costo Material Parental	36	0	0	0	2,4-D	0,10	675	0,0675	Picloram	0,10	675	0,0675
Mantenición Plantas Madre					2,4-D	0,50	675	0,3375	Picloram	0,50	675	0,3375
	N° contenedores	mL x contenedor	Total mL Medio		2,4-D	1,00	675	0,6750	Picloram	1,00	675	0,6750
Total Medio	108	15	1.620		RCVs				RCVs			
INSUMOS MEDIOS	Total Medio	Costo mL			RCVs				RCVs			
	(mL)	(\$)			RCVs				RCVs			
	1.620	1,18	1.912	1.912								
RCVs	mg Tratm	Costo mg	Costo RCVs		TRATAMIENTO 3				TRATAMIENTO 4			
2,4-D	1,08	0,09	0,10			[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total		[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total
Picloram	1,08	5,49	5,93		2IP	0,10	675	0,0675	BA	0,10	675	0,0675
2IP	0,34	44,10	14,88		2IP	0,50	675	0,3375	BA	0,50	675	0,3375
BA	1,08	227,76	245,98		2IP	1,00	675	0,6750	BA	1,00	675	0,6750
RCVs	1,08		0,00		RCVs				RCVs			
RCVs	1,08		0,00	267	RCVs				RCVs			
USO LABORATORIOS - INVERNADEROS					RCVs				RCVs			
	Uso	Costo	Total Laboratorios		TRATAMIENTO 5				TRATAMIENTO 6			
	(hr)	(\$)	(\$)			[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total		[] mg*L ⁻¹	mL. Tratm	mg Total
Lab. Preparación medios	4	176	705		RCVs	0,10	675	0,0675	RCVs	0,10	675	0,0675
Campaña flujo laminar	4	73	292		RCVs	0,50	675	0,3375	RCVs	0,50	675	0,3375
Cámara de crecimiento	28	176	4.935		RCVs	1,00	675	0,6750	RCVs	1,00	675	0,6750
Autoclave	2	500	1.000		RCVs				RCVs			
Invernadero		82	0	6.932	RCVs				RCVs			
Consumos básicos	38	46	1.749	7.976								
Horas Técnico	20	2.159	43.182	43.182	RCVs				RCVs			
SUBTOTAL INICIACION Y MULTIPLICACION				60.269								
TASA DE MULTIPLICACION	3,3		356,4	169								

Detalle de cálculo por etapa de Enraizamiento. Ej. Caso 1.

PLANILLA COSTO POR PLANTA					SECCION CALCULO RCVs POR TRATAMIENTO			
ENRAIZAMIENTO					TRATAMIENTO 1			
	N° Plantas-Semillas	Costo unidad	Costo Total	Subtotales		[] mg*L ⁻¹	mL Tratm	mg Total
Costo Material Parental	0	0	0	0	BA	1,00	990	0,9900
Mantenición Plantas Madre					BA	2,00	990	1,9800
	N° contenedores	ml x contenedor	mL Total		BA	3,00	990	2,9700
Total Medio	356	30	10.692		RCVs			0,0000
INSUMOS MEDIOS	Total Medio	Costo mL			RCVs			0,0000
	(mL)	(\$)			RCVs			0,0000
	10.692	1,18	12.621	12.621				
RVCs	mg Tratm	Costo mg	Costo RCVs		TRATAMIENTO 3			
1 BA	5,94	227,76	1.352,89			[] mg*L ⁻¹	mL Tratm	mg Total
2 RCVs	0,00		0,00		RCVs	0,10	675	0,0675
3 RCVs	0,34		0,00		RCVs	0,50	675	0,3375
4 RCVs	0,00		0,00		RCVs	1,00	675	0,6750
5 RCVs	0,00		0,00		RCVs			0,0000
6 RCVs	0,00		0,00	1.353	RCVs			0,0000
USO LABORATORIOS - INVERNADEROS					TRATAMIENTO 5			
	Uso	Costo	Total Laboratorios			[] mg*L ⁻¹	mL Tratm	mg Total
	(hr)	(\$)	(\$)					
Lab. Preparación medios	2	176	352		RCVs			0,0000
Campana flujo laminar	2	73	146		RCVs			0,0000
Cámara de crecimiento	336	176	59.219		RCVs			0,0000
Autoclave	2	500	1.000		RCVs			0,0000
Invernaderos		82	0	60.718	RCVs			0,0000
Consumos básicos	342	35	11.806	72.171				
Horas Técnico	12	2.159	25.909	25.909	RCVs			0,0000
SUBTOTAL INICIACION Y MULTIPLICACION								172.772
TASA DE MULTIPLICACION		0,95	338,58	510				

Detalle de cálculo por etapa de Aclimatación. Ej. Caso 1

PLANILLA COSTO POR PLANTA					SECCION CALCULO RCVs POR TRATAMIENTO			
ACLIMATACION					TRATAMIENTO 1			
	N° Plantas-Semillas	Costo unidad	Costo Total	Subtotales		[] mg*L ⁻¹	mL Tratm	mg Total
Costo Material Parental	0	0	0	0	BA	1,00	990	0,9900
Mantenición Plantas Madre					BA	2,00	990	1,9800
					BA	3,00	990	2,9700
Si es CONTENEDOR:	N° Unid	Unid	Costo /Unid	Costo Total	RCVs			0,0000
Vol. Total:	1	lt			RCVs			0,0000
Vol. Util:	0,6	lt			RCVs			0,0000
Contenedor plástico (6 pl/cont)	56	Unid	160	9.029				
Perlita	50%	16,929	lt	24,44	414			
Turba	10%	3,3858	lt	79,9	271			
Arena	40%	14	lt	6,00	81	9.794		
RVCs	mg Tratm	Costo mg	Costo RCVs		RCVs	[] mg*L ⁻¹	mL Tratm	mg Total
BA	5,94	227,76	1.352,89		RCVs			0,0000
RCVs	0,00		0,00	1.353	RCVs			0,0000
					RCVs			0,0000
					RCVs			0,0000
USO LABORATORIOS - INVERNADEROS					TRATAMIENTO 2			
	Uso	Costo	Total Laboratorios					
	(hr)	(\$)	(\$)					
Lab. Preparación medios	0,02	176,2	4	4				
Campana flujo laminar	0	73,1	0	4				
Cámara de crecimiento	0	176,2	0	4				
Autoclave	0,28	500,0	140	144				
Invernaderos	336	82,1	27.586	27.729				
Consumos básicos	336,28	23,0	7.739	35.465				
Horas Técnico	8	2.159,1	17.273	17.273				
SUBTOTAL INICIACION Y MULTIPLICACION								91.768
TASA DE MULTIPLICACION		0,95	321.651	285				

Detalle de cálculo amortización de Inversiones.

COSTO USO EQUIPAMIENTO		DEPRECIACION								
		Costo	Mantenición	VU	VR		Dep. Anual	Deprec.+ Mant.	Costo Día	Costo Hora
			(US\$/Año)	(Años)	%	\$	\$	(\$ Anuales)	(\$)	(\$)
TRANSFERENCIA ASEPTICA	US\$	7.692	577	10	15,0%	600.000	340.000	640.000	1.753,4	73,1
	\$	4.000.000								
CAMARA DE CRECIMIENTO		2.060.000	103.000	7	10,0%	206.000	264.857	367.857	1.007,8	42,0
LAB. PREP. MEDIOS		8.646.000	432.300	7	10,0%	864.600	1.111.629	1.543.929	4.229,9	176,2
INVERNADEROS (200 M2)	US\$	8.000	700	10	15,0%	624.000	355.200	719.200	1.970,4	82,1
	\$	4.160.000								
SISTEMAS DE CONTROL		2.400.000	120.000	5	10,0%	240.000	432.000	552.000	1.512,3	63,0
SUB-TOTAL		21.266.000								

Detalle de cálculo costo de Insumos.

PLANILLA DE PRECIOS INSUMOS PARA CULTIVO IN-VITRO									
		VALOR DÓLAR	520						
		FECHA	Estim fin 2009						
Medios		Envase	Costo Envase		Costo L.	Costo mL.			
		(gr)	(US\$)	(\$)	(\$)	(\$)			
	Medio MS completo	10	22,7	11.804	1.180,40	1,18			
	Azúcar								
	Agar								
	Stock I								
	Stock II								
	Stock III								
	Stock IV								
	Stock V								
RCVs		Envase	Costo Envase		Costo mg				
		(gr)	(mg)	(US\$)	(\$)	(\$)			
	2,4-D	100,00	100.000	17,80	9.256	0,09			
	AIA	100,00	100.000	182,80	95.056	0,95			
	IBA	1,00	1.000	10,10	5.252	5,25			
	ANA	100,00	100.000	40,00	20.800	0,21			
	PICLORAM	10,00	10.000	105,60	54.912	5,49			
	ABA	0,10	100	43,80	22.776	227,76			
	GA3	1,00	1.000	35,30	18.356	18,36			
	AC JASMONICO	0,10	100	48,20	25.064	250,64			
	2IP	1,00	1.000	84,80	44.096	44,10			
	KINETIN	0,10	100	11,10	5.772	57,72			
	TDZ	0,10	100	221,10	114.972	1.149,72			
	ZEATIN	0,05	50	746,50	388.180	7.763,60			
Uso Infraestructura					Costo Día	Costo Hora			
	LAB. PREP. MEDIOS			1		176			
	Cámara Creclimiento			1		176			
	Campana de Flujo			1		73			
	Invernadero			1		82			
	Autoclave			1		500			
Mano de obra						Costo Hora			
	Técnico Laboratorio			1	380.000	2.159			
Sustratos									
	Saco	unidad	Vol cc	Costo unit.	Costo unit.	Vol real	Vol real	\$/cc	
				US\$	\$	lt	cc		
	Perlita	100	lt	100.000	4,7	2.444	100	100.000	0,02444
	Turba mejorada	107	lt	107.000	17.100	214	214.000	0,07991	
	Arena	1	m3	1.000.000	6.000	1.000	1.000.000	0,00600	
	Vermiculita	100	lt	100.000	11	5.720	100	100.000	0,05720
Almacigueras									
Contenedor tipo cassata									
	Largo	20 cm							
	Ancho	10 cm							
	Alto	5 cm							
	Vol	1000 cc							
	Valor Unitario, \$	160							
Macetas									
Chicas redondas									
	Diámetro	13 cm							
	Alto útil	10 cm							
	Vol	958,504625 cc							
	Valor Unitario, \$	42							
Bolsas									
	Diámetro	11 cm							
	Alto útil	9 cm							
	Vol	617,6399625 cc							
	Valor Unitario, \$	2							

- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.

De acuerdo a lo observado a lo largo del proyecto, y especialmente en esta última etapa de ejecución, se puede señalar que el rubro en el cual se inserta, que en este caso corresponde a la producción de flores y especies ornamentales, es de interés creciente para nuestro país. Sin embargo, durante este último año, y debido a la crisis general nivel mundial, las ventas del sector se vieron significativamente afectadas, pues no son bienes de primera necesidad. Actualmente se observan signos de reactivación a través del reinicio de algunos proyectos agrícolas y agroindustriales que se habían detenido o disminuidos al máximo, generándose nuevamente el interés por desarrollar nuevos productos para venta, nuevos servicios asociados al desarrollo de nuevas variedades, asesorías puntuales en la resolución de problemas técnicos, etc.

- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

La estrategia de marketing de los productos servicios logrados por el proyecto se basará en el ofrecimiento de un servicio de alto valor agregado, muy especializado y desarrollado a la medida de cada cliente. Por lo tanto, es una estrategia dirigida a calidad y diferenciación por especialización y focalización a nichos muy específicos de la producción. Se señala que el cliente que busca acceder a este tipo de servicios es, en general, empresarios y/o profesionales muy especializados en la producción de plantas ornamentales o directamente viveros ornamentales. Paralelamente, se ha estado explorando el trabajo conjunto, pero más bien a nivel de desarrollo conjunto con empresas productoras de flores, que indirectamente, y debido a la utilización de técnicas complementarias estarían interesadas en desarrollar nuevas variedades, para lo cual requieren la utilización de técnicas desarrolladas por este laboratorio.

6. Impactos y Logros del Proyecto:

- Descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias.
- Indicadores de impactos y logros a detallar dependiendo de los objetivos y naturaleza del proyecto:

Impactos Productivos, Económicos y Comerciales

Sin duda que la generación de una unidad de este tipo, generará la posibilidad de una plataforma de conocimiento y preparación profesional, no solo para el equipo técnico involucrado directamente, sino que al gran número de agrónomos que fueron preparados como parte de sus proyectos de título en el transcurso de estos cuatro años. Junto a lo anterior se pudo desarrollar una estrategia para enfrentar en forma comercial, especies de difícil propagación, dándose a conocer en el ámbito nacional e internacional, lo que ha traído consigo oportunidades de desarrollo de negocio directo con varias empresas y entidades de I+D+i al cual es posible transferirle la tecnología. Esto abrió la posibilidad de mejorar estructura de costos y enfrentar de mejor manera el mercado para productores de flor de corte y viveros de plantas para parques y jardines, al poder contar con la experiencia y el expertise logrado en estos años.

La generación de patentes en este caso vino de la mano del apoyo que este proyecto implicó y será fundamental para la continuación del primer programa de mejoramiento genético de *Alstroemeria* totalmente nacional. En mayo de 2009 se comenzó con el proceso de registro de la primera variedad de *Alstroemeria* generada bajo este programa, y se espera que en los próximos años un número similar en forma anual. Una posibilidad cierta de negocio es la venta de material genético desarrollado por este programa, con las herramientas biotecnológicas logradas por esta Unidad de Propagación *In Vitro*. Sin esto último, las desventajas de tipo competitivo y comparativo habrían sido muy grandes como para lograr avances de tipo comercial a nivel nacional e internacional.

Aun cuando no se pudo lograr el patentamiento de protocolos de cultivo *in vitro*, si se logró sentar las bases para futuras investigaciones en el área de la propagación clonal de especies vegetales. Gracias a la Unidad generada, hoy nos hemos posicionado a nivel nacional, como un referente obligado de consulta, tanto a nivel de investigadores que buscan complementar sus proyectos o a nivel de empresas, buscando satisfacer demandas por ciertas especies vegetales (ornamentales o no), y/o empresas que requieren de asesoría específica en el tema.

La generación de soluciones a nivel productivo nos permitió conocer y enfrentar el problema a una escala de negocio, lo cual es relevante para el sector externo a la Universidad. Esto nos proveyó de un contacto más directo con el medio productivo "real", y abrió la posibilidad de aumentar el tipo de productos que nuestro país puede ofrecer al mercado externo, ya que sin duda es en los cultivos ornamentales donde mayor transacción internacional de plantas *in vitro* ocurre.

Impactos Sociales

La generación de un servicio de transferencia tecnológica que beneficie eventualmente a pequeños y medianos productores florícolas (tanto viveristas, como productores de flore de corte), constituye un mejoramiento en la cadena de producción, ya que permite la solución de problemas críticos del mercado de cada uno, por ejemplo la limitación para poder acceder a mercados de mayor volumen y de alta calidad. Este problema puede ser subsanado al integrar herramientas biotecnológicas de alto impacto, este es el caso del cultivo in vitro el que permite acceder a un mayor número de plantas en menor tiempo y con un excelente estado sanitario y nutricional.

Como beneficio social adicional está la capacitación de un número importante de futuros profesionales, que lograron durante el desarrollo del proyecto, una preparación y diferenciación que les permitió enfrentar el mercado laboral con mayor libertad. Hoy contamos con al menos diez profesionales colocados en empresas relacionadas a la industria ornamental y/o de I+D+i o desarrollando su posgrado en áreas relacionadas.

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual			
Nuevos empleos generados			
Productores o unidades de negocio replicadas			

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto				
Proceso				

Servicio				
----------	--	--	--	--

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente	1	Cultivar de Alstroemeria híbrida de propagación clonal mediante cultivo in vitro
Intención de patentar	2	Cultivares de Alstroemeria en los próximos 24 meses.
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	2	The Tree Lab (alianza estratégica productiva) Bioforest (asesoría permanente)
Generación nuevos proyectos	5	2007 – 2009. Investigador Principal Proyecto “Producción intensiva de cultivares híbridos de Alstroemeria nativa, para flor en maceta y parques y jardines, para el mercado nacional y norteamericano” . Fundación COPEC-UC CC-035, Chile. Total: \$105.119.000 (PUC: \$26.267.000; Aporte Fundación: \$70.000.000). 2007 – 2009. Asesoría Técnica Proyecto CORFO-INNOVA “Sistema de producción forzada de cala de color (<i>Zantedeschia spp.</i>) para flor de corte en la zona de Ovalle (IV Región)” . 2005 – 2008. Investigadores asociados proyecto INNOVA “Mejoramiento y Desarrollo de nuevos híbridos patentables a través de cruza intergenéricas (Copihue x Coicopihue) e interespecífico en <i>Rhodophiala sp.</i> apoyado por herramientas biotecnológicas” . Empresa Novazel-CORFO. (asignado a PUC: \$5.700.000).

		<p>Generación de protocolo intensivo de cultivo in vitro y forzado de copihue para el mercado nacional (COPEC-UC, preseleccionado 2009). Agente asociado.</p> <p>Generación de cultivares de alstroemeria para ambientes extremos (COPEC-UC, preseleccionado 2009). Agente Ejecutor.</p>
--	--	--

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	1	2009. Olate, E., L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Ríos and P. Errandonea. Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species. Acta Horticulturae (enviado)
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	7	<p>2008. 5th International Symposium on Aromatic, Medicinal, Tinctorial and Ornamental Plants. Noviembre, Noumea, New Caledonia. Presentación del trabajo (póster): "Alstroemeria breeding program in Chile" (E. Olate, L.H. Escobar, C. Sepúlveda*, C. Encina, M.U. Wilmans y C. Jaramillo).</p> <p>2008. 13th International Protea Association Conference & IXth International Protea Working Group Symposium. 3-6 Septiembre, Stellenbosch, Sudáfrica. Presentación del trabajo (oral): "Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species" (E. Olate*, L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Ríos and P. Errandonea).</p> <p>2008. 1º Congreso Nacional de Flora Nativa. 21 al 23 de Agosto, Santiago, Chile. Presentación del trabajo (oral): "Programa de mejoramiento genético en Alstroemeria: avances y problemáticas" (E. Olate*, L.H. Escobar,</p>

	<p>C. Sepúlveda, C. Encina, M. Úrsula Wilmans y C. Jaramillo).</p> <p>2007. 2° Simposio de Horticultura Ornamental. Presentación del trabajo: “Programa de mejoramiento genético en <i>Alstroemeria nativa</i>” (E. Olate*, C. Sepúlveda, Luis H. Escobar, A. García, M. Gebauer y M. Musalem). Talca, Chile.</p> <p>2007. VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria REDBIO 2007. 22 al 26 de octubre, Viña del Mar, Chile. Presentación de los trabajos: “Iniciación y multiplicación <i>in vitro</i> de brotes aéreos de <i>Leucospermum ‘High Gold’ (Proteaceae)</i>” (C. Ríos, L.H. Escobar, P. Errandonea, E. Olate(*), C. Sepúlveda); “Optimización del proceso de iniciación de yemas subterráneas de <i>Paeonia</i> spp. y efecto de benzilaminopurina en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i>” (Y. Matsumoto, C. Sepúlveda, K. Pizarro, E. Olate*, L. H. Escobar).</p> <p>2007. 57th Annual Meeting of the International Plant Propagators' Society - Eastern Region. 16 al 19 de septiembre, Montreal, Canadá. Presentación del trabajo: “Effect of 6-Benzylaminopurine on the <i>in vitro</i> growth of <i>Alstroemeria ‘Freedom’, ‘Liberty’ and ‘Sweet Laura’</i> during the stage of multiplication” (E. Olate*, P. Villalobos, C. Sepúlveda and L.H. Escobar).</p> <p>2005. 55th Annual Conference of the International Plant Propagators' Society - Eastern Region. Presentación del trabajo: “Manejo y aclimatación de plantas provenientes de cultivo <i>in vitro</i>” (E. Olate* y A. Blanco). 3 al 6 de Octubre. Atlantic City, NJ. USA.</p>
--	--

<p>Integración a redes de investigación</p>	<p>8</p>	<p>2008. Gestor y Coordinador "1° Congreso Nacional de Flora Nativa". P. Universidad Católica de Chile en conjunto con la Universidad de Talca y Vivero y Jardín Pumahuida Ltda. 21, 22 y 23 de Agosto. Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.</p> <p>2008. Gestor y Coordinador "Misión Tecnológica a Israel: Desarrollo y cultivo de especies ornamentales de interés para Chile". Proyecto CORFO-INNOVA Chile 208-6911.</p> <p>2008. Miembro Comité Mejoradores Genéticos Asociación Nacional de Producción de Semillas ANPROS.</p> <p>2008. Expositor invitado al VI Seminario Flora y Fauna Nativa. Presentación charla: "Mejoramiento genético de Alstroemeria: uso de especies de nativas de Chile". CORMA Biobío y CONAMA Biobío. 14 de Noviembre, Concepción, Chile.</p> <p>2006. Coordinador Curso Internacional "Actualización, comercialización y técnicas en post cosecha en flores de corte y follajes". Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile – Fundación para la Innovación Agraria, 29, 30 de Noviembre y 1° de Diciembre de 2006. Santiago, Chile.</p> <p>2004 al 2007. Expositor en Feria Anual Flores de Invierno del Club de Jardines de Chile. Programa de Floricultura y Micropropagación FAIF-UC. Casas de Lo Matta. Vitacura, Santiago, Chile.</p> <p>2006 y 2008. Expositor Feria Agro Innovación UC – INAGRO 2006. Programa de Floricultura y Micropropagación FAIF-UC. Facultad de</p>
---	----------	---

		<p>Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.</p> <p>Julio 2008 a la fecha. Miembro del Comité de Fitomejoradores de la Asociación Nacional de Productores de Semillas ANPROS.</p>
--	--	---

Logro	Numero	Detalle (Título, grado, lugar, institución)
Tesis pregrado	18	<p>2009. Guía Proyecto de Título “Uso de retardantes de crecimiento en iniciación y multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Alstroemeria</i> ‘Sweet Laura’. Cristián Jofré Vidal. Ing. Agr.</p> <p>2009. Guía Proyecto de Título “Desarrollo y optimización de un protocolo de micropropagación de <i>Banksia</i> spp. y <i>Protea</i> spp. (Proteaceae)”. Claudia Barriga Carrera. Ing. Agr.</p> <p>2009. Guía Proyecto de Título “Evaluación del comportamiento de clones híbridos de <i>Alstroemeria</i> en las fases de enraizamiento y aclimatación bajo cultivo <i>in vitro</i>”. Macarena Santa Cruz Manríquez. Ing. Agr.</p> <p>2009. Guía Proyecto de Título “Desarrollo y optimización de un protocolo de micropropagación de <i>Banksia coccinea</i>, <i>Leucospermum</i> cv. High Gold y <i>L.</i> cv. Succession II (Proteaceae)”. Cindy Reyes Yáñez. Ing. Agr.</p> <p>2009. Guía Proyecto de Título “Efecto del número de rizomas iniciales por contenedor de <i>Alstroemeria</i> cv. Sweet Laura en la tasa de multiplicación utilizando un sistema de inmersión temporal. Francisca Cornejo Parra. Ing. Agr.</p> <p>2008. Guía Proyecto de Título “Avances en la generación de un protocolo de embriogénesis somática en tres cultivares de <i>Paeonia lactiflora</i>: etapas de inducción de callo embriogénico y maduración, con expresión de estructuras tipo embrión (ETEs)”. Gabriela Dunner Planella. Ing. Agr.</p> <p>2008. Guía Proyecto de Título “Optimización del proceso de iniciación y multiplicación de yemas apicales de rizomas de <i>Alstroemeria</i> ‘Sweet Laura’ y efecto de benzilaminopurina en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de los cultivares ‘Sweet Laura’ y ‘Freedom’”. Pamela Ruíz Juliá. Ing. Agr.</p> <p>2008. Profesor guía Proyecto de Título “Selección y caracterización de parentales para cruzamientos interespecíficos de <i>Alstroemeria</i> spp. para su uso con</p>

	<p>técnicas de cultivo <i>in vitro</i>". María Úrsula Wilmans Cifuentes. Ing. Agr.</p> <p>2008. Guía Proyecto de Título "Desarrollo y optimización de un protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de multiplicación de <i>Leucospermum</i> cv. High Gold (<i>Proteaceae</i>)". Margarita Bilbao Becerra. Ing. Agr.</p> <p>2008. Guía Proyecto de Título "Efecto del ácido 2,4-Dicloro-fenoxi-acético en la inducción, formación y proliferación de callos con carácter embriogénico en <i>Paeonia lactiflora</i> cvs. Top Brass e Immaculee". María Alejandra Toro Reyes. Ing. Agr.</p> <p>2007. Informante Proyecto de Título "Evaluación de enraizamiento en estacas de <i>Quillaja saponaria</i> Mol. provenientes de la Región Metropolitana y VII Región de Chile". Pascuala Muggli Elton. Ing. Agr. Profesor guía Juan Gastó.</p> <p>2007. Guía Proyecto de Título "Uso de inflorescencias inmaduras como explante de iniciación y optimización del crecimiento <i>in vitro</i> de rizomas de <i>Alstroemeria</i> cultivares 'Freedom', 'Liberty' y 'Sweet Laura'". Paula Villalobos Fernández. Ing. Agr.</p> <p>2007. Guía Proyecto de Título "Desarrollo y optimización de cultivo <i>in vitro</i> de tres especies de la familia <i>Proteaceae</i>". Carola Ríos Labarca. Ing. Agr.</p> <p>2007. Guía Proyecto de Título "Optimización del proceso de iniciación de yemas subterráneas de <i>Paeonia</i> spp. y el efecto de benzilaminopurina en la etapa de multiplicación <i>in vitro</i>". Yuriko Matsumoto Courdurier. Ing. Agr.</p> <p>2007. Guía Proyecto de Título "Iniciación <i>in vitro</i> de yemas subterráneas de <i>Paeonia lactiflora</i> cv. Top Brass". Karin Pizarro Verme. Ing. Agr.</p> <p>2006. Guía Proyecto de Título "Iniciación <i>in vitro</i> de <i>Banksia coccinea</i>, <i>Leucospermum</i> cv. High Gold y <i>Protea</i> cv. Lady Di". Paulina M. Errandonea Althausen. Ing. Agr.</p> <p>2006. Guía Proyecto de Título "Iniciación <i>in vitro</i> de rizomas de <i>Alstroemeria</i> spp.". Carolina Andrea Jaramillo Escalante. Ing. Agr.</p>
--	--

		2005. Guía Proyecto de Título " Validación y desarrollo de protocolos de multiplicación <i>in vitro</i> de <i>Lapageria rosea</i> (Copihue) en las etapas de enraizamiento y aclimatación de plantas a invernadero ". Paula Quiroz Figueroa. Ing. Agr.
Tesis postgrado	2	2009. Profesor integrante Comité Proyecto de Tesis " Establecimiento de protocolo de transformación de arándanos mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ". Magíster en Ciencias Vegetales, Mención Fisiología y Producción de Cultivos. Florencia Gutiérrez, Lic. Biol., Biol. Facultad de Agronomía en Ing. Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Profesor Guía Patricio Arce. 2009. Profesor informante Tesis Magíster en Recursos Naturales " Valor agregado en la rehabilitación de depósitos de relaves mineros de la zona centro-norte de Chile con recursos fitogenéticos nativos ". Cristina Orchard Gremler. Ing. Agr., M.Sc. Profesor guía Rosana Guinocchio.
Pasantías		
Cursos de capacitación		

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- **Legales**

No se presentaron problemas legales de ningún tipo durante el transcurso del proyecto.

- **Técnicos**

- **Alstroemeria**

Las plantas madres fueron traspasadas a perlita sin considerar las diferencias fisiológicas entre éstas. La variedad Sweet Laura mostró un crecimiento más acelerado, presentando deficiencia de hierro. Debido a que las plantas, para iniciarse *in vitro*, deben tener las mejores condiciones, no se ha podido experimentar con dicha variedad.

Las diferencias en cuanto a los niveles de esterilización de los tres cultivares ensayados en cuanto a la aplicación de tratamientos a las plantas madres, podría ser un indicador de diferencias morfológicas de las yemas apicales y axilares de rizomas.

En el protocolo de iniciación de ápices florales, la principal dificultad fue diferenciar entre ápices vegetativos y florales en la planta madre, esto debido a que el estado requerido para lograr la desdiferenciación es previo a la visualización de las estructuras

florales. Por otra parte, la determinación del sistema de transporte y mantención de ápices, cuando estos son extraídos en otros lugares lejanos al sitio de experimentación, mermó el número de explantes en buen estado para ser iniciados.

La contaminación bacteriana (endógena) fue el principal problema para la multiplicación de rizomas en el sistema de inmersión temporal.

El tipo de filtro (tipo pirinola de 0.22 micras y de 30 mm de ancho) presentó problemas en algunas ocasiones por la presión interna del sistema que hace que se colapsen e impidan el flujo del aire, esto impide el trasvasije del medio de un frasco al otro.

- **Peonía**

Un problema que surgió al momento de querer iniciar un micropropagación in vitro en Peonías es tener la disponibilidad suficiente de explantes. Por ello, fue necesario, previo al primer experimento, someter a las plantas a frío (0° C) para así estimular la brotación de yemas desde los trozos de planta madre

En este sentido la iniciación se puede hacer dependiente de este factor, y podría dificultar una experimentación continua a través de todo el año.

Subsecuentemente, un problema técnico que se debió enfrentar en esta especie corresponde a la disminución del número de yemas producidas por los rizomas. Esto se debe principalmente al debilitamiento de las estructuras subterráneas.

Otro problema fue la alta producción de fenoles por parte de los tejidos florales utilizados como explante para los nuevos experimentos y en los callos mantenidos en el medio de expresión. Estos llegaron rápidamente a niveles tóxicos en el medio de cultivo, produciendo la oxidación y posterior muerte del material.

- **Proteas**

La inclusión del antibiótico rifampicina al medio de cultivo no se presenta como una opción viable para la eliminación de bacterias, ya que incidió en el vigor del explante.

La eliminación de hojas dejando parte del pecíolo fue necesaria para evitar la eliminación y daño de yemas axilares, además permite que se mantenga una estructura que las proteja.

El uso de PPM, suplementado en el medio o como solución fungicida y bactericida en material contaminado, fue una excelente opción para disminuir pérdida de material por contaminación, por una parte la contaminación disminuye considerablemente y por otro lado el producto no afecta al explante.

En *Banksia coccinea* el problema técnico, fue la brotación de las yemas laterales del brote apical. En el caso de *Protea* 'Lady Di' la mayor problemática enfrentada ha sido la exudación de fenoles de los explantes iniciados *in vitro*. Una vez superado el punto anterior se está abocado a la brotación de yemas laterales.

El mayor problema enfrentado durante el periodo 2007 y posterior fue el daño causado a los brotes apicales, especialmente en *Protea* 'Lady Di', por las heladas que afectaron la zona central durante ese invierno.

En *Banksia coccinea* la exposición a altas concentraciones de cloro por largos períodos de tiempo aumenta el porcentaje de desinfección, aunque acelera la senescencia del explante. En esta especie el mayor problema es la brotación lateral de los explantes, por lo que se consideró tratar las plantas madres periódicamente con Citogrower a modo de aumentar la brotación de estos.

En *Leucospermum* cv. "High Gold", al igual que en *B. coccinea*, altas concentraciones de cloro, por largos períodos de tiempo, aumenta el porcentaje de desinfección, aunque acelera la senescencia del explante. Con un tiempo de contacto de

5 min y concentración de cloro al 3% se logra una buena desinfección, manteniendo el vigor del explante.

En *Protea cv. "Lady Di"* el mayor problema que presenta este cultivar es la oxidación por compuestos fenólicos.

- **Administrativos**

El cambio en el sistema financiero de la Tesorería en la Pontificia Universidad Católica de Chile, dificultó el pago de boletas y facturas, debido a la imposibilidad de ingresar al sistema por parte del personal administrativo encargado de la cancelación de las mismas. Este problema fue en gran medida subsanado por la administración central de la Universidad funcionando sin dificultad y los pagos al día.

- **Gestión**

La implementación de cámara de crecimiento 2, presentó problemas ya que los presupuestos para la iluminación aumentaron considerablemente. Por lo cual se hizo necesario: (a) reasignar lo presupuestado para subdivisión de cámara crecimiento 1y (b) reasignar lo presupuestado para esterilizador de sustratos en la compra de un equipo de frío/calor que pueda mantener un rango de temperatura de manera automática.

La compra de micropipeta presentó un valor mayor a lo presupuestado, siendo indispensable para la precisión en la preparación de los medios involucrados en cada uno de los ensayos, se procedió a comprar una oferta que nos permitió comprar dos micropipetas (200 y 1000 μ L) por el valor de una.

Otro problema de gestión fue la menor disponibilidad para el uso de autoclave en laboratorio de biotecnología. El problema se ha originado por que el número de usuarios ha aumentado debido al mayor número de proyectos en ejecución en la Facultad, por el mayor número de ensayos y de material a esterilizar en esta etapa del proyecto. Esta situación complica y en ocasiones retrasa los tiempos de ejecución pre-determinados.

- **Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.**

Técnicos

Alstroemeria

Debido a que algunas plantas madres de *Alstroemeria* presentaban deficiencia de hierro, se cambió el fertilizante aplicado.

Para validar el supuesto de diferencias morfológicas y encontrar un indicador que nos permita dirigir a futuro los tratamientos a plantas madres de *Alstroemeria*, se realizaron análisis histológicos a las yemas.

Para *Alstroemeria*, se evaluaron métodos de manejo de ápices florales en estado de madurez media, con el fin de facilitar el reconocimiento del ápice floral. En relación a los métodos de transporte de material, se evaluaron algunas técnicas de transporte y almacenamiento de brotes, tanto con temperatura, sustrato y agentes químicos para mejorar la sobrevivencia de estos.

El medio de cultivo en el sistema de inmersión temporal fue modificado y se suplementó con un ácido orgánico para eliminar la contaminación bacteriana y la pérdida de explantes.

Los filtros del SIT fueron cambiados por otros de 0,5 micras y de 60 mm de ancho para evitar su colapso. Los ciclos serán de 16 semanas o más, el medio fue renovado cada 4 semanas sin intervenir en los explantes hasta completadas las semanas de cultivo.

Peonía

En Peonías se trasladaron las plantas madre a cámara de frío (5° C) para vernalización, se aumentó la dosis de fertilización para vigorizar las plantas y se gestionaron los contactos para la incorporación de nuevo material con la Asociación de Productores de Peonías de Chile.

Para Peonía, se elaboró un listado de condiciones necesarias para el envío de plantas madres por parte de los productores, que además de considerar condiciones sanitarias, incluyan el estado de desarrollo, edad de la planta, número de yemas presentes en la corona, entre otras.

Para solucionar el problema de escasez de material para iniciar se incorporó el uso de tejidos florales como otro tipo de explante, lo anterior permite obtener una fuente de material numerosa, fácil de manejar y que puede ser recolectada durante la temporada estival. En conjunto a lo anterior se minimizan los problemas de contaminación durante la iniciación por tratarse de tejidos internos.

En el protocolo de embriogénesis somática se cambió el medio de cultivo semisólido por medio líquido, a fin de promover la difusión de fenoles y reducir sus efectos negativos sobre los explantes.

Proteáceas

Para *Banksia coccinea* y para *Leucospermum* cv. High Gold se procedió a cuantificar con un tercer ensayo cual era la concentración y tiempo de exposición más adecuado para ambas especies. Se verificó con nuevos ensayos que fueron ensayados con 5% de concentración y cinco minutos de exposición.

Se aumentó el tamaño del explante en *Leucospermum* cv. High Gold de forma tal de poder eliminar la zona basal que en contacto con el agar se necrosa, de esta forma podemos mantener un número de yemas laterales uniforme para su posterior brotación.

La mayor carga de patógenos en plantel de plantas madre de proteáceas durante el invierno fue contrarrestado con la aplicación periódica de fungicidas/ bactericidas.

De forma de disminuir la contaminación que aún pudiera estar remanente en los explantes iniciados *in vitro* se suplementó el medio MS con PPM.

El aumento en el presupuesto de implementación de cámara de crecimiento 2 se previó compensarlo con la reasignación de éste.

Para el caso de *Banksia coccinea* se modificó el medio de cultivo, la forma de transporte y se aplicó BAP a brotes juveniles en plantas madre. En *Protea* 'Lady Di' se etiolaron parcialmente los brotes juveniles obtenidos desde podas de formación en plantas madre lo cual solucionó la problemática exudación de fenoles en condiciones *in vitro* de los explantes.

Para *Protea* 'Lady Di' se pospuso la poda de inducción de brotes laterales en las plantas madre de forma tal de no afectar la recuperación de las plantas y se comenzó con la aplicación de BAP. Para *Leucospermum* 'High Gold' se utilizaron brotes apicales de las plantas madre ubicadas en los invernaderos de la PUC. En *Banksia coccinea* se seleccionaron dos plantas madre para la producción exclusiva de explantes para iniciar *in vitro*.

La gran carga de patógenos que traen los explantes en proteáceas durante el periodo de invierno fue tratada en terreno con aplicaciones semanales de StreptoPlus® y Aliette®.

También se aumentó el tamaño del explante (de 4 a 7 cm) ya que se distinguió un leve deterioro del explante en la parte en contacto con el agar, porción que debe ser eliminada semanalmente en cada traspaso. Con esto se busca que el tamaño del explante no disminuya drásticamente con el correr de las semanas, y así no perder yemas que luego podrán formar nuevos brotes.

En *Protea* 'Lady Di' el mayor problema que presentó este cultivar es la oxidación por compuestos fenólicos. La adición de antioxidantes al medio parece no ser suficiente para el control de éstos en brotes lignificados. La hidratación en una solución rica en antioxidantes tampoco elimina del todo este problema en este tipo de brotes. Es por esto que en el Ensayo 4 se probó la utilización de brotes más 'juveniles', con el fin de reducir este problema, que fueron obtenidos mediante un fuerte rebaje en las plantas madre realizado a principios de febrero. Se obtuvo brotes sobre madera de dos años. Después de una semana desde la iniciación los explantes jóvenes no presentaban oxidación por fenoles pero sí deterioro al parecer por acción del cloro. Es posible que este efecto haya sido ocultado por la rápida oxidación de los explantes más adultos en los ensayos anteriores. Es por esto que los ensayos futuros deben considerar menores concentraciones o, en definitiva, otro agente desinfectante.

Los tiempos de contacto y concentraciones de cloro para la desinfección previa al inicio del cultivo se fueron ajustando de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos previos.

La preparación de los explantes antes de la desinfección se corrigió, para proteger las yemas apicales aumentado el tamaño del explante, y cortando la hoja lateral dejando un trozo de pecíolo como protección.

En *Protea* cv. 'Lady Di' la obtención de brotes juveniles se obtuvo mediante técnica de poda de rebaje en las plantas madres.

La inmersión en una solución rica en antioxidantes y la adición de antioxidantes al medio no lograron controlar la producción de fenoles, principalmente debido a las características leñosas de las proteas (mayor contenido de lignina). La solución más adecuada que se encontró fue la etiolación parcial de brotes en terreno más el uso de antioxidantes en el medio de cultivo.

8. Otros Aspectos de Interés

9. Conclusiones y Recomendaciones:

- **Desde el punto de vista:**
 - **Técnico**
 - La implementación de una Unidad Especializada de Proapagación in vitro en Chile es posible de establecer.
 - Existe demanda e interés en el sector productivo por los servicios generados en una unidad de este tipo.
 - Es posible generar conocimiento y tecnología avanzada con los recursos humanos y materiales con que se cuenta en Chile.

- El capital humano es de vital importancia para el éxito de este tipo de iniciativa, siendo la permanencia del personal técnico, no profesional, vital para el avance rápido en encontrar soluciones a los problemas encomendados.
- La metodología de trabajo propuesta fue la apropiada para enfrentar problemas variados en cada grupo de especies.
- Se debe enfatizar en el trabajo parcializado, evaluando etapas individuales, y no procesos completos desde iniciación in vitro hasta aclimatación ex vitro.
- Las diferencias genéticas dentro de cada especie, deben ser consideradas, ya que las respuestas a distintos tratamientos, son diferentes y se acrecientan cuando se trabaja en condiciones in vitro, por lo que no pueden ser generalizadas a partir de otros protocolos.

○ **Económico**

- El costo de desarrollo de un protocolo de propagación in vitro, es posible de ser generado por una Unidad Especializada.
- Los costos asociados a la generación de dicho protocolo son diferentes a los asociados a la producción masiva de plantas in vitro, ya que incluyen costos diferentes de tiempo de profesionales e investigadores, y pruebas y errores consecutivos hasta lograr el resultado esperado.
- La generación de un nuevo protocolo posee una estructura de costos diferente para cada fase de multiplicación in vitro, y es muy específica para cada especie y en algunos casos también a nivel de cultivar, y debe ser considerado al momento de asumir un compromiso de este tipo.

○ **De gestión.**

- La Universidad es capaz de generar una Unidad independiente y especializada para la generación de este tipo de protocolos.
- El tamaño y dificultad de la gestión financiera deben ser incluidos dentro de las consideraciones a evaluar, ya que pueden provocar dificultades adicionales a las dificultades técnicas.
- El trabajo con personal técnico y profesional permanente es mucho más eficiente para este tipo de Unidades, ya que el trabajo con alumnos, aun cuando es ventajoso en varios aspectos (conocimientos básicos, búsqueda de información, independencia en el trabajo), posee la gran desventaja de ser más lento al incluir una etapa de 4 a 8 semanas de entrenamiento cada vez que se incluye un nuevo integrante.

IV. INFORME DE DIFUSIÓN

- Difusión de los resultados obtenidos **adjuntando** las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Charla y Visita de Difusión, enmarcada en el proyecto

“Unidad Especializada de Propagación In Vitro en Especies Ornamentales de Difícil Multiplicación”,

financiado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA), a realizarse el 16 de Noviembre de 2007 a partir de las 15:00 horas, en el Auditorio de Postgrado de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, ubicado en Vicuña Mackenna 4860, Macul, Santiago. La actividad, comenzará con una charla, para luego visitar los laboratorios además de otras instalaciones.

Notas entregadas durante la charla:

PEONÍA

Metodología General manejo de rizomas de Peonía:

Cultivares utilizados traídos desde Punta Arenas (cv. Top Brass) y Osorno (cvs. Inmaculee, Monsieur Jules Ellies, Big Ben, Festiva Maxima y Gardenia), los rizomas son lavados y sumergidos en una solución fungicida y bactericida para luego ser plantados en un sustrato inerte (perlita). Las plantas son llevadas a invernadero y/o sombreadero, lugar en el cual son mantenidas con fertilización, riego y tratamientos semanales con fungicidas. A medida que las yemas subterráneas aparecen en el rizoma, estas son extraídas para ser iniciadas bajo condiciones *in vitro*.

Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática (asexual o adventicia, consiste en el desarrollo de embriones clonales a partir de células que no son el producto de una fusión gamética, o en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática.

Cortes Histológicos

Los cortes histológicos realizados a callos tratados con altos niveles de auxina 2,4-D; presentaron sectores con células con alto nivel de división celular, lo cual podría ser indicador de la inducción de nuevas zonas meristemáticas.

ALSTROEMERIA

Metodología General manejo de rizomas de Alstroemeria:

Cultivares utilizados: Sweet Laura, Liberty, Freedom. Los rizomas son lavados y sumergidos en una solución fungicida para luego ser plantados en un sustrato inerte (perlita). Las plantas son llevadas a invernadero y/o sombreadero, lugar en el cual son mantenidas con fertilización, riego y tratamientos semanales con fungicidas. La yema apical generada en perlita así como las estructuras aéreas de las plantas presentan una menor carga de inóculos, disminuyendo la dificultad de iniciación bajo condiciones *in vitro*.

Explantes de Alstroemeria utilizados

Los explantes utilizados para la iniciación *in vitro* han sido **yemas apicales de rizomas subterráneos** y **ápices florales inmaduros**. Ambos explantes son capaces de generar brotes aéreos bajo condiciones controladas.

Estos explantes generan brotes aéreos vegetativos y rizomas. La cantidad de reservas del rizoma es la que determina finalmente el éxito de la etapa de aclimatación.

Se adjunta copia presentación realizada



Unidad Especializada de Propagación *in vitro* de Especies Ornamentales de Difícil Multiplicación

(Código FIA-PI-C-2005-1-A-67)

Programa

- Antecedentes Generales (E. Olate)
- Trabajos Experimentales y Resultados Parciales:
 - Proteáceas (Luis Humberto Escobar)
 - Peonía (Constanza Sepúlveda)
 - Alstroemeria (Constanza Sepúlveda)
- Modelo Técnico Pre Comercial (Alvaro García)
- Visita a los Laboratorios e Invernaderos de Investigación
- Coffee break

Antecedentes previos

- Áreas prioritarias FAIF-UC y DCV (Plan de Desarrollo 1998-2008)
 - Producción de Ornamentales
 - Biotecnología
- Expertise y conformación equipo de investigación → desarrollo del área
- Requerimientos de la industria ornamental en el área de la propagación clonal
- FAIF + BTA/Tres Robles + FIA

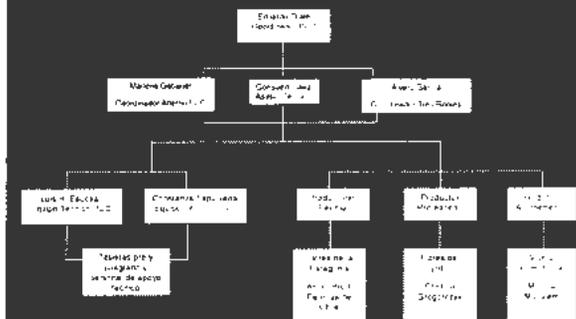
Antecedentes generales del proyecto

- **NOMBRE DEL PROYECTO:**
 - Unidad especializada de propagación *in vitro* de especies ornamentales de difícil multiplicación
- **LÍNEA TEMÁTICA:**
 - Biotecnología
- **RUBRO:**
 - Desarrollo de técnicas de selección y propagación de material genético de alto impacto económico
- **REGIONES DE EJECUCIÓN:**
 - V, XII, RM
- **FECHA DE INICIO:**
 - 03.10.00
- **FECHA DE TÉRMINO:**
 - 30.09.09
- **DURACIÓN:**
 - 48 meses
- **AGENTE POSTULANTE y EJECUTOR:**
 - Pontificia Universidad Católica de Chile

Antecedentes generales del proyecto

- **AGENTES ASOCIADOS**
 - Jardín y Vivero Pumahuída
 - Flores del Fynbos
 - Flores de la Patagonia (Asociación de Productores de Peonía de Chile)

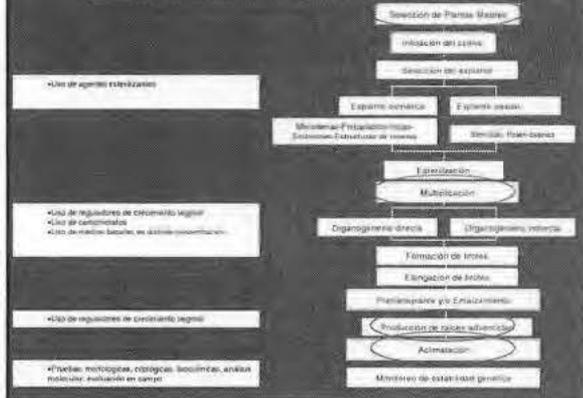
Equipo de Coordinación y Equipo Técnico



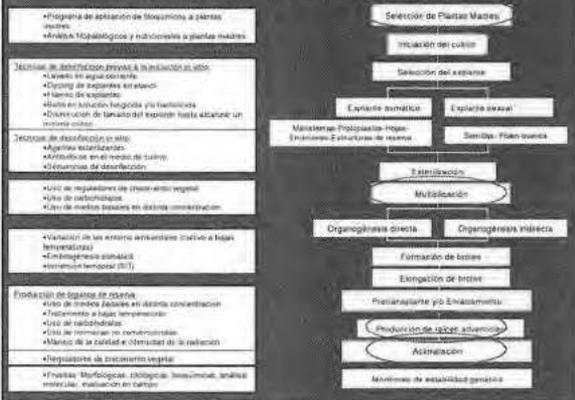
Objetivos del Proyecto

- Objetivo General**
Desarrollar nuevas metodologías de cultivo intensivo *in vitro* para especies vegetales ornamentales de alto impacto económico y complejas de propagar.
- Objetivos Específicos**
 - Desarrollar e implementar técnicas intensivas de cultivo *in vitro* a nivel experimental, que permitan solucionar las dificultades de propagación de productores de especies ornamentales de alto impacto económico, estableciendo con esto, una plataforma base de conocimiento y transferencia tecnológica para la propagación de plantas y el desarrollo de nuevos protocolos.
 - Integrar, adaptar y evaluar las etapas y metodologías no convencionales a un modelo técnico precomercial de propagación *in vitro*.
 - Implementar un modelo de escalamiento comercial de una unidad de propagación *in vitro* no convencional.
 - Transferir y difundir los resultados a todos los componentes del sector productivo y de la red de biotecnología nacional.

Técnicas Convencionales de Producción Clonal de Plantas *in vitro*



Técnicas NO Convencionales de Producción Clonal de Plantas *in vitro*



Especies Modelo Fase Técnica y Modelo Pre Comercial

PROTEAS

Protea 'Lady Di'



Banksia coccinea



Leucospermum 'High Gold'

PEONÍAS



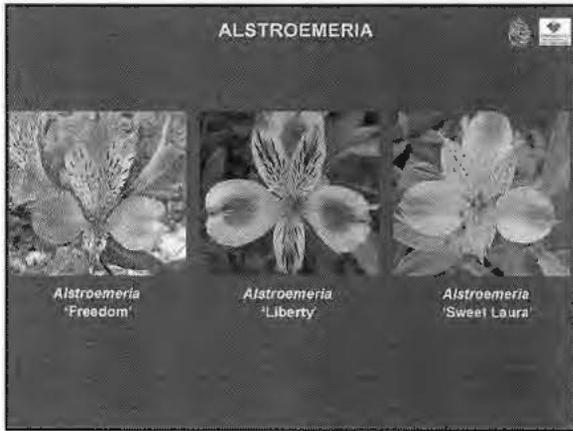
Peonia 'Festiva Maxima'



Peonia 'Immaculee'

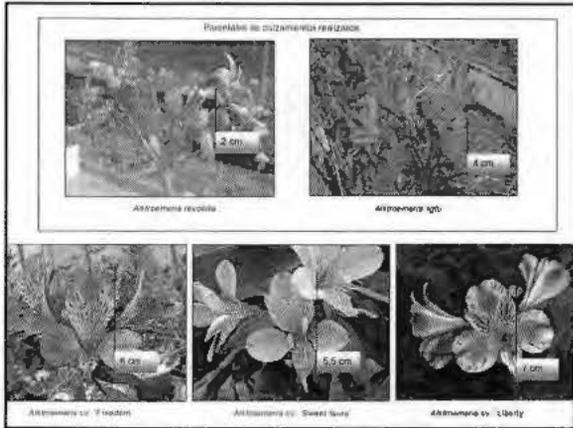


Peonia 'Ms. Jules Elies'



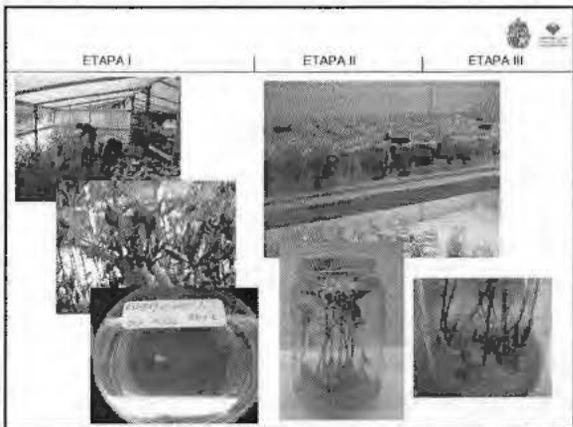
**FUNDACIÓN
COPEC • UNIVERSIDAD CATÓLICA**

**Programa de Mejoramiento Genético Intensivo en
Alstroemeria Nativa
con Uso de Herramientas Biotecnológicas**
 Dr. Eduardo Olate M.



Objetivo de cruzamientos:

- Tamaño de flor y/o inflorescencia
- Largo de vara
- Color de flores
- Uso
 - Flor de corte (-1 m)
 - Planta en maceta (-50 cm)
 - Parques y jardines (-1 m)



Difusión UPIVO-UC

Georob, Enero 2006

- Visitas a terreno

Difusión UPIVO-UC



Vivero Pumahuída,
Abril, 2007

- Visitas a terreno

Difusión UPIVO-UC



FAIF-UC, Enero 2006

- Visitas a terreno

Difusión UPIVO-UC



Club de Jardines 2005

- Ferias y eventos de extensión

Difusión UPIVO-UC



Club de Jardines 2005

- Ferias y eventos de extensión

Difusión UPIVO-UC



Curso Producción
Geófitas
Trilhanqui,
Octubre 2006

- Cursos de especialización relacionados

Difusión UPIVO-UC



Curso Producción
Geófitas
Trilhanqui,
Octubre 2006

- Cursos de especialización relacionados

Difusión UPIVO-UC



Curso Pascocha Ornamentales, 2006

- Cursos de especialización relacionados

Difusión UPIVO-UC



Curso Pascocha Ornamentales, 2006

- Cursos de especialización relacionados

Difusión UPIVO-UC



IPA 2006, San Diego, Abril 2006

- Asistencia a eventos científicos y técnicos

Difusión UPIVO-UC



IPPS, 2007, Montreal Septiembre 2007

- Asistencia a eventos científicos y técnicos

Difusión UPIVO-UC



RedBio, Viña del Mar Octubre 2007

- Asistencia a eventos científicos y técnicos

Difusión UPIVO-UC



www.plantainvitro.cl



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

Unidad Especializada de Propagación *in vitro* de Especies Ornamentales de Difícil Multiplicación

(Código FIA-PI-C-2005-1-A-67)

PROTEAS

Objetivo: propagación clonal *in vitro* de tres especies de Proteas

Protea 'Lady Di'



Banksia coccinea



Leucospermum 'High Gold'



Protea 'Lady Di'

Desinfección explantes



Principal problema



Necrosis de brotes apicales

→

Estrategia aplicada

1. Poda



2. Etiolación



3. Transporte

- Cooler
- T 10° C aprox.
- Espuma Oasis

4. Cámara Crecimiento

- Disminución radiación

Resultados

Tipo de explante

Explante	% explantes vivos
Apical	20%
Sub apical	63%

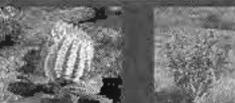


Brote yema lateral luego de 12 semanas de cultivo

Forma de etiolación

Etiolación	invierno	verano
Bolsa papel	100%	0%
Malla raschel	80%	74%

Banksia coccinea



Principal problema

Brotación de yemas laterales



Estrategia aplicada

1. Aplicación BAP
2. Transporte
3. Medio MS modificado

Sales de control (g/l)	Medio MS	Medio MS Modificado
MgSO ₄	5.000	4.000
KNO ₃	1.500	2.000
K ₂ HPO ₄	1.0	1.0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2.00	2.00
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	4.0	0

Resultados

Tratamiento planta madre	Transporte	Medio Cultivo	% brotación
BAP (11.000 ppm)	Bolsa papel	MS	0
		MS modificado	0
	Espuma Oasis	MS	0
		MS modificado	77
		MS modificado + hoja	0



Leucospermum 'High Gold'

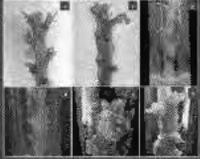
Estrategia aplicada

1. Poda inducción brotes juveniles
2. Transporte
3. Testeo con diferentes reguladores de crecimiento
4. Multiplicación de brotes en SIT



Resultados

1. Establecimiento *in vitro* logrado está entre un 85 y 100%.
2. % Brotación de yemas laterales
 - a. Se encuentra en el rango de 75 y hasta 90%
 - b. Difiere según el tipo de RCV suplementado.



(a) Sin RCVs, (b) BAP, (c) Kn, (d) ANA-BAP / Kn, (e) TDZ, (f) ANA-BAP / TDZ

3. La tasa multiplicación de brotes se ha verificado en 2.7
4. Se ha iniciado la fase de enraizamiento de los explantes clonados *in vitro*
5. Se ha probado el protocolo desarrollado para L. 'High Gold' en L. 'Succession II':
 - a. Se alcanzó un establecimiento entre un 20 y un 47%
 - b. La brotación alcanzó un 77%



RESUMEN

Se ha logrado definir estrategias de terreno para el establecimiento exitoso *in vitro* de las tres especies.

Establecimiento *in vitro* de Protea 'Lady Di'

Establecimiento y brotación *in vitro* de *Banksia coccinea*

Establecimiento, brotación y multiplicación *in vitro* de *Leucospermum 'High Gold'*

Establecimiento y brotación *in vitro* de *Leucospermum 'Succession II'*

ALUMNAS RESIDENTES:

Paulina Errandonea A.
Carola Ríos L.
Margarita Bilbao

FLORES DEL FYNBOS

Sra. Cristina Oregorczyk




Unidad Especializada de Propagación *in vitro* de Especies Ornamentales de Difícil Multiplicación

(Código: FIA-PI-C-2005-1-A-67)



Modelo Técnico Precomercial

Proyecto FIA "Unidad especializada de propagación in Vitro en especies ornamentales de difícil multiplicación"

Alvaro García Morales Ing. Agr. MSc.
Noviembre de 2007

Tres Robles



PLANIFICACION ESTRATEGICA

- REALIZAR UN ANALISIS DE LA SITUACION ACTUAL
- IDENTIFICAR OBJETIVOS
- IDENTIFICAR POSICIONAMIENTO Y DIFERENCIACION
- SELECCIÓN Y CUANTIFICACION DE MERCADOS METAS
- DISEÑAR UNA MEZCLA COMERCIAL ESTRATEGICA



ESTRATEGIA GENERICA

RENTABILIDAD

ALTA

CONCENTRADO O DIFERENCIADO

LIBERAZGO EN COSTOS

SIN DIFERENCIACION SIN LIBERAZGO EN COSTOS SIN CONCENTRACION

REDUCIDO

AMPLIO

BAJA

COBERTURA DEL MERCADO



¿Hacia donde dirigir el crecimiento...?

PRODUCTOS ACTUALES

PRODUCTOS NUEVOS

MERCADOS ACTUALES

MERCADOS NUEVOS

PENETRACIÓN DE MERCADO

DESARROLLO PRODUCTOS

DESARROLLO MERCADO

DIVERSIFICACIÓN



MEZCLA COMERCIAL

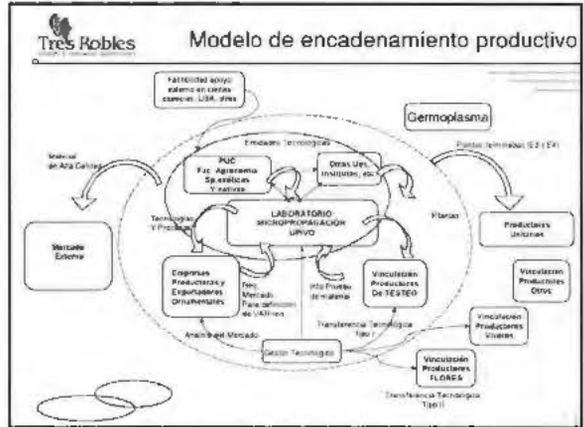
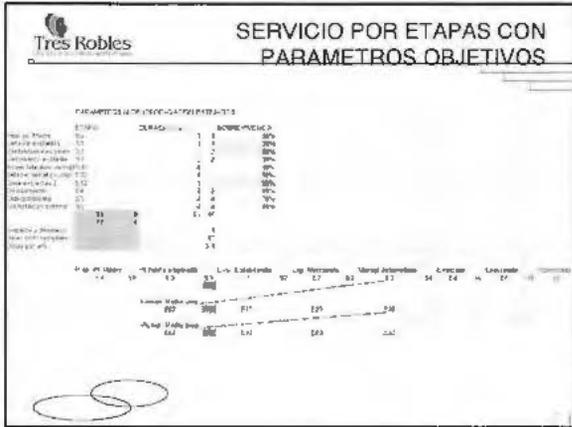
ESTRATEGIA PRODUCTO/SERVICIO	ESTRATEGIA PRECIO	ESTRATEGIA DISTRIBUCIÓN
SERVICIO PRE-VENTA	MAXIMIZACIÓN BENEFICIOS	PRODUCTOR
PROTOCOLO vs MULTIPLICACIÓN	INCREMENTO VOLUMEN DE VENTA	AGENTE
MARCA		MAYORISTA
IMAGEN	AUMENTO DE PARTICIPACIÓN	DETALLISTA
PRESENTACIÓN	REACCIONES DE LA COMPETENCIA	CONSUMIDOR
ETIQUETADO		
GARANTIA Y RESPALDO		
SERVICIO POST VENTA		



Adecuada cuantificación económica

COSTO FINAL POR PLANTAS EN CULTIVO IN-VITRO

ITEM	MULTIPLICACION	ENRAIZAMIENTO	ACUMULACION	SUBTOTAL	
	PLANTAS	PLANTAS	PLANTAS	PLANTAS	%
Costo Material Parental	10 000	0	0	10 000	17.91%
Costo Medio	264	11 217	18 428	29 909	53.92%
Costo PC/7	267	1 253	1 253	2 787	5.03%
Uso Infraestructura	4 932	129 436	80 014	214 382	388.23%
Costo Material Otros	1 045	20 155	13 536	24 736	44.52%
SUB-TOTAL COSTO	17 508	143 499	102 228	363 235	648.67%
1/1 Plantas Finales	600	510	510		
COSTO POR PLANTA	137.8	281.4	200.4	\$ 619.60	100%
	28.7%	45.4%	31.9%	100%	



Tres Robles

Muchas gracias

- Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:
 - Presentaciones en congresos y seminarios

2008. 5th International Symposium on Aromatic, Medicinal, Tinctorial and Ornamental Plants. Noviembre, Noumea, New Caledonia. Presentación del trabajo (póster): "**Alstroemeria breeding program in Chile**" (E. Olate, L.H. Escobar, C. Sepúlveda*, C. Encina, M.U. Wilmans y C. Jaramillo).

2008. 13th International Protea Association Conference & IXth International Protea Working Group Symposium. 3-6 Septiembre, Stellenbosch, Sudáfrica. Presentación del trabajo (oral): "**Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species**" (E. Olate*, L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Ríos and P. Errandonea).

2008. 1º Congreso Nacional de Flora Nativa. 21 al 23 de Agosto, Santiago, Chile. Presentación del trabajo (oral): "**Programa de mejoramiento genético en Alstroemeria: avances y problemáticas**" (E. Olate*, L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Encina, M. Úrsula Wilmans y C. Jaramillo).

2007. 2º Simposio de Horticultura Ornamental. Presentación del trabajo: "**Programa de mejoramiento genético en Alstroemeria nativa**" (E. Olate*, C. Sepúlveda, Luis H. Escobar, A. García, M. Gebauer y M. Musalem). Talca, Chile.

2007. VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria REDBIO 2007. 22 al 26 de octubre, Viña del Mar, Chile. Presentación de los trabajos: "**Iniciación y multiplicación *in vitro* de brotes aéreos de Leucospermum 'High Gold' (Proteaceae)**" (C. Ríos, L.H. Escobar, P. Errandonea, E. Olate(*), C. Sepúlveda); "**Optimización del proceso de iniciación de yemas subterráneas de *Paeonia* spp. y efecto de benzilaminopurina en la etapa de multiplicación *in vitro***" (Y. Matsumoto, C. Sepúlveda, K. Pizarro, E. Olate*, L. H. Escobar).

2007. 57th Annual Meeting of the International Plant Propagators' Society - Eastern Region. 16 al 19 de septiembre, Montreal, Canadá. Presentación del trabajo: "**Effect of 6-Benzylaminopurine on the *in vitro* growth of Alstroemeria 'Freedom', 'Liberty' and 'Sweet Laura' during the stage of multiplication**" (E. Olate*, P. Villalobos, C. Sepúlveda and L.H. Escobar).

2005. 55th Annual Conference of the International Plant Propagators' Society - Eastern Region. Presentación del trabajo: "**Manejo y aclimatación de plantas provenientes de cultivo *in vitro***" (E. Olate* y A. Blanco). 3 al 6 de Octubre. Atlantic City, NJ. USA.

- Organización de seminarios y talleres

2006. Curso Internacional **“Actualización, comercialización y técnicas en post cosecha en flores de corte y follajes”**. Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile – Fundación para la Innovación Agraria, 29, 30 de Noviembre y 1º de Diciembre de 2006. Santiago, Chile.

2004 al 2007. Expositores Feria Anual Flores de Invierno del Club de Jardines de Chile. **Programa de Floricultura y Micropropagación FAIF-UC**. Casas de Lo Matta. Vitacura, Santiago, Chile.

2006 y 2008. Expositores Feria Agro Innovación UC – INAGRO 2006. **Programa de Floricultura y Micropropagación FAIF-UC**. Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

2005. Exposición Seminario **“Proteas: Nueva Alternativa Para el Secano Costero”**. Jornadas de Invierno. Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

- Días de campo o reuniones técnicas
- Publicaciones científicas

2009. **Olate, E.**, L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Rios and P. Errandonea. **Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species**. Acta Horticulturae (enviado)

- Publicaciones divulgativas
- Artículos en prensa

Ben Gill. 2008. Protea growers up-and-coming: Chile profile. Floraculture International. Septemeber 2008: 56-57.

Visión Universitaria. 2007. Agronomía trabaja para renovar el mercado de las flores a través de cultivo in vitro. Sección Universidad y Sociedad. Diciembre 2007: 9.

El Mercurio. 2007. Modificaciones genéticas: La UC hace de hada madrina de las alstromerías. 26 diciembre 2007: A12.

- Páginas web

www.plantainvitro.cl

Plantas In Vitro - Difusión - Eventos - Windows Internet Explorer

http://www.plantainvitro.c/difusion.html

Vinculos Customize Links

MI PortalUC Plantas In Vitro - Dif... Home Fresh Print Page Tools Help Messenger

Unidad de Propagación In Vitro de Especies Ornamentales

Inicio Quiénes Somos Sitios Relacionados Mapa del Sitio Contactenos

Difusión / Eventos

Eventos Tesis Asociadas Eventos Pasados

Lineas de Investigación
Especies de Interés
Servicios
Proyectos
Difusión
Glosario de Términos

Noticias

SEGUNDO CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARQUES NACIONALES Y OTRAS ÁREAS PROTEGIDAS CONSERVACION, 30 de Septiembre al 06 de Octubre de 2007 Bariloche, Argentina.

Dos profesores premiados por Fundación COPEC - UC. La Fundación Copec-UC realizó la premiación de las nueve iniciativas ganadoras del Cuarto Concurso Nacional de Proyectos de Desarrollo de Recursos Naturales.

ISFBP 2008 Xth International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials The Xth International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials will be held in Golden Tulip Hotel De Nachtogal in Lisse, The Netherlands, April 20 - 24, 2008, under the auspices of the International Society for Horticultural Science.

Resumen de Prensa Fundación Copec-Universidad Católica Completo informe semanal con los principales hechos informativos aparecidos en medios de comunicación nacional con información tanto de nuestra fundación como de los sectores afines a I+D+i, Innovación Científico-Tecnológica, Tecnología, Sectores Productivos y Gobierno, Entidades y Emprendimiento. Además, le recordamos que usted puede ver la información ampliada de cada noticia con sólo pinchar el título de esta.

SEGUNDO CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARQUES NACIONALES Y OTRAS ÁREAS PROTEGIDAS CONSERVACION, INTEGRACION Y BIENESTAR PARA LOS PUEBLOS DE AMÉRICA LATINA 30 de Septiembre al 06 de Octubre de 2007 Bariloche, Argentina. Este Congreso será un evento interdisciplinario, que propiciará el intercambio de ideas y experiencias de todos los que se beneficiarán y ofrecen sus conocimientos al manejo y administración de los parques nacionales y áreas protegidas de la Región y que producirá resultados y acciones concretas en la gestión y manejo de estas unidades de conservación.

Dos profesores premiados por Fundación COPEC - UC. La Fundación Copec-UC realizó la premiación de las nueve iniciativas ganadoras del Cuarto Concurso Nacional de Proyectos de Desarrollo de Recursos Naturales. En la ceremonia, que fue inaugurada por el presidente de la Fundación Copec-UC, Roberto Angelini, y encabezada por el rector Pedro Pablo Rosso, se distinguieron cuatro proyectos a cargo de académicos de la Universidad Católica.

Entre ellos se destacan uno presentado por la profesora de la Facultad María Angélica Feilenberg, quien trabajó en el desarrollo de edulcorantes antioxidantes en base a quillay y uva para el mejoramiento de las carnes. Junto a ella se distinguió el profesor Eduardo Clate por su programa de mejoramiento genético intensivo en

Inicio Berceje... RESUM... Unidad... Present... FOTOS

18/02

V. ANEXOS

Como fue indicado para los informes de avance técnico, pero en este caso la información no corresponde sólo a la actualización sino a la histórica. Por ejemplo, cambios en el equipo técnico, se debe adjuntar la ficha de todos los participantes que participaron en alguna de las etapas del proyecto aunque hayan sido reemplazados.

No Hubo cambios en el equipo técnico u otras actividades a informar.

VI. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Aitken-Christie J. 1991. Automation. In: Debergh PC & Zimmerman RJ (eds) *Micropropagation: Technology and Application* (pp 363-388). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
2. Akutsu M. y SAto H. 2002. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstroemeria* calli. *Plant Science*, 163 (3): 475-479.
3. Albers J. y Kunneman M. 1992. Micropropagation of *Paeonia*. *Acta Horticulturae*, 314 : 85-92.
4. Alvard D., Cote F. y Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid cultura for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 32: 55-60.
5. Barraza, C. 2004. Tesis Magíster "Estudios en cultivo *in vitro* de *Rhodophiala bagnoldii* (Amarillidaceae), una geófito nativa con potencial ornamental". Profesor guía E. Olate.
6. Beruto, M.; Lanteri, L. y Portogallo, C. 2004. Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 79 (2): 249-255.
7. Berthouly M., Dufour M. y Alvard D. Carrasco C., Alemano L. & Teisson C. 1995. Coffee micropropagation in a liquid médium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers (eds) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon (pp 514-519), Vevey.
8. Bouza L., Jacques M. y Miginiac E. 1994. In vitro propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase.. *Scientia-Horticulturae*, 57(3): 241-251.
9. Chengalrayan K. Hazra S. y Gallo-Meagher M. 2001. Histological analysis of somatic embryogenesis and organogenesis induced from mature zygotic embryo-derived leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant-Science*.161(3): 415-421
10. Chiari A. y Bridgen E., 2002. Meristem cultura and virus eradication in *Alstroemeria*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*, 68(1): 49-55.
11. Chiari A. y Bridgen E., 2000. Rhizome splitting: a new micropropagation technique to increase in vitro propagule yield in *Alstroemeria*. *Tissue and Organ Culture*, 62(1): 39-46.
12. Debergh P. 1988. Improving mass propagation of in vitro plantlets . In: Kozai T (ed) *Horticulture in High Technology Era* (pp 45-57). International Symposium on High technology in Protected Cultivation, Tokyo.
13. Debergh P. Harbaoui Y. & Lemeur R. 1981. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*)/ evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol.Plant*, 53: 181 -187
14. Escalona M., Lorenzo JC., Gonzalez B., Daquinta M., Gonzalez JL., Desjardins Y. & Borroto CG. 1999 . Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr).micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep*. 18: 743-748.
15. Escobar L.H., Olate A., Jordán M. and Gebauer M. 2005. *In vitro* indirect organogenesis of *Leucocoryne purpurea*, an ornamental geophyte species endemic to Chile. In: *Journal of*

Conference 2005 of American Society for Horticultural Science. August 2005, Las Vegas, USA (in print).

16. Etienne H. y Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant cell. Tissue Culture and Organ Culture*, 69(3): 215-231.
17. Ferreira CD., Dias JD. y Canhoto JM. 2003. In vitro propagation of *Leucadendron laureolum* x *L. salignum* cv. Safari Sunset: ultrastructural and anatomical studies of regenerated plantlets. *Acta Horticulturae*. (602): 29-38.
18. FIA, 1997. Rescate y multiplicación de bulbosas nativas de valor comercial
19. FIA, 1997. Cultivo, cosecha y comercialización de la *Paeonia lactiflora* en Magallanes.
20. FIA, 1998. Establecimiento y evaluación de una plantación comercial de Peonia herbácea (*Paeonia lactiflora*).
21. FIA, 2000. Introducción y evaluación de once variedades de Peonias (*Paeonia lactiflora*) en la zona de Temuco IX Región.
22. FIA, 2000. Cultivo comercial de proteáceas en el secano de la VII Región.
23. FIA, 2001. Introducción y evaluación de ocho variedades de peonías (*Paeonia lactiflora*) en la zona de Panguipulli, Xª Región.
24. FIA, 2002. Introducción de proteáceas como alternativa productiva al secano de la V Región.
25. FIA, 2002. Las proteáceas, una oportunidad de desarrollo económico para el secano costero de la Sexta Región.
26. FONTEC, 1993. Experimentación para la introducción del cultivo de la "*Peonia arbustiva*", en Magallanes.
27. FONTEC, 1995. Introducción del cultivo y producción de peonias para flor de corte en la VII Región.
28. FONTEC, 1997. Introducción y evaluación de especies del genero protea en el secano costero de la VI Región, como vara y flor de corte para exportación.
29. FONTEC, 1998. División o fragmento de la Peonia herbácea sobre distintos tamaños iniciales y en distintas etapas de cultivo en la X región, comuna de Puerto Octay.
30. Gabryszewska, E. 2000. The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. Jadwiga in vitro. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*. 6(3/4): 157-169.
31. Gabryszewska E. y Rudnicki RM. 1997. The effects of light quality on the growth and development of shoots and roots of *Ficus benjamina* in vitro. *Acta-Horticulturae*. 1997; (418): 163-167.
32. Garcés, M. 2003. Tesis Magíster "Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeifer) Backberg (Cactaceae), una especie endémica de Chile en peligro de extinción". Profesor guía E. Olate.

33. Ham, F. 2003. Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Mención Fisiología y Producción de Cultivos "Evaluación de la germinación *in vitro* de *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil., geófita endémica con potencial ornamental". Profesor guía E. Olate.
34. Hartmann H. y Kester D. y Davies F. 1997. Plant propagation. Principles and practices. Printice Hall Englewood Clifts. Capítulo 19: In vitro techniques.
35. Hsueh-Shih Lin, Jeu MJ. De y Jacobsen E. 2000. The aplication of leafy explant micropropagation protocol in enhancing the multiplication efficiency of *Alstroemeria*. *Scientia Horticulturae*. 85 (4): 307-318.
36. Hsueh-Shih Lin, Jeu MJ. De y Jacobsen E. 1998. Formation of shoots from leaf axils of *Alstroemeria*: the effect of the position on the stem. *Plant Cell. Tissue and organ Culture*, 52(3): 165-169.
37. Hussey, G. 1986. Problems and prospects in the *in vitro* propagation of herbaceous plants. In: Withers LA & Alderson PG (eds). *Plant Tissue Culture and ist Agricultural Applications* (pp 69-84). Butterworths. Boston.
38. Kristiansen, K., H. Ornstrup y K. Brandt. *In vitro* PPF and media composition affect both *in* and *ex vitro* performance of *Alstroemeria* Butterfly-hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 145-153
39. Krueguer S., Robacker C. & Simonton W. 1991. Cultura of *Amelanchier x grandiflora* in a programable microporpagation apparatus. *Plant Cell Tissue and Organ Cultura*, 27: 219-226.
40. Laval, E. 2003. Flores de corte. Mercados Agropecuarios NO 130 (Mayo). ODEPA - Gobierno de Chile. www.odepa.cl.
41. Lyon, G. 1991. Bases biológicas para la regeneración *in vitro* de *alstroemeria*. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Católica de Chile. 114 p.
42. McComb, BH. Y MacCown, DD. 2000. a general approach for developing a commercial micropropagation system. *In Vitro cellular and developmental biology plant*. 35(4): 276-277.
43. Newell C., Growns D. y cComb J. 2003. The influence of medium aeration on *in vitro* rooting of Australian plant microcuttings. *Plant Cell. Tissue and organ Culture*, 75(2): 131-142.
44. ODEPA. 2005. Estadísticas de la Agricultura Chilena. Comercio exterior silvoagropecuario. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Ministerio de Agricultura. Chile. www.odepa.cl .
45. Orlikowska T., Marasek, A. y Kucharska, D.1998. Regeneration of *Paeonia mlokosewitschii* Lom. And *P. tenuifolia* L. *in vitro* from different explants. 67 (3/4): 223-227.
46. Pedersen, C., C.W. Hansen, K. Brandt and K. Kristiansen. 1996. *Alstroemeria* plantlets can be induced to flowering by cold treatment during *in vitro* culture. *Scientia Horticulturae* 66: 217-228.
47. Pérez-Francés JF., Raya-Ramallo V. y Rodrigues-Perez JA. 2001. Micropropagation of *Leucospermum* 'Sunrise' (Proteaceae). *Acta Horticulturae*, (545): 161-169.

48. Pérez-Francés JF., Raya-Ramallo V. y Rodrigues-Perez JA. 1995. Effect of different factors on in vitro multiplication of *Leucadendron* 'Safari Sunset' (Proteaceae). *Acta Horticulturae*, (387): 115-120.
49. Pierik RLM. 1991. Micropropagation of ornamental plants. *Acta-Horticulturae*. (289): 45-53
50. Reuveni M., Evenor D. y Jaacov JB. 2003. On the road to micro-propagation of *Banksia ashbyi*. *Acta-Horticulturae*,(602): 149-154.
51. Rugge BA. 1995. Micropropagation of *Protea repens*. *Acta-Horticulturae*, (387): 121-127.
52. Simonton W., Robacker C & Krueger S. 1991. A programable micropropagation apparatus using cycled medium. *Plant Cell Tissues and Organ Culture*, 27 :211-218.
53. Sluis CJ. y Walter KA. 1985. Commercialization of plant tissue culture propagation. *Intl. Assoc. Plant Tiss. Newsl.* 47 :2-12.
54. Tapia, C. 2005. Tesis de grado "Iniciación in vitro de algunas especies Proteáceas de interés comercial en Chile e Iniciación *in vitro* de *Herbertia lahue*, una Iridácea chilena de interés ornamental". Profesor guía E. Olate.
55. Teisson C. y Alvard D. Lartaud M., Etienne H., Berthouly M., Escalona M. & Lorenzo JC. 1999. Temporary immersion for plant tissue cultura. In : *Plant Biotechnology and In vitro biology in the 21st Century*, Proceedings of the ICth International Congress of Plant Tissue and Cell Cultura, section H : Novel micropropagation methods (pp 629-632), Jerusalem.
56. Trigiano R. y Gary D. 1999. *Plant Tissue Cultura and Laboratory Exercises*. Segunda Edición. *Organogenesis*: Capitulo 14 pp 125-138.
57. Trigiano R. y Gary D. 1999. *Plant Tissue Cultura and Laboratory Exercises*. Segunda Edición. *Somatic Embryogeneis* : Capitulo 19 pp 175-190.
58. Vidal, A.K. 2005. Tesis Magister "Creación de protocolos para la iniciación *in vitro* de semillas y cormos de *Zephyra elegans* D.Don.". Profesor guía E. Olate.
59. Zimmerman, J.L. 1993. Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell* 5: 1411-1423.
60. Ziv M., Meir G. & Halevy AH. 1983. Factors influencing the production of hardened glaucous carnation plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2:55-65.