



Informe Técnico Final

Nombre Proyecto: **Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne.**

Código Proyecto: **PYT-2012-0079**

Ejecutor: **Mansur Agricultural Service Ltda.**

Período comprendido desde el 01 de Diciembre de 2012 hasta el 31 de Diciembre de 2015.

Fecha entrega: 22 de Enero de 2016.

Nombre y firma coordinador proyecto:

Carlos de la Cuadra.

INFORME TÉCNICO FINAL

I. ANTECEDENTES GENERALES

- Código
 - Nombre del Proyecto
 - Región o Regiones de Ejecución (*Originalmente planteadas en la propuesta y las efectivas*)
 - Agente Ejecutor
 - Agente(s) Asociado(s) (*Originalmente planteados en la propuesta y los efectivos*)
 - Coordinador del Proyecto
 - Costo Total (*Programado y Real*)
 - Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (*Programado y Real*)
 - Período de Ejecución (*Programado y Real*)
-

I. ANTECEDENTES GENERALES

Antecedentes

Código:	PYT-2012-0079.
Nombre del Proyecto:	Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne.
Objetivo General:	Mejorar la técnica de propagación in vitro a nivel que permita ofrecer bulbos de variedades registradas o patentadas a un precio competitivo.
Regiones de ejecución (originalmente planteadas):	Valparaíso, Metropolitana
Regiones de ejecución (efectivas):	Valparaíso, Metropolitana
Agente Ejecutor:	Mansur Agricultural Service Ltda.
Nombre(s) Asociado(s):	-
Coordinador del Proyecto:	Carlos de la Cuadra

Costos

Costo general programado:

Costo total de la Iniciativa			
Aporte FIA			
Aporte Contraparte	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total Contraparte		

Ejecución presupuestaria a la fecha:

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA	Suma cuotas programadas ⁽¹⁾	
	Suma cuotas pagadas	
	Suma gasto programado	
	Suma gasto real ⁽²⁾	
Aportes Contraparte	Gasto programado	
	Gasto real	
	Gasto pecuniario programado ⁽³⁾	
	Gasto pecuniario real	

Fecha de inicio iniciativa (programado):	01 de Diciembre de 2012
Fecha de inicio iniciativa (real):	01 de Diciembre de 2012
Fecha término Iniciativa (programado):	30 de Noviembre de 2015
Fecha término Iniciativa (real):	31 de Diciembre de 2015 (31 de Agosto de 2017) ¹

¹ De acuerdo a carta UPP-A-Nº3032 del 21 de Diciembre de 2015, se ha autorizado la realización de actividad "Producción, a escala piloto, de bulbos" con fecha de término 31 de agosto de 2017.

I. RESUMEN EJECUTIVO

Resumen ejecutivo del desarrollo del proyecto, sus objetivos, justificación, resultados e impactos logrados. Debe ser **globalizante**, incorporando aspectos de importancia general dentro del proyecto, y dejando el detalle de la discusión en el Texto Principal. Debe ser corto y específico, no repitiendo las discusiones, análisis y calificaciones específicas contenidas en el Texto Principal.

La floricultura nacional posee un potencial de desarrollo e innovación basado en el fitomejoramiento, la producción y exportación de variedades propias. A la fecha, se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar el potencial ornamental de bulbosas nativas chilenas siendo el género *Leucocoryne* un ejemplo de ello. Lamentablemente, al igual que muchas otras plantas bulbosas chilenas, el *Leucocoryne* no había podido desarrollar su potencial comercial siendo su principal limitante la ausencia de una técnica de multiplicación masiva de bulbos.

Gracias a la ejecución de este proyecto, se encontró una solución para mejorar de la técnica de propagación in vitro en base, principalmente, al ajuste de las variables como temperatura, uso de citoquininas, frecuencia de repique y concentración de sacarosa.

El objetivo principal fue mejorar la técnica de propagación in vitro al nivel que permita ofrecer bulbos de variedades registradas o patentadas a un precio competitivo. Y, el principal resultado logrado fue la obtención de una técnica de propagación masiva que permite la obtención de bulbos florales para su producción comercial.

El principal beneficio buscado es el éxito comercial del *Leucocoryne* de manera que la inversión estatal y privada echa por casi 15 años finalmente fructifique. El negocio principal es la exportación de flor cortada para el mercado internacional (EEUU) en contraestación. Otros negocios asociados: producción de bulbos para venta en mercado nacional y exportación; desarrollo de variedades de flor de corte, flor de jardín y flor de maceta; y, producción de flor cortada para el mercado nacional. Además, ayudar a la conservación de la flora nativa.

II. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)

1. Objetivos del Proyecto:

- Descripción del cumplimiento de los objetivos general y específicos planteados en la propuesta de proyecto, en función de los resultados e impactos obtenidos.
- En lo posible, realizar una cuantificación relativa del cumplimiento de los objetivos.

El objetivo general *“mejorar la técnica de propagación in vitro al nivel que permita ofrecer bulbos de variedades registradas o patentadas a un precio competitivo”* ha sido cumplido. Al 31 de diciembre de 2015 se cuenta con una técnica de propagación in vitro sobre la cual un laboratorio especializado en multiplicación in vitro de plantas bulbosas ornamentales (SMRL-Grupo Hijuelas) planea desarrollar una producción a escala piloto a un precio similar a otros bulbos comerciales ornamentales.

Respecto al objetivo específico (OE) N°1, *“actualizar la información referente a la situación de mercado y la competitividad del Leucocoryne y las variedades nacionales en el mercado internacional”*, su cumplimiento fue de un 100%.

De igual manera, el OE N°2, *“mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro”*, su cumplimiento fue de un 100% alcanzándose para el indicador *“Tasa de multiplicación in vitro general”* el valor meta de 300 bulbos por explante en 2 años.

Relativo al OE N°3, *“evaluar el costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro”*, corrió la misma suerte, se cumplió en un 100%.

El OE N°4, *“producir, a escala piloto, bulbos florales de clones seleccionados usando la técnica de cultivo in vitro”*, no se cumplió. La razón principal es que las actividades asociadas no pudieron iniciarse debido a que se requería el cumplimiento del OE N°2 que, finalmente se logró, pero en forma tardía. No obstante lo anterior, el FIA ha autorizado (Carta UPP-A-N° 3032 del 21 de diciembre de 2015) la realización de la actividad *“Producción, a escala piloto, de bulbos”* de Leucocoryne que se extenderá entre enero 2016 y agosto 2017.

Por último, el OE N°5, *“desarrollar una estrategia comercial a nivel nacional e internacional”*, también fue cumplido. Basado en el conocimiento adquirido durante el proyecto se identificó, contactó y conversó con actores relevantes (principalmente a nivel nacional) que puedan ayudar, en un futuro, a dar valor al Leucocoryne como planta ornamental. Dentro de las empresas contactadas se destaca a SMRL-Grupo Hijuelas, Paz y Flora Ltda., Vivero Pochay y Prolaflora SpA.

2. Metodología del Proyecto:

- Descripción de la metodología efectivamente utilizada (*aunque sea igual a la indicada en la propuesta de proyecto original*).
- Principales problemas metodológicos enfrentados.
- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.
- Descripción detallada de los protocolos y métodos utilizados, de manera que sea fácil su comprensión y replicabilidad (*se pueden incluir como anexos*).

OE N° 1. Actualizar la información referente a la situación de mercado y la competitividad del *Leucocoryne* y las variedades nacionales en el mercado internacional.

La metodología efectivamente utilizada correspondió a la indicada en la propuesta original.

La actualización de la información referente a la situación de mercado y la competitividad del *Leucocoryne* y las variedades nacionales en el mercado internacional fue abordado por medio de:

- ▲ Recopilación de antecedentes de la situación de mercado y competitividad del *Leucocoryne* recurriendo a fuentes secundarias.
- ▲ Desarrollo de “entrevista en profundidad” con expertos con el fin de obtener información respecto al *Leucocoryne*.
- ▲ Elaboración de informe referente a la situación de mercado y la competitividad del *Leucocoryne* (Anexo II-1).

El principal problema metodológico fue encontrar a los “expertos” que conocieran en profundidad el *Leucocoryne*. Se logró ubicar 10 personas que, al menos, lo conocían más que la media. Las personas fueron: Mr. Bolta (Sunlory B.V., Holanda), Mr. Henk Beentjes (BulbsOnaWire, Holanda); Sr. Dick Houter (Dos Cordilleras, Chile), Sr. Bram Delissen (Chilfresh, Chile), Sr. Alexis K. Vidal (Japón), Mr. Eric Walton (Nueva Zelanda), Sr. Eduardo Olate (PUC, Chile), Sra. Gariela Verdugo (PUCV, Chile), Sra. Claudia Barrera (Pazyflora, Chile) y Sr. Leví Mansur (MAS, Chile).

Otra dificultad fue la elaboración de una Ficha Técnica Económica dado la dificultad de encontrar información de campo confiable. Para evitar el exceso de supuestos y estimaciones se contruyó unas fichas que permiten comparar ingresos y egresos directos por metro cuadrado de distintas especies de flores de corte y compararla con el *Leucocoryne*.

La actividades relativas a este objetivo fueron finalizadas el 31/12/2013. No obstante lo anterior, últimos antecedentes de la situación de mercado fueron incluidos en informe “Evaluación Costo/Beneficio de la Técnica Mejorada de Propagación In Vitro de Bulbos de *Leucocoryne*”. Más detalles en OE N°3.

OE N° 2. Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.

La metodología efectivamente utilizada correspondió, en un principio, a la indicada en la propuesta original a la que se le fue complementando para llegar, finalmente, al cumplimiento del objetivo.

Inicialmente, la solución innovadora propuesta fue la mejora de la técnica de propagación in vitro en base al control de la temperatura durante las distintas etapas que forman el proceso. Sin embargo, debido a que el desempeño fue bajo lo esperado, se requirió complementar la técnica de propagación in vitro, principalmente, con otras variables como uso de citoquinina, frecuencia de repique y concentración de sacarosa.

A modo resumido, la técnica de propagación in vitro del *Leucocoryne* se describe de la siguiente manera:

1) Establecimiento del material in vitro

El establecimiento de un cultivo in vitro de *Leucocoryne* puede realizarse por semilla y bulbo. Cuando se utiliza el bulbo, lo más recomendado es usar como explante el “punto de crecimiento”. Es esperable una contaminación de 20% y brotación de 90%.

Eliminar túnicas protectoras secas del bulbo para lavarlo bajo flujo de agua corriente. Luego, lavado en solución fungicida (1 g/L Benomilo + 1 g/L Captan) y enjuague con agua destilada. Posteriormente, lavado con etanol al 95% por 1 minuto y luego se desinfectaron con cloro comercial (50 g·L⁻¹ NaOCl) más la adición de un detergente no iónico (Tween 20®). Al ingresarlos a cámara de flujo laminar, tres enjuagues con agua destilada estéril.

Establecimiento en medio M535 con adición de 30 g·L⁻¹ de sacarosa, 1 mg/L de Bencilaminopurina (BAP), 6 g·L⁻¹ de agar, pH a 5,7 y 2ml·L⁻¹ de PPM® (Plant Preservative Mixture). Temperatura 20 °C con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad.

2) Multiplicación de bulbillos

Una vez establecido, se inician los ciclos de multiplicación. Cada ciclo de multiplicación tiene una duración de ocho semanas y se espera una tasa de multiplicación de 2,4 por ciclo. No es necesario producir daño en disco basal para favorecer nuevos bulbos.

Multiplicación en medio M535 con adición de 60 g·L⁻¹ de sacarosa, 1 mg/L de Bencilaminopurina (BAP), 6 g·L⁻¹ de agar, pH a 5,7 y 2ml·L⁻¹ de PPM® (Plant Preservative Mixture). Temperatura 20 °C con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad.

3) Engorda de bulbillos

Una vez cumplido los ciclos de multiplicación los bulbillos se requiere aumentar su peso y prepararlos para su aclimatación. Se requiere un tiempo mínimo de 8 semanas y se espera alcanzar bulbos con un peso fresco mayor a 0,5 gr.

Engorda en medio M535 con adición de 60 g·L⁻¹ de sacarosa, 0,5 mg/L de Bencilaminopurina (BAP), 6 g·L⁻¹ de agar, pH a 5,7 y 2ml·L⁻¹ de PPM® (Plant Preservative Mixture). Temperatura 20 °C con fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad.

Las principales actividades que permitieron definir la metodología se listan a continuación. Los Informes Finales con la información detallada se encuentran en respectivos anexos.

- 2.1.- Establecimiento de material in vitro, Multiplicación y Bulbificación de bulbillos (Anexo II-2a).
- 2.2.- Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos. (Anexo II-2b, II-2c y II-2d).
- 2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina (Anexo II-2e, II-2f y II-2g).
- 2.6.- Prueba de Protocolo Americano en Lab. Agro – PUC (Anexo II-2h).
- 2.7.- Efecto pH & sacarosa en semillas in vitro en Lab. Agro-PUC (Anexo II-2i).
- 2.8.- Efecto pH & sacarosa en bulbos in vitro en CIDI (Grupo Hijuelas) (Anexo II-2j).

En este esfuerzo de mejora de la técnica de propagación on vitro se contó con la participación de los asesores: Prof. Sr. Eduardo Olate, Prof. Sra. Marlene Gebauer y el estudiante de doctorado Sr. Alejandro Altamira de la Pontificia Universidad Católica de Chile; Prof. Sra. Gabriela Verdugo y la estudiante de magister Srta. Josefina Santana de la Universidad Católica de Valparaíso; Srta. María José Montañola y Sr. Pablo Morales investigadores del Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación de la empresa Sone Mericrom Research Laboratory – Grupo Hijuelas; y la colaboración internacional de Sr. Eric Walton (Nueva Zelanda).

OE N° 3. Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.

Siguiendo la metodología de la propuesta original, se realizó informe Evaluación Costo/Beneficio de la Técnica Mejorada de Propagación In Vitro de Bulbos de *Leucocoryne* considerando los antecedentes técnicos originados en las actividades relacionadas con OE N°2 y OE N°4.

El informe incluye antecedentes de la propagación vegetativa en campo, la importancia del cultivo in vitro, la importancia del cultivo in vitro, una simulación de una producción comercial de bulbos y conclusiones. Los detalles se encuentran en Anexo II-3.

OE N° 4. Producir, a escala piloto, bulbos florales de clones seleccionados usando la técnica de cultivo in vitro.

En líneas generales la metodología utilizada corresponde a lo descrito en propuesta original. Como ha sido explicado con anterioridad, la ejecución de todas las actividades no fue posible debido a que estaba condicionado por el cumplimiento del OE N°2. El OEN°2 se rcumplió casi al finalizar el proyecto (31/12/2015).

Al cierre de este informe (31/12/2015), se avanzó en identificar los clones que serán utilizados en la producción a escala piloto y en identificar el laboratorio que prestará el servicio que corresponde a Sone Mericron Research Laboratory S.A. del Grupo Hijuelas (SMRL-Grupo Hijuelas).

Basado en la autorización entregada por FIA (Carta UPP-A-N° 3032 del 21/12/2015) se llevará a cabo la realización de las actividades no realizadas durante enero 206 y agosto 2017. La especificación del alcance (número de clones, etapas, cantidades y calidad), tiempo y costo se encuentra en Anexo II-4.

OE N° 5. Desarrollar una estrategia comercial a nivel nacional e internacional.

La metodología utilizada correspondió a la indicada en propuesta original. La empresa Mansur Agricultural Service Ltda. entiende que el desarrollo del potencial del Leucocoryne como planta ornamental necesita de la participación de los distintos actores de la cadena productiva.

Con la intención de generar las condiciones que permitan dar el paso, al finalizar este proyecto, a un escalamiento productivo junto a los otros actores de la cadena generando oportunidades de negocio para Chile, se desarrolló una estrategia comercial que incluyó: la elaboración de boletín en modo Facebook (<https://www.facebook.com/Leucocoryne-online-420305598168624/>) y actualización de página web (www.leucocoryne.cl), visitas guiadas (Día de Campo) personalizadas con distintos actores relevantes, y participación en 4^{to} Congreso Nacional de Flora Nativa.

Además, gracias a Convenio de Cooperación entre la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso y la empresa, se realizó, durante dos años, el rescate y valoración de bulbos de Leucocoryne creándose la Colección Ornamental de Leucocoryne PUCV-MAS e identificándose nuevos clones con potencial de convertirse en nuevas variedades de flor de corte y flor de jardín.

A las variedades de flor de corte registradas (Gabriela®, Paulina® y Elena®) se han identificado 6 nuevas potenciales variedades: E526 (tépalos color blanco); E527 y E420 (tépalos color pastel); E624 (tépalos rayados lila); E402 (tépalos color lila); E30 y E639 (tépalos color pastel ligeramente rayados); y, E633 y E542 (tépalos ligeramente rayados). Imágenes en Anexo II-5a.

Los clones seleccionados como variedades de flor de jardín se muestran en la siguiente tabla. Imágenes en Anexo II-5b.

Tipo Flor de Jardín	Tépalo Color Blanco	Tépalo Color Lila	Tépalo Rayado
Alto (50 a 70 cm)	E523; E524	E618	
Bajo (30 a 40 cm)	E552; E555	E104; E621; E622	E122; E414; E637
Bajo c / aroma	E548; E625	E560	

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.

Se entrega cuadro de actividades comparativo entre programación planteada en propuesta original (fila con color de fondo gris) y la real (fila con color de fondo blanco).

Las discrepancias relevantes se destacan con un número entre paréntesis al costado derecho del cuadro y se explican a continuación del cuadro.

Nº OE	Nº RE	Actividades	Fecha de inicio	Fecha de término
1	1	1.1.- Recopilación de antecedentes de la situación de mercado y competitividad del Leucocoryne.	Dic 2012	Ene 2013
			Dic 2012	Jun 2013
		1.2.- Entrevista en profundidad con expertos.	Ene 2013	Mar 2013
			Ene 2013	Sep 2013
1	1	1.3.- Elaboración de Informe referente a la situación de mercado y la competitividad del Leucocoryne.	Mar 2013	May 2013
			Mar 2013	Nov 2013
		1.4.- Elaboración ficha técnica – económica del Leucocoryne (línea base)	Mar 2013	May 2013
			Jul 2013	Nov 2013
2	2	2.1.- Establecimiento de material in vitro, Multiplicación y Bulbificación de bulbillos	Abr 2013	Mar 2014
			Jun 2013	Jul 2014
		2.2.- Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos	Ene 2014	Jun 2015
			Jul 2014	Ene 2016
		2.3.- Visita de asesor internacional.	Sep 2013	Oct 2013
			Sep 2013	Oct 2013
		2.4.- Análisis de Patentabilidad, Redacción de Solicitud de Patente y Presentación de Solicitud de Patente.	Ene 2015	Jun 2015
			-	-
2	2	2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina.	Ene 2014	Jun 2015
			Mar 2014	Nov 2015
		2.6.- Prueba de Protocolo Americano en Lab. Agro – PUC.	May 2014	Nov 2015
			Jun 2014	Dic 2015
2	2	2.7.- Efecto pH & sacarosa en semillas in vitro en Lab. Agro-PUC	Jun 2015	Nov 2015
			Sep 2015	Ene 2016
2	2	2.8.- Efecto pH & sacarosa en bulbos in vitro en CIDI (Grupo Hijuelas)	Jun 2015	Nov 2015
			Ago 2015	Dic 2015
3	3	3.1.- Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.	Ene 2015	Junio 2015
			Julio 2015	Dic 2015
4	4	4.1.- Identificar el laboratorio prestador de servicio de multiplicación in vitro y firmar contrato.	Dic 2013	Mar 2014
			Dic 2013	Dic 2015
4	4	4.2.- Establecimiento de material in vitro, Multiplicación	Abr 2014	Jun 2015

		y Bulbificación de bulbillos	Ene 2016	Jun 2017	(4)
		4.3.- Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos.	Junio 2015	Nov 2015	(4)
			Jul 2017	Ago 2017	(4)
5	5	5.1.- Cultivo de Leucocoryne en invernadero.	Dic 2012	Nov 2015	
			Dic 2012	Dic 2015	
		5.2.- Elaboración de Boletín Técnico y actualización página web	Abr 2014	Jun 2014	
			Jul 2015	Dic 2015	
		5.3.- Visitas guiadas a Cultivo de Leucocoryne (Día de Campo)	Sep 2014	Oct 2014	
			Sep 2015	Oct 2015	
		5.4.- Desarrollo Red de Contactos Nacional / Internacional	Jun 2014	Nov 2015	
			Jun 2014	Dic 2015	
1,2,3, 4 y 5	1,2, 3,4 y 5	Coordinación, Administración general y Relaciones Comerciales.	Dic 2012	Nov 2015	
			Dic 2012	Ene 2016	(3)
1 y 3	1 y 3	Servicio de Terceros PUCV (consultoría; uso de Infraestructura y mantenimiento base; y mano de obra agrícola extraordinaria).	Dic 2012	Nov 2015	
			Dic 2012	Dic 2015	

- (1) A pesar de que el proyecto se extendió un mes, hasta el 31 de diciembre de 2015, la ejecución de la actividad “2.2.- Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos” no se completó en su totalidad. Dificultades técnicas en la medición en Esy. 2 y Esy. 3 explican la demora. De acuerdo a lo indicado por asesor técnico, Prof. Sra. Gabriela Verdugo de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, se estima que, a fines de enero 2016, los ensayos estarán terminados y elaborado informe final.
- (2) Las actividades 2.7.- Efecto pH & sacarosa en semillas in vitro en Lab. Agro-PUC fueron autorizadas a principios del 2do semestre de 2015. Lamentablemente, la actividad 2.7 no logró completarse a tiempo (diciembre 2015) quedando pendiente la última etapa de los experimentos. Error en estimación del tiempo requerido en primera etapa de establecimiento de los experimentos, explican demora. Responsable de la ejecución es la Prof. Marlene Gebauer de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- (3) Relacionado con la Administración General, actividad “Mantenimiento de Equipos (Cámaras Bioclimáticas)” de Gastos Generales. Durante el mes de noviembre 2015 estaba programada la mantención de las dos Cámaras de Crecimiento. Una de las mantenciones fue realizada, pero otra quedó una pendiente. La mantención de la Cámara de Crecimiento faltante requiere una intervención mayor que no fue posible realizarla durante el año 2015 quedando pendiente. La empresa CIENTEC se ha comprometido a realizar dicha mantención al inicio del año 2016.
- (4) Felizmente durante este periodo se logró obtener resultados que nos permitieron cumplir satisfactoriamente con el OE N° 2 “Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y

crecimiento ex vitro.” Lo anterior, ha permitido contar con la autorización para iniciar las actividades relacionadas con el “OE N°4 *“Producir, a escala piloto, bulbos florales de clones seleccionados usando la técnica de cultivo in vitro.”* durante el 2016 y 2017 (Carta UPP-A-N° 3032 del 21 de diciembre de 2015).

- (5) La actividad no fue realizada debido a las dificultades y demora en la obtención de una técnica mejorada de propagación in vitro (RE N°2). Situación advertida en informes de avance. El cumplimiento tardío, diciembre 2015, imposibilitó conseguir autorización para su ejecución.

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.
- 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.

El OE N°1 *“Actualizar la información referente a la situación de mercado y la competitividad del Leucocoryne y las variedades nacionales en el mercado internacional.”* tuvo como RE *“1. Actualización de la información referente a la situación de mercado y la competitividad del Leucocoryne y las variedades nacionales en el mercado internacional.”*.

A principios de Noviembre de 2013, se dio cumplimiento del OE N°1 por medio de la elaboración de “Informe Situación de Mercado del Leucocoryne” (Anexo II-1). Las conclusiones fueron:

- a) El principal uso del Leucoryne es como flor de jardín y como flor de corte.
- b) El principal proveedor de bulbos de Leucocoryne es Holanda. El precio unitario promedio por bulbo es USD 0,10.
- c) Como flor de jardín, se comercializan en los principales mercados mundiales (Europa, Estados Unidos y Japón) bulbos secos de Leucocoryne en bolsas con 5 a 20 bulbos con un precio unitario por bulbo de USD 0,50 a USD 1,00 por bulbo.
- d) Flores de corte de Leucocoryne son, principalmente, producidas y comercializadas en Japón.
- e) A nivel nacional, el precio a productor por flores de corte de Leucocoryne podría ser de USD 0,20.
- f) La producción de flores de corte de Leucocoryne es tan competitivo como lo es la producción de flores de Fresa.
- g) Es extraordinariamente relevante para la rentabilidad del productor de flores la capacidad de reutilizar los bulbos de Leucocoryne durante más de dos temporadas.

Relacionado al OE N°2 *“Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.”*, se

alcanzó el resultados esperado al final del año 2015. La situación actual es una “Tasa de Multiplicación In Vitro General” de 300 bulbos por explante en **2 años** correspondiendo al valor meta.

Cuadro 1. Indicadores de resultados relacionados con OE N° 2.

Indicadores de Resultados				Fecha de Cumplimiento
Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Línea base del indicador (situación actual)	Meta del indicador (al final del proyecto)	
Tasa de multiplicación in vitro general (indicador resumen)	Cantidad de bulbos terminados/ explante/tiempo (años)	5 a 10 bulbos / explante/ 2 años	300 bulbos / explante / 2 años	30/06/15

Las variables ajustadas más importantes que explican este nuevo desempeño de la técnica de cultivo in vitro es el uso de citoquinina (1 mg/l de BAP), la frecuencia de repique (cada 8 semanas) y el uso de sacarosa (60 g/l) en los ciclos de multiplicación.

El RE “3. Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.”, relacionado con OE N°3 “Evaluar el costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.” se obtuvo durante el 2do semestre de 2015 (Anexo II-3).

Las principales conclusiones del informe son:

- Es deseable que las variedades clonales de *Leucocoryne* presenten la característica de una alta Tasa de Multiplicación Vegetativa en Campo en un año (> 2,5).
- La actual Tasa de Multiplicación In Vitro de bulbos de *Leucocoryne* es de 300 bulbos / explante / 2 años. Similar a la presentado por *Lilium*.
- Una alta Tasa de Multiplicación In Vitro es deseable pero no debiera considerarse una condición limitante para el desarrollo de variedades clonales de bulbosas como el *Leucocoryne* (opinión de experto Dr. Arie Petersen, Septiembre 2015).
- La actual Tasa de Multiplicación In Vitro de bulbos de *Leucocoryne* permite una ganancia de tiempo de 3 años.
- Un bulbo producido in vitro es caro, pero se puede reducir su costo luego de sucesivas temporadas de cultivo en campo.
- Simulando una producción piloto de 525.000 bulbos/año en 0,5 ha, se requiere una inversión de CLP 8 millones. Se estima un VAN de CLP 10 millones a una tasa de 10% y un TIR de 22%.

Por último, basado en cotización entregada por empresa SMRL (Grupo Hijuelas), el costo unitario de bulbo producido in vitro es de \$ 221 (IVA incluido).

El "RE N°4. Producción de bulbos florales de clones seleccionados a escala piloto.", relacionado con OE N°4 "Producir, a escala piloto, bulbos florales de clones seleccionados usando la técnica de cultivo in vitro.", no se logró. Sin embargo, las actividades relacionadas han sido reprogramada para realizarse entre enero 2016 y agosto 2017, y una vez finalizadas, se espera lograr el RE N°4.

La principal explicación es el cumplimiento tardío del OE N°2 y su resultado asociado, RE N°2. *Técnica de cultivo in vitro mejorada basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa.*", que era una condición necesaria para continuar con las actividades del OE N°4.

En el marco de colaboración entre la empresa Mansur Agricultural Service Ltda y la empresa SMRL (Grupo Hijuelas), se cuenta con cotización actualizada (18 de enero de 2016) para realización de producción a escala piloto de bulbos de Leucocoryne utilizando técnica mejorada de multiplicación in vitro (Anexo II-4).

El RE "5. Conocimiento por parte del mercado y sus actores del estado actual del Leucocoryne.", relacionado con OE N°5 "Desarrollar una estrategia comercial a nivel nacional e internacional." se cumplió durante el desarrollo del proyecto (01/12/2012 al 30/12/2015).

Se creó Colección Ornamental de Leucocoryne PUCV-MAS rescatándose variedades registradas de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso e identificándose potenciales nuevas variedades de flor de corte y jardín (Anexo II-5a y II-5b).

Se contactó y recibió visitas de empresas como SMRL-Grupo Hijuelas (Patricia Sone), Vivero Pochay (Annemarie Kamp), empresa productora y comercializadora de flores de corte Prolaflor S.p.A. (Edgardo Grasso), empresa productora y comercializadora de bulbos Paz y Flora Ltda. (Claudia Barrera), Restaurante Boragó (Rodolfo Guzmán), entre otros.

Se actualizó página web www.leucocoryne.cl y se creó página de Facebook "Leucocoryne online" (<https://www.facebook.com/Leucocoryne-online-420305598168624/>).

Se presentaron dos trabajos, en modalidad panel, en el 4to Congreso Nacional de Flora Nativa realizado entre el 14 y 17 de Octubre de 2015.

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*).
- Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.
- Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.
- Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios (*según corresponda a la naturaleza del proyecto*).

El proyecto incluyó dentro de sus objetivos, actividades y resultados la realización de “Informe Situación de Mercado del Leucocoryne” (RE N° 01, Anexo II-1) y una “Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro” (RE N° 03, Anexo, II-3). Sus principales conclusiones se encuentran en la sección anterior (4.- Resultados del proyecto).

Al término de este proyecto, al contactar con un técnica mejora de propagación in vitro, han mejorado las condiciones para el desarrollo del potencial ornamental del Leucocoryne. Es positivo mencionar que existe interés en el mercado nacional e internacional (Holanda, Japón y Sudáfrica) por el Leucocoryne como flor de corte, flor de jardín y, especialmente, flor de maceta. Además, se han creado una red de contacto y cooperación con empresas importantes en el rubro de bulbosas ornamentales que permitirá crear alianzas futuras en la producción y comercialización. Y, a la fecha, el paquete tecnológico para producir y comercializar no sería una limitante. Por último, aparte del potencial ornamental del Leucocoryne, ha surgido interés en el uso comestible y nutracéutico.

No obstante lo anterior, existen espacios de mejora como es el desarrollo de nuevas variedades que se ajusten a diseños y colores más deseables de los mercados como el caso del mercado japonés y el del estado de california (EEUU).

La empresa desea continuar mejorando sus competencias en el desarrollo de variedades de plantas nativas junto el desarrollo de una estrategia de colaboración con otras empresas que aporten su know how en la producción y comercialización.

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

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Formación de empresa o unidades de negocio	0	1	
Producción (<i>por producto</i>)	0	1.200 bulbos / año	
Costos de producción			
Ventas y/o Ingresos	0	/ año	
<i>Nacional</i>	0	/ año	
<i>Internacional</i>	0	0	
Convenios comerciales	0	<ul style="list-style-type: none"> • Paz y Flora Ltda. ha comercializado 1.200 bulbos de Leucocoryne en Homecenter en 2014 y 2015. Ha solicitado 50.000 para exportar a sudáfrica. • SMRL-Grupo Hijuelas realizará producción in vitro de 30.000 bulbos (entrega ago 2017). • Vivero Pocochay interesado en 5.000 bulbos para macetas para temporada 2016. • Prolaflor SpA interesada en comercializar flores de corte. • Restaurante Borago interesado en dar uso comestible a flores. 	

Impactos Sociales

Logro	Al inicio del Proyecto	Al final del proyecto	Diferencial
Nivel de empleo anual		(1)	
Nuevos empleos generados		(1)	
Productores o unidades de negocio replicadas		(1)	

(1) Considerando el nivel de desarrollo del proyecto y el horizonte de evaluación completar tabla de impactos sociales.

Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto				
Proceso			1	Técnica de multiplicación In Vitro del Leucocoryne, 300 bulbos por explante en 2 años.
Servicio				

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes		
Solicitudes de patente		
Intención de patentar	1	Existe intención de patentar técnica mejorada de multiplicación in vitro. Se espera que en el corto plazo conseguir fondos para iniciar el proceso.
Secreto industrial		
Resultado no patentable		
Resultado interés público		

Logro	Número	Detalle
Convenio o alianza tecnológica	4	<ul style="list-style-type: none"> • Convenio de Cooperación con Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Creación Colección Ornamental del Leucocoryne PUCV-MAS y acceso a variedades. • Contrato de Servicios con Laboratorio de Biotecnología (Cultivo In Vitro) de Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. • Contrato de Servicios de Asesoría con Escuela de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota. • Contrato de Confidencialidad con Sone Mericrom Research Laboratory - Grupo Hijuelas para actividades de investigación y producción de bulbos in vitro.
Generación	1	<ul style="list-style-type: none"> • EST-2016-0037 "Explotación Comercial del Leucocoryne como

nuevos proyectos		Planta Ornamental y su Potencial Nutraceutico", Convocatoria Agricultura Sustentable. Proyecto admitido pero no adjudicado.
------------------	--	---

Impactos Científicos

Logro	Número	Detalle (<i>Citas, título, descripción</i>)
Publicaciones	1	<ul style="list-style-type: none"> De la Cuadra, C., A.K. Vidal, S. Lefimil, and L. Mansur. Temperature Effect on Seed Germination in the Genus Leucocoryne (Amaryllidaceae). Hortscience. (enviado 30/10/2015; aceptado 15/01/2016).
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	3	<ul style="list-style-type: none"> Altamira, A., Mansur, L. y E. Olate. 2013. Respuesta de diferentes genotipos del género Leucocoryne en el desarrollo de un protocolo de multiplicación clonal masiva in vitro. 3^{er} Congreso Nacional de Flora Nativa, 5 al 7 de Septiembre de 2013, Campus Antumapu, Universidad de Chile. Libro Resumen: Domesticación pág. 17-19. (Resumen). Altamira, A., C. De la Cuadra, L. Mansur, E. Olate, y M. Gebauer. 2015. Efecto de la temperatura en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos de tres genotipos de Leucocoryne en condiciones in vitro. 4^{to} Congreso Nacional de Flora Nativa, 14 al 17 de Octubre de 2015, Facultad de ciencias Forestales, Universidad de Concepción. De la Cuadra, C., A.K. Vidal, S. Lefimil, y L. Mansur. 2015. Efecto de la Temperatura sobre la Germinación de Semillas del Género Leucocoryne. 4^{to} Congreso Nacional de Flora Nativa, 14 al 17 de Octubre de 2015, Facultad de ciencias Forestales, Universidad de Concepción.
Integración a redes de investigación	3	<ul style="list-style-type: none"> Trabajos en coordinación con Prof. Sr. Eduardo Olate y Prof. Sra. Marlene Gebauer del Laboratorio de Biotecnología (Cultivo In Vitro) de Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. Trabajos en coordinación con Prof. Sra. Gabriela Verdugo de la Escuela de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota. Trabajos en coordinación con investigadores María José Montañola y Pablo Morales del Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación (CIDI) perteneciente a la empresa SMRL-Grupo Hijuelas.

Impactos en Formación

Logro	Numero	Detalle (<i>Título, grado, lugar, institución</i>)
Tesis pregrado	1	<ul style="list-style-type: none">• Efecto de la temperatura sobre la germinación de semillas de especies de <i>Leucocoryne</i>. Tesis para optar al título de Biólogo. Instituto de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Alumno: Susana Lefimil Rodríguez.
Tesis postgrado	2	<ul style="list-style-type: none">• Prolongación del tiempo de crecimiento de bulbos de <i>Leucocoryne</i> propagados in vitro a través de la aplicación de Fluridona. Proyecto de Tesis para optar al título de Magister en Ciencias Agronómicas y Ambientales. Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Alumno: Josefina Santana Toro.• Desarrollo de técnicas in vitro como apoyo al mejoramiento genético y a la multiplicación clonal masiva de <i>Leucocoryne</i> spp. (Alliaceae). Proyecto de Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias de la Agricultura. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Alumno: Alejandro Altamira Bravo.
Pasantías		
Cursos de capacitación		

7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales
- Técnicos
- Administrativos
- Gestión
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Los principales problemas presentados durante a ejecución del proyecto correspondió a problemas técnicos relacionados con el OE N° 2 *“Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.”*

Los problemas técnicos fueron de distinta naturaleza, desde la contaminación de bulbos en etapa de establecimiento in vitro hasta el funcionamiento deficiente cámaras bioclimáticas recién compradas. Sin embargo, el problema que obligó a invertir mayor esfuerzo de tiempo y recursos, fue que la solución innovadora (uso de temperaturas frescas) no fue suficiente para mejorar el desempeño dela técnica de propagación in vitro al nivel del indicador meta.

Con tal de conseguir el OE N°2, en la medida que se analizaban los resultados de los experimentos programados originalmente, se fueron desarrollando nuevos que incluyeran nuevas variables que mejoraran el desempeño. Dentro de los nuevos experimentos, aprobados por FIA, podemos mencionar:

1. Efecto Genotipo, Temperatura, Fotoperiodo y Citoquinina (Actividad 2.5).
2. Prueba de Protocolo Americano en Lab. Agro – PUC (Actividad 2.6).
3. Pruebas de multiplicación in vitro por parte de la empresa Sone Mericrom Research Laboratory – Grupo Hijuelas.
4. Efecto pH & sacarosa en semillas in vitro en Lab. Agro-PUC. (Actividad 2.7).
5. Efecto pH & sacarosa en bulbos in vitro en CIDI (Grupo Hijuelas) (Actividad 2.8).

Felizmente, los resultados obtenidos, luego de realizados los experimentos, permitieron cumplir con el OE N°2.

8. Otros Aspectos de Interés

9. Conclusiones y Recomendaciones:

- Desde el punto de vista:
 - Técnico
 - Económico
 - De gestión
-

El proyecto "Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para la producción comercial de planta nativa chilena *Leucocoryne*" (Cod. PYT-2012-0079) cumplió con su objetivo general de "mejorar la técnica de propagación in vitro a nivel que permita ofrecer bulbos de variedades a un precio competitivo".

Sin restar mérito a lo anterior, el desarrollo del *Leucocoryne* como planta ornamental requiere seguir avanzando en el proceso para convertirse en una alternativa económica para Chile.

Desde un punto de vista técnico, fue ingenuo pensar una solución innovadora reducida a una sola variable (temperatura) sería suficiente para ajustar un protocolo de multiplicación in vitro. Gracias a la comprensión, flexibilidad y apoyo del FIA, se logró enmendar la situación y mejorar el protocolo de multiplicación hasta alcanzar el desempeño deseado.

Desde un punto de vista económico, fue un error el haber reducido el proyecto al uso del *Leucocoryne* como flor de corte basado en las tres variedades clonales registradas. Debió haberse permitido una aproximación más amplia que incorporara financiamiento para desarrollar el programa de mejoramiento genético de desarrollo de nuevas variedades con potencial ornamental amplio (flor de corte, flor de jardín y flor de macetas) y otros usos (comestible y nutracéutico).

Desde un punto de vista de gestión, fue un acierto el desarrollar una red de apoyo que involucró a profesionales nacionales e internacionales con experiencia en cultivo in vitro junto con la participación de empresas especializadas como Sone Mericrom Research Laboratory - Grupo Hijuelas.

VII. 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.
- Listado (número y detalle) de actividades por instrumento de difusión, como por ejemplo:
 - Presentaciones en congresos y seminarios
 - Organización de seminarios y talleres
 - Días de campo o reuniones técnicas
 - Publicaciones científicas
 - Publicaciones divulgativas
 - Artículos en prensa
 - Páginas web

Durante el desarrollo del proyecto se difundieron algunos resultados. Se utilizó preferentemente, las presentaciones en congresos, visitas guiadas (Día de Campo), publicaciones científicas, página web y página de facebook.

A continuación, se presenta en una tabla las distintas actividades:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes*	Documentación Generada*
5 al 7 de Sep de 2013	Campus Antumapu, Universidad de Chile. Santiago.	Presentación en Congreso. 3er Congreso Nacional de Flora Nativa	1 (Leví Mansur)	Resumen trabajo realizado. Anexo VII-1
14 al 17 de Oct de 2015	Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Concepción.	Presentación en Congreso. 4to Congreso Nacional de Flora Nativa	2 (Carlos de la Cuadra y Leví Mansur)	Resumen y Poster de algunos trabajos realizados en el marco de este proyecto. (Anexo VII-2 y VII-3)
Oct 2015	Hortscience, revista científica de la Amercian Society for Horticultural Science	Publicación Científica	2 (Carlos de la Cuadra y Leví Mansur)	Artículo: Temperature Effect on Seed Germination in the Genus Leucocoryne (Alliaceae). Enviado el 30/12/2015. Anexo VII-4

Sep a Nov 2015	Escuela de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Sector Flores. Colección Ornamental de Leucocoryne PUCV-MAS.	Visitas Guiadas (Día de Campo)	SMRL-Grupo Hijuelas (Patricia Sone), Vivero Pochay (Annemarie Kamp), Prolaflor S.p.A. (Edgardo Grasso), Paz y Flora Ltda. (Claudia Barrera), Restaurante Boragó (Rodolfo Guzmán), Pachamama Gourmet SpA (Sergio Aguilar), Agrícola Tencadán Ltda. (Betania Barrientos)	
Jul a Dic 2015	Espacio virtual (internet)	Página web Elaboración de Boletín Técnico y actualización página web.	Carlos de la Cuadra, Leví Mansur, Elías Mansur)	Página web www.leucocoryne.cl
Jul a Dic 2015	Espacio virtual (internet)	Página Facebook Elaboración de Boletín Técnico.	Carlos de la Cuadra, Leví Mansur, Elías Mansur)	Página Facebook "Leucocoryne online" (https://www.facebook.com/Leucocoryne-online-420305598168624/)

VIII. 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.

Se adjunta CV de todos los participantes en anexos anteceditos por número romano de VIII.

- Carlos de la Cuadra, Anexo VIII-1,
- Leví Mansur, Anexo VIII-2,
- Elías Mansur, Anexo VIII-3,
- Eduardo Olate, Anexo VIII-4,
- Gabriela Verdugo, Anexo VIII-5,
- Eric Walton, Anexo VIII-6,
- Marlene Gebauer, Anexo VIII-7.

IX. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Cada informe adjuntado como anexo incluye la bibliografía consultada.



ANEXOS

Informe Técnico Final

Nombre Proyecto: Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena *Leucocoryne*.

Código Proyecto: PYT-2012-0079

Ejecutor: Mansur Agricultural Service Ltda.

Período comprendido desde el 01 de Diciembre de 2012 hasta el 31 de Diciembre de 2015.

Anexo II-1

INFORME
SITUACIÓN de MERCADO
del
LEUCOCORYNE

PROYECTO CÓDIGO
PYT-2012-0079

**Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro
para producción comercial de planta nativa chilena *Leucocoryne*.**

Diciembre 2012 - Junio 2013.

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO y METODOLOGÍA

Se ha preparado el Informe Situación de Mercado del *Leucocoryne* teniendo presente el cumplimiento del objetivo específico y la metodología comprometida.

Como ayuda memoria se muestra tabla con objetivo, descripción de metodología y actividades mencionadas en el Plan de Trabajo.

Objetivo N° 1	Actualizar la información referente a la situación de mercado y la competitividad del <i>Leucocoryne</i> y las variedades nacionales en el mercado internacional.
<p>La actualización de la información referente a la situación de mercado y la competitividad del <i>Leucocoryne</i> y las variedades nacionales en el mercado internacional será abordado por medio de:</p> <ul style="list-style-type: none"> △ Recopilación de antecedentes de la situación de mercado y competitividad del <i>Leucocoryne</i> recurriendo a fuentes secundarias. <ul style="list-style-type: none"> ○ Determinar si existe mercado y dimensionar su tamaño (oferta, demanda y precios) ○ Si no hay mercado, determinar interés por el producto según su uso (flor de corte, flor de maceta, flor de jardín, paisajismo, etc.) △ Desarrollo de “entrevista en profundidad” con expertos con el fin de obtener información de estos últimos respecto al <i>Leucocoryne</i>. La “entrevista en profundidad” será la técnica usada para recurrir a fuentes primarias de información. △ Elaboración de informe referente a la situación de mercado y la competitividad del <i>Leucocoryne</i>. <ul style="list-style-type: none"> ○ Se incluirá la elaboración de una Ficha Técnica Económica para la producción de bulbos y flores. Se estimará la rentabilidad de la producción de bulbos y de flor de corte en base a la información disponible y supuestos de costo, rinde y precio. 	

Actividad
1.1.- Recopilación de antecedentes de la situación de mercado y competitividad del <i>Leucocoryne</i> .
1.2.- Entrevista en profundidad con expertos.
1.3.- Elaboración de Informe referente a la situación de mercado y la competitividad del <i>Leucocoryne</i> .
1.4.- Elaboración ficha técnica – económica del <i>Leucocoryne</i>

ANTECEDENTES DE LA SITUACIÓN DE MERCADO DEL LEUCOCORYNE

Usando Internet como fuente secundaria de recopilación de información se confeccionó una Base de Datos (Anexo N°1) sobre la oferta de material vegetal (semillas y bulbos) del género *Leucocoryne*.

El mercado del *Leucocoryne* puede segmentarse en de la siguiente manera:

1. Bulbosa para Coleccionista
2. Flor de jardín y maceta
3. Flor de corte
4. Proveedor de Bulbos

Bulbosa para Coleccionista

El género *Leucocoryne* es una especie bulbosa que se encuentra en muchas tiendas on-line con una clara orientación a un público “coleccionista” de plantas. Los “coleccionistas” gustan cultivar en su jardín o invernadero plantas provenientes de otras latitudes, le importa conocer el nombre científico, les interesa los temas de cultivo (temperatura, riego, almacenaje) y alcanzan un alto grado de experiencia que les permite gozar el crecimiento, floración y propagación de sus plantas.

Como ejemplo de tiendas on-line podemos citar: Telos Rare Bulbs (<http://telosrarebulbs.com/>, Estados Unidos); Rare Plants (<http://www.rareplants.de>, Alemania); y Chileflora (<http://www.chileflora.com>, Chile).

Se comercializan semillas y/o bulbos de especies botánicas. Las semillas se venden en sobres con 8, 10, 20 a 50 semillas por sobre y los bulbos de manera unitaria. Las especies botánicas más frecuentes son: *Leucocoryne purpurea*, *Leucocoryne ixioides* y *Leucocoryne vittata*.

El precio de un sobre de semillas va de USD 4,00 a USD 7,00 y el precio de un bulbo va de USD 3,50 a USD 4,50.

Flor de jardín y maceta

El potencial del *Leucocoryne* como flor de jardín se ha ido desarrollando en los últimos 20 años basado, principalmente, en variedades comerciales ofrecidas desde el año 1990 por la empresa holandesa Sunglory B.V. El cliente busca en el cultivo de estos bulbos una recreación y ornamentación (Figura 01).

El *Leucocoryne* es recomendada como una planta bulbosa para ser usada como planta de jardín o maceta y se ofrece en el estado de bulbo dormante. No fue posible encontrar ofertas de *Leucocoryne* como planta en flor, cultivadas en macetas, para ser comercializadas.

Los *Leucocoryne* son ofrecidos en tiendas minoristas o *retailers* del tipo “Garden Centre” como por ejemplo: Easy to Grow Bulbs (www.easytogrowbulb.com, Estados Unidos), Thompsons Plants & Garden Centres (www.thompsons-plants.co.uk, Inglaterra), Garden Express (<http://www.gardenexpress.com.au>, Australia), British Seed Ltda. (<http://www.britishseed.com>, Japón), Bulbi web shop (www.bulbi.nl, Holanda), Jacques Briant (<http://www.jacques-briant.fr>, Francia), Flora Kom (www.florakom-blumenzwiebeln.de, Alemania) (Figura 02).

Los bulbos de *Leucocoryne* en estado dormante se comercializan usando nombres registrados. Las primeras variedades ofrecidas al mercado fueron: Caravelle®, Sirius®, Dione®, Blue Ocean®, La serena®, Calgary®, Sunny Stripe® y Double Fantasy®. Las actuales variedades son Andes®, Dione®, Blue Ocean®, White Dream®, Spotlight® y “Mix” (Figura 03). *Leucocoryne* Andes® es la más popular. Los bulbos dormantes de *Leucocoryne* se venden, en la mayoría de los casos, en bolsas con 5 a 20 bulbos.

Basado en *Leucocoryne* Andes®, variedad más popular, el precio de una bolsa con 10 bulbos dormantes es de USD 5,00 a USD 10,00, es decir, desde USD 0,50 a USD 1,00 por bulbo.



01A9404C * © VISIONS|www.diomedia.com * *Leucocoryne andes*
* 22 Aug 2013



01A956ZD * © VISIONS|www.diomedia.com * *Leucocoryne Andes* *
23 Aug 2013

Figura 01. El *Leucocoryne* como flor de jardín y maceta.



Figura 02. Colección de carátulas de sobres o bolsas con bulbos dormantes de *Leucocoryne* ofrecidos a nivel minorista en distintos países (Inglaterra, Alemania, Holanda, Polonia, Francia, Japón).



Figura 03. Variedades comerciales de *Leucocoryne*, Andes®, Dione®, Blue Ocean®, Spotlight®, White Dream® y Sunny Stripe® (www.visionpictures.com).

Flor de corte

El potencial como flor de corte presenta un desarrollo comercial incipiente a nivel global. La Royal General Bulb Growers' Association (KAVB) de Holanda presenta regularmente en la KAVB Flower Show de la ciudad de Lisse, Holanda al *Leucocoryne* como flor de corte (Figura 04).



Figura 04. Vista general de variedades comerciales de *Leucocoryne* para flor de corte presentadas en KAVB Flower Show, Lisse, Holanda (<http://www.srgc.net/forum/index.php?topic=1315.msg50803;topicseen#msg50803>).

Las variedades usadas son Andes®, Dione®, Blue Ocean®, White Dream®, Spotlight® y Sunny Stripe® (Figura 05).

En Holanda, algunas empresas comercializadoras de flores de corte la ofrecen en su catálogos (ej. <http://www.dgi.nl>; <http://www.euflorea.eu>, <http://www.antonspaargaren.nl>) (Figura 06). En Japón también es cultivado como flor de corte para el mercado interno y para exportación como lo indica la página web de la empresa Bloom Japan Network Co. Ltd. (<http://www.bloom-japan.net/>) en su Calendario Anual de Suministro de Flores de Corte (Cut Flower Yearly Supply Calendar). La disponibilidad es durante 6 meses (Diciembre a Mayo), siendo los meses de primavera donde se obtiene la mejor calidad y mayor disponibilidad (Figura 07). A modo de ejemplo, la empresa Candy Floriculture Pte Ltd. de Singapur (<http://candy.com.sg>) ofrece *Leucocoryne* importados de Japón.

El *Leucocoryne* como flor de corte es usado para arreglos florales y bouquets (Figura 08).



Figura 05. Variedades comerciales de *Leucocoryne* para flor de corte presentadas en KAVB Flower Show, Lisse, Holanda.

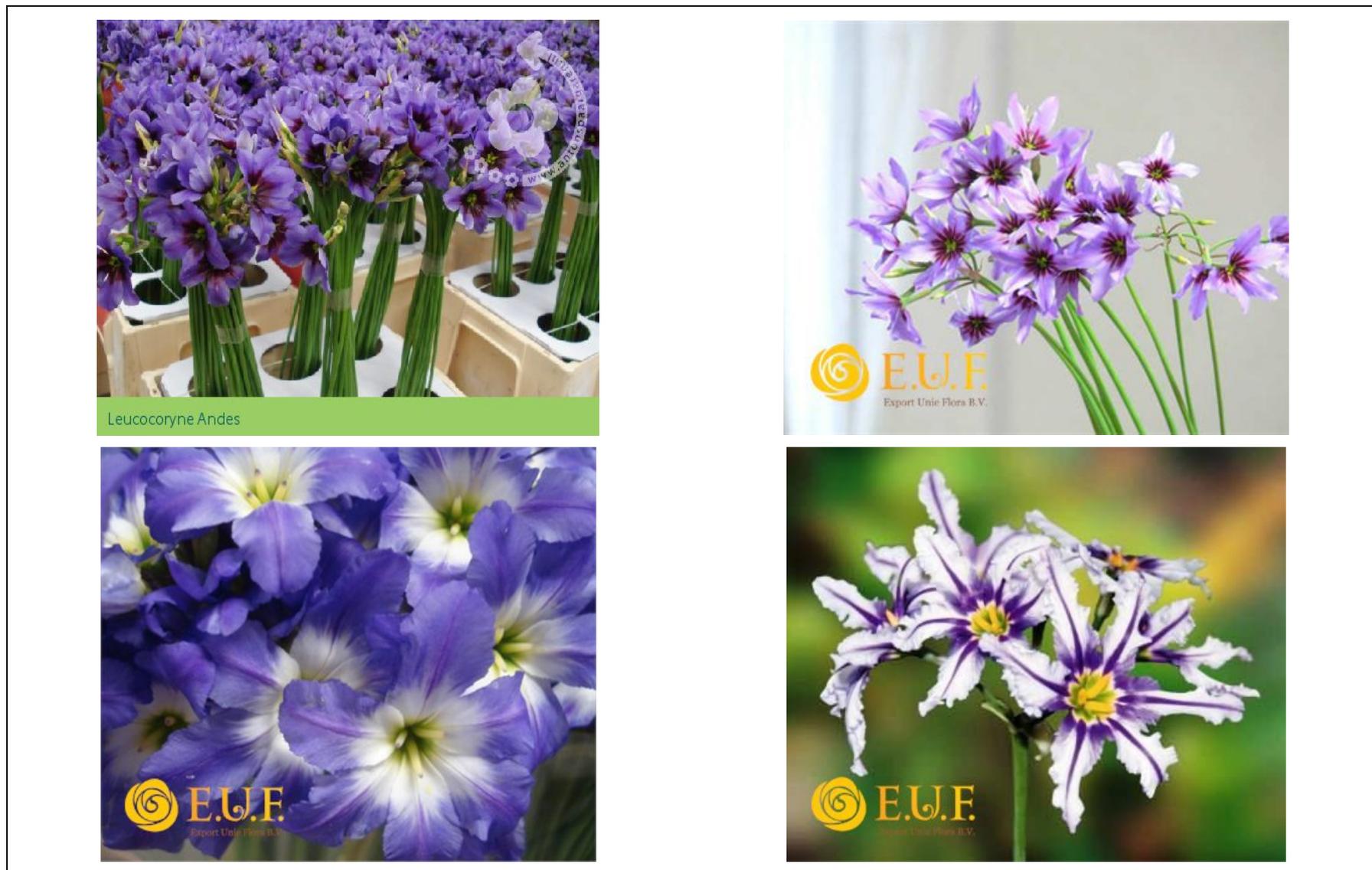


Figura 06. Variedades ofrecidas por empresas exportadoras/importadoras de Leucocoryne para flor de corte.

Availability Calendar for Key Japanese Cut Flowers for Export

→ High Season, Large Availability
 → Medium Availability
 → Low Availability
 → Not Available

Bloom Japan Network Co.Ltd.

Item Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	The best season in quality
Anemone	High	High	High	Med									Jan - Early Mar
Asplenium Crispy Wave	Med	Med	Med	Med	High	Nov - May							
Astilbe	High	High	High	Med	Dec - Mar								
Camellia japonica	High	High	High	Med	High	Mid Nov - End Feb							
Clematis				Med	High	High	High	High	Med	Med	Med	Med	Early May - Early July
Cornus officinalis	High	High	High	Med	Mid Jan - Mid Mar								
Cosmos	High	High	High	Med	High	Dec - Mar							
Curcuma alismatifolia							High	High	High	High	High	High	Earl July - End Sep
Cymbidium	High	Early Dec - End Apr											
Dahlia		Med	Med	Med	Med	Med	High	High	High	High	High	High	Mid Feb - emd Apr
Delphinium Sinensis						High	Early Nov - Early Dec / Mid Jun - End Jun						
Delphinium(Giant)				Med	High	End Nov - End Feb							
Epidendrum			High	End Feb - End Apr									
Equisetum hyemale L.													
Eustoma							High	High	High	High	High	High	Mid July - Early Oct
Forsythia suspensa		Med	High	End Jan - Mid Mar									
Gentiana Blue							High	High	High	High	High	High	Early Sep - Mid Oct
Gentiana Pink							High	High	High	High	High	High	Early Sep - Mid Oct
Gloriosa				Med	High	Early Nov - End Dec							
Grammatophyllum							High	High	High	High	High	High	Early Jun - Early Aug
Helleborus hybridus	High	Jan - Early Mar											
Iris ensata var. spontanea				High	End Apr - Early May								
Lathyrus latifolius	High	Feb - Apr											
Lathyrus latifolius (stem cut)							High	High	High	High	High	High	Mar - Apr
Lathyrus odoratus		High	Mid Jan - Early Mar										
Leucocoryne													Mar - Apr
Lindera citriodora Aomoji											High	High	Early Feb - End Feb

Figura 07. Calendario Anual de Suministro de Flores de Corte (Cut Flower Yearly Supply Calendar) de la Bloom Japan Network Co. Ltd. (<http://www.bloom-japan.net/>).



Figura 08. Uso del *Leucocoryne* como flor de corte. Fotografías de *wedding bouquet* en página web de empresa de Corea del Sur y de Hungría. Fotografía de arreglo floral en página web de empresa de República Checa.

Proveedor de Bulbos

Las empresas mayoristas proveedoras de bulbo están orientadas a satisfacer las necesidades de minoristas (*retailers*), paisajistas y productores de flor de corte. Las variedades usadas son las mismas descritas para “Flor de jardín y maceta” y “Flor de corte”.

Muchas empresas mayoristas ofrecen los bulbos dormantes de *Leucocoryne* ya envasados para que los minoristas realicen la venta directa como por ejemplo: Veld Siergewassen (<http://www.veldsiergewassen.nl>, Holanda), O.A. Taylor & Sons Bulbs Ltd. (<http://www.taylors-bulbs.com/>, Inglaterra) y A.D.R. Bulbs, Inc. (<http://www.adrbulbs.com>, Estados Unidos). El formato para minoristas es de 5 a 20 bulbos por bolsa. También se ofrecen en formato de 60 o 100 bulbos por bolsa pensando en paisajistas como la empresa J. Parker Dutch Bulbs (Wholesale) Ltd. (www.dutchbulbs.co.uk, Inglaterra) y Treppens (<http://www.treppens.de>, Alemania). Y por último, también se ofrecen en formato de 1.000 y 5.000 bulbos por bolsa, Bulbs On a Wire (<http://www.bulbsonawire.com/>, Holanda) y J. Parker Dutch Bulbs (Wholesale) Ltd. (www.dutchbulbs.co.uk, Inglaterra) para productores de flores de corte o intermediarios de la cadena de comercialización.

Para el formato minorista de 5 a 20 bulbos por bolsa, el precio promedio del bulbo es de USD 0,27. Para el formato intermedio de 100 bulbos por bolsa, el precio promedio del bulbo es de USD 0,17. Finalmente para el formato de 1.000 bulbos por bolsa, el precio promedio del bulbo puede llegar a ser entre USD 0,08 a USD 0,12.

COMPETITIVIDAD DEL LEUCOCORYNE

Recopilación de datos.

El estudio de la competitividad del *Leucocoryne* como flor de corte se apoya en la comparación con otras especies de flor de corte como anémona, ranúnculo, liliium, lisianthus y fresia. Por medio de información técnica e información de precios obtenida a nivel de proveedores de material vegetal, productores de flor de corte, y comercializadores de flor de corte se construyeron las Tabla 01 y Tabla 02 para poder comparar las distintas especies. Basado en los datos obtenidos, se generaron indicadores como: *Costos (propágulos) / m²* ; *Ingresos (varas florales) / m²* ; *Margen Bruto (Ingresos – Costos) / m²* ; *Relación Ingresos / Costos por cultivo*; y *Relación Ingresos / Costos por cultivo anualizado*.

Importante destacar que no se han incluido costos relacionado a preparación de suelo, agroquímicos, riego, infraestructura como invernadero o sombreaderos, mano de obra de cosecha y embalaje ya que se asumen parecidos. Igualmente, muchos productores de flores, con el ánimo de maximizar sus utilidades reutilizan los propágulos (material vegetal) por más de una temporada como por ejemplo: ranúnculo y fresia.

Competitividad

Basado en los resultados entregados en la Tabla 01, las especies de flores de corte estudiadas deben de presentar una *Relación Ingresos / Costos por cultivo anualizado* igual o superior a 10 con un *Margen Bruto (Ingresos – Costos) / m²* anualizado sobre \$30.000 como anémona, liliium y lisianthus. Otras especies, como ranúnculos y fresia, para ser más competitivas necesitan ser producidas bajo un sistema de menor costo (aire libre, sombreaderos) dado su *Margen Bruto (Ingresos – Costos) / m²* anualizado menor y/o, sus propágulos deben ser utilizados en cultivos subsiguientes, reduciendo el costo del propágulo, para maximizar su utilidad.

Con respecto a las especies estudiadas, el *Leucocoryne* presenta características similares a la fresia. Su capacidad competitiva se fundamenta en la posibilidad de reutilizar el propágulo (cormo o bulbo) varias veces y de las cantidad de nuevos propágulos que se produzcan y puedan ser incorporados en los siguientes cultivos. El *Leucocoryne*, al igual que la fresia, también tendría la ventaja de poder desplazar su floración por medio de una plantación escalonada. Lugares de producción que se caractericen por presentar temperaturas frescas (influencia marina) y estables durante todo el año y un suelo suelto que permita una buena tasa de recuperación de bulbos, son claves para que el *Leucocoryne* sea competitivo como flor de corte.

Otras especies, no incluidas en este estudio, que pueden presentar características similares a *Leucocoryne* son: *Narcissus*, *Nerine* y *Cyrthanthus*.

Tabla 01. Cuadro comparativo de distintas especies bulbosas de flor de corte.

Cuadro Comparativo de Ingresos / Egresos de Flores de Corte	<i>Anemona coronaria</i>	<i>Ranunculus spp.</i>	<i>Lilium spp.</i>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Lisianthus)	<i>Freesia x hybrid</i> (1er Cultivo)	<i>Freesia x hybrid</i> (2do Cultivo)
Propágulo	túbero	túbero	bulbo	almácigo	cormo	cormo
Tamaño del propagulo	5/6	4/5			5/6	5/6
Precio a Productor Flores (CLP/propagulo)	\$ 150	\$ 125	\$ 130	\$ 70	\$ 100	\$ 30
Densidad de Plantación (propágulos / m2)	22	16	64	60	90	90
Costo Propágulos (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 3.300	\$ 2.000	\$ 8.320	\$ 4.200	\$ 9.000	\$ 2.700
Tiempo a floración (días)	90 días	90 días	90 días	90 días		
Duración del Cultivo en meses (tiempo cosecha incluido)	9	9	3	4	8	8
Nº Cultivos al Año (máximo)	1,3	1,3	4,0	3,0	1,5	1,5
Longitu vara (cm)	40	40			40 a 50	40 a 50
Productividad (varas / propágulo)	11	8	1	1	2,5	2,5
Productividad (varas / m2)	242	128	64	60	225	225
Precio Vara Floral (CLP/unidad) a Productor	\$ 123	\$ 115	\$ 300	\$ 300	\$ 90	\$ 90
Ingreso Varas (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 29.645	\$ 14.720	\$ 19.200	\$ 18.000	\$ 20.250	\$ 20.250
Margen Bruto (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 26.345	\$ 12.720	\$ 10.880	\$ 13.800	\$ 11.250	\$ 17.550
Margen Bruto (CLP) / m2 / Año	\$ 35.127	\$ 16.960	\$ 43.520	\$ 41.400	\$ 16.875	\$ 26.325
Relación [Ingreso Varas m2] / [Costo Propágulos m2] / Cultivo	9,0	7,4	2,3	4,3	2,3	7,5
Relación [Ingreso Varas m2] / [Costo Propágulos m2] / Año	12,0	9,8	9,2	12,9	3,4	11,3

Reutilización de los propágulos

Anemona coronaria. Recomendable, 1 temporada. 50% recuperación para 2da temporada.

Ranunculus spp. 5 nuevos propágulos al final de cada temporada. Mínimo 2 temporadas.

Freesia x hybrida. La reutilización del cormo (y/o engorde de cormillos) es clave para optar, en un siguiente cultivo, a una rentabilidad atractiva.

Tabla 02. Cuadro comparativo entre *Freesia x hybrida* y *Leucocoryne spp.*

Cuadro Comparativo de Ingresos / Egresos de Flores de Corte	<i>Freesia x hybrid</i> (1er Cultivo)	<i>Freesia x hybrid</i> (2do Cultivo)	<i>Leucocoryne spp.</i> (1er Cultivo)	<i>Leucocoryne spp.</i> (2do Cultivo)
Propágulo	cormo	cormo	bulbo	bulbo
Tamaño del propágulo	5/6	5/6	4/5	4/5
Precio a Productor Flores (CLP/propágulo)	\$ 100	\$ 30	\$ 100	\$ 30
Densidad de Plantación (propágulos / m2)	90	90	90	90
Costo Propágulos (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 9.000	\$ 2.700	\$ 9.000	\$ 2.700
Tiempo a floración (días)			100 días	100 días
Duración del Cultivo en meses (tiempo cosecha incluido)	8	8	8	8
Nº Cultivos al Año (maximo)	1,5	1,5	1,5	1,5
Longitu vara (cm)	40 a 50	40 a 50	40 a 50	40 a 50
Productividad (varas / propágulo)	2,5	2,5	2,5	2,5
Productividad (varas / m2)	225	225	225	225
Precio Vara Floral (CLP/unidad) a Productor	\$ 90	\$ 90	\$ 100	\$ 100
Ingreso Varas (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 20.250	\$ 20.250	\$ 22.500	\$ 22.500
Margen Bruto (CLP) / m2 / Cultivo	\$ 11.250	\$ 17.550	\$ 13.500	\$ 19.800
Margen Bruto (CLP) / m2 / Año	\$ 16.875	\$ 26.325	\$ 20.250	\$ 29.700
Relación [Ingreso Varas m2] / [Costo Propágulos m2] / Cultivo	2,3	7,5	2,5	8,3
Relación [Ingreso Varas m2] / [Costo Propágulos m2] / Año	3,4	11,3	3,8	12,5

Reutilización de los propágulos.

Freesia x hybrida. La reutilización del cormo (y/o engorde de cormillos) es clave para optar, en un siguiente cultivo, a una rentabilidad atractiva.

Leucocoryne spp. La reutilización del bulbo (y/o engorde de bulbillos) es clave para optar, en un siguiente cultivo, a una rentabilidad atractiva.

RESUMEN

- El principal uso del *Leucocoryne* es como flor de jardín y como flor de corte.
- El principal proveedor de bulbos de *Leucocoryne* es Holanda. El precio unitario promedio por bulbo es USD 0,10.
- Como flor de jardín, se comercializan en los principales mercados mundiales (Europa, Estados Unidos y Japón) bulbos secos de *Leucocoryne* en bolsas con 5 a 20 bulbos con un precio unitario por bulbo de USD 0,50 a USD 1,00 por bulbo.
- Flores de corte de *Leucocoryne* son, principalmente, producidas y comercializadas en Japón.
- A nivel nacional, el precio a productor por flores de corte de *Leucocoryne* podría ser de USD 0,20.
- La producción de flores de corte de *Leucocoryne* es tan competitivo como lo es la producción de flores de Fresa.
- Es extraordinariamente relevante para la rentabilidad del productor de flores la capacidad de reutilizar los bulbos de *Leucocoryne* durante más de dos temporadas.

Anexo II-2a



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VEGETALES
LABORATORIO CULTIVO IN VITRO Y ORNAMENTALES

INFORME PARTE I FINAL:

“Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne” código PYT-2012-0079”

Autores: Alejandro F. Altamira Bravo
Eduardo A. Olate Muñoz
Julio, 2014, Stgo, Chile.

En el presente informe se expone la implementación y resultados de cada uno de los experimentos contemplados en la primera parte del proyecto *Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne*” código *PYT-2012-0079*.

EXPERIMENTO 1. Efecto de la temperatura en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos en tres genotipos de *Leucocoryne spp.*

EXPERIMENTO 2. Efecto de la temperatura en el desarrollo y crecimiento de bulbos en tres genotipos de *Leucocoryne spp.*

EXPERIMENTO 3. Efecto de la temperatura en la multiplicación a partir de división de bulbos de *Leucocoryne spp.*

EXPERIMENTO 1. Efecto de la temperatura en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos en tres genotipos de *Leucocoryne*.

Unidad Experimental (Inicial): 25 plántulas
Factor GENOTIPO: 3 (C509, C516 y C518)
Factor TEMPERATURA: 2 (15 y 20°C)
N° Plántulas (inicial)/genotipo: 300
N° Plántulas (inicial) total 900
Fecha establecimiento: Agosto 2013

Cuadro 1. Estructura Experimento 1

Tratamientos	Temperatura	Genotipos		
		G1	G2	G3
TMT 1.1	20°C	G1-TMT1.1	G2-TMT1.1	G3-TMT1.1
TMT 1.2	15°C	G1-TMT1.2	G2-TMT1.2	G3-TMT1.2

El protocolo para iniciar el material consistió en la conformación de grupos de 50 semillas, las que fueron introducidas en bolsitas de papel filtro, las que fueron amarradas con elástico para impedir que las semillas escaparan de estas (Figura 1). Las semillas dentro de las bolsitas fueron desinfectadas en solución de cloro comercial ($50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cloro activo) al 20% durante 15 minutos bajo campana de flujo laminar, en forma posterior se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas las semillas fueron mantenidas en proceso de imbibición durante 96 horas en agua destilada estéril a 8°C, en oscuridad.



Figura 1: Bolsa con semillas para proceso de desinfección *in vitro*.

Transcurridas 96 horas, se aislaron las semillas, para su siembra en condiciones estériles en frascos de vidrio de 200mL con 30mL de medio de cultivo MS con vitaminas (Murashige and Skoog, 1962) al 12,5%, además contenía 30 g·L⁻¹ de Sacarosa, 6 g·L⁻¹ de Agar como agente gelificante y pH ajustado a 5,7.

Para cada genotipo se iniciaron 300 semillas las que fueron distribuidas en 5 semillas/frasco. La mitad del material fue dispuesto en cámara de crecimiento a 20±1°C y la otra mitad del material a 8±1°C, en ambos casos en oscuridad por una semana. Cumplido este período ambos grupos fueron dispuestos en cámara de crecimiento bajo fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, a 20±1°C y 15±1°C respectivamente (Figura 2 y Figura 3).

Una vez que germinaron las semillas se mantuvieron en crecimiento hasta la semana N°13, momento en el cual se realizó transferencia a medio de cultivo fresco. Según lo planeado se aumentó la concentración del medio de cultivo MS con vitaminas (Murashige and Skoog, 1962) de 12,5% a 25%, se mantuvo el contenido de Sacarosa (30 g·L⁻¹), Agar (6 g·L⁻¹) y ajuste de pH a 5,7.



Figura 2. Semillas de *Leucocoryne spp.* en proceso de germinación en cámara de crecimiento 20±1 °C (TMT 1.1).



Figura 3. Semillas de *Leucocoryne spp.* en proceso de germinación en cámara de crecimiento $15\pm 1^{\circ}\text{C}$ (TMT 1.2).

En el momento del traspaso (semana 13 de cultivo) se evaluó el porcentaje final de germinación del primer periodo, porcentaje de receso de las plántulas, N° de bulbos producidos (Cuadro 2 y Figura 4) y además se tomó 6 muestras de 5 bulbos cada una, para cada tratamiento en cada uno de los genotipos para determinar el peso promedio de los bulbos (Cuadro 3 y Figura 5).

Cuadro 2. Evaluación Experimento 1 transcurridas 13 semanas después de ser establecidas semillas de distintos genotipos de *Leucocoryne spp.* en condiciones *in vitro*.

Genotipo Tratamiento	Total	Germinación		Formación de bulbo		Receso**	
		N°	%	N°	%*	N°	%*
C509 TMT1.1	150	73	48,67	60	82,19	39	53,42
C509 TMT1.2	150	128	85,33	118	92,19	37	28,91
C518 TMT1.1	140	118	84,29	114	96,61	106	89,83
C518 TMT1.2	150	145	96,67	144	99,31	108	74,48
C516 TMT1.1	150	125	83,33	108	86,40	104	83,20
C516 TMT1.2	150	148	98,67	140	94,59	108	72,97

* Los porcentajes de formación de bulbos y Senescencia fueron calculados en base al número de semillas germinadas.

** Para el parámetro Receso se contabilizó a aquellas plántulas en que se observaba más de 2/3 del brote senescente.

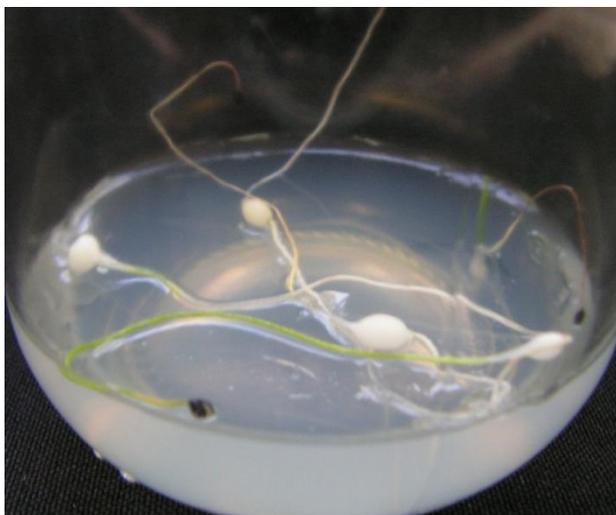


Figura 4. Formación de bulbos y distintos grados de receso en plántulas de *Leucocoryne spp.* la provenientes de la germinación de semillas del genotipo C516 en el tratamiento TMT1,2 después de transcurridas 13 semanas en cultivo.

En el Cuadro 3 se puede observar el número de bulbos por genotipo y tratamiento que siguieron en cultivo, ya que en algunos casos existió una pequeña pérdida de material al momento del traspaso, debido principalmente a la dificultad de manejo por su reducido tamaño, fragilidad, muerte y/o contaminación.

Cuadro 3. Peso promedio y número de bulbos de cada genotipode *Leucocoryne spp.* en cada tratamiento *in vitro* evaluados al momento del primer traspaso (semana 13 de cultivo).

Genotipo	Tratamiento	N° de bulbos	Promedio peso bulbo (g)
C509	TMT1.1	60	0,017
C509	TMT1.2	117	0,029
C518	TMT1.1	107	0,017
C518	TMT1.2	144	0,023
C516	TMT1.1	107	0,022
C516	TMT1.2	134	0,035

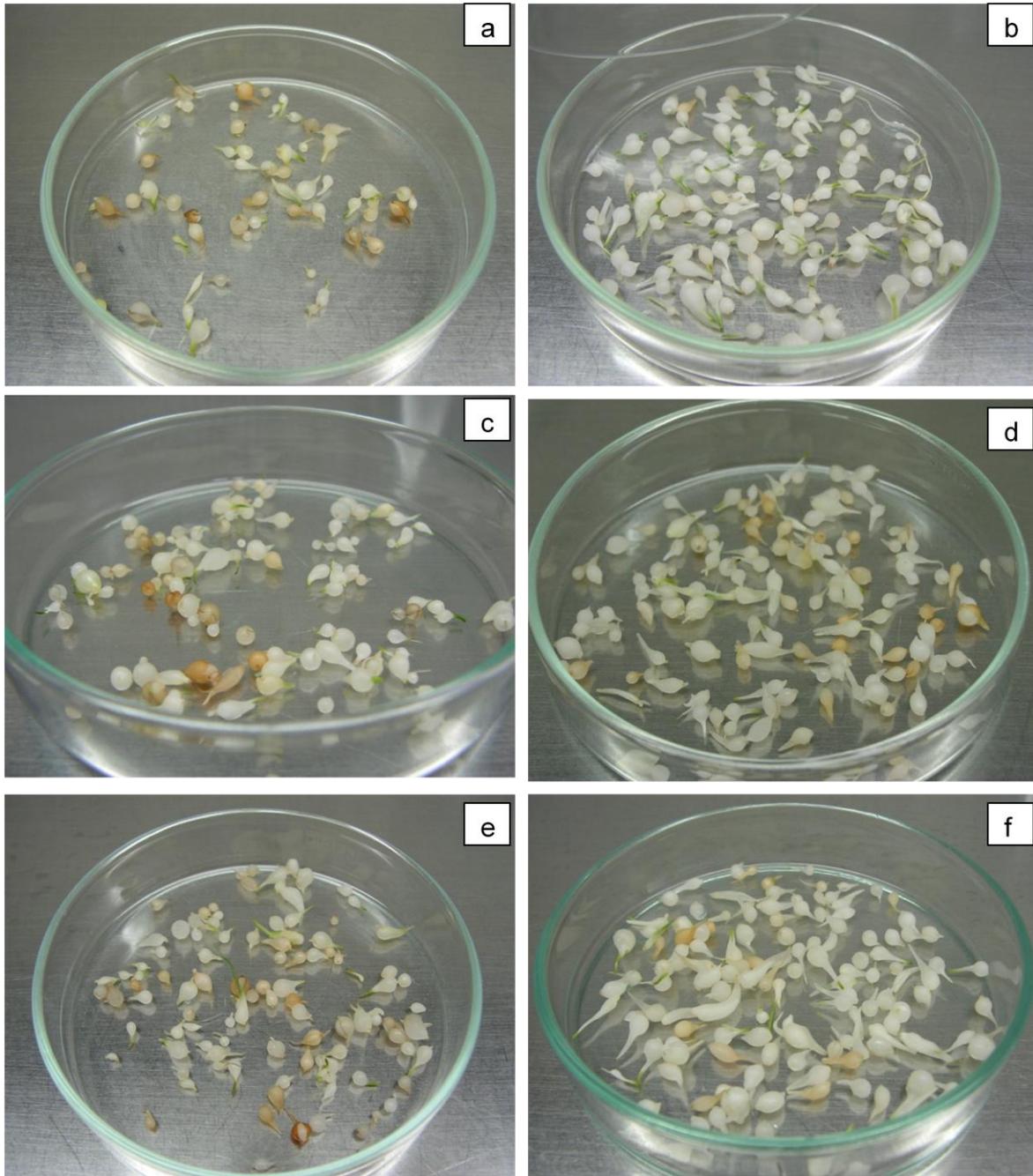


Figura 5. Apreciación visual del número y tamaño de bulbos de *Leucocoryne spp.* para cada uno de los genotipos y tratamientos al momento de realizar el traspaso (13 semanas en condiciones de cultivo *in vitro*) en el Experimento 1: a.C509TMT1.1; b.C509TMT1.2; c.C518TMT1.1; d.C518TMT1.2; e.C516TMT1.1 y d.C516TMT1.2.

Para los tres genotipos se obtuvo mejores resultados en los parámetros evaluados (Germinación, número de bulbos, grado de receso y peso de bulbos) en los tratamientos con menor temperatura (15°C).

Posterior al traspaso a medio fresco (50% MS + vitaminas) los bulbitos producidos mostraron una disminución en la actividad, crecimiento y brotación en las dos temperaturas para cada uno de los genotipos (Cuadro 4 y Figura 6).

Cuadro 4. Evaluación Experimento 1 transcurridas 10 semanas después de que los bulbos de *Leucocoryne spp.* fueron traspasados a medio fresco (50%MS) en condiciones *in vitro*.

Material	Bulbos		1 Brote		Sin Brote	
	N°	N°	%	N°	%	
C509 TMT1.1	60	2	3,33	58	96,67	
C509 TMT1.2	117	21	17,95	96	82,05	
C518 TMT1.1	107	11	10,28	96	89,72	
C518 TMT1.2	144	7	4,86	137	95,14	
C516 TMT1.1	107	5	4,67	102	95,33	
C516 TMT1.2	134	18	13,43	116	86,57	



Figura 6. Bulbos de *Leucocoryne* genotipo C509 sin brotación o sin crecimiento activo luego del traspaso realizado a 10 semanas de cultivo en condiciones *in vitro*.

Debido a la disminución en la actividad de los bulbos observada en ambas condiciones de temperatura, se decidió realizar un nuevo traspaso a medio fresco (50% MS) pero con adición de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina (BAP), para sacar del receso a los bulbos. Al realizar el traspaso (a las 10 semanas) se evaluó el peso de los bulbos, momento en el que se pudo observar además una disminución en el peso promedio de estos al final del período señalado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso promedio y número de bulbos de *Leucocoryne spp. in vitro* evaluados al momento del traspaso a medio fresco (50%MS+1ml*L⁻¹BAP).

Genotipo	Tratamiento	N° de bulbos	Prom. peso bulbo (g)
C509	TMT1.1	53	0,13
C509	TMT1.2	107	0,17
C518	TMT1.1	106	0,11
C518	TMT1.2	143	0,18
C516	TMT1.1	85	0,12
C516	TMT1.2	135	0,23

Sin embargo, transcurridas 13 y 17 semanas desde el traspaso, y luego de evaluar nuevamente brotación, formación de brotes múltiples, producción de bulbillos y formación de raíces, se pudo observar nuevamente actividad en parte de los bulbos (Figura 7), Esto se reflejó, en el aumento en los porcentajes de bulbos con un brote y brotes múltiples que aumentaron desde la evaluación realizada antes del traspaso (Cuadro 6 y Cuadro 7).

Cuadro 6. Evaluación Experimento 1 transcurridas 13 semanas después de que los bulbos de *Leucocoryne spp.* fueron traspasados a medio fresco (50%MS+1ml*L⁻¹BAP) en condiciones *in vitro*.

Material	Bulbos N°	1 Brote		Sin Brote		Brot. múltiple /Bulbillos		Formación raíces	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
C509 TMT1.1	53	26	49,06	25	47,17	2	3,77	5	9,43
C509 TMT1.2	107	61	57,01	42	39,25	4	3,74	32	29,91
C518 TMT1.1	106	52	49,06	52	49,06	2	1,89	18	16,98
C518 TMT1.2	143	85	59,44	53	37,06	5	3,50	38	26,57
C516 TMT1.1	85	43	50,59	38	44,71	2	2,35	11	12,94
C516 TMT1.2	135	101	74,81	33	24,44	1	0,74	59	43,70

Cuadro 7. Evaluación Experimento 1 transcurridas 17 semanas después de que los bulbos de *Leucocoryne* spp. fueron traspasados a medio fresco (50%MS+1mg*L⁻¹BAP) en condiciones *in vitro*.

Material	Bulbos		1 Brote		Sin Brote		Brot. múltiple / Bulbillos		Formación raíces	
	N°	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
C509 TMT1.1	53	31	58,49	20	37,74	2	3,77	9	16,98	
C509 TMT1.2	107	67	62,62	36	33,64	4	3,74	33	30,84	
C518 TMT1.1	106	54	50,94	45	42,45	7	6,60	21	19,81	
C518 TMT1.2	143	92	64,34	46	32,17	5	3,50	47	32,87	
C516 TMT1.1	85	46	54,12	32	37,65	7	8,24	14	16,47	
C516 TMT1.2	135	100	74,07	25	18,52	10	7,41	65	48,15	

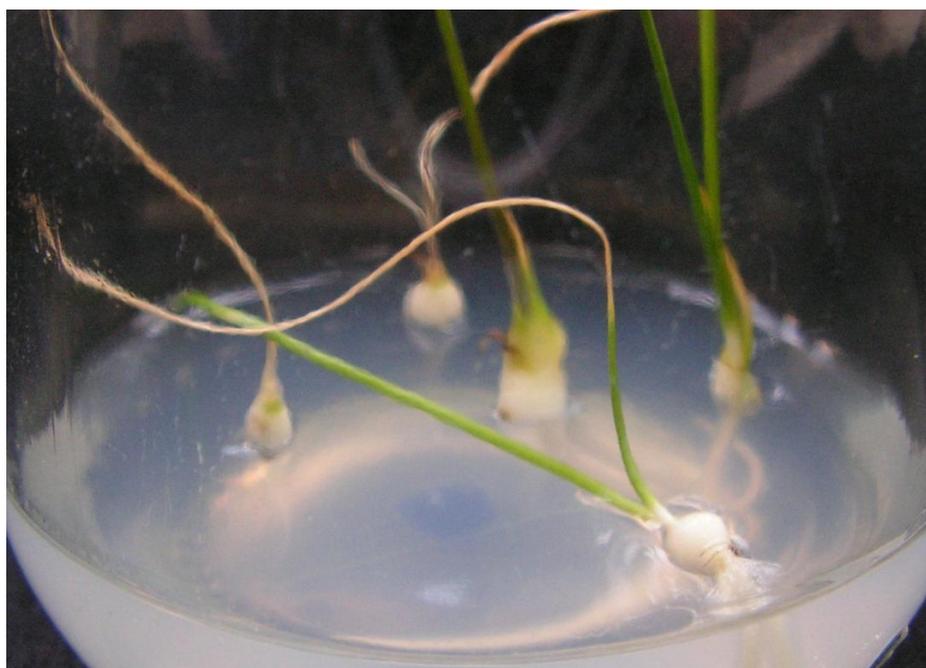


Figura 7. Bulbos de *Leucocoryne* C509 sometidos al tratamiento TMT1.2 con crecimiento activo en condiciones *in vitro*, luego de 13 semanas de realizado el traspaso a medio de cultivo 50%MS + 1mg*L⁻¹ BAP.

A las 24 semanas y para tener un registro de la entrega del material se evaluó nuevamente el Experimento 1, donde se pudo observar un aumento en el número de bulbos con formación de brotes múltiples o bulbillos (Cuadro 8). Además se evaluó el peso de los bulbillos transcurridas las 24 semanas desde su último traspaso y se pudo constatar una baja del peso promedio obtenido (Cuadro 9), lo que podría estar explicado por la muestra en la que se tomaron estos datos, que correspondió a 6 repeticiones de 5 bulbitos en cada uno de los tratamientos, y en que se seleccionaron solo bulbitos individuales, dejando sin pesar en esta muestra

los bulbos que tenían producción de bulbillos laterales, ya que no en todos los casos estaba claro cuál era el bulbo original y cuales los laterales (Figura 8).

Cuadro 8. Evaluación Experimento 1 transcurridas 24 semanas después de que los bulbos de *Leucocoryne spp.* fueron traspasados a medio fresco ($50\%MS+1mg*L^{-1}$) en condiciones *in vitro*.

Material	Bulbos		1 Brote		Sin Brote		Brot. múltiple / Bulbillos		Formación raíces	
	N°	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	
C509 TMT1.1	53	36	67,92	15	28,30	4	7,55	11	20,75	
C509 TMT1.2	107	71	66,36	33	30,84	7	6,54	33	30,84	
C518 TMT1.1	107	76	71,03	24	22,43	7	6,54	28	26,17	
C518 TMT1.2	143	94	65,73	43	30,07	7	4,90	44	30,77	
C516 TMT1.1	85	63	74,12	15	17,65	7	8,24	28	32,94	
C516 TMT1.2	135	97	71,85	26	19,26	17	12,59	66	48,89	

Cuadro 9. Peso promedio y número de bulbos de *Leucocoryne spp.* producidos a las 24 semanas en cada genotipo y tratamiento en condiciones *in vitro*.

Genotipo	Tratamiento	Bulbos	Prom. Peso final	Bulbos
		Iniciales	bulbo	finales
		N°	(g)	N°
C509	TMT1.1	53	0,08	54
C509	TMT1.2	107	0,05	112
C518	TMT1.1	107	0,04	116
C518	TMT1.2	143	0,09	147
C516	TMT1.1	85	0,06	103
C516	TMT1.2	135	0,10	146



Figura 8. Bulbos individuales y múltiples de *Leucocoryne* genotipo C516 sometido al tratamiento TMT1.1 con crecimiento activo en condiciones *in vitro*, luego de 24 semanas de realizado el traspaso a medio de cultivo $50\%MS + 1mg*L^{-1}$ BAP.

Conclusiones

1. La iniciación *in vitro* de semillas de *Leucocoryne* en 25% MS sin reguladores de crecimiento vegetal es posible, produciendo rápidamente un bulbillito cercano a los 0,1 a 0,2 g.
2. Una temperatura de cultivo de 15°C produce un mayor número y peso de bulbos inicial de plantas producidas *in vitro*, a partir de semillas en comparación a aquellas cultivadas a 20°C.
3. El uso de BAP es beneficioso desde etapas muy iniciales del cultivo de *Leucocoryne spp.* previniendo el ingreso prematuro en receso.
4. Al final de 24 semanas de cultivo, un porcentaje importante de los genotipos estudiados fueron capaces de multiplicar el número de bulbillitos, pero no fueron capaces de aumentar significativamente su peso individual.
5. No obstante lo anterior, ya es posible detectar diferencias de respuesta entre distintos genotipos.
6. Es probable que sea necesario aumentar la concentración de macro y micronutrientes (MS) y/o de sacarosa desde el momento en que concluya la formación de bulbillito y comience el proceso de receso natural, con el fin de mantener el crecimiento vegetativo y aumentar así el peso fresco de cada bulbillito iniciado a partir de semilla.

EXPERIMENTO 2. Efecto de la temperatura en el desarrollo y crecimiento de bulbos en tres genotipos de *Leucocoryne*.

Unidad Experimental (Inicial): bulbo de 0,5g

Factor GENOTIPO: 3 (C150, C509 y C510)

Factor TEMPERATURA: 2 (15 y 20°C)

Tratamiento / Genotipo: 2

Tratamientos totales: 6

Fecha establecimiento: Mayo-Junio y Noviembre 2013

Cuadro 10. Estructura Experimento 2.

Tratamientos	Temperatura	Genotipos		
		G1	G2	G3
TMT 2.1	20°C	G1-TMT2.1	G2-TMT2.1	G3-TMT2.1
TMT 2.2	15°C	G1-TMT2.2	G2-TMT2.2	G3-TMT2.2

Para los primeros bulbos iniciados, el protocolo consistió en la eliminación de las túnicas protectoras secas externas, luego los bulbos fueron lavados bajo flujo de agua corriente. Al ingresarlos a la cámara de flujo laminar se asperjaron con etanol 70%, posteriormente se desinfectaron con cloro comercial ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOCl) y luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

La preparación de los explantes consistió en la eliminación de las catáfilas de reserva hasta llegar lo más cercano posible al punto de crecimiento, eliminando además la parte más externa del plato basal (Figura 9). Luego de esto fueron establecidos en tubos de ensayo con 20mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) con adición de $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa como fuente de carbohidratos, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar como agente gelificante y se ajustó el pH a 5,7. Posteriormente los bulbos fueron dispuestos en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a $20\pm 1^\circ\text{C}$ para su brotación y crecimiento.

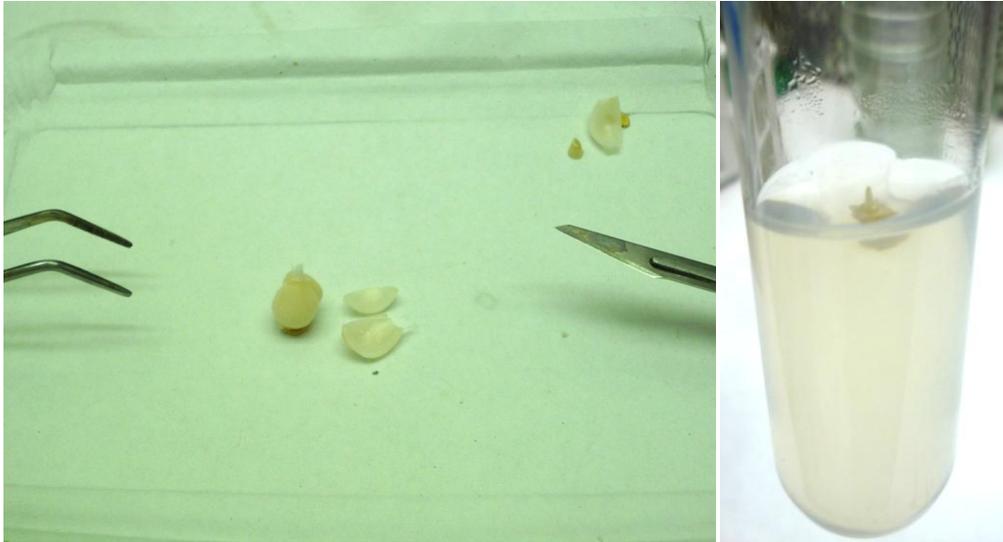


Figura 9. Eliminación de catáfilas de reserva y establecimiento del explante *in vitro* de bulbos de *Leucocoryne spp.*

A pesar de que el protocolo anterior dio resultados positivos en experiencias previas (iniciación realizada en febrero) en este caso no se obtuvo la misma respuesta probablemente porque la vez anterior se utilizó un menor número de individuos y en una etapa en que los bulbos se encontraban en receso profundo.

Se presentaron algunos problemas en la estabilización de los explantes, ya que trascurrido aproximadamente un mes desde el establecimiento se pudo observar contaminación en los bulbos en condiciones *in vitro*. Si bien exteriormente se encontraban limpios, se presentó una contaminación proveniente desde la parte central de los bulbos (Figura 10), lo que significaría que la desinfección y lavados fueron efectivos para la desinfección exterior de los explantes, pero no fue suficiente para llegar al centro de estos. Un posible factor que podría haber influido en este problema podría ser el estado o fecha en que se inició el material, ya que se encontraban saliendo del receso y con el proceso de brotación iniciado en muchos de los bulbos, a diferencia de los bulbos que se utilizaron preliminarmente (febrero) que se encontraban en receso.



Figura 10. Contaminación desde el centro del bulbo de *Leucocoryne spp.*

Para superar el problema de contaminación se ajustó el protocolo de iniciación para el nuevo material a establecer *in vitro*, al cual se le agregó un lavado previo con etanol 95% por un minuto y la adición de un detergente no iónico (Tween 20®) a la solución de cloro. obteniendo así una mejor respuesta a este protocolo.

Para este ensayo se utilizó bulbos correspondientes a los genotipos C510, C509 y C150. Luego que se logró la estabilización *in vitro* (esterilizados y activos) de suficientes bulbos, se pesó grupos de 10 bulbos para ser asignados a cada uno de los tratamientos, para así tener una estimación del peso inicial promedio de los bulbos utilizados en este experimento (Cuadro 11) y así poder evaluar en el tiempo su ganancia en peso. Para esto se sacó los bulbos de condiciones *in vitro* y fueron pesados en magentas previamente esterilizadas y pesadas, y de esta forma por diferencia de peso se pudo obtener el valor promedio inicial de los bulbos a utilizar.

Cuadro 11. Peso de muestras de 10 bulbos y promedio de bulbo, en material utilizado en el experimento 2.

Material	Peso	
	10 bulbos (g)	promedio bulbo (g)
C510 TMT2,1	5,22	0,522
C510 TMT2,2	5,26	0,526
C509 TMT2,1	6,22	0,622
C509 TMT2,2	5,59	0,559
C150 TMT2,1	3,84	0,384
C150 TMT2,2	3,65	0,365

Luego de obtener el peso inicial de los bulbos, estos fueron establecidos en tubos de ensayo con 20mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) con adición de 30 g·L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos, 6 g·L⁻¹ de agar como agente gelificante y pH ajustado a 5,7. Posteriormente los bulbos fueron dispuestos en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a 20±1°C y 15±1°C según tratamiento. El experimento fue evaluado a las 6 y 10 semanas de cultivo, para ver su evolución en brotación y formación de raíces (Cuadro 12, Cuadro 13 y Figura 11).

Cuadro 12. Evaluación de brotación y formación de raíces de bulbos de *Leucocoryne spp.* a las 6 semanas de cultivo *in vitro* para cada tratamiento del Experimento 2.

Material	Total	Bulbos con brotación			Bulbos con formación raíces	
		1 brote N°	Brote múltiple N°	%	N°	%
C510 TMT2.1	10	1	0	10	1	10
C510 TMT2.2	10	2	0	20	0	0
C509 TMT2.1	10	5	0	50	0	0
C509 TMT2.2	10	6	1	70	3	30
C150 TMT2.1	10	7	0	70	3	30
C150 TMT2.2	10	8	0	80	7	70

Cuadro 13. Evaluación de brotación y formación de raíces de bulbos de *Leucocoryne spp.* a las 10 semanas de cultivo *in vitro* para cada tratamiento del Experimento 2.

Material	Total	Bulbos con brotación			Bulbos con formación raíces	
		1 Brote N°	Brote múltiple N°	%	N°	%
C510 TMT2.1	10	1	0	10	1	10
C510 TMT2.2	10	3	0	30	0	0
C509 TMT2.1	10	5	0	50	2	20
C509 TMT2.2	10	6	1	70	3	30
C150 TMT2.1	10	7	0	70	4	40
C150 TMT2.2	10	8	0	80	7	70

En el Experimento 2 existió la tendencia a obtener mejores resultados en el porcentaje de brotación para los tratamientos con menor temperatura (15°C) pero además existió un marcado efecto del genotipo en el número de bulbos que presentan respuesta a los distintos tratamientos de temperatura.

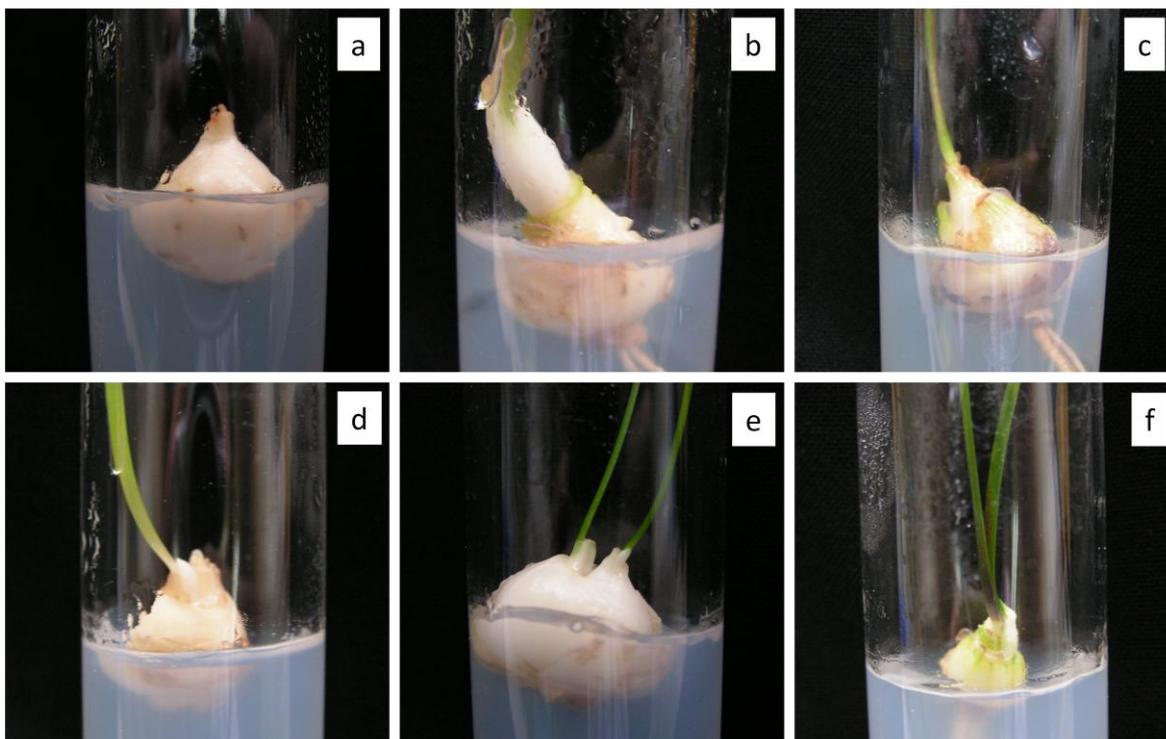


Figura 11. Evaluación visual de brotación y formación de raíces en bulbos para cada uno de los genotipos y tratamientos luego de 10 semanas de iniciado el experimento 2: a.C510TMT2.1; b.C509TMT2.1; c.C150TMT2.1; d.C510TMT2.2; e.C509TMT2.2 y f.C150TMT2.2.

En febrero de 2014 (a las 14 semanas de iniciación) se realizó un traspaso a medio fresco de las mismas características que el medio utilizado en el ciclo anterior. Se mantuvieron en crecimiento durante otras 13 semanas hasta su evaluación, en la que se pudo observar un menor porcentaje de brotación y una apariencia de entrada en receso de los bulbos. También fue posible constatar la formación de bulbos laterales en mayor porcentaje para el genotipo C510 (Cuadro 14), existiendo un posible efecto del genotipo.

Cuadro 14. Evaluación de brotación, formación de raíces y bulbos laterales de bulbos de *Leucocoryne spp.* a las 13 semanas de cultivo *in vitro* en la segunda etapa, para cada tratamiento en el Experimento 2.

Material	Total	1 Brote		Brote Múltiple		Sin Brote		Formación de raíces		Formación de bulbos	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
C510 TMT2.1	10	3	30	1	10	6	60	1	10	5	50
C510 TMT2.2	10	1	10	3	30	6	60	0	0	7	70
C509 TMT2.1	10	2	20	0	0	8	80	2	20	1	10
C509 TMT2.2	10	3	30	0	0	7	70	0	0	3	30
C150 TMT2.1	10	0	0	1	10	9	90	1	10	1	10
C150 TMT2.2	10	7	70	0	0	3	30	2	20	1	10

Se realizó otra evaluación a las 17 semanas para constatar estado de brotación, donde se pudo observar un pequeño aumento en los porcentajes de brotación y brotación múltiple en los genotipos C509 y C510 (Cuadro 15). En el mismo cuadro es posible observar la diferente respuesta que tuvieron los tres genotipos estudiados sobre la formación de bulbos, los cuales, en general no presentaron respuestas importantes a las temperaturas de cultivo, siendo levemente superior en aquellos sometidos a 15°C.

Cuadro 15. Evaluación de brotación, formación de raíces y bulbos laterales de *Leucocoryne spp.* a las 17 semanas de cultivo *in vitro* en la segunda etapa, para cada tratamiento del Experimento 2.

Material	Total	1 Brote		Brote Múltiple		Sin Brote		Formación de raíces		Formación de bulbos	
		N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
C510 TMT2.1	10	2	20	5	50	3	30	1	10	5	50
C510 TMT2.2	10	1	10	3	30	6	60	0	0	7	70
C509 TMT2.1	10	2	20	1	10	7	70	3	30	1	10
C509 TMT2.2	10	5	50	0	0	5	50	0	0	3	30
C150 TMT2.1	10	0	0	1	10	9	90	2	20	1	10
C150 TMT2.2	10	7	70	0	0	3	30	2	20	1	10

En el Cuadro 16 se puede observar la diferencia entre el peso inicial y el peso final de los explantes y el aumento en el número de bulbos después de 27 semanas de cultivo (14 semanas ciclo 1 + 23 semanas ciclo 2). Destacó el número de bulbos producido en el genotipo C510 en ambas temperaturas, evidenciando una vez más el efecto del genotipo.

Al momento de pesar los bulbos, estos fueron sacados de las condiciones *in vitro* y guardados en bolsa de papel a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ para ser entregados al mandante. No se mantuvieron en condiciones *in vitro*, ya que en su mayoría se encontraban en estado de receso y como una forma adicional de testear su capacidad de aclimatación *ex vitro* (Figura 12).

Cuadro 16. Número de bulbos inicial, peso promedio inicial, peso promedio de bulbo final y N° de bulbos obtenidos de *Leucocoryne spp.* después de 37 (14 + 23) semanas de cultivo en condiciones *in vitro*.

Material	N° de bulbos iniciales	Peso promedio inicial bulbo (g)	Peso promedio final bulbo (g)	N° de bulbos finales
C510 TMT2,1	10	0,522	1,155	23
C510 TMT2,2	10	0,526	1,066	21
C509 TMT2,1	10	0,622	1,351	11
C509 TMT2,2	10	0,559	0,951	13
C150 TMT2,1	10	0,384	0,692	14
C150 TMT2,2	10	0,365	0,727	11

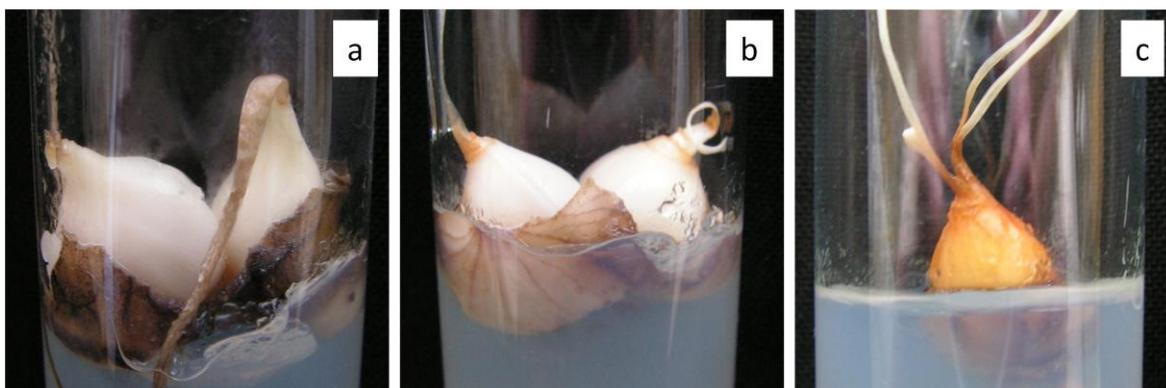


Figura 12. Evaluación visual de brotación y formación de raíces *in vitro* en bulbos de *Leucocoryne spp.* para cada uno de los genotipos y tratamientos luego de 37 semanas de iniciado el experimento 2: a.C510TMT2.1; b.C509TMT2.1; c. C150TMT2.2.

Conclusiones

1. Fue posible aumentar el peso fresco de bulbos de *Leucocoryne spp.* de 0,5g a 1,0g en 27 semanas de cultivo *in vitro* utilizando los tratamientos descritos.

2. El genotipo C510 aumentó a más del doble la cantidad de bulbos producidos en igual período, independiente de la temperatura de cultivo. Los genotipos C509 y C150 solo fueron capaces de aumentar entre un 10 y un 40% el número de bulbos producidos, no observándose una clara respuesta a la temperatura de cultivo respecto de este parámetro.
3. Solo C509 tuvo una clara respuesta positiva al cultivo a 20 °C en comparación a aquellos cultivados a 15 °C, al comparar el aumento en peso fresco, no así en el número de bulbos producidos.
4. Según los resultados obtenidos, existe un efecto mucho más importante del genotipo sobre el parámetro tasa de multiplicación que sobre el parámetro de aumento de peso fresco de bulbo.

EXPERIMENTO 3. Efecto de la temperatura en la multiplicación a partir de división de bulbos.

Unidad Experimental (Inicial): bulbo de 0,5g

Factor GENOTIPO: 3 (C509, C516 y C518)

Factor TEMPERATURA: 2 (15 y 20°C)

Tratamiento / Genotipo: 2

Tratamientos totales: 6

Fecha establecimiento: Octubre 2013

Cuadro 17. Estructura Experimento 3.

Tratamientos	Temperatura	Genotipos		
		G1	G2	G3
TMT 3.1	20°C	G1-TMT3.1	G2-TMT3.1	G3-TMT3.1
TMT 3.2	15°C	G1-TMT3.2	G2-TMT3.2	G3-TMT3.2

En este experimento el material fue iniciado utilizando el mismo protocolo de desinfección e iniciación descrito en para el Experimento 2.

Se dio inicio al experimento en el mes de octubre de 2013 a partir de material estabilizado, que se había establecido en condiciones de cultivo *in vitro* entre los meses de Mayo y Junio del mismo año. Para esto se utilizaron los genotipos C509, C516 y C518.

Se pesó en forma individual 5 bulbos ya estabilizados *in vitro* de cada genotipo (Cuadro 18), los cuales luego fueron divididos en cuatro partes cada uno, asegurando dejar parte del plato basal en cada explante (Figura 13) y fueron distribuidos aleatoriamente en tubos de ensayo con 20mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) con adición de 30 g·L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos, 6 g·L⁻¹ de agar como agente gelificante y se ajustó el pH a 5,7 (Figura 14). Posteriormente las secciones de bulbos fueron dispuestos en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a 20±1°C y 15±1°C según tratamiento.

Cuadro 18. Peso inicial de bulbos de *Leucocoryne spp.* utilizados para la división y establecimiento *in vitro* en el Experimento 3.

Genotipo	Bulbo	Peso Inicial (g)
C509	1	1,00
	2	1,29
	3	1,23
	4	0,81
	5	1,25
C516	1	1,45
	2	1,23
	3	2,01
	4	1,44
	5	1,01
C518	1	1,48
	2	1,17
	3	1,24
	4	1,03
	5	1,24



Figura 13. División de bulbos de *Leucocoryne spp.* *in vitro* para establecimiento de Experimento 3.

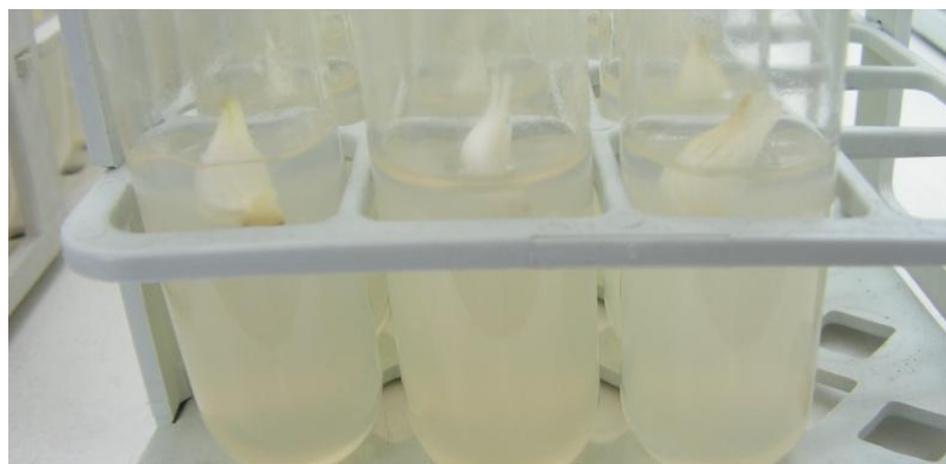


Figura 14. Establecimiento de secciones de bulbos de *Leucocoryne spp.* en medio de cultivo MS en el Experimento 3.

El experimento 3 fue evaluado a las 6 y 10 semanas de cultivo, para ver su evolución en brotación, formación de raíces y formación de bulbos (Cuadro 19, Cuadro 20 y Figura 15)

Cuadro 19. Evaluación de brotación, formación de raíces y bulbos de *Leucocoryne spp.* a las 6 semanas de cultivo *in vitro* para cada tratamiento en el Experimento 3.

Material	Total	Brotación			Formación raíces		Formación bulbos	
		N° 1 Brote	N° Brote Múltiple	%	N°	%	N°	%
C509 TMT3.1	10	3	2	50	0	0	2	20
C509 TMT3.2	10	1	2	30	0	0	3	30
C516 TMT3.1	10	0	0	0	0	0	0	0
C516 TMT3.2	10	2	0	20	0	0	2	20
C518 TMT3.1	10	3	1	40	1	10	1	10
C518 TMT3.2	10	4	0	40	1	10	3	30

Cuadro 20. Evaluación de brotación, formación de raíces y bulbos de *Leucocoryne spp.* a las 10 semanas de cultivo *in vitro* para cada tratamiento en el Experimento 3.

Material	Total	Brotación			Formación raíces		Formación bulbos	
		N° 1 Brote	N° Brote Múltiple	%	N°	%	N°	%
C509 TMT3.1	10	3	3	60	0	0	5	50
C509 TMT3.2	10	1	2	30	0	0	3	30
C516 TMT3.1	10	2	2	40	0	0	4	40
C516 TMT3.2	10	2	0	0	0	0	2	20
C518 TMT3.1	10	3	2	50	1	10	1	10
C518 TMT3.2	10	4	0	40	1	10	3	30

La formación de bulbos observada a las 6 y 10 semanas fue mejor en los tratamientos de temperatura mayor (20°C), excepto para el caso del genotipo C518, lo que indica que el genotipo podría haber estado influyendo en la respuesta.

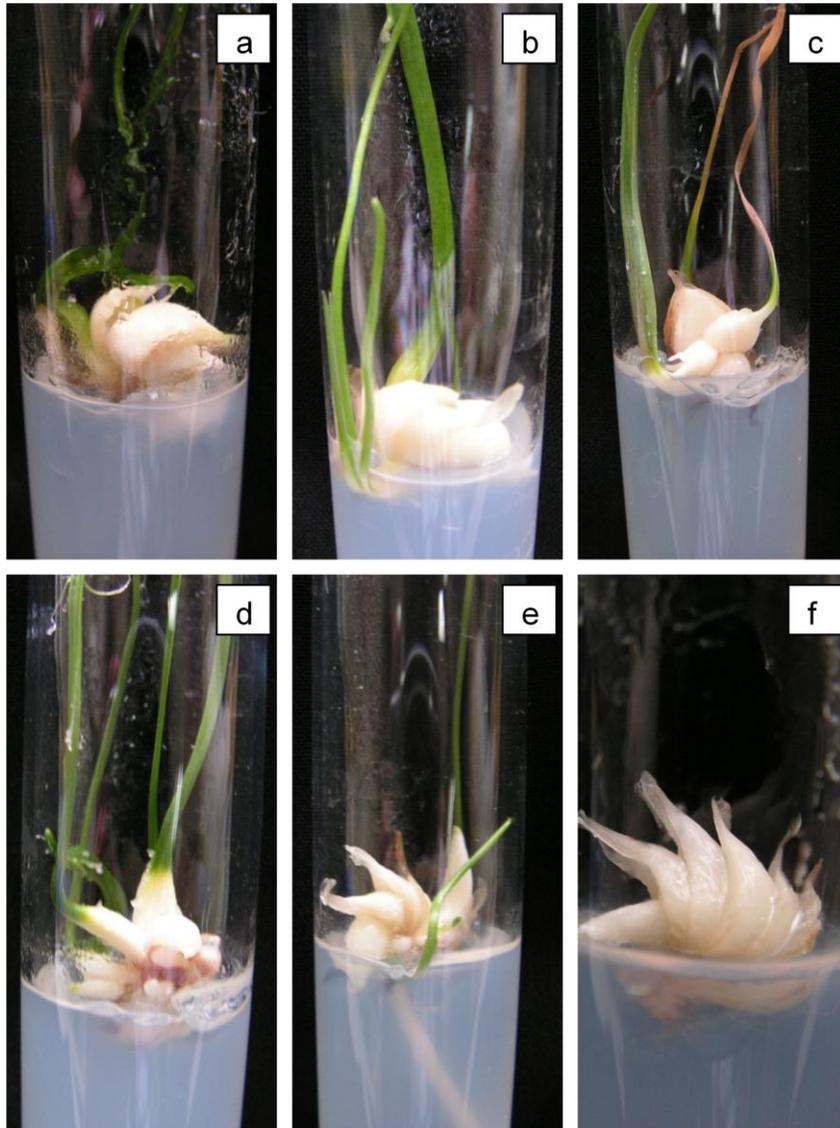


Figura 15. Evaluación visual de brotación, formación de raíces y bulbos para cada uno de los genotipos y tratamientos luego de 10 semanas de iniciado el experimento 3: a.C509TMT3.1; b.C516TMT3.1; c.C518TMT3.1; d.C509TMT3.2; e.C516TMT3.2 y d.C518TMT3.2.

Aproximadamente a las 15 semanas de cultivo se realizó un traspaso a medio fresco (MS con vitaminas), al que en esta etapa se le adicionó $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, buscando la posibilidad de mejorar la formación de bulbos. En dicho momento se traspasó la totalidad del explante sin separar ni cortar ninguna sección.

Se evaluó el porcentaje de brotación, producción de bulbillos y engorde de escamas. A las 14 semanas de este nuevo cultivo, se pudo observar diferencias en los porcentajes de brotación entre los distintos genotipos, sin importar el

régimen de temperatura en el que estaban, donde el genotipo C516 mostró el menor porcentaje de respuesta (Cuadro 21).

Cuadro 21. Evaluación de brotación, formación de bulbillos y engorda de escamas de *Leucocoryne spp.* a las 14 semanas de cultivo *in vitro* de la etapa 2, para cada tratamiento en el Experimento 3.

Material	Explantos	Brotación		Bulbillos	Escamas engrosadas
	N°	N°	%	N°	N°
C509TMT3.1	10	7	70,0	39	6
C509TMT3.2	10	8	80,0	64	0
C516TMT3.1	10	3	30,0	10	7
C516TMT3.2	10	3	30,0	7	10
C518TMT3.1	10	6	60,0	38	5
C518TMT3.2	10	6	60,0	20	4

A las 17 semanas se realizó una nueva evaluación, donde en forma general se pudo observar un aumento en la formación de bulbillos (Cuadro 22 y Figura 16). Este aumento en número de bulbillos y brotes imposibilitó una evaluación precisa en cuanto al número exacto de bulbillos producidos, por lo que los valores podrían tener un ligero margen de error al momento de sacar los explantes a condiciones *ex vitro*, en donde si se podrán aislar y contar con mayor facilidad. En el caso de las escamas engrosadas algunas de ellas se transformaron a una estructura similar a un bulbo y en otros casos estas terminaron muriendo.

Cuadro 22. Evaluación de brotación, formación de bulbillos y engorda de escamas de *Leucocoryne spp.* a las 17 semanas de cultivo *in vitro* de la etapa 2, para cada tratamiento en el Experimento 3.

Material	Explantos	Brotación		Bulbillos	Escamas engrosadas
	N°	N°	%	N°	N°
C509TMT3.1	10	7	70,0	46	2
C509TMT3.2	10	8	80,0	64	3
C516TMT3.1	10	3	30,0	22	7
C516TMT3.2	10	3	30,0	28	5
C518TMT3.1	10	6	60,0	51	3
C518TMT3.2	10	6	60,0	20	5

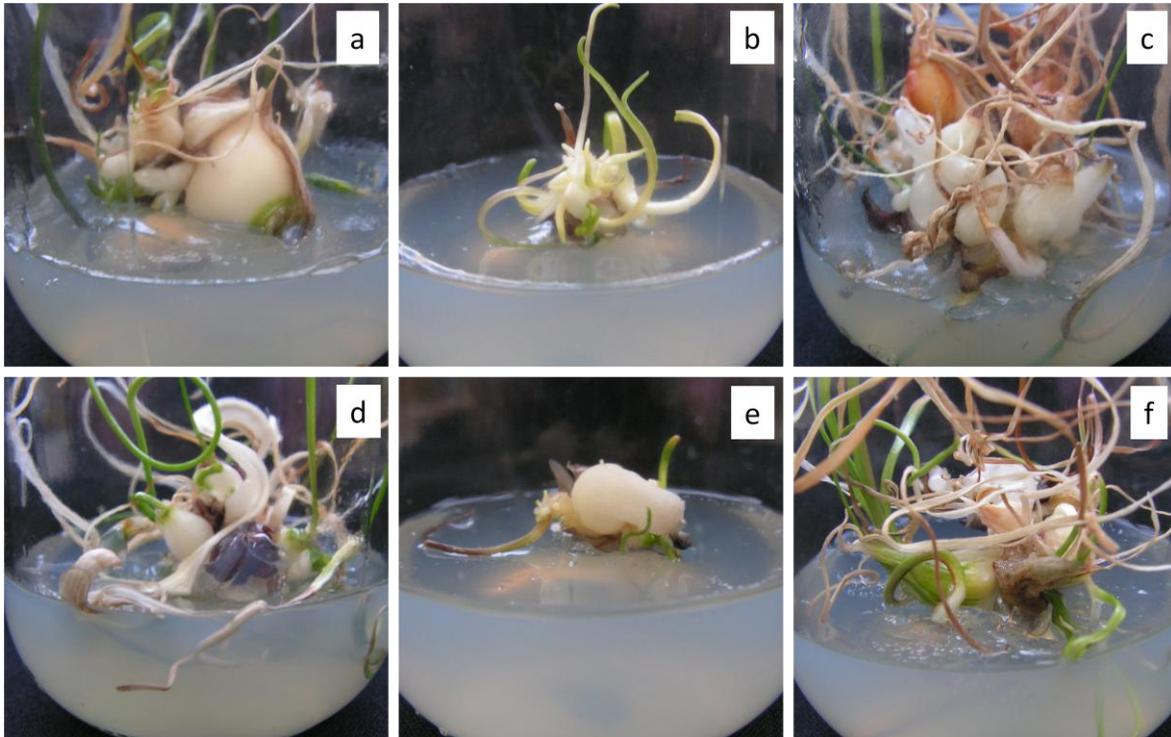


Figura 16. Evaluación visual de brotación, formación de raíces y bulbos *in vitro* para cada uno de los genotipos de *Leucocoryne spp.* y tratamientos luego de 23 semanas de ser traspasadas a medio MS + $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP: a.C509TMT3.1; b.C516TMT3.1; c.C518TMT3.1; d.C509TMT3.2; e.C516TMT3.2 y d.C518TMT3.2.

Conclusiones

1. El seccionamiento completo de bulbos de *Leucocoryne spp.* estimula fuertemente la producción de nuevos bulbos en condiciones *in vitro*.
2. Existe un efecto importante del genotipo sobre su capacidad de multiplicación final, lo cual debe ser considerado en futuras evaluaciones y selección de genotipos superiores.
3. La adición de 1 mg L^{-1} de BAP provocó un efecto de mayor tasa de multiplicación, lográndose entre un 200 y un 600% aproximadamente.
4. La adición de BAP también produjo una mayor actividad vegetativa, retrasando la dormancia lo cual es importante al momento de realizar la multiplicación de estos genotipos.
5. El tamaño de los bulbos producidos es muy inferior a los bulbos iniciales, y deben ser traspasados a una etapa de engorda posterior.

Anexo II-2b

PYT-2012-0079

Experimento 4b. - Informe de Avance

Responsable: Carlos de la Cuadra

Fecha: 30/06/2015.

El Exp. 4b se realiza dentro de la actividad “2.2.- *Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos*” que pertenece al OE N°2 “*Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.*” del proyecto FIA PYT-2012-0079.

El Exp. 4b tiene como objetivo mejorar la “Tasa de Aclimatación ex vitro” y estaba programado para ser iniciado en Abril 2014 y terminado en Diciembre 2014. No obstante, dado que existió un atraso en la disponibilidad de material in vitro (actividad “2.1.- *Establecimiento de material in vitro, Multiplicación y Bulbificación de bulbillos (Exp. 1, Exp. 2, Exp. 3 y Exp. 4a)*”), su ejecución se inició con desfase. Durante el último trimestre del 2014 se decidió realizar un (experimento) complemento al Exp. 4b. La nueva programación y su nivel de ejecución se describen a continuación:

PYT-2012-0079 Agonomía UCV	2014				2015												
	T3		T4		T1		T2		T3		T4						
	j	a	s	o	n	d	e	f	m	a	m	j	j	a	s	o	n

Exp. N°4b. In vitro + almacen. + ex vitro	Plan																	
	Real																	

OBJETIVO: Mejora de Tasa de aclimatación ex vitro.

Exp. N°4b (complemento).	Plan																	
	Real																	

OBJETIVO: Mejora de Tasa de aclimatación ex vitro.

- **Material Vegetal Utilizado**

El material utilizado corresponde a bulbos utilizados en Exp. 1, Exp. 2 y Exp. 3 provenientes de la actividad “2.1.- *Establecimiento de material in vitro, Multiplicación y Bulbificación de bulbillos*” desarrollada en el Laboratorio de Cultivo In Vitro y Ornamentales de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad católica de Chile. El material fue recibido en Julio de 2014.

Origen	# Bulbitos / Bulbos	Promedio de Peso Promedio (gr)
Exp. 1	528	0,07
Exp. 2	93	1,0
Exp. 3	309	0,7

- **Curado y Almacenaje**

Los bulbos fueron extraídos de su condición de cultivo in vitro, lavados (para retirar el gel), secados y guardados en sobres de papel en cámara de almacenaje a 20 °C. No se realizó ningún procedimiento más de curado. A las 7, 14, 22 y 26 semanas de almacenaje se realizaron controles. Se descartaron bulbos dañados, se contaron el número bulbitos/bulbos y se pesaron (a las 7 y 26 semanas de almacenaje).

El % de sobrevivencia (# Bulbos Final / # Bulbos Inicial) es mayor en la medida que el peso fresco del bulbo inicial es mayor. La principal pérdida de bulbos es por deshidratación y ocurre en durante los primeros meses de almacenaje.

Experimentos	Tiempo de Almacenaje a 20 °C				
	% Sobrevivencia				
	0 semanas	7 semanas	14 semanas	22 semanas	26 semanas
Exp. 1	100%	64%	46%	35%	34%
Exp. 2	100%	62%	55%	54%	55%
Exp. 3	100%	48%	44%	40%	39%

Experimentos	Tiempo de Almacenaje a 20 °C				
	Peso Fresco Promedio Bulbo (gr)	% Pérdida de Peso Fresco Promedio Bulbo			
	0 semanas	7 semanas	14 semanas	22 semanas	26 semanas
Exp. 1	0,07	-18%	NR	NR	-69%
Exp. 2	1,0	-59%	NR	NR	-64%
Exp. 3	0,7	-78%	NR	NR	-78%

NR = No Registrado

El mejor promedio general de sobrevivencia lo presenta el Exp. 2 (55%). Y si se tomarán en consideración, solamente los provenientes del TMT 2.2 (cultivados in vitro a 15 °C), el porcentaje promedio de sobrevivencia de los tres genotipos utilizados fue de 77%.

- **Brotación y Cultivo ex vitro**

Cumplidas las 26 semanas (09/01/15), los bulbitos/bulbos fueron plantados en maceteros y puestos cámara de crecimiento a 15 °C con un fotoperiodo de 12 hrs (20.000 lux). Luego de 28 días (06/02/15) se observó un 43% de brotación promedio y a los 56 días (06/03/15) se observó un 75% de brotación promedio.

Exp.	# Bulbitos / Bulbos	Peso Fresco Prom. Bulbo (gr)	Tiempo de Cultivo a 15 °C							
			% Brotación							
	0 DDP		7 DDP	14 DDP	21 DDP	28 DDP	35 DDP	42 DDP	49 DDP	56 DDP

Exp. 1	178	0,02	3%	12%	24%	42%	71%	71%	78%	80%
Exp. 2	51	0,3	18%	37%	57%	70%	76%	76%	80%	80%
Exp. 3	122	0,1	3%	16%	27%	32%	50%	50%	60%	66%

DDP = Días Después de Plantación

Al finalizar el experimento (06/03/15), las plantas fueron llevadas al invernadero.

Conclusión.

Los resultados obtenidos en este Exp. 4b pueden ser considerados como línea base.

Bulbos in vitro de 1 gr (Exp. 2) presentan un % de sobrevivencia de 55% a las 26 semanas de almacenaje y una brotación de un 80% a los 56 días de cultivo, es decir, la Tasa de Aclimatación ex - vitro fue de 44%.

Considerando solamente el desempeño de los bulbos provenientes del TMT 2.2 (cultivados in vitro a 15 °C), bulbos in vitro de 1 gr presentan un % de sobrevivencia de 77% a las 26 semanas de almacenaje y una brotación de un 80% a los 56 días de cultivo. En otras palabras, la Tasa de Aclimatación ex - vitro fue de 58%.

Observaciones.

Como complemento al Exp. 4b, se inició en noviembre 2014, otro experimento de aclimatación ex vitro. Se seleccionaron bulbos que se encontraban en (aparente) crecimiento activo (presencia de hojas verdes) y se llevaron a temperaturas de senescencia (25°C) hasta finales de enero 2015 para favorecer entrada en dormancia. Posteriormente, estos bulbos han sido almacenados en cámara de 20 °C por 26 semanas (6 meses) y se cultivaran, desde fines de Julio de 2015, en cámara de crecimiento para control de brotación.

Anexo II-2c

PYT-2012-0079

Experimento 4b (complemento). - Informe de Avance

Responsable: Carlos de la Cuadra

Fecha: 31/12/2015.

El Exp. 4b (complemento) se realiza dentro de la actividad “2.2.- *Enraizamiento; Aclimatación; Paso a tierra; Cosecha y Almacenaje de bulbos*” que pertenece al OE N°2 “*Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.*” del proyecto FIA PYT-2012-0079.

El Exp. 4b (complemento) tiene como objetivo mejorar la “Tasa de Aclimatación ex vitro” y se decidió su ejecución, durante último trimestre del 2014, aprovechando disponibilidad de bulbos in vitro existentes en el Laboratorio de Cultivo In Vitro y Ornamentales de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Su programación y nivel de ejecución se describen a continuación:

PYT-2012-0079 Agonomía UCV	2014				2015												
	T3		T4		T1	T2	T3		T4								
	j	a	s	o	n	d	e	f	m	a	m	j	j	a	s	o	n

Exp. N°4b (complemento).	Plan																		
	Real																		

OBJETIVO: Mejora de Tasa de aclimatación ex vitro.

• Material Vegetal Utilizado

El material utilizado corresponde a bulbos de *Leucocoryne* del Laboratorio de Cultivo In Vitro y Ornamentales. Los bulbos originales fueron entregados por el Prof. Leví Mansur al Laboratorio de Cultivo In Vitro con anterioridad al inicio del proyecto FIA PYT-2012-0079.

Genotipo	Tº de Cultivo	# Bulbos
L. vittata	15ºC	10
L. vittata 753	15ºC	20
L. purpurea	20ºC	16
L. vittata	20ºC	10
L. ixioides	20ºC	20

Los distintos genotipos no solo difieren de temperatura de cultivo sino que también de tiempo desde el último repique (desde 12 a 34 semanas).

- **Curado y Almacenaje**

Previo a que los bulbos fueron extraídos de su condición de cultivo in vitro se realizaron tratamientos para favorecer el curado aumentando la temperatura de cultivo (25 °C). A las 6 y 10 semanas de tratamiento de curado se realizaron controles de senescencia. Una vez cumplidos los tratamientos (11 semanas), los bulbos fueron extraídos, es decir, lavados (para retirar el gel), secados y guardados en sobres de papel en cámara de almacenaje a 20 °C. No se realizó ningún procedimiento más de curado. A las 1, 3, 8 y 36 semanas de almacenaje se realizaron controles. Se descartaron bulbos dañados, se contaron el número bulbos y se pesaron (a las 8 y 36 semanas de almacenaje).

El % de senescencia es mayor en la medida que se expone a tratamientos con mayores temperaturas (25°C). Respecto a la pérdida de bulbos por deshidratación no supera el 25% durante las primeras 8 semanas de almacenaje, pero ésta continúa hasta alcanzar un 40% en promedio al término del almacenaje.

TMT	Tiempo de Curado a 25 °C % Senescencia		
	0 semanas	6 semanas	10 semanas
15°C / 15°C	100%	25%	35%
15°C / 25°C	100%	45%	60%
20°C / 20°C	100%	28%	50%
20°C / 25°C	100%	71%	89%

TMT	Tiempo de Almacenaje a 20 °C % Supervivencia						
	0 semanas	1 semanas	3 semanas	8 semanas	Peso Fresco Promedio Bulbo (gr)	36 semanas	Peso Fresco Promedio Bulbo (gr)
15°C / 15°C	100%	93%	93%	88%	0,5	66%	0,4
15°C / 25°C	100%	78%	78%	75%	0,4	62%	0,3
20°C / 20°C	100%	96%	90%	67%	0,4	52%	0,3
20°C / 25°C	100%	97%	95%	78%	0,6	59%	0,3

Al analizar los datos a nivel de genotipo, se observa gran variación. Los genotipos *L. vittata* 753 y *L. purpurea* cuando no han sido afectados por tratamiento de curado (25°C por 11 semanas) presentan un % Supervivencia de un 86%.

- **Brotación y Cultivo ex vitro**

Cumplidas 36 semanas (24/09/15), los bulbos fueron plantados en maceteros y puestos cámara de crecimiento a 15 °C con un fotoperiodo de 12 hrs (20.000 lux). Luego de 25 días (19/10/15) se observó un 42% de brotación promedio y a los 43 días (06/11/15) se observó un 51% de brotación promedio.

TMT.	# Bulbos	Peso Fresco Prom. Bulbo (gr)	Tiempo de Cultivo a 15 °C % Brotación			
			0 DDP	11 DDP	25 DDP	32 DDP
15°C / 15°C	12	0,4	43%	43%	43%	58%
15°C / 25°C	14	0,3	36%	47%	47%	42%
20°C / 20°C	26	0,3	33%	55%	60%	68%
20°C / 25°C	24	0,3	4%	14%	18%	22%

DDP = Días Después de Plantación

Al finalizar el experimento, las plantas fueron llevadas al invernadero.

Al analizar los datos a nivel de genotipo, se observa gran variación para el % Brotación. Los genotipos *L. vittata* 753 y *L. purpurea* cuando no han sido afectados por tratamiento de curado (25°C por 11 semanas) presentan un % Brotación de un 87%.

Conclusión.

En forma preliminar, el tratamiento de curado en condición in vitro (25°C, 11 semanas) no tienen efecto sobre la sobrevivencia en almacenaje y su posterior brotación.

Se debiera ahondar en definir condiciones de humedad durante el almacenaje que disminuyan pérdida por deshidratación cuando los bulbos se exponen a largos periodos de almacenaje (4 a 6 meses).

Existe una gran variación de desempeño por genotipo. Si se consideran los genotipos de mejor desempeño, *L. vittata* 753 y *L. purpurea*, presentan un % de sobrevivencia de 86% y una brotación de 87%, es decir, una Tasa de Aclimatación ex - vitro de 75%.

Anexo II-2d

**Informe de avance n°2: Etapa
aclimatización ex vitro de Leucocoryne**

Introducción

Chile presenta una gran diversidad de geófitas nativas dentro de las cuales se encuentra el género *Leucocoryne* (Shiappacasse *et al.*, 1999). Este último pertenece a la familia Alliaceae y es endémico de Chile (Mansur *et al.*, 2002). El género cuenta con 12-14 especies (Yañez, 2007), todas provistas de bulbo, distribuidas entre la primera a la actual octava región (Mansur, De la Cuadra, 2004). Las flores presentan una gran variabilidad tanto en la forma y color de los tépalos como en la forma y colorido de los estaminodios (Yañez, 2007).

Si se piensa en su futuro comercial, este género presenta cualidades excepcionales como planta ornamental, ya sea como flor de corte, maceta o aplicaciones al paisajismo (Mansur *et al.*, 2002). Dentro de las características que le otorgan este potencial se pueden señalar vistosas flores, buena duración postcosecha y gran variabilidad del género respecto al colorido (Walton, 2008). Debido a las características mencionadas anteriormente el *Leucocoryne* ha sido cultivado desde el siglo XIX en jardines europeos, a través de semillas o bulbos llevados desde su país de origen. En la década de los setenta se desarrollaron varios cultivares en Holanda y actualmente se cultivan en Japón, Israel y en menor grado en Holanda (Yañez, 2007). Sin embargo para que una planta o género pueda ser explotado a nivel comercial resulta fundamental que la propagación sea capaz de responder a las necesidades de un mercado exigente tanto en calidad como en los tiempos requeridos para la obtención de los bulbos.

No obstante el tiempo que el género lleva siendo explotado, su cultivo aún no es masivo principalmente por lo extenso del periodo de receso, lo que impide obtener bulbos con calidad comercial en un tiempo razonable. Sumado a esto el ciclo completo es extenso tomando al menos tres años, desde semilla a bulbo floral, pudiendo variar levemente según la especie (Zoëllner *et al.*, 2002). Es importante mencionar además, que el *Leucocoryne* tiene la posibilidad de reproducirse vegetativamente mediante la producción de nuevos bulbillos originados en el disco basal del bulbo madre (Mansur *et al.*, 2002). Pero lamentablemente debido a lo largo del proceso, este tipo de propagación tampoco es capaz de responder a las exigencias del mercado.

A partir de esto se ha buscado en los últimos años acelerar el ciclo de vida del *Leucocoryne*, principalmente a través de la técnica de cultivo *in vitro*, de ahí que sea posible obtener bulbos capaces de producir flores con valor comercial en menos tiempo. Se han detectado dificultades a partir de la técnica de clonación ya que las cantidades entregadas por los laboratorios de micropropagación son bajas y el material muy heterogéneo. Por otra parte la micropropagación realizada hasta la fecha es a partir de semillas, por lo tanto no se ha desarrollado la técnica de clonación que permitiría un escalamiento comercial.

Más aún, además de la heterogeneidad del material un problema mayor resulta ser la entrada en receso de los bulbos, sean a partir de semilla o clonación. Se han obtenido resultados en relación a los medios de cultivo adecuados, explantes y tasa de multiplicación, pero es común que al momento del cultivo *in vitro* los bulbos entren en profunda dormancia (Verdugo, 2013). Es más, observaciones realizadas por Eduardo Olate y Carlos de la Cuadra (Comunicación personal, 2014) indican que gran parte de los bulbos entran en receso entre la semana 11 y 13 luego de iniciado el cultivo *in vitro*. Esto último implica que el tiempo de crecimiento del material se acorta y en consecuencia los bulbos obtenidos no cuentan con el tamaño suficiente para producir varas florales de calidad comercial, ya que como menciona Verdugo (2013) para que un bulbo pueda producir flores con valor comercial se requiere que este tenga un peso mínimo de 1 gramo aunque otros autores indican que los bulbos a partir de 0,3 g tienen capacidad de florecer.

Con el objetivo de atrasar el comienzo del receso, el año 2007 Araneda y Verdugo aplicaron auxinas a la base de los bulbos logrando un 70 % de enraizamiento sin entrada en receso. Sin embargo al repetir esos tratamientos el año 2014 se observó que la mayoría de estos entraron en receso independiente del uso de la hormona y del estado en que fue recibido el bulbo (con hojas verdes, sin hojas o con hojas senescentes).

Los antecedentes mencionados han llevado a plantear la necesidad de verificar que mecanismo gobierna la entrada en receso, de forma que mediante el control de este sea factible prolongar el tiempo de crecimiento y así obtener un bulbo más grande que produzca por lo tanto una o más flores de alta calidad.

Actualmente el receso se relaciona al contenido de ABA o con la relación ABA/GA en el interior de un órgano o tejido. Lo que se evidencia en el trabajo de Yamazaki *et al.* (1999), en el cual la cantidad de ABA fue relacionada con la profundidad en la dormancia de bulbos de *Allium wakegi*, donde a través de aplicaciones de 500 μ M de ABA a los bulbos por 24 horas se retrasó significativamente la brotación. Análogamente Matsubara y Kimura el año 1991 trabajaron con bulbos de cebolla donde observaron que el momento del receso del bulbo correspondía con los más altos niveles de ABA endógeno durante el ciclo de crecimiento. En cuanto a la relación ABA/GA Yamazaki *et al.* (2002) menciona que el estado de dormancia del bulbo se considera independiente de las concentraciones de GA en *A. wakegi*, de forma que es posible pensar en una mínima o nula participación de esta hormona en la dormancia del *Leucocoryne*, también del genero allium.

Adicionalmente este fenómeno se relaciona con condiciones de estrés durante el crecimiento, principalmente ya que estas podrían facilitar la producción de ABA. Se ha determinado que los niveles endógenos de ABA se incrementan en diferentes condiciones de estrés, incluido el déficit hídrico. Estos datos, junto con el estudio de promotores y la caracterización de las mutantes deficientes en ABA de *A. thaliana* y de maíz, apoyan la participación del ABA endógeno en la regulación de la expresión de genes durante estrés (Moreno, 2009).

Sin embargo al evaluar el factor estrés es difícil considerar que un bulbo durante su permanencia in vitro sufra algún tipo de estrés, puesto que las condiciones tanto de luz, temperatura y humedad se encuentran estables, ya que en la propagación in vitro se controlan estrictamente las condiciones del ambiente (Hartmann y Kester, 1995). Eso sí resulta importante mencionar que un único factor potencialmente variable estaría relacionado con el medio de cultivo usado y más específicamente con el agotamiento de alguno o algunos de los componentes del medio, pero en los antecedentes de los dos cultivos in vitro realizados hasta la fecha por Fuentesvilla (2004) y Olate (2004) independiente de la cantidad de repiques realizados a lo largo del cultivo, los bulbos llegan a un peso similar. Por lo tanto, es factible pensar que probablemente exista formación de ABA endógeno natural en los bulbos lo que ocasionaría la entrada en receso. Es más, el hecho de que la inducción de la dormancia en plantas bulbosas sea acompañada por la bulbificación (Kaori Li *et al.*, 2002) ha llevado a pensar que ambos procesos son simultáneos lo que explicaría la formación endógena de ABA (Uemoto, S.*et al.*, 1983).

Es de esta manera que si se determina la curva de acumulación de ABA durante el cultivo in vitro será posible retrasar el receso mediante la aplicación de un anti ABA en los momentos críticos, aquellos en los que se alcanzan cantidades activas en los tejidos. Un anti ABA de uso común es la Fluridona de la que existen antecedentes de efectividad. Yamazaki *et al.* en 1999 afirmaba que los niveles de ABA endógeno

en bulbos, yemas de bulbos, laminas foliares y raíces fueron reducidos gracias a la aplicación de Fluridona. Más aún se ha informado que los microtubérculos de patata y los bulbillos de *Lilium* regenerados en la presencia de Fluridona no desarrollaron dormancia y el efecto del herbicida fue suprimido al aplicar ABA exógeno (Yamazaki *et al.*, 1999). Asimismo Yoshioka *et al.* (1998), determinaron que el contenido de ABA en semillas de lechuga decayó luego de una imbibición rápida en Fluridona. Sin embargo para obtener el resultado buscado es necesario que la aplicación se realice en el momento adecuado y en la dosis precisa.

En base a lo anterior se propone por tanto hacer una serie de ensayos tendientes a probar la hipótesis y a determinar un procedimiento que pueda ser usado a escala comercial para obtener bulbos de alto peso en corto tiempo.

Ensayo N°1: Determinación del medio de cultivo

El día 7 de mayo del 2015 se inició la evaluación de dos medios de cultivo en la producción de bulbos a partir de semillas de *Leucocoryne purpurea*. El objetivo era determinar aquel medio que resulte más eficiente en la micropropagación, tanto en calidad y cantidad de plántulas obtenidas como en la economía de elaboración. Los medios son descritos a continuación:

- Medio A: Medio denominado MS (Murashige y Skoog, 1962) diluido en un octavo.
- Medio B: Medio OMA (agar avena) el cual ha sido utilizado en tratamientos de germinación simbiótica de *Chloraeas* con buenos resultados (Steinfort, U. *et al.* 2010, Chou and Chang, 2004)

La composición de cada medio se puede observar en el anexo número 1.

Cada siembra se realizó en frascos de cultivo, con una cantidad de 6 semillas por frasco y 15 repeticiones por medio.

Protocolo de desinfección:

180 semillas de *Leucocoryne purpurea* fueron desinfectadas durante 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1% y unas gotas de detergente en un matraz, para luego, ser lavadas tres veces con agua destilada estéril, al interior de la cámara de flujo laminar. Posteriormente estas se secaron sobre papel absorbente durante 30 minutos.

Protocolo de siembra:

Se sembraron 6 semillas por frasco con 20 cc de medio. Posteriormente se trasladaron los frascos a una cámara de cultivo proporcionándoles oscuridad y una temperatura de 15°C. Al momento de la aparición de la radícula se llevaron a una cámara dotada de un panel de luces led donde se les proporcionó 16 horas de luz.

En el anexo numero dos es posible observar imágenes de los frascos de cultivo de cada medio y en el anexo 4 la metodología utilizada para la iluminación.

Finalmente para determinar el efecto del medio sobre la germinación, las evaluaciones fueron las siguientes:

1. Tiempo que demora la primera semilla en emerger en cada tratamiento.

2. Tiempo que toman en emerger el 50% de las semillas en cada tratamiento

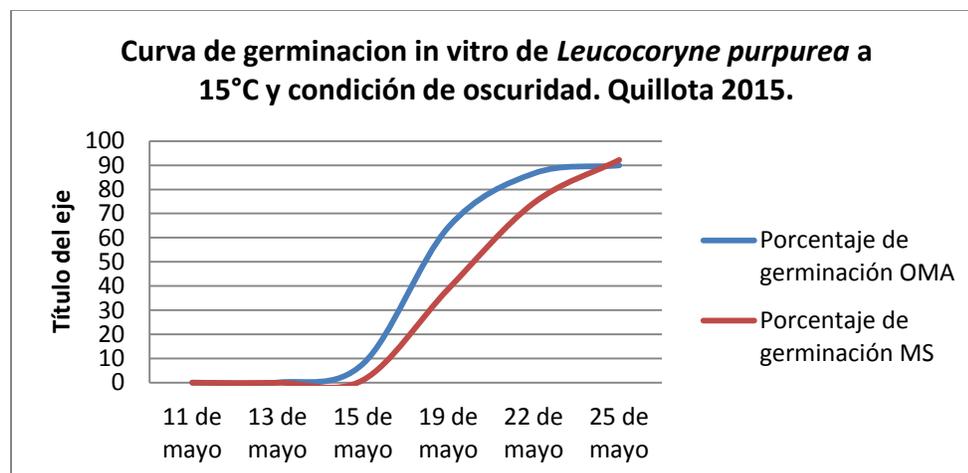
También se midió la ganancia de peso de los bulbillos formados posteriormente a la germinación.

Resultados

1. Germinación

Datos de germinación en porcentaje

Día	Porcentaje de germinación	
	OMA	MS
11 de mayo	0	0
13 de mayo	0	0
15 de mayo	7,8	1,1
19 de mayo	64,4	38,9
22 de mayo	86,7	74,4
25 de mayo	90,0	92,2



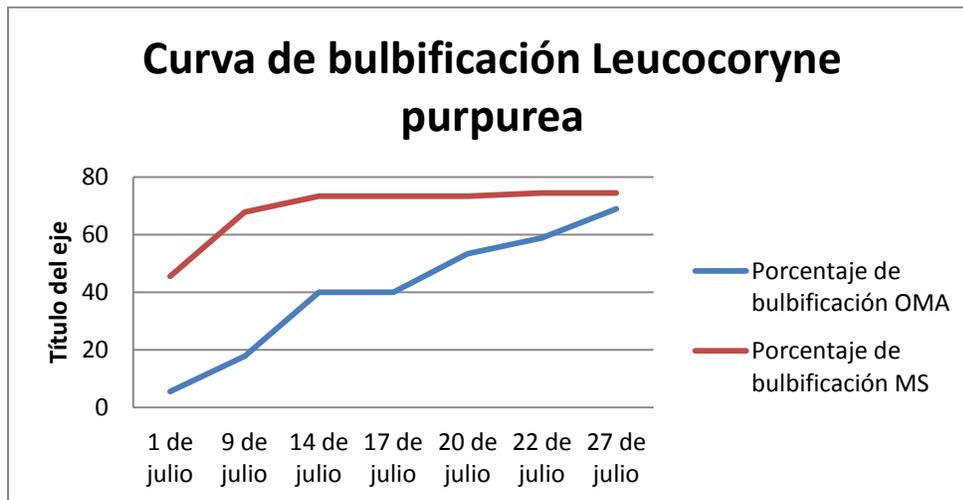
1. Germinación de la primera semilla

- 8 días después de la siembra en ambos medios se dio la germinación de la primera semilla.

2. Germinación del 50%

- En OMA 11 días después con 58 semillas
- En MS 15 días después con 70 semillas.

3. Bulbificación



Ensayo N°2: Obtención de la curva de formación de ABA endógeno en *Leucocoryne*

En base a los resultados obtenidos del ensayo número uno se sembró en el medio MS/8 cada dos semanas semillas de *Leucocoryne sp.* La siembra se realizó en frascos de cultivo con 6 semillas por frasco, la unidad experimental estará constituida por 20 frascos y con 3 repeticiones, de modo que a la semana 14 sea posible contar con siete estados de desarrollo. En cada estado se realizará una evaluación del contenido de ABA mediante un test de ELISA. A través de esta metodología será posible elaborar una curva de formación de ABA endógeno en $\mu\text{g/ml}$ en bulbos de *Leucocoryne* propagados in vitro. Dependiendo de las características de la curva será posible establecer el momento en el cual esta hormona alcanza valores críticos los cuales podrían estar provocando la entrada en receso de los bulbos. De acuerdo a experiencias de cultivos anteriores se ha estimado que la máxima concentración de ABA se debiese encontrar aproximadamente entre la semana 10 y 14 de cultivo, de forma que gracias a la obtención de las concentraciones será posible establecer el momento exacto en el cual la hormona alcanza valores significativos. Es importante mencionar que para llevar a cabo la medición de ABA en tejido el protocolo del test exige un total de 0,5 gr de peso seco de material vegetal. Por tanto si se

considera un peso de 0,3 gr por bulbo y un porcentaje de 95% de agua en cada bulbo, se debe tomar en cuenta que cada bulbo aporta solamente 0,015 gr para la evaluación de forma que es necesario contar con al menos 30 bulbos por cada estado lo que permitiría realizar la medición del contenido de ABA.

Metodología de evaluación de ABA

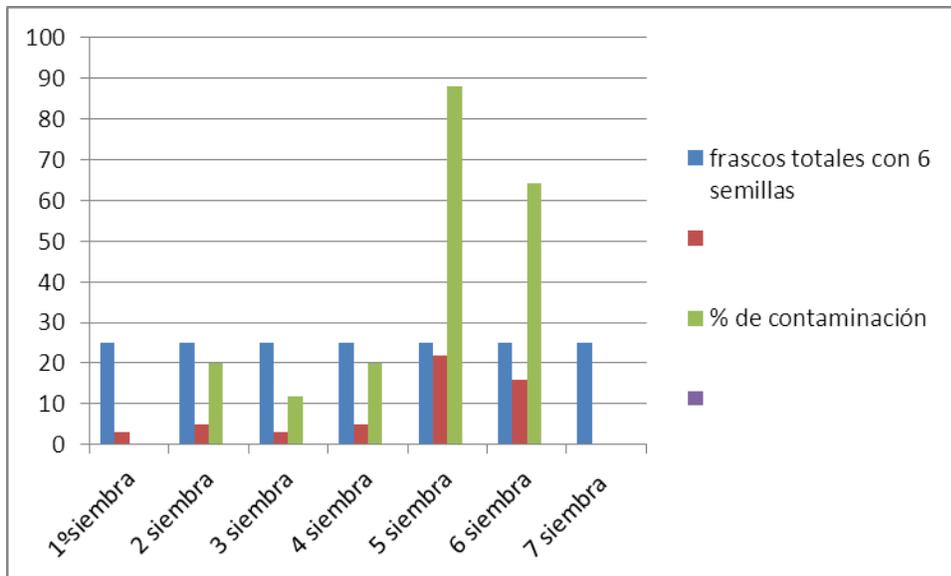
Para llevar a cabo la evaluación del contenido de ABA será necesario de manera inicial elaborar los extractos crudos, los cuales se obtienen a partir de los bulbillos liofilizados. Para cada evaluación es necesario un peso de 0,5 gr. Posteriormente la muestra se lleva a una centrifuga en la cual se agregan 4,5 ml del buffer de extracción. Las muestras se deberán agitar durante la noche en frío a 4-5°C y en oscuridad. A continuación será necesario centrifugar los sólidos y usar el sobrenadante directamente o diluido con el buffer o H₂O en el ELISA, lo que finalmente otorgará las concentraciones de ABA en las muestras.

Resultados

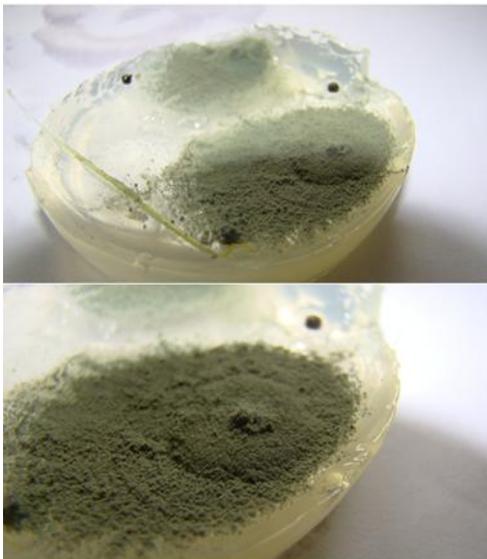
A la fecha se han realizado 7 siembras consecutivas, que se encuentran en crecimiento en cámara de cultivo a 15°C y con fotoperíodo aportado por luces led, de ellas sólo la fecha 5 tuvo problemas de pérdida de ejemplares por contaminación, en las primeras siembras ya se ha iniciado la formación de bulbillos, la evaluación del ABA endógeno será realizada la primera semana de diciembre momento en el cual las primeras siembras están en la semana 13 y por lo tanto mostrarían una alta concentración de ABA.

Fechas siembras:

1. 27 de agosto
2. 3 de septiembre
3. 10 de septiembre
4. 16 de septiembre
5. 24 de septiembre
6. 1 de octubre
7. 5 de noviembre



Contaminación detectada por fecha de siembra, porcentualmente la 5 fecha tiene 88 % de contaminación y los ejemplares que permanecen no alcanzaran los mg de peso seco requeridos para el test de presencia de ABA, al existir otras 6 fechas se puede graficar el resultado y extrapolar si fuese necesario.



Imágenes de los frascos contaminados, todos presentan el mismo crecimiento, en la 7 fecha de siembra se volvió a desinfectar las semillas, esta siembra realizada el 5 de noviembre está aún sin germinar.

También se ha importado el producto anti ABA y una vez obtenida la curva de acumulación de ABA se realizará el ensayo de cultivo in vitro con adición del producto mencionado y evaluar así el tiempo que demora en entrar en receso y su efecto en el peso de los bulbos obtenidos.

Imágenes de bulbillos



Figure 2MS 27 de Julio

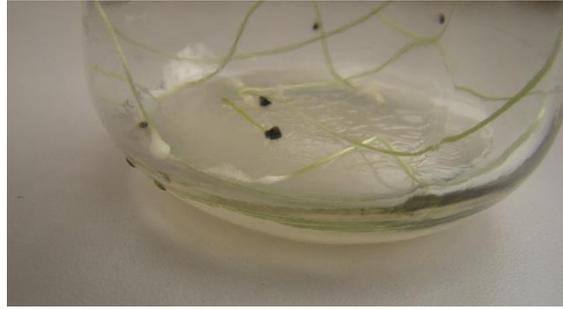


Figure 1OMA 27 de Julio

Pesos promedios en gr de bulbillos obtenidos

Este valor corresponde al promedio de 15 ejemplares

1. **OMA:** 0,00303333
2. **MS:** 0,01528

3. Contaminación

Porcentaje de contaminación

FECHA	MEDIO		Porcentaje de contaminación	
	OMA	MS	OMA	MS
NUMERO DE FRASCO	Cantidad de frascos contaminados			
11 de mayo	0	0	0	0
13 de mayo	0	0	0	0
15 de mayo	0	0	0	0
19 de mayo	0	2	0	12,5
22 de mayo	0	0	0	0
25 de mayo	6	2	28,6	12,5
27 de mayo	1	0	4,8	0
29 de mayo	1	0	4,8	0

1 de junio	0	0	0	0
3 de junio	0	0	0	0
5 de junio	0	0	0	0
8 de junio	0	0	0	0
9 de junio	0	0	0	0
10 de junio	0	0	0	0
11 de junio	0	0	0	0
12 de junio	0	0	0	0
13 de junio	0	0	0	0
14 de junio	0	0	0	0
15 de junio	0	0	0	0
TOTAL	8	4	38,10	25,00

En el adjunto número 3 se pueden observar imágenes de los frascos contaminados

Literatura citada

Literatura citada

- **Araneda, L., and Verdugo, G.** 2007. Effect of Auxin on Rooting during Acclimatization of *Leucocoryne* Bulb. *Acta Hort*, 748: 121-126.
- **Chou and Chang.** 2004. Asymbiotic and symbiotic seed germination of *Anoectochilus formosanus* and *Haemaria discolor* and their F₁ hybrids. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 143-147.
- **Fuentevilla, C.** 2004. Propagación in vitro de algunas especies de *Leucocoryne*. Taller de título. Ing. Agr. Quillota, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Facultad de Agronomía. 41p.
- **Hartmann, H. y Kester, E.** 1995. Propagación de plantas. Principios y Prácticas. 4a. ed. México. D.F. Continental. 760 p.
- **H. H Kim, K. Ohkawa and E. Nitta.** 1998b. Effects of bulb weight on the growth and flowering of *Leucocoryne coquimbensis* F.Phil. *Acta Hort.* 454: 341-346.
- **Li, K., Okubo, H. and Matsumoto, T.** 2002. Control of bulb dormancy in hyacinth - a molecular biological approach. *Acta Hort.* 570:241-246.

- **Mark P. Bridgen, Eduardo Olate, and Flavia Schiappacasse.** 2002. Flowering Geophytes from Chile. *Acta Hort.* 570: 75-80.
- **Matsubara, S. and Kimura, I.** 1991. Changes of ABA Content during Bulbing in Bulbing and Dormancy and in vitro Onion Plant. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 54, 757-762.
- **Mansur, L., De La Cuadra, C.** 2004. EL caso Leucocoryne: Bulbosas Chilenas: conservación, mejoramiento y propiedad intelectual. *Tierra Adentro*, 1, 44-47.
- **Mansur, L., Zöllner, O., Riedemann, P., Verdugo, G., y C. Harrison.** 2002. Ciclo de vida, autoincompatibilidad y plasticidad genética en diseño y color de sus flores. En: *Leucocoryne*, un género nativo chileno y su uso como planta de jardín. Serie manuales innovación tecnológica para la agricultura. Manual Nº 1. Primera edición. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso. Chile. 49 pág
- **Moreno, P.** 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 27: 179-191.
- **Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- **Olate, E., and Bridgen, M. P.** 2004. Techniques for the in vitro propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* spp. *Acta Horticulturae.* 673:335-342.
- **Steinfort, U., Verdugo, G., Besoain, X., Cisternas, M.** 2010. Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Poepp.) Johnst (Orchidaceae). *Flora.* 205: 811-817
- **Schiappacasse, F.; Yañez, P. y Peñailillo, P.,** 1999. Propagación de geófitos nativos. En Peñailillo, P. y Schiappacasse, F. (eds). "Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura". Seminario Universidad de Talca, Talca. Noviembre 1999. pp. 11.
- **Uemoto, S., Okubo, H. and Choi, S.T.** 1983. Relationships between bulb formation and dormancy in respect to the endogenous plant hormone levels. *Acta Hort.* 134:101-108
- **Verdugo, G.** 2013. Flower Breeding of Native Plants: the Chilean Experience. *Acta Hort.*1000: 401-405.
- **Walton, E., F.** 2008. Bulb and inflorescence development in *Leucocoryne ixiooides* (Hook.) Lind. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 83: 574-580.

- **Yamazaki, H., Nishijima, T., Koshioka, M., and Miura, H.** 2002. Gibberellins do not act against abscisic acid in the regulation of bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. *Plant Growth Regulation*, 36: 223-229.
- **Yamazaki, H., Nishijima, T., Yamato, Y., Koshioka M. and Miura, H.** 1999. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and Fluridone. *Plant Growth Regulation*, 29: 189-194.
- **Yáñez C., P.** 2007. Control de floración en especies ornamentales: *Leucocoryne*, *Zephira* y *Helianthus*. *Agro Sur*, 35: 9-10.
- **Yoshioka, T. Endo, T., and Satoh, S.** 1998. Restoration of Seed Germination at Supraoptimal Temperatures by Fluridone, an Inhibitor of Abscisic Acid Biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 39: 307-312.
- **Zöellner, O., Mansur, L., Riedemann, P., Verdugo, G., y C. Harrison.** 2002. Descripción del genero *Leucocoryne* (Alliaceae), su forma de propagación y distribución.

Anexos

1. Anexo n°1: Constitución de medios de cultivo

Constitución Medio MS

Código solución madre	Constitución	Concentración solución madre (g/l)	Volumen para preparación de 1 litro de medio (ml/l)	Concentración final del medio (mg/l)	Concentración de MS/8 (mg/l)
Macroelementos					
I	NH ₄ NO ₃	330	5	1650	206
II	KNO ₃	190	10	1900	237
III	KH ₂ PO ₄	34	5	170	22
IV	MgSO ₄ 7H ₂ O	74	5	370	46,25
V	CaCl ₂ 2H ₂ O	88	5	440	55
Microelementos					
VI	KI	0.166	5	0.83	0,10
	H ₃ PO ₃	1.24	5	6.2	0,775
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	2.12		8.6	1

	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.38		22.3	2,8
VII	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01	2.5	0.025	0,003
VIII	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.05	5	0.025	0,003
IX	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01	2.5	0.025	0,003
X	Na ₂ EDTA	7.46	5	37.3	4,6
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.56		27.8	3,47
Vitaminas					
XI	Tiamina HCL	0.02	0.5	0.1	0,01
XII	Piridoxina	0.1	2.5	0.5	0,06
XIII	Ac.Nicotínico	0.1	2.5	0.5	0,06

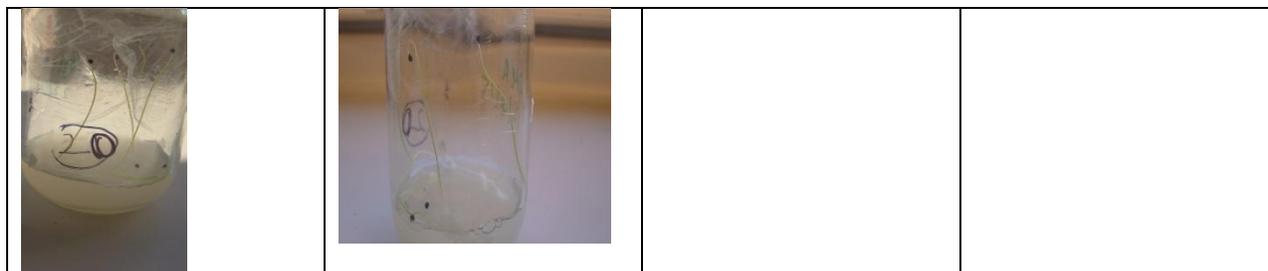
Formulación de medio Agar avena

Constitución	Cantidad para 1 litro de medio
Avena	3 g
Agar	7 g
Agua destilada desionizada	1.0 L
Extracto de levadura	0,1 g

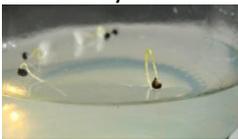
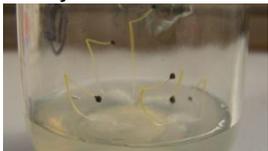
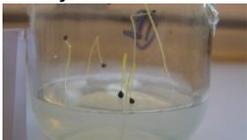
2. Anexo n°2 Imágenes frascos de cultivo

1. Evolución de semillas en OMA

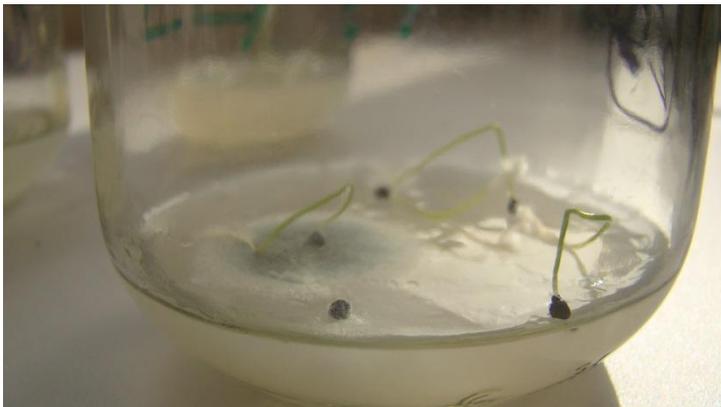
11 de mayo 	15 de mayo 	19 de mayo 	22 de mayo 
25 de mayo  OMA 2/4/15 20	27 de mayo 	29 de mayo 	1 de junio  OMA 4/6/2015 20
3 de junio 	5 de junio  OMA 5/6/2015 20	8 de junio 	10 de junio 
12 de junio	15 de junio		



2. Evolución de semillas en MS

11 de mayo 	15 de mayo 	19 de mayo 	22 de mayo 
25 de mayo 	27 de mayo 	29 de mayo 	1 de junio 
3 de junio 	5 de junio 	8 de junio 	10 de junio 
12 de junio 	15 de junio 		

3. Anexo nº3: imágenes de frascos contaminados



4. Anexo n°4 metodología de iluminación

Cámara con iluminación LED



Anexo II-2e

PYT-2012-0079

Experimento 7. - Informe

Efecto de la temperatura sobre la germinación del *Leucocoryne*.

Responsable: Carlos de la Cuadra

Fecha: 30/01/2015.

El Exp. 7 se realiza dentro de la actividad “2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina” que pertenece al OE N°2 “Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro.” del proyecto FIA PYT-2012-0079.

El Exp. 7 tiene como objetivo identificar condiciones favorables de cultivo ex vitro (temperatura) que favorezcan la germinación en distintos genotipos de *Leucocoryne*. El identificar esas condiciones favorables en condiciones ex vitro (cámaras) para los distintos genotipos será una referencia para ajustar el protocolo de cultivo in vitro.

La programación inicial y ejecución se describen a continuación:

PYT-2012-0079 2.5.- Efecto Genotipo, T°; Fotoperiodo y Citoquinina	2014										2015						
	T1			T2			T3		T4		T1		T2				
	e	f	m	a	m	j	j	a	s	o	n	d	e	f	m	a	m

Exp. N°7. Efecto Genotipo y T° sobre Germinación.	Plan														
	Real														

OBJETIVO: Identificar condición que favorezca crecimiento vegetativo permanente.

Antecedentes

JARA, 2006. *L. purpurea* germina a 10 °C y no germina a 25 °C. Semilla colectada en verano y almacenada por 60 días a 25 °C.

DE LA CUADRA *et al.*, 2002. *L. sp.* ecotipo Pichicuy con 0,3 años de almacenaje germina a 10 °C. Igualmente, *L. coquimbensis*, *L. purpurea* y *L. sp.* ecotipo Pichicuy con 1,3 años de almacenaje germina a 10 °C. Semillas cosechadas y almacenadas a temperatura ambiente (20 °C).

SCHIAPPACASSE *et al.*, 2005. *L. coquimbensis*, *L. purpurea* y *L. ixioides* no germinan a 20 °C. No obstante, se pueden conseguir altos porcentajes de germinación a 20 °C, mayor a 90%, cuando las semillas se exponen previamente a tratamiento de frío (8 °C) por 3 a 6 semanas.

Objetivo

Evaluar germinación a distintas temperaturas dentro del rango 10 y 25 °C de distintas especies de *Leucocoryne*.

Materiales y Método

Basado en el tiempo de almacenaje de la semilla, se diseñaron dos experimentos.

Exp 1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de especies de *Leucocoryne* de semilla obtenida de plantas cultivadas en invernadero Quillota durante el año 2012 con 0,3 años de almacenaje.

Exp 2. Efecto de la temperatura sobre la germinación de especies de *Leucocoryne* de semilla obtenida de plantas cultivadas en invernadero Quillota durante el año 2012 con 1,3 años de almacenaje.

Resultados

Curvas de Germinación.

MOBAYEN (1980) desarrolló un modelo, $p = A [1 - \exp\{-k \{t - t_0\}\}]$, que se ajusta satisfactoriamente a curvas de germinación, en donde p es el porcentaje de germinación en el tiempo t , A el porcentaje final de germinación, t_0 el tiempo estimado de germinación de la primera semilla y k es la medida de la extensión del tiempo de germinación; en otras palabras, k es el índice de la razón de cambio de p con respecto a t ($dp/dt = k [A - p]$). Altos valores de k indican un corto tiempo y valores bajos un largo tiempo entre la germinación de la primera y la última semilla. Otro parámetro que se desprende del modelo es la velocidad de germinación, $1/t_{A/2}$, en donde $t_{A/2}$ es el tiempo en que ha germinado la mitad de las semillas y está dado por $t_0 + 0,693/k$.

Según los resultados obtenidos, se puede apreciar que el coeficiente de determinación (R^2) fue igual o mayor a 0.9 para todas las especies, lo que significa que los datos obtenidos se ajustan satisfactoriamente al modelo de Mobayen (1980) (Figura 1).

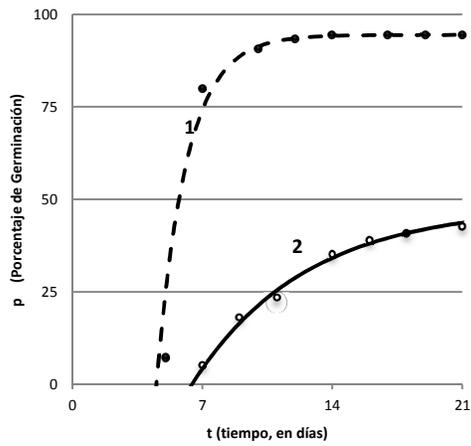


Figura 1. Ejemplo de curvas de germinación. (1) Semillas de *L. vittata* almacenada por 1,3 años y germinadas a 15 °C y (2) Semillas de *L. dimorphopetala* almacenada por 0,3 años y germinadas a 10 °C.

Las curvas están descritas por las siguientes ecuaciones:

Curva 1: $p = 94 [1 - \exp \{ - 0,622 (t - 4,53) \}]$

Curva 2: $p = 48 [1 - \exp \{ - 0,164 (t - 6,44) \}]$

Exp. 1. Germinación de semillas almacenadas por 0,3 años

- A 10 °C, se obtienen los mayores valores de A (porcentaje final de germinación) para todas las especies. A excepción de *L. dimorphopetala* ($A = 48\%$), los valores de A para las distintas especies fue $\geq 88\%$.
- A 15 °C, la mayoría las especies (*L. dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea* y *L. sp.* ecotipo Pichicuy) también alcanzan sus mayores valores de A (porcentaje final de germinación). Sin embargo, las especies *L. sp.* ecotipo Alcones y *L. ixioides* presentan una disminución significativa respecto a lo alcanzado a 10 °C. Germina un tercio menos que a 10 °C.
- A 20 °C, hay una baja significativa de la germinación con respecto a 15 °C. Los valores de A (porcentaje final de germinación) son menores en un tercio o más de lo obtenido a 15°C pudiendo, incluso, no germinar (*L. sp.* ecotipo Alcones).
- A 25 °C, no hay germinación.
- Para las especies en que alcanzan sus máximos valores de A a 10 y 15 °C, los otros parámetros (t_0 , k y $1/t_{A/2}$) presentan una tendencia de que a 15 °C se obtienen los mejores valores para identificar la temperatura óptima de germinación. En otras palabras, a 15 °C se obtienen los menores valores de t_0 (tiempo estimado de germinación de la primera semilla) y los mayores valores de k (extensión del tiempo de germinación) y $1/t_{A/2}$ (velocidad de germinación).

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semilla de *Leucocoryne* almacenada por 0,3 años usando los parámetros *A* (porcentaje final de germinación), *t₀* (tiempo estimado de germinación de la primera semilla), *k* (extensión del tiempo de germinación) y *1/t_{A/2}* (velocidad de germinación). Valores entre paréntesis afectos a transformación arcsen. Medias y error estándar.

Temperature (°C)	A (%)	<i>t₀</i> (d)	<i>k</i> (d ⁻¹)	<i>1/t_{A/2}</i> (d ⁻¹)
<i>L. dimorphopetala</i>				
10 °C	48 (43,9 ± 1,0)	6,44 ± 0,98	0,164 ± 0,009	0,094 ± 0,008
15 °C	53 (46,8 ± 2,1)	4,70 ± 1,82	0,417 ± 0,066	0,157 ± 0,082
20 °C	12 (19,0 ± 4,0)	3,76 ± 1,87	0,361 ± 0,078	0,176 ± 0,031
25 °C	0 (0,0 ± 0,0)			
<i>L. coquimbensis</i>				
10 °C	93 (74,5 ± 1,5)	8,30 ± 1,63	0,319 ± 0,029	0,096 ± 0,019
15 °C	92 (73,7 ± 1,7)	5,19 ± 0,92	0,459 ± 0,055	0,149 ± 0,020
20 °C	59 (50,4 ± 2,8)	6,84 ± 1,34	0,214 ± 0,021	0,099 ± 0,012
25 °C	0 (1,8 ± 1,8)			
<i>L. purpurea</i>				
10 °C	85 (66,9 ± 1,1)	7,80 ± 1,27	0,342 ± 0,027	0,102 ± 0,015
15 °C	89 (71,7 ± 3,2)	5,19 ± 1,05	0,604 ± 0,071	0,158 ± 0,041
20 °C	54 (46,9 ± 12,0)	4,19 ± 0,58	0,309 ± 0,014	0,155 ± 0,014
25 °C	1 (3,2 ± 3,2)			
<i>L. sp. ecotipo Pichicuy</i>				
10 °C	94 (75,7 ± 1,9)	8,07 ± 1,29	0,518 ± 0,051	0,106 ± 0,019
15 °C	95 (78,1 ± 2,3)	5,26 ± 1,38	0,837 ± 0,151	0,164 ± 0,019
20 °C	30 (33,0 ± 0,8)	7,71 ± 1,87	0,205 ± 0,023	0,090 ± 0,015
25 °C	0 (0,0 ± 0,0)			
<i>L. sp. ecotipo Alcones</i>				
10 °C	96 (78,6 ± 2,1)	8,68 ± 1,27	0,355 ± 0,029	0,094 ± 0,013
15 °C	68 (56,2 ± 7,4)	6,02 ± 1,65	0,498 ± 0,081	0,135 ± 0,043
20 °C	0 (1,9 ± 1,9)			
25 °C	0 (0,0 ± 0,0)			
<i>L. ixiodes</i>				
10 °C	88 (70,0 ± 0,6)	8,64 ± 1,08	0,213 ± 0,012	0,084 ± 0,007
15 °C	58 (49,9 ± 2,4)	5,22 ± 0,58	0,225 ± 0,008	0,120 ± 0,008
20 °C	17 (24,0 ± 2,2)	5,81 ± 0,97	0,172 ± 0,010	0,102 ± 0,009
25 °C	2 (6,1 ± 3,6)			

- En el caso de *L. dimorphopetala*, dado que a ninguna temperatura supero el 85% de porcentaje final de germinación (A), se realizó test de tetrazolium que indicó un 84% de viabilidad.

Exp. 2. Germinación de semillas almacenadas por 1,3 años

- A 10 y 15 °C, se obtienen los mayores valores de A (porcentaje final de germinación). Sobre el 90% para *L. purpurea*, *L. vittata* y *L. sp.* ecotipo Pichicuy, y sobre el 80% en *L. ixioides*.
- A 20 °C, los valores de A (porcentaje final de germinación) disminuyen significativamente respecto a lo obtenido a 10 y 15 °C. No obstante, la disminución no es mayor a un cuarto de lo que germinó a 10 y 15 °C.
- A 25 °C, no hay germinación.
- Al observar los otros parámetros (t_0 , k y $1/t_{A/2}$) a las temperaturas de 10 y 15 °C, se observa la tendencia de que a 15 °C se obtienen los mejores valores para identificar la temperatura óptima de germinación. A 15 °C se obtienen los menores valores de t_0 (tiempo estimado de germinación de la primera semilla) y los mayores valores de k (extensión del tiempo de germinación) y $1/t_{A/2}$ (velocidad de germinación).

Tabla 2. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semilla de *Leucocoryne* almacenada por 1,3 años usando los parámetros *A* (porcentaje final de germinación), t_0 (tiempo estimado de germinación de la primera semilla), *k* (extensión del tiempo de germinación) y $1/t_{A/2}$ (velocidad de germinación). Valores entre paréntesis afectos a transformación arcsen. Medias y error estándar.

Temperature (°C)	A (%)	t_0 (d)	<i>k</i> (d ⁻¹)	$1/t_{A/2}$ (d ⁻¹)
<i>L. purpurea</i>				
10 °C	92 (74,0 ± 1,3)	9,16 ± 0,82	0,471 ± 0,025	0,094 ± 0,008
15 °C	93 (75,0 ± 1,1)	4,91 ± 0,18	0,659 ± 0,012	0,168 ± 0,005
20 °C	72 (59,0 ± 5,7)	3,19 ± 1,21	0,465 ± 0,050	0,214 ± 0,107
25 °C	3 (9,5 ± 1,0)			
<i>L. vittata</i>				
10 °C	94 (76,0 ± 2,4)	7,45 ± 2,42	0,338 ± 0,046	0,105 ± 0,046
15 °C	94 (76,6 ± 1,6)	4,53 ± 0,8	0,622 ± 0,056	0,177 ± 0,039
20 °C	81 (63,9 ± 1,4)	2,89 ± 0,78	0,295 ± 0,018	0,191 ± 0,191
25 °C	1 (2,7 ± 2,7)			
<i>L. sp. ecotipo Pichicuy</i>				
10 °C	93 (75,0 ± 1,9)	8,31 ± 1,69	0,383 ± 0,039	0,099 ± 0,022
15 °C	91 (73,0 ± 2,8)	4,88 ± 1,19	0,683 ± 0,080	0,170 ± 0,062
20 °C	62 (51,9 ± 4,4)	4,88 ± 1,85	0,211 ± 0,028	0,122 ± 0,028
25 °C	1 (4,6 ± 2,7)			
<i>L. ixiooides</i>				
10 °C	87 (68,9 ± 1,5)	6,67 ± 2,35	0,128 ± 0,012	0,083 ± 0,017
15 °C	81 (64,6 ± 2,1)	5,85 ± 1,01	0,390 ± 0,029	0,131 ± 0,021
20 °C	67 (54,9 ± 2,7)	6,92 ± 2,09	0,185 ± 0,021	0,094 ± 0,019
25 °C	1 (3,8 ± 2,2)			

Discusión

- *L. dimorphopetala* presentaría algún mecanismo de dormancia basado en el test de tetrazolium (84% viable) y el mejor valor de *A* obtenido (53% a 15 °C). *L. dimorphopetala* presenta algunas particularidades respecto a las otras especies mencionadas como crecer en la III Región con una condición climática más árida y pertenecer a un linaje distinto dentro del género *Leucocoryne* (JARA, 2013).
- En este trabajo se han utilizado semillas de *L. purpurea*, *L. sp.* ecotipo Pichicuy y *L. ixioides* cosechadas en dos temporadas de cultivo distintas que ha originado dos tiempos de almacenaje, 0,3 años y 1,3 años. Reconociendo que las semillas de cada una de estas especies no corresponde a un mismo lote de semillas, los datos muestran que el mayor tiempo de almacenaje (1,3 años) no afectaría la germinación de semillas de *Leucocoryne* a 10 °C, coincidiendo con lo indicado por DE LA CUADRA *et al.* (2002). A 15 °C, aparentemente, la germinación se mantiene para *L. purpurea* y *L. sp.* ecotipo Pichicuy, pero muestra una mejoría en *L. ixioides*. A 20 °C, la tendencia es más marcada, la germinación mejora para todas las especies, especialmente, para *L. sp.* ecotipo Pichicuy y *L. ixioides* en la medida que el tiempo de almacenaje es mayor (1,3 años). Lo observado, sugeriría, que existiría un mecanismo de dormancia que se afecta por el tiempo de almacenaje y se manifiesta a temperaturas frescas (15 °C) y altas (20 °C).
- Aparentemente, el *Leucocoryne* presentaría dormancia fisiológica del nivel no-profundo del tipo 1 según la clasificación con criterio ecofisiológico de BASKIN and BASKIN (2004).

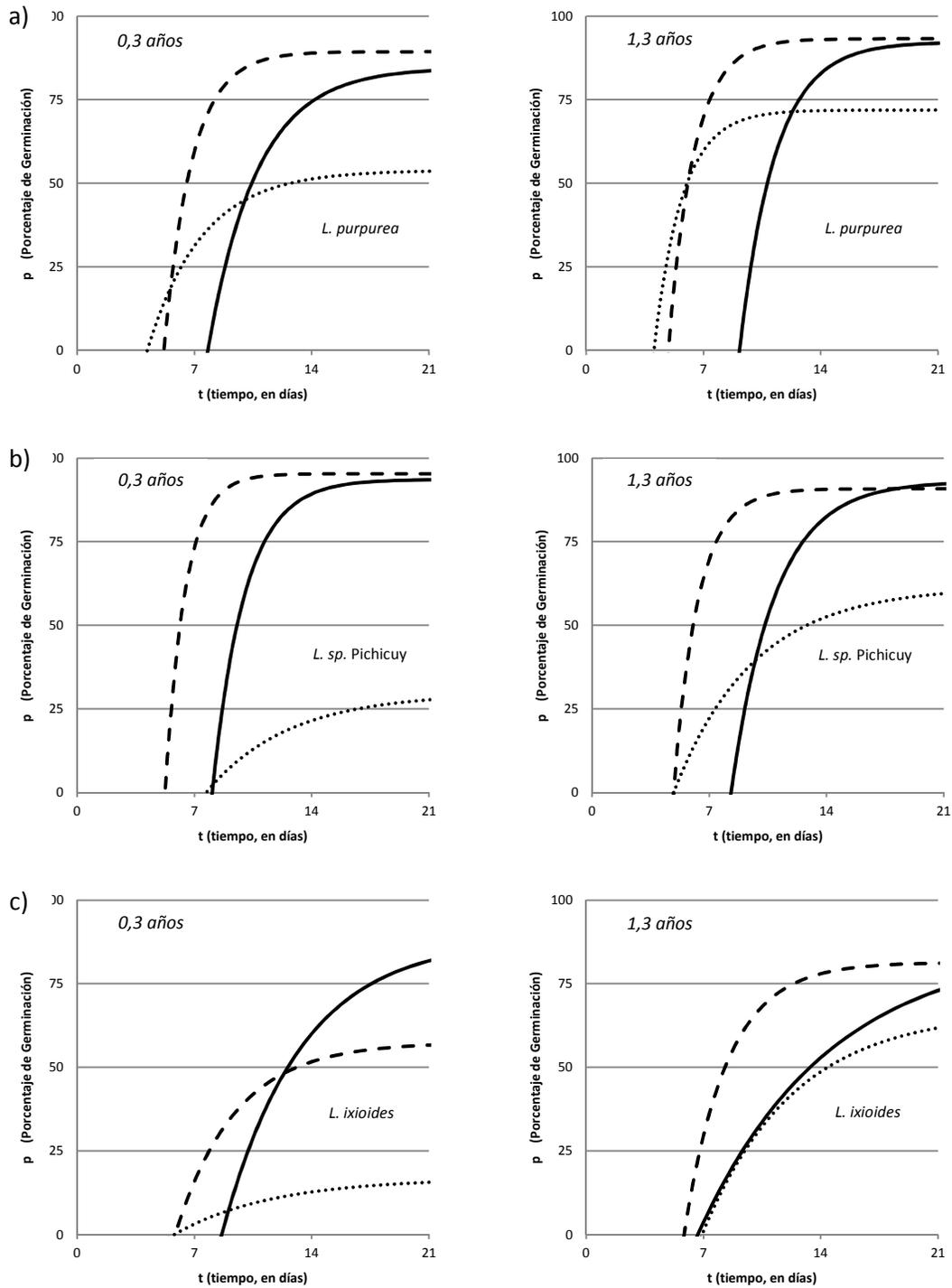


Figura 2. Efecto de la temperatura 10 (—), 15 (---) y 20 °C (.....) sobre la germinación de semillas almacenadas por 0,3 y 1,3 años de (a) *L. purpurea*, (b) *L. sp. ecotipo Pichicuy* y (c) *L. ixioides*.

Conclusión

- Al igual que lo indicado por JARA (2006) para *L. purpurea*, otras especies del género *Leucocoryne* (*L. dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. vittata*, *L. sp.* ecotipo Pichicuy, *L. sp.* ecotipo Alcones y *L. ixioides*) también alcanzan a 10 °C los mayores valores de *A* (porcentaje final de germinación), pudiendo considerarse 10 °C como dentro del rango óptimo de germinación, y que a 25 °C, las especies de *Leucocoryne* no germina.
- La temperatura de germinación de 15 °C es una temperatura óptima de germinación para varias especies (*L. dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea*, *L. sp.* ecotipo Pichicuy).

Anexo II-2f

PYT-2012-0079

Experimento 8. - Informe

Efecto de la temperatura y Biozyme (citoquinina) en el crecimiento del *Leucocoryne* a partir de semilla.

Responsable: Carlos de la Cuadra

Fecha: 30/01/2015.

El Exp. 8 se realiza dentro de la actividad "2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina" que pertenece al OE N°2 "Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro." del proyecto FIA PYT-2012-0079.

El Exp. 8 tiene como objetivo identificar condiciones favorables de cultivo ex vitro (temperatura y nivel de citoquinina) que favorezcan la duración del cultivo (eviten la senescencia) y favorezcan la obtención de bulbitos de mayor tamaño. El identificar esas condiciones favorables en condiciones ex vitro (cámara de crecimiento de plantas) será una referencia para ajustar el protocolo de cultivo in vitro, especialmente, para el indicador "Tasa de Bulbificación (ganancia de peso) in vitro".

La programación inicial y ejecución se describen a continuación:

PYT-2012-0079 2.5.- Efecto Genotipo, T°; Fotoperiodo y Citoquinina	2014								2015								
	T1			T2			T3		T4		T1		T2				
	e	f	m	a	m	j	j	a	s	o	n	d	e	f	m	a	m

Exp. N°8.Efecto Genotipo, T° y Citoquinina.	Plan	[Barra negra]											
	Real	[Barra blanca]				[Barra azul]							

OBJETIVO: Identificar condición que favorezca crecimiento vegetativo permanente.

- **Materiales y Tratamientos**

Los materiales vegetales (semillas) utilizados y los tratamientos se muestran en la siguiente tabla.

Experimento 8. Efecto de la **Temperatura y Biozyme (citoquinina)** en el crecimiento del *Leucocoryne* a partir de semilla.

COD. GEN	GENOTIPO	PRE - TRATAMIENTO w01 a w06 ¹					TRATAMIENTO w07 a w13 (y más).					
		Tº Día/Noche	Luz	Riego	Nº Rep.	Nº Semillas / Rep.	Tº Día/Noche	Luz	Riego	Tratamiento	Nº Rep.	Nº Plántulas / Rep.
OP2012-C509	L. purpurea	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en cada riego.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en riego cada tres semanas.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	25/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en cada riego.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en riego cada tres semanas.	3	25

¹ En la w06 se ralearán las plántulas dejándose 25 por repetición (o maceta).

Complemento Exp. 8. Otros Genotipos

OP2012-C518	L. vittata	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C516	L. sp. "marina"				3	50				Control	3	25
OP2012-C524	L. ixiodes				3	50				Control	3	25
OP2012-C518	L. vittata	15/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	25/10 °C	12 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C516	L. sp. "marina"				3	50				Control	3	25
OP2012-C524	L. ixiodes				3	50				Control	3	25

- **Duración del cultivo (retraso de senescencia)**

Desde la semana 07 de cultivo se registro el % de plantas verdes (= 1 - % senescencia). Cada 2 semanas se registro el % de plantas verdes hasta alcanzar la senescencia total del cultivo.

La temperatura fresca (15 °C) y alta (25 °C) no afecta el inicio de la senescencia que se manifiesta a la semana 09 de cultivo (63 días después de siembra). No obstante, la temperatura fresca (15 °C) muestra una tendencia de favorecer la duración del cultivo (reduce la velocidad de senescencia) al comparar con la temperatura alta (25 °C). El efecto de la temperatura alta (25 °C) podría ser la reducción de la duración del cultivo en dos semanas comparado con la temperatura fresca (15 °C). Aparentemente, el efecto del genotipo en la duración del cultivo no sería significativo. Ver Figura 1 y 2.

Al aplicar de Biozyme, existe una tendencia a aumentar la duración del cultivo (reduce la velocidad de senescencia) a temperaturas frescas (Figura 3). Sin embargo, a temperatura alta (25 °C), la tendencia es la opuesta, es decir, existe una tendencia a reducir la duración del cultivo (aumenta la velocidad de senescencia) (Figura 4).

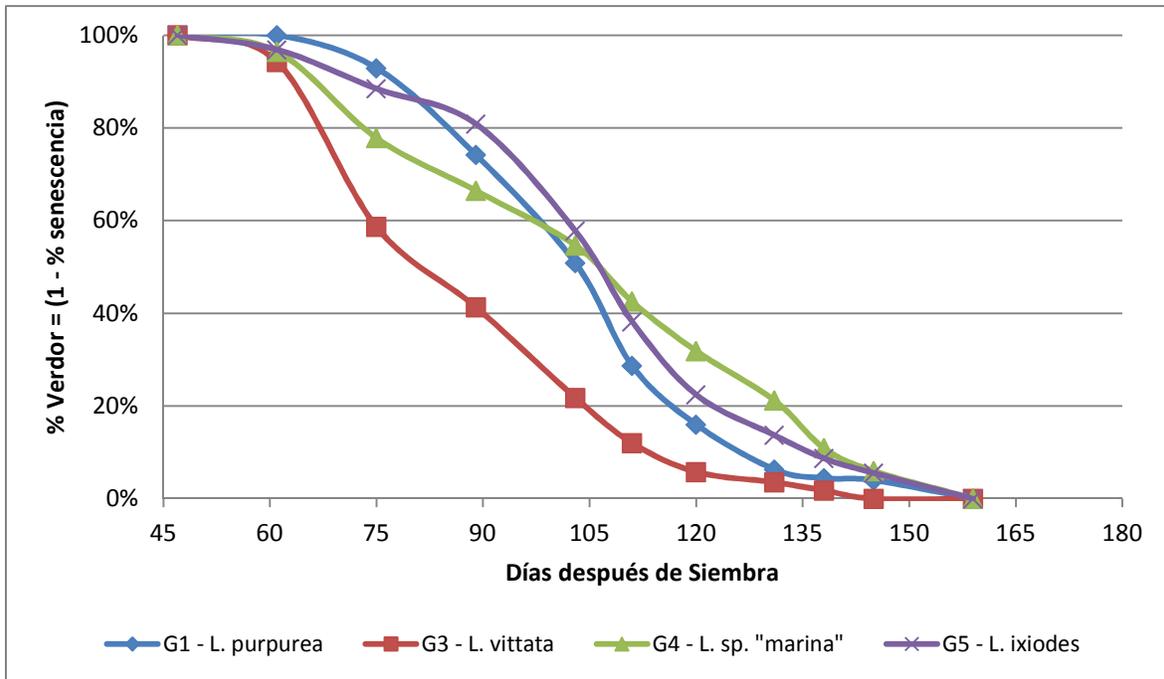


Figura 1. Efecto de la Temperatura 15 °C sobre la senescencia de plántulas de Leucocoryne spp.

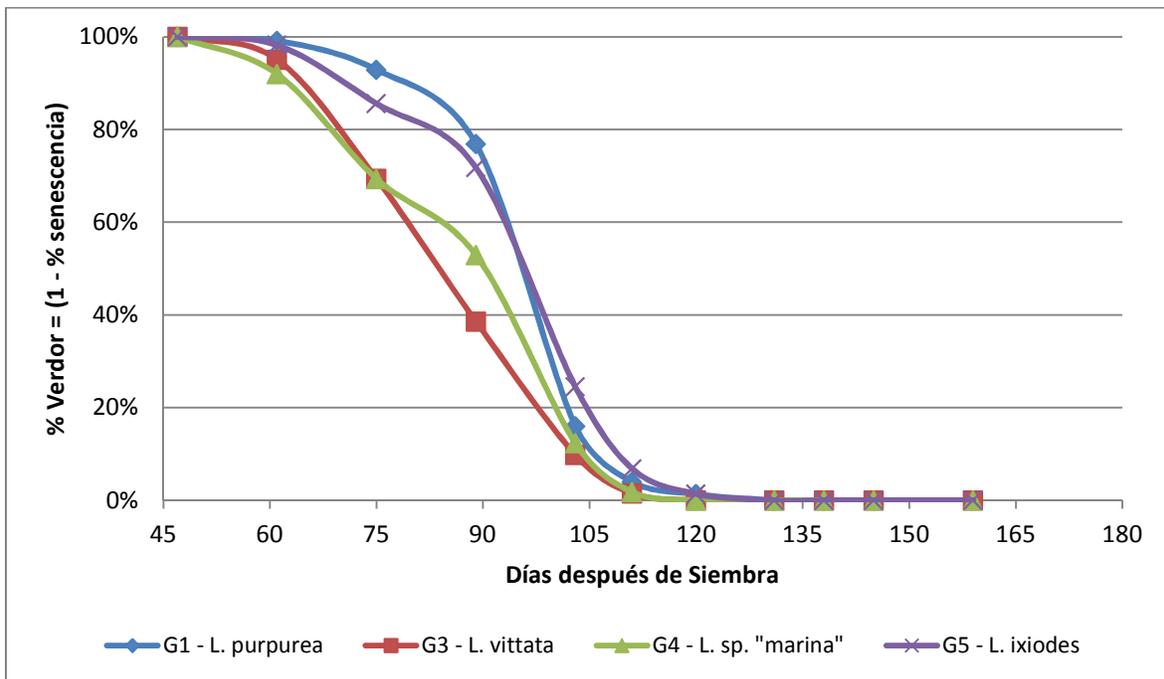


Figura 2. Efecto de la Temperatura 25 °C sobre la senescencia de plántulas de Leucocoryne spp.

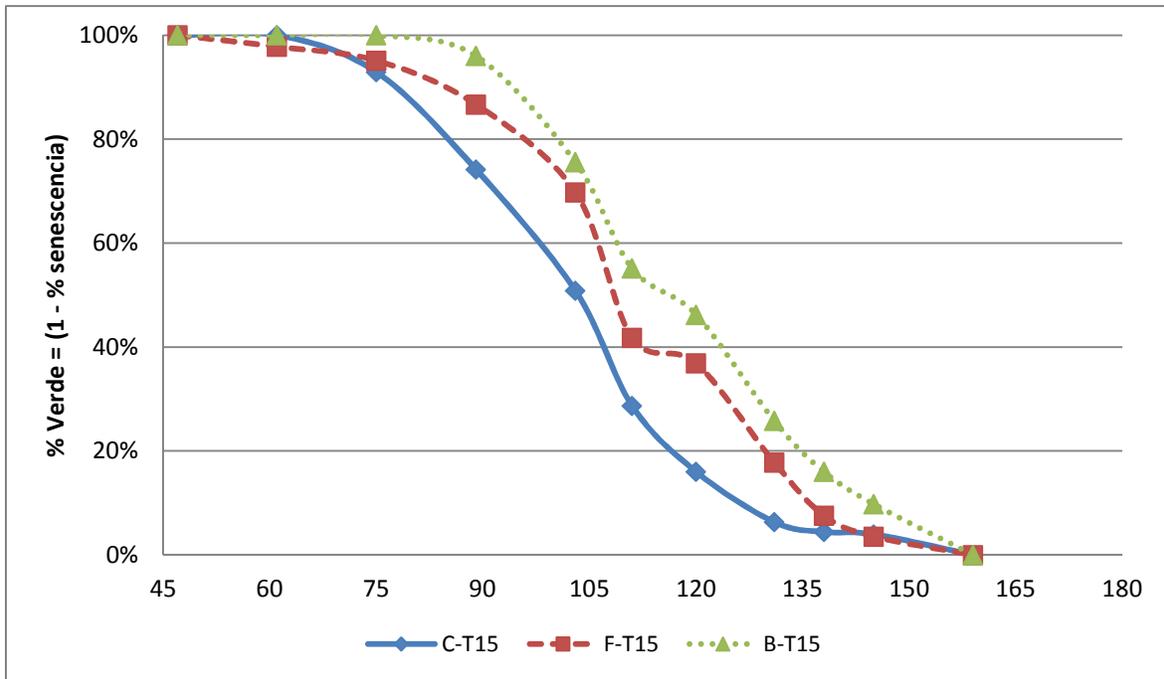


Figura 3. Efecto de Biozyme (Citoquinina + Auxinas + Giberalinas) en la senescencia de plántulas de *Leucocoryne purpurea* a 15 °C de Temperatura.

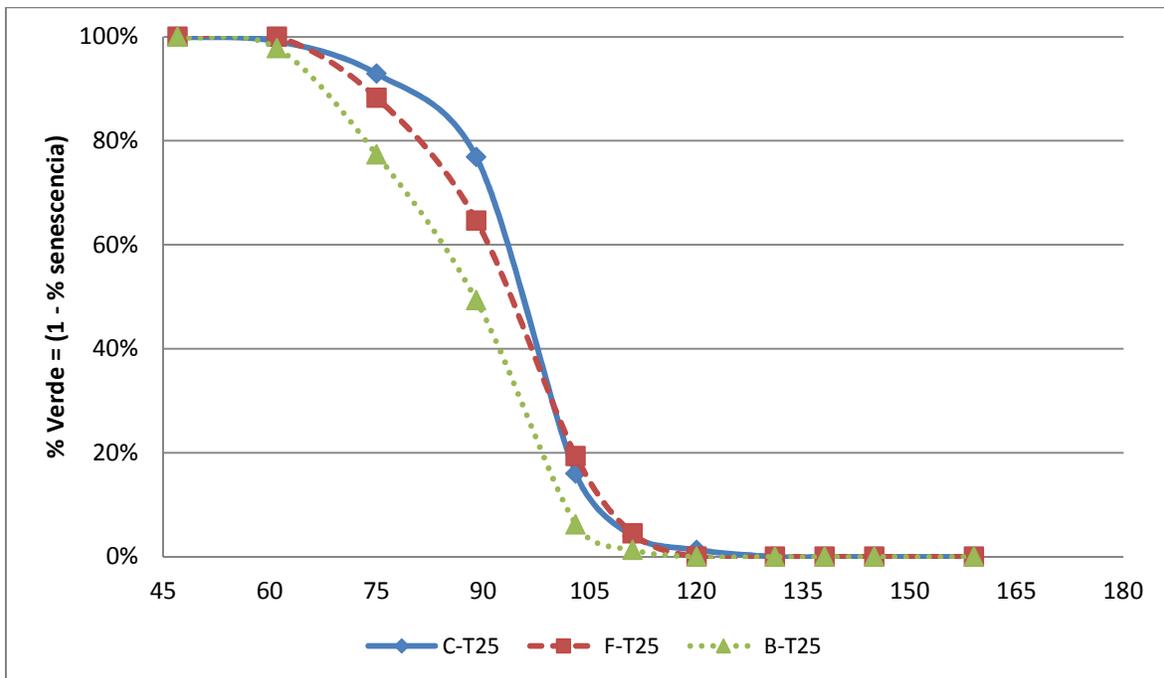


Figura 4. Efecto de Biozyme (Citoquinina + Auxinas + Giberalinas) en la senescencia de plántulas de *Leucocoryne purpurea* a 25 °C de Temperatura.

- **% de Bulbificación y Peso Fresco Bulbo Final**

Al finalizar el cultivo se levantaron, contaron y pesaron los bulbos para obtener el % de Bulbificación y el Peso Fresco Promedio de Bulbo.

El cultivo a temperatura alta (25 °C), favorece la formación de bulbo (% de Bulbificación) obteniéndose valores iguales o superiores que a temperaturas frescas (15 °C). Aparentemente, existiría un requerimiento de mayor temperatura para que los genotipos *L. purpurea* y *L. vittata* puedan formar bulbo.

Genotipo	% de Bulbificación ¹	
	Temp. 15 °C	Temp. 25 °C
G1 - <i>L. purpurea</i>	81% (17%)	100%
G3 - <i>L. vittata</i>	35% (13%)	93% (12%)
G4 - <i>L. sp. "marina"</i>	84% (28%)	85% (19%)
G5 - <i>L. ixiodes</i>	92% (11%)	97% (5%)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Al comparar los datos obtenidos en el Exp. 1 (condición de cultivo in vitro), no se ven diferencias entre genotipos (*L. purpurea*, *L. vittata* y *L. sp. "marina"*) ni entre temperaturas (15 y 22 °C) y el % de Bulbificación fue de 92%.

La aplicación de Biozyme (citoquininas) tendría un efecto favorable en *L. purpurea* cuando es cultivado a temperatura fresca (15 °C), el % Bulbificación mejora significativamente. No obstante, la aplicación de Biozyme (citoquinina) en condiciones de cultivo de temperatura alta (25 °C) tiende a bajar el % de Bulbificación.

G1 - <i>L. purpurea</i>	% de Bulbificación ¹	
	Temp. 15 °C	Temp. 25 °C
Control	81% (17%)	100%
F - Biozyme en riego cada 3 semanas.	92% (11%)	95% (5%)
B - Biozyme en riego semanal.	100%	92% (14%)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Con respecto al peso fresco promedio del bulbo obtenido al final del cultivo, aparentemente, no existiría efecto de las temperaturas frescas (15 °C) y altas (25 °C). El Peso Fresco Promedio de Bulbo total es de 60 mg que es 2,5 veces más de lo obtenido en condiciones in vitro (Exp. 1).

Genotipo	Peso Fresco Promedio Bulbo (mg) ¹	
	Temp. 15 °C	Temp. 25 °C
G1 - <i>L. purpurea</i>	65 (12)	67 (9)
G3 - <i>L. vittata</i>	48 (12)	53 (8)
G4 - <i>L. sp. "marina"</i>	72 (23)	58 (2)
G5 - <i>L. ixiodes</i>	59 (10)	57 (8)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Al aplicar Biozyme, existe un efecto en el Peso Fresco Promedio de Bulbo en *L. purpurea* al ser cultivado a temperatura fresca (15 °C). El Peso Fresco Promedio de Bulbo puede llegar a los 100 mg.

G1 - <i>L. purpurea</i>	Peso Fresco Promedio Bulbo (mg) ¹	
	Temp. 15 °C	Temp. 25 °C
Control	65 (12)	67 (9)
F - Biozyme en riego cada 3 semanas.	92 (7)	58 (14)
B - Biozyme en riego semanal.	100 (5)	56 (5)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Bulbos de 300 mg de peso fresco son considerados florales.

Observaciones.

1.- Las plántulas de *Leucocoryne* producen solamente una hoja, la hoja cotiledón. La ocurrencia de la aparición de una segunda hoja, la primera hoja verdadera, es poco frecuente. Se observó 3 plantas que produjeron una segunda hoja, todas pertenecientes a *L. purpurea* cultivado a temperatura fresca (15 °C) y con aplicación de Biozyme en riego semanal. En otras palabras, un 4% de las plántulas de *L. purpurea* cultivado a temperatura fresca (15 °C) y con aplicación de Biozyme en riego semanal produjo una segunda hoja.

2.- Este experimento reafirma la idea de que a temperaturas frescas (15 °C) y con citoquininas (Biozyme) se favorece una mayor duración del cultivo (se retarda la velocidad de senescencia), se favorece un % de Bulbificación mayor y la obtención de bulbos de pesos frescos mayores.

3.- No obstante, no se ha identificado las condiciones que evitan la entrada en senescencia ni tampoco las condiciones que favorecen la emisión de nuevas hojas que redundaran en bulbos de mayor peso fresco.

Anexo II-2g

PYT-2012-0079

Experimento 9. - Informe

Efecto del fotoperiodo y Biozyme (citoquinina) en el crecimiento del *Leucocoryne* a partir de semilla.

Responsable: Carlos de la Cuadra

Fecha: 31/12/2015.

El Exp. 9 se realiza dentro de la actividad "2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina" que pertenece al OE N°2 "Mejorar la técnica de propagación in vitro, basada en uso de técnicas tradicionales de propagación vegetativa, incluyendo su aclimatación y crecimiento ex vitro." del proyecto FIA PYT-2012-0079.

El Exp. 9 tiene como objetivo identificar condiciones favorables de cultivo ex vitro (fotoperiodo y nivel de citoquinina) que favorezcan la duración del cultivo (eviten la senescencia) y favorezcan la obtención de bulbitos de mayor tamaño. Al identificar esas condiciones favorables en condiciones ex vitro (cámara de crecimiento de plantas) será una referencia para ajustar el protocolo de cultivo in vitro, especialmente, para el indicador "Tasa de Bulbificación (ganancia de peso) in vitro".

La programación inicial y ejecución se describen a continuación:

PYT-2012-0079 2.5.- Efecto Genotipo, T°, Fotoperiodo y Citoquinina	2014				2015												
	T3		T4		T1	T2	T3		T4								
	j	a	s	o	n	d	e	f	m	a	m	j	j	a	s	o	n

Exp. N°9.Efecto Genotipo, Fotoperiodo y Citoquinina.	Plan																
	Real																

OBJETIVO: Identificar condición que favorezca crecimiento vegetativo permanente.

- **Materiales y Tratamientos**

Los materiales vegetales (semillas) utilizados y los tratamientos se muestran en la siguiente tabla.

Experimento 9. Efecto del Fotoperiodo y Biozyme (citoquinina) en el crecimiento del *Leucocoryne* a partir de semilla.

COD. GEN	GENOTIPO	PRE - TRATAMIENTO w01 a w06 ¹					TRATAMIENTO w07 a w13 (y más).					
		Tº Día/Noche	Luz	Riego	Nº Rep.	Nº Semillas / Rep.	Tº Día/Noche	Luz	Riego	Tratamiento	Nº Rep.	Nº Plantulas / Rep.
OP2012-C509	L. purpurea	15/10 °C	8 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C ó 20/15 °C	8 horas	Riego c/ fertilizant e pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en cada riego.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en riego cada tres semanas.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea	15/10 °C	8 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C ó 20/15 °C	16 horas	Riego c/ fertilizant e pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en cada riego.	3	25
OP2012-C509	L. purpurea				3	50				Biozyme® TF en riego cada tres semanas.	3	25

¹ En la w06 se ralearán las plántulas dejándose 25 por repetición (o maceta).

Complemento Exp. 9. Otros Genotipos

OP2012-C518	L. vittata	15/10 °C	8 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C ó 20/15 °C	8 horas	Riego c/ fertilizant e pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C516	L.sp. "marina"				3	50				3	25	
OP2012-C524	L. ixiodes				3	50				3	25	
OP2012-C518	L. vittata	15/10 °C	8 horas	Riego c/ fertilizante pH= 6,5; CE = 1,4	3	50	15/10 °C ó 20/15 °C	16 horas	Riego c/ fertilizant e pH= 6,5; CE = 1,4	Control	3	25
OP2012-C516	L.sp. "marina"				3	50				3	25	
OP2012-C524	L. ixiodes				3	50				3	25	

- **Duración del cultivo (retraso de senescencia)**

Desde la semana 07 de cultivo se registro el % de plantas verdes (= 1 - % senescencia). Posteriormente, a la semana 12, 15, 18 y 20, se registro el % de plantas verdes hasta alcanzar la senescencia total del cultivo.

En general, el fotoperiodo de 8 y 16 horas no afecta el inicio de la senescencia, su velocidad y su duración. Buen ejemplo de lo anterior son los genotipos *L. purpurea* y *L. vittata*. No obstante, para el genotipo *L. sp. "marina"* se muestra una tendencia de aumento de la velocidad de senescencia cuando el fotoperiodo es de 16 horas. Por el contrario, para el genotipo *L. ixioides*, se observa una tendencia a reducir la velocidad de senescencia y aumentar su duración. Ver Figura 1 y 2.

Al aplicar de Biozyme, existe una tendencia a reducir la velocidad de senescencia durante las primeras semanas en ambas condiciones de cultivo (fotoperiodo de 8 y 16 horas). No existe efecto sobre el inicio ni la duración de la senescencia. Ver Figura 3 y 4.

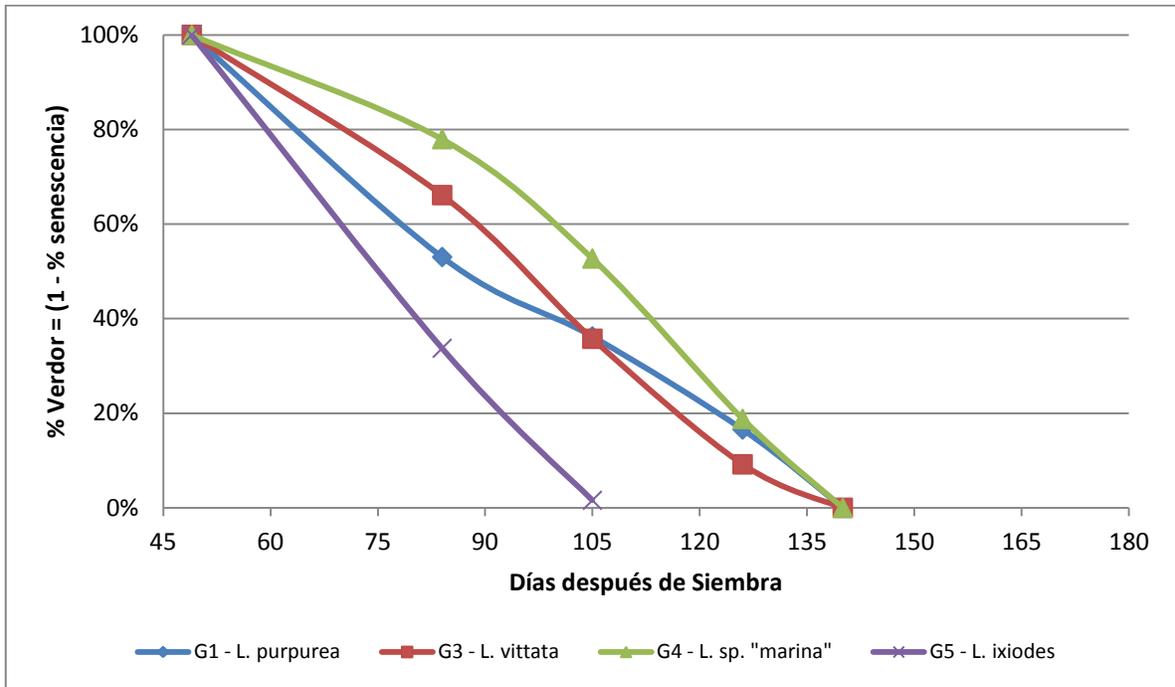


Figura 1. Efecto del Fotoperiodo de 8 horas sobre la senescencia de plántulas de *Leucocoryne* spp.

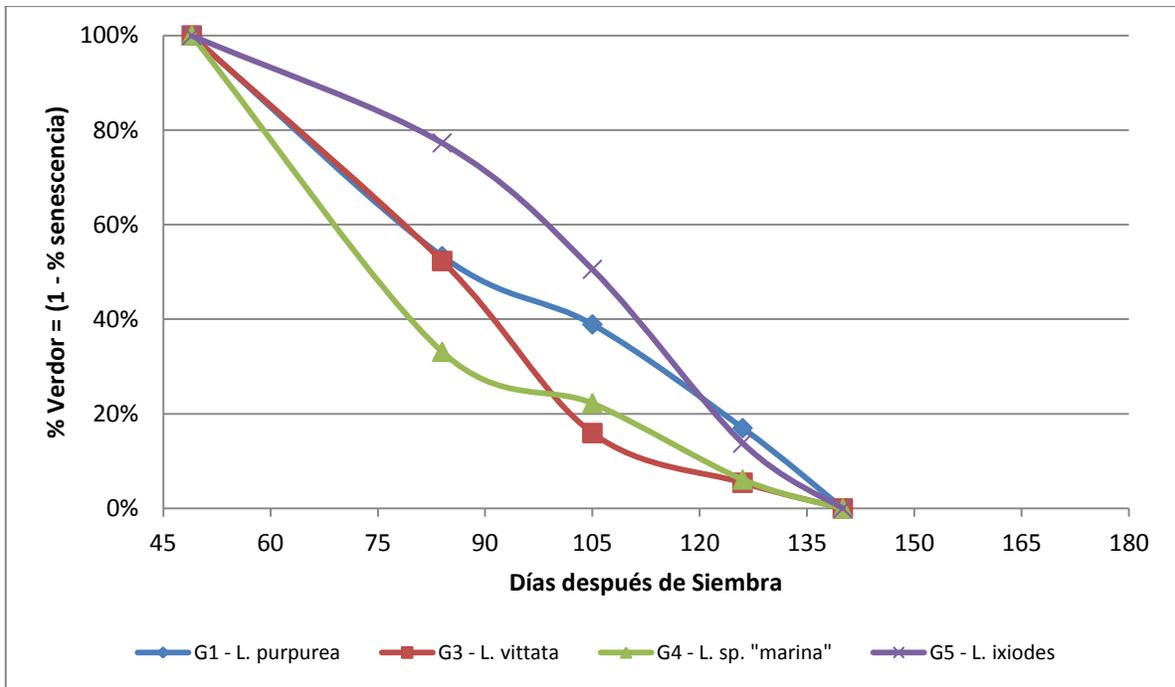


Figura 2. Efecto del Fotoperiodo de 16 horas sobre la senescencia de plántulas de *Leucocoryne* spp.

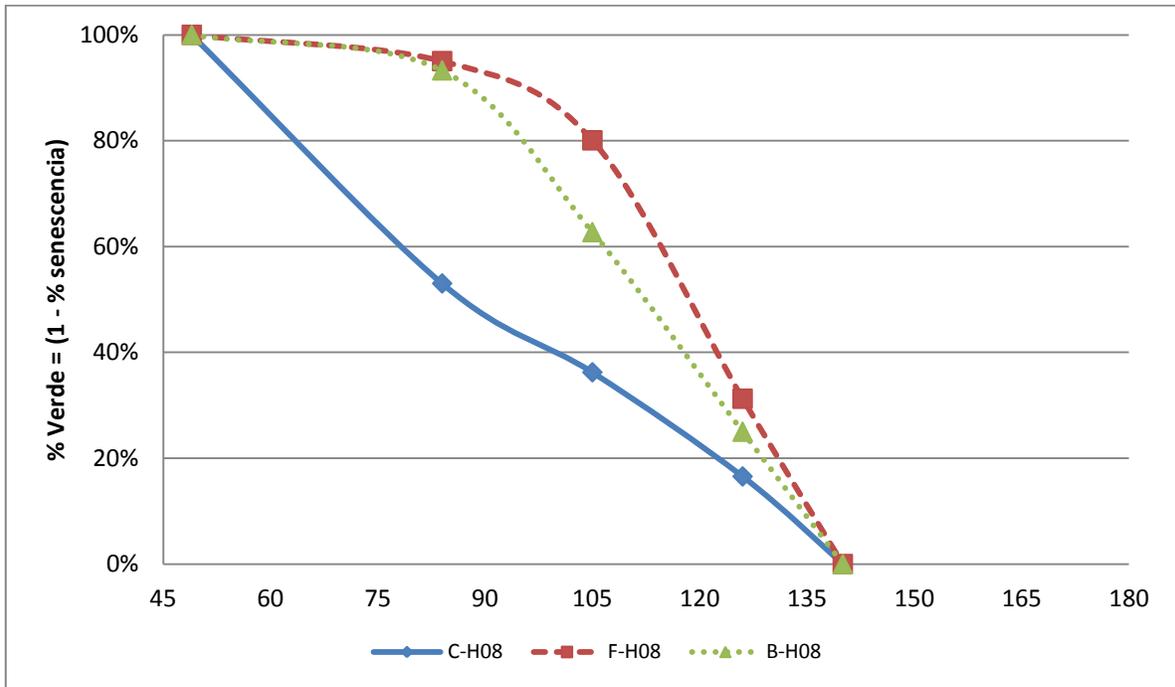


Figura 3. Efecto de Biozyme (Citoquinina + Auxinas + Giberalinas) en la senescencia de plántulas de *Leucocoryne purpurea* con Fotoperiodo de 8 horas.

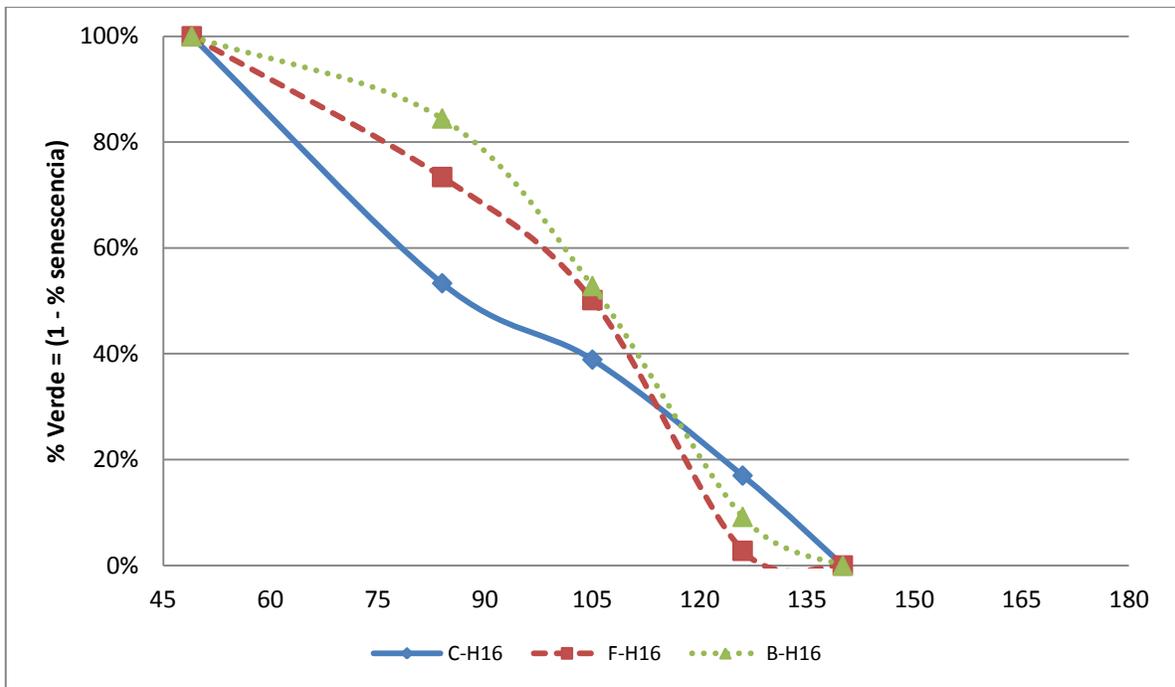


Figura 4. Efecto de Biozyme (Citoquinina + Auxinas + Giberalinas) en la senescencia de plántulas de *Leucocoryne purpurea* con Fotoperiodo de 16 horas.

- **% de Bulbificación y Peso Fresco Bulbo Final**

Al finalizar el cultivo se levantaron, contaron y pesaron los bulbos para obtener el % de Bulbificación y el Peso Fresco Promedio de Bulbo.

El cultivo con fotoperiodo de 16 horas, favorece la formación de bulbo (% de Bulbificación) obteniéndose valores iguales o superiores que con fotoperiodo de 8 horas. La nota disonante la entrega el genotipo *L. sp. "marina"*.

Genotipo	% de Bulbificación ¹	
	Fotoperiodo 8 hrs	Fotoperiodo 16 hrs
G1 - <i>L. purpurea</i>	54% (22%)	72% (22%)
G3 - <i>L. vittata</i>	54% (8%)	77% (11%)
G4 - <i>L. sp. "marina"</i>	82% (12%)	57% (38%)
G5 - <i>L. ixiodes</i>	31% (4%)	68% (6%)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

La aplicación de Biozyme (citoquininas) tendría un efecto favorable en *L. purpurea* cuando es cultivado con fotoperiodo de 8 horas, el % Bulbificación mejora significativamente. No obstante, la aplicación de Biozyme (citoquinina) en condiciones de cultivo de fotoperiodo de 16 horas es mayor solamente cuando es aplicado en cada riego.

G1 - <i>L. purpurea</i>	% de Bulbificación ¹	
	Fotoperiodo 8 hrs	Fotoperiodo 16 hrs
Control	54% (22%)	72% (22%)
F - Biozyme en riego cada 3 semanas.	87% (4%)	74% (26%)
B - Biozyme en riego semanal.	88% (17%)	99% (3%)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Con respecto al peso fresco promedio del bulbo obtenido al final del cultivo, la condición de fotoperiodo de 16 horas favorece la obtención de mayores pesos de bulbo.

Genotipo	Peso Fresco Promedio Bulbo (mg) ¹	
	Fotoperiodo 8 hrs	Fotoperiodo 16 hrs
G1 - <i>L. purpurea</i>	24 (2)	46 (20)
G3 - <i>L. vittata</i>	23 (8)	39 (6)
G4 - <i>L. sp. "marina"</i>	30 (3)	33 (15)
G5 - <i>L. ixiodes</i>	10 (0)	50 (10)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

La aplicación de Biozyme, también favorece la obtención de un mayor Peso Fresco Promedio de Bulbo en *L. purpurea* al ser cultivado con fotoperiodo de 8 y 16 horas. No obstante, el Peso Fresco Promedio de Bulbo no sobrepasó los 100 mg.

G1 - L. purpurea	Peso Fresco Promedio Bulbo (mg) ¹	
	Tratamiento	Fotoperiodo 8 hrs
Control	24 (2)	46 (20)
F - Biozyme en riego cada 3 semanas.	49 (3)	61 (17)
B - Biozyme en riego semanal.	37 (28)	68 (6)

¹ Valor desviación estándar entre paréntesis.

Bulbos de 300 mg de peso fresco son considerados florales.

Observaciones.

1.- Las plántulas de Leucocoryne producen solamente una hoja, la hoja cotiledón. La ocurrencia de la aparición de una segunda hoja, la primera hoja verdadera, es poco frecuente. Se observaron 15 plantas que produjeron una segunda hoja, todas pertenecientes a L. purpurea. En otras palabras, un 4% de las plántulas de L. purpurea presentaron una segunda hoja.

2.- Este experimento reafirma la idea de que cuando se cultiva a temperaturas frescas (15 °C) el fotoperiodo de 8 o 16 horas no tiene un efecto claro en la senescencia. No obstante, la aplicación de Biozyme si favorece un retardo en la velocidad de la senescencia. Y además, la aplicación de Biozyme favorece la obtención de bulbos de mayor peso.

3.- Ha sido posible identificar algunas condiciones que favorecen la obtención de bulbos de mayor peso, no obstante, no se ha identificado las condiciones que evitan la entrada en senescencia ni tampoco las condiciones que favorecen la emisión de nuevas hojas que redunden en bulbos de mayor peso fresco.

4.- En Exp. 9 el porcentaje de emergencia de plántulas fue 35%, en Exp. 8 fue de 76%. El sustrato utilizado en Exp. 8 fue obtenido en Estación Experimental Agronomía PUCV (1/3 maicillo blanco; 1/3 corteza de pino compostada; 1/3 suelo franco arcilloso) y el utilizado en Exp. 8 fue 100% corteza de pino compostada.

Anexo II-2h



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VEGETALES
LABORATORIO BIOTECNOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO

INFORME FINAL Etapa II:

“Mejoramiento de la técnica de propagación *in vitro* para producción comercial de planta nativa chilena *Leucocoryne*” código PYT-2012-0079”

Autores: Alejandro Altamira Bravo
Marlene Gebauer Hernández
Diciembre, 2015, Stgo, Chile.

En el presente informe se expone cada uno de los experimentos realizados en la segunda parte del proyecto *Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne* código *PYT-2012-0079*.

EXPERIMENTO FIA12.1. Validación Protocolo Americano 1. Formación de Nuevos Bulbos de *Leucocoryne spp.* (Estrategia de multiplicación 1).

EXPERIMENTO FIA12.2. Validación Protocolo Americano 1. Formación de brotes de *Leucocoryne spp.* (Estrategia de multiplicación 2).

EXPERIMENTO 13. Evaluación de “scales” de bulbos de *Leucocoryne spp.* para ser utilizados como explante inicial en condiciones de cultivo *in vitro*.

EXPERIMENTO FIA14. Efecto del pH en la formación de nuevos bulbos de *Leucocoryne spp.* a partir de división de bulbos iniciados previamente *in vitro*.

EXPERIMENTO FIA15. Efecto de la antigüedad del medio de cultivo en la formación de nuevos bulbos de *Leucocoryne spp.*

EXPERIMENTO FIA12.1: Validación Protocolo Americano 1. Formación de Nuevos Bulbos de *Leucocoryne spp.* (Estrategia de multiplicación 1).

- Nº de Genotipos: 1 (C150: *Leucocoryne* 'Caravelle')
- Nº de Bulbos por Genotipo: 20 bulbos *in vitro* (Se iniciaron 40 bulbos).
- Pretratamiento: Bulbos frescos NO iniciados *in vitro*.
- Tratamiento: El definido como "Bulb Formation from Scales"
- Fecha Inicio: Junio 2014
- Duración: 6 a 10 meses dependiendo de la reacción del material vegetal al protocolo. 10 a 12 meses para la segunda fase de este experimento, utilizando brotes provenientes de Protocolo 2.
- Resultado Esperado: Formación de nuevos bulbillos adventicios.

El protocolo de iniciación del material vegetal para este ensayo ya fue detallado en los informes anteriores, Al momento de implementar el ensayo se evaluó el peso y diámetro de una muestra de 10 bulbos con un promedio de peso de bulbos de 1,49g y un diámetro de 13,69mm. Los explantes fueron establecidos en tubos de ensayo con 20mL de medio M535 con adición de 90 g·L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos, 1 mg·L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), 6 g·L⁻¹ de agar como agente gelificante y 2ml·L⁻¹ de PPM®, ajustado el pH a 5,7 (este medio de cultivo en adelante será denominado como PA1). Posteriormente los bulbos fueron dispuestos en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a 20±1°C para su brotación y crecimiento. Durante el primer ciclo de cultivo se realizaron cuatro evaluaciones de porcentaje de brotación y contaminación, correspondientes a la tercera, sexta, novena y décima tercera semanas desde la iniciación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Evaluaciones Experimento FIA12.1 transcurridas 3, 6, 9 y 13 semanas después de ser establecidos los explantes de bulbos de *Leucocoryne spp.* genotipo C150.

Sem.	Bulbos Inicio Nº	1 Brote Nº	Brote múltiple Nº	Sin brote Nº	Brotación %	Form. de raíces Nº	Bulbo lateral		Estabilización	
							Nº	%	Nº	%
3	40	34	0	6	85,0	1	0	0,0	32	80,0
6	37	36	0	1	97,3	0	0	0,0	32	86,5
9	33	31	0	2	93,9	0	2	6,1	30	90,9
13	32	23	8	1	96,9	0	8	25,0	31	96,9

Durante el mes de septiembre del 2014, una vez cumplida la semana n°13 se realizó un traspaso a medio fresco. Se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento y se realizaron nuevas evaluaciones de brotación y multiplicación a las 5, 9, 13 y 16 semanas del ciclo de cultivo N°2 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Evaluaciones Experimento FIA12.1 durante el ciclo N°2, transcurridas 5, 9, 13 y 16 semanas después de traspasar los explantes de bulbos de *Leucocoryne spp.* genotipo C150.

Sem. N°	Bulbos Inicio N°	1 Brote N°	Brote múltiple N°	Sin brote N°	Brotación %	Form. de raíces N°	Bulbo lateral		Estabilización	
							N°	%	N°	%
5	32	14	11	7	78,1	2	11	34,4	25	78,1
9	32	15	11	6	81,3	1	8	25,0	25	78,1
13	32	16	11	5	84,4	1	10	31,3	27	84,4
16	32	18	10	4	87,5	0	11	34,4	27	84,4

Durante el mes de enero del año 2015, ya cumplidas 16 semanas del segundo ciclo de cultivo se realizó un nuevo traspaso, momento en que se evaluó brotación, número de brotes, número de bulbos producidos y peso de los explantes (Cuadro 3).

A partir de las evaluaciones realizadas al momento del traspaso, correspondientes al peso de bulbos y la producción de brotes o bulbillos laterales, se traspasaron los explantes en distintos medios de cultivo. Para el caso de los explantes que produjeron brotes y bulbillos múltiples, según lo acordado en la reunión realizada el mes de Diciembre, fueron traspasados en forma equitativa tanto los bulbos principales como los bulbillos producidos a los medios con las mismas condiciones antes mencionadas pero variando la concentración de reguladores de crecimiento, estos fueron codificados como PA2 y PA3, correspondientes a medios M535 con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina (BAP) y $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ácido Naftalenacético (ANA) respectivamente. Por otra parte los explantes que no produjeron bulbillos laterales fueron traspasados nuevamente a medio fresco PA1, idéntico al medio del que provenían (Cuadro 3).

A partir de los 11 explantes en que se observó multiplicación se obtuvieron 109 bulbos y bulbillos laterales (Cuadro 3), que fueron traspasados a medio PA2 (54 bulbos) y PA3 (55 bulbos) como se indicó antes. El resto de los explantes, correspondiente a 18 bulbos con brote simple o sin brotación fueron traspasados a medio de cultivo PA1.

Cuadro 3. Evaluaciones de peso, producción de brotes y bulbillos laterales en explantes de *Leucocoryne* spp. C150 en Experimento FIA12.1, transcurridas 16 semanas del ciclo 2.

Tubo	N° de bulbos	N° de brotes	Peso explante (g)	Traspasado a medio:
1	1	5	1,2	
2	5	5	1,7	
3	34	2	13,1	
4	16	3	2,1	
5	16	2	4,2	
6	7	10	13,9	PA2 y PA3
7	4	3	1	
8	8	2	1,4	
9	5	3	3	
10	11	5	2,7	
11	2	1	0,4	
12	1	1	1,3	
13	1	1	0,4	
14	1	1	0,6	
15	1	1	0,3	
16	1	1	0,7	
17	1	1	0,9	
18	1	1	1,1	
19	1	1	0,1	
20	1	1	1,6	PA1
21	1	1	1,1	
22	1	1	0,5	
23	1	1	0,7	
24	1	1	0,5	
25	1	1	0,4	
26	1	1	0,2	
27	1	1	0,7	
28	1	1	0,4	
29	1	1	0,3	
30	1	1	-	Muerto
31	1	1	-	Contaminado
32	1	1	-	Muerto

Se evaluó la respuesta a los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento durante el ciclo 3 a las 4, 9, 13, 21, 28 y 34 semanas de cultivo en condiciones *in vitro* (Cuadro 4 y Figura 1). Se puede destacar que los explantes en medio de cultivo PA1 presentaron 100% de brotación muy superior a los medios PA2 y PA3. Por otro lado los explantes expuestos al medio con adición de ANA (PA3) tuvieron una respuesta adversa ya que no presentaron mayor formación de raíces y si la formación de callos, que no ocurrió con los otros medios de cultivo y que puede llegar a ser negativo por el aumento de probabilidad de que ocurran variaciones somaclonales.

Cuadro 4. Evaluaciones Experimento FIA12.1 durante el ciclo 3, transcurridas 4, 9, 13, 21, 28 y 34 semanas después de traspasar los explantes de bulbos de *Leucocoryne spp* genotipo C150.

Sem.	Medio de cultivo	Bulbos inicio N°	1 Brote N°	Brote múltiple N°	Sin brote N°	Brotación %	Form. de raíces		Bulbo lateral		Formación callo	
							N°	%	N°	%	N°	%
4	PA1	18	18	0	0	100,0	12	66,7	0	0,0	0	0,0
4	PA2	54	12	19	23	57,4	8	14,8	3	5,6	0	0,0
4	PA3	55	6	0	49	10,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
9	PA1	18	18	0	0	100,0	13	72,2	0	0,0	0	0,0
9	PA2	54	18	18	18	66,7	9	16,7	11	20,4	0	0,0
9	PA3	55	8	4	43	21,8	1	1,8	10	18,2	18	32,7
13	PA1	18	17	1	0	100,0	12	66,7	0	0,0	0	0,0
13	PA2	54	16	20	18	66,7	8	14,8	17	31,5	0	0,0
13	PA3	55	9	1	45	18,2	0	0,0	15	27,3	27	49,1
21	PA1	18	17	1	0	100,0	8	44,4	3	16,7	0	0,0
21	PA2	54	15	21	18	66,7	9	16,7	23	42,6	0	0,0
21	PA3	55	10	17	28	49,1	1	1,8	22	40,0	22	40,0
28	PA1	5	0	5	0	100,0	3	60,0	3	60,0	0	0,0
28	PA2	54	14	22	18	66,7	12	22,2	22	40,7	0	0,0
28	PA3	55	11	17	27	50,9	4	7,3	24	43,6	32	58,2
34	PA1	5	0	5	0	100,0	3	60,0	3	60,0	0	0,0
34	PA2	54	14	23	17	68,5	14	25,9	23	42,6	0	0,0
34	PA3	55	11	17	27	50,9	7	12,7	26	47,3	37	67,3

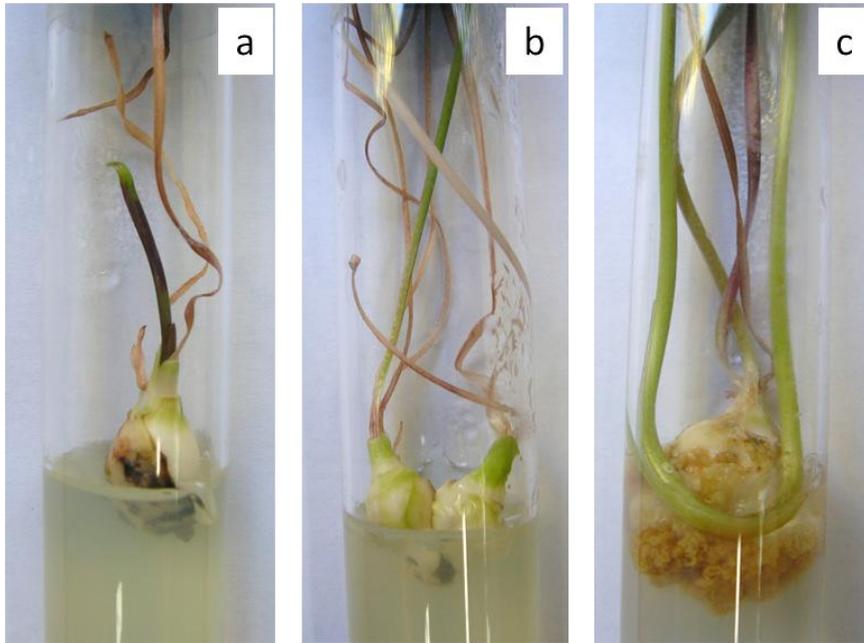


Figura 1. Apariencia de los bulbos del genotipo C150 al momento de la evaluación a las 21 semanas de cultivo en el ciclo N°3. a. Explante con brotación simple en medio de cultivo PA1, b. Explante con brotación múltiple y formación de bulbo lateral en medio de cultivo PA2, c. Explante con brotación simple y presencia de callo en la base del explante en medio de cultivo PA3.

Posterior a la evaluación correspondiente a las 21 semanas se separó y traspasó los bulbos que se encontraban en medio PA1 y que presentaban 1 brote para ser utilizados en el nuevo experimento codificado como FIA14, el cual es explicado más adelante. Lo anterior explica el bajo número de bulbos evaluados en el medio PA1 desde la semana 28 de cultivo en adelante (Cuadro 4). En el caso de los bulbos que se encontraban en medio PA2 y que presentaban multiplicación se mantuvieron en el mismo medio de cultivo hasta la semana 42 y luego fueron traspasados a medio fresco para ser utilizados en el experimento FIA15, donde se eliminaron los bulbos sin actividad o muertos y de los 22 explantes que se mantuvieron se obtuvo 236 bulbos (Figura 2). El resto de los bulbos que se encontraban en PA1 y PA3 fueron mantenidos en los mismos medios de cultivo hasta la actualidad según lo acordado, para que estos entraran en receso para prepararlos para su aclimatación en condiciones *ex vitro*.

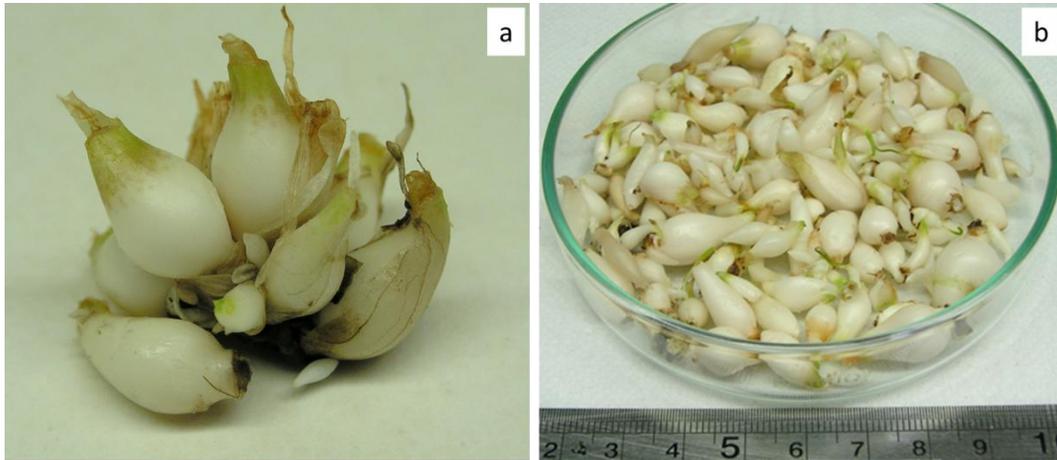


Figura 2. Apariencia de los bulbos del genotipo C150 al momento de la evaluación a las 42 semanas de cultivo en el ciclo N°3. a. Explante con formación de bulbillos en medio de cultivo PA2 y b. Bulbos y bulbillos obtenidos a partir de 22 explantes en medio de cultivo PA2.

Transcurridas las 42 semanas los explantes presentaban multiplicación y formación de bulbillos laterales, en algunos casos mostraban senescencia del follaje y formación de túnica protectora, por lo que al momento del traspaso se realizó una limpieza del material excedente y se separaron los bulbillos laterales para que cada uno se convirtiera en un nuevo explante (Figura 3).

En el transcurso de los experimentos se planteó el traspaso de los explantes que se encontraban en medio PA3 a un medio sin reguladores de crecimiento (PA0) debido al alto porcentaje de formación de callos (67%) provocado por la concentración de auxina ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Ácido Naftalenacético) existente en el medio de cultivo PA3 (Figura 1c), con el cual no se logró el efecto buscado que era el enraizamiento de los explantes. Pero finalmente se decidió en la última reunión mantenerlos en el medio de cultivo PA3 sin realizar traspaso para así prepararlos para su etapa de endurecimiento/aclimatación como fue indicado previamente y no generar una nueva brotación al transferirlos a un medio de cultivo nuevo.

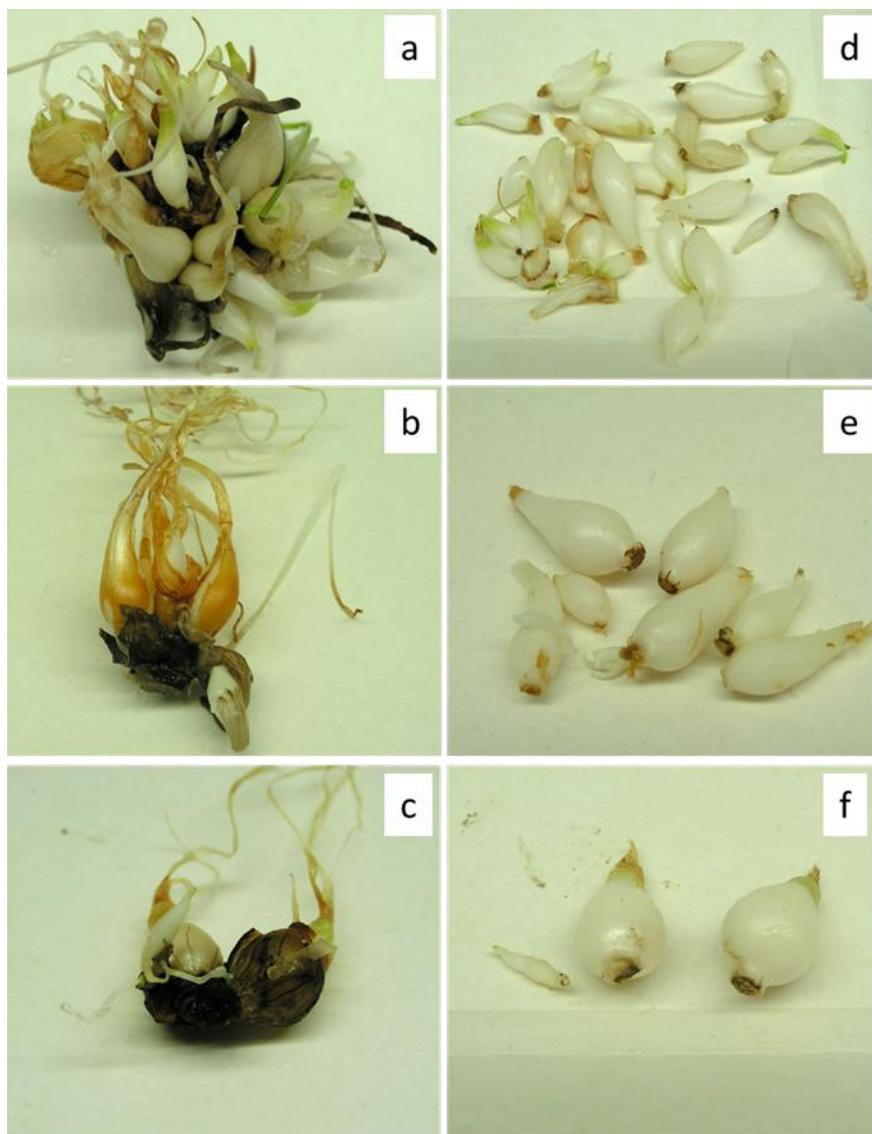


Figura 3. Apariencia de los bulbos del genotipo C150 al momento del traspaso a las 42 semanas de cultivo en el ciclo N°3. a, b y c Explantes con brotación múltiple y formación de bulbillos en medio de cultivo PA2. d, e y f . Bulbos y bulbillos obtenidos a partir de los explantes a, b y c respectivamente.

Conclusiones Experimento FIA12.1

- El medio de cultivo PA1 presentó el máximo porcentaje de brotación (100%) durante toda la duración del experimento, mientras que los medios de cultivo PA2 y PA3 produjeron una brotación final de 68,5% y 50,9% respectivamente.
- El medio de cultivo PA2 presentó la mayor incidencia en la formación de brotación múltiple, lo que favorece la posterior formación de bulbillos laterales.
- El medio de cultivo PA3 no cumplió el objetivo de enraizamiento y por el contrario provocó un efecto negativo en los explantes que fue un alto porcentaje (67%) de formación de callos lo que puede aumentar la probabilidad de variaciones somaclonales y por lo tanto la pérdida del genotipo que se espera propagar. Además cabe destacar que por experiencias previas se ha podido constatar que los explantes de *Leucocoryne* no necesitarían la adición de auxinas para la formación de raíces ya que en medios sin reguladores de crecimiento tiene un adecuado enraizamiento.
- Si bien el medio de cultivo PA2 produjo mayor brotación múltiple, la primera etapa en medio de cultivo PA1 favoreció un alto porcentaje de brotación y puede haber influido en la posterior respuesta.
- Según la experiencia la multiplicación masiva de bulbos de *Leucocoryne spp.* es posible, lo que se puede demostrar en los 236 bulbos obtenidos a partir de solo 22 explantes, pero se debe tener en cuenta que el tiempo requerido para el aumento en el número de individuos puede llegar a ser mayor que el convencional de otras especies.

EXPERIMENTO FIA12.2: Validación Protocolo Americano 1. Formación de brotes de *Leucocoryne spp.* (Estrategia de multiplicación 2).

- Nº de Genotipos:1 (C149: *Leucocoryne* “Sirius”)
- Nº de Bulbos por Genotipo: 20 bulbos *in vitro* (Se iniciaron 40 bulbos).
- Pretratamiento: Bulbos frescos NO iniciados *in vitro*.
- Tratamiento: El definido como “Shooting from micro-bulbs”
- Fecha Inicio: Junio 2014
- Duración: 6 a 10 meses dependiendo de la reacción del material vegetal al protocolo. 10 a 12 meses para la segunda fase de este experimento, utilizando brotes provenientes de Protocolo 2.
- Resultado Esperado: Formación de nuevos bulbillos adventicios.

El protocolo de iniciación y desinfección del material vegetal de este ensayo es idéntico al descrito para el Experimento FIA12.1, variando solo la concentración de BAP utilizada en el medio de cultivo en el que fueron establecidos los bulbos y ya fue explicado en forma detallada en los informes anteriores. El establecimiento se realizó en tubos de ensayo con 20mL de medio M535 con adición de $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa como fuente de carbohidratos, $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina (BAP), $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agar como agente gelificante y $2 \text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ de PPM®, ajustado el pH a 5,7 (medio denominado PA2).

Al momento de implementar este ensayo se evaluó el peso y diámetro de una muestra de 10 bulbos los cuales tuvieron un valor promedio de 1,28g y un diámetro de 12,98mm.

Se realizaron evaluaciones, a las 3, 6, 9 y 13 semanas del ciclo 1 de cultivo, para observar los porcentajes de brotación y estabilización de explantes desde su establecimiento en condiciones de cultivo *in vitro* (Cuadro 5)

Cuadro 5. Evaluaciones Experimento 12.2 transcurridas 3, 6, 9 y 13 semanas después de ser establecidos los explantes de bulbos de *Leucocoryne* spp genotipo C149.

Sem.	Bulbos inicio	1 Brote	Brote múltiple	Sin brote	Brotación	Form. de raíces	Bulbo lateral		Estabilización	
							N°	%	N°	%
3	40	33	0	7	82,5	1	0	0,0	32	80,0
6	38	33	0	4	86,8	0	0	0,0	31	81,6
9	36	31	0	5	86,1	0	0	0,0	27	75,0
13	32	26	1	5	84,4	0	1	3,1	26	81,3

Durante el mes de septiembre, una vez cumplida la semana n° 13 se realizó un traspaso a medio fresco con las mismas concentraciones indicadas anteriormente. Se mantuvieron en las mismas condiciones de crecimiento y se realizaron nuevas evaluaciones de brotación, multiplicación y contaminación a las 5, 9, 13 y 16 semanas del ciclo 2 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluaciones Experimento FIA12.2 durante el ciclo 2, transcurridas 5, 9, 13 y 16 semanas después de traspasar los explantes de bulbos de *Leucocoryne* spp genotipo C149.

Sem.	Bulbos	1 Brote	Brote múltiple	Sin brote	Brotación	Form. de raíces	Bulbo lateral		Estabilización	
							N°	%	N°	%
5	27	17	2	8	70,4	1	0	0,0	19	70,4
9	27	16	3	6	70,4	0	0	0,0	19	70,4
13	27	18	3	6	77,8	0	0	0,0	21	77,8
16	27	18	3	6	77,8	0	0	0,0	21	77,8

En el mes de enero del 2015, momento en que ya se habían cumplido 16 semanas de cultivo del segundo ciclo se realizó un nuevo traspaso, en dicho momento se evaluó brotación, número de brotes, número de bulbos producidos y peso de los explantes (Cuadro 7).

Cuadro 7. Evaluaciones de peso, producción de brotes y bulbos en explantes de *Leucocoryne* spp. C149 en Experimento 12.2, transcurridas 16 semanas del ciclo 2.

Tubo	N° de bulbos	N° brotes	Peso explante (g)	Traspasado a medio:
1	1	1	0,6	
2	1	1	0,4	
3	1	1	0,5	
4	1	1	0,3	
5	1	1	0,2	
6	1	1	0,4	
7	1	1	0,3	
8	1	1	0,5	
9	1	1	0,1	
10	1	1	0,2	
11	1	1	0,7	
12	1	1	0,5	
13	1	1	0,6	
14	1	1	0,4	PA1
15	1	1	0,4	
16	1	1	0,6	
17	1	1	0,6	
18	1	1	0,1	
19	1	3	0,4	
20	1	2	0,2	
21	1	2	0,4	
22	1	0	0,1	
23	1	0	0,5	
24	1	0	0,5	
25	1	0	0,1	
26	1	0	0,1	
27	1	0	0,1	Muerto

Tal como se acordó en la reunión técnica realizada en el mes de Diciembre, los bulbos luego de ser evaluados fueron traspasados al medio de cultivo PA1 (medio que cuenta con la adición de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina (BAP)), para favorecer la brotación y multiplicación de los explantes.

Se evaluó la respuesta de los explantes al medio de cultivo PA1 durante el ciclo 3 a las 4, 9, 13, 21 y 28 semanas de cultivo. (Cuadro 8 y Figura 4). Un 96,2% de los explantes presentó brotación, en donde 23 de ellos presentaron brotación del tipo simple y sólo 2 explantes presentaron brotación múltiple.

Cuadro 8. Evaluaciones Experimento FIA12.2 durante el ciclo 3, transcurridas 4, 9, 13, 21, 28 y 34 semanas después de traspasar los explantes de bulbos de *Leucocoryne spp.* genotipo C149.

Sem. N°	Medio de cultivo	Bulbos Inicio N°	1 Brote		Sin brote N°	Brotación %	Form. de raíces		Bulbo lateral		Formación callo	
			N°	N°			N°	%	N°	%	N°	%
4	PA1	26	24	1	1	96,2	11	42,3	0	0,0	0	0,0
9	PA1	26	24	1	1	96,2	11	42,3	0	0,0	0	0,0
13	PA1	26	23	2	1	96,2	12	46,2	2	7,7	0	0,0
21	PA1	26	23	2	1	96,2	15	57,7	2	7,7	0	0,0
28	PA1	2	0	2	0	100,0	2	100,0	2	100,0	0	0,0
34	PA1	2	0	2	0	100,0	2	100,0	2	100,0	0	0,0

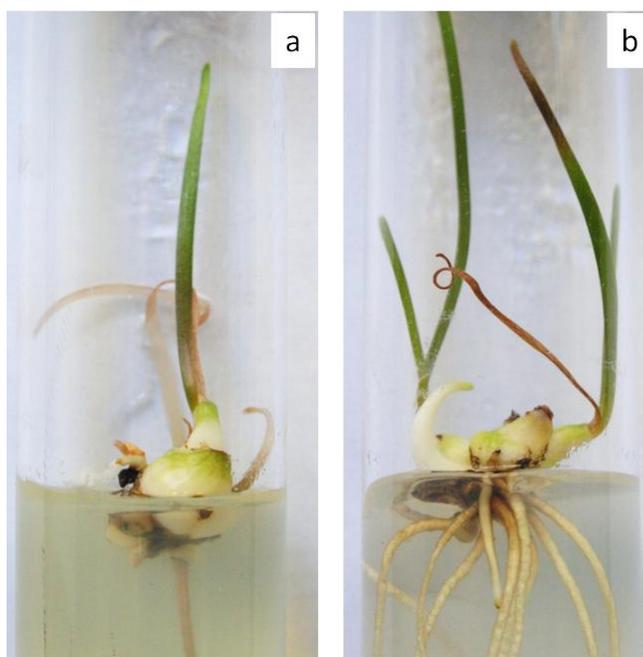


Figura 4. Apariencia de los bulbos del genotipo C149 al momento de la evaluación a las 21 semanas de cultivo en el ciclo N°3. a. Explante con brotación simple en medio de cultivo PA1, b. Explante con brotación múltiple y formación de bulbos laterales en medio de cultivo PA1.

Posterior a la evaluación correspondiente a las 21 semanas se separó y traspasó los bulbos que presentaban 1 brote (Figura 3a) para ser utilizados en el nuevo experimento codificado como FIA14, el cual es descrito más adelante. Lo anterior explica el bajo número de bulbos evaluados desde la semana 28 de cultivo en adelante, los que solo corresponden a 2 explantes que presentan brotación múltiple (Cuadro 8).

Conclusiones Experimento FIA12.2

- El iniciar el cultivo en el medio PA2 (medio con la adición de $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP) produjo una germinación mayor a 80%, pero menor que el obtenido con el medio PA1 (medio con la adición de $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP).
- Se pudo observar que la calidad de la brotación y la apariencia de las hojas en el medio PA2 fue mucho más débil que el observado al utilizar $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP en el medio de cultivo (PA1).
- El posterior traspaso a medio de cultivo con $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP mejoró la calidad, porcentaje de brotación y crecimiento visual de los bulbos.
- Los explantes produjeron un bajo porcentaje de brotación múltiple, menor al 10% de los explantes, lo que podría indicar que es necesario un estímulo inicial mayor para que los explantes tengan mayor brotación y formación de bulbos laterales.

EXPERIMENTO 13: Evaluación de “scales” de bulbos de *Leucocoryne spp.* para ser utilizados como explante inicial en condiciones de cultivo *in vitro*.

- Nº de Genotipos: 3 (C507: *Leucocoryne spp* "azureum", C509: *L. purpurea* y C516: *Leucocoryne spp.* "marina")
- Nº de Bulbos por Genotipo: 10 bulbos.
- Pretratamiento: Bulbos frescos NO iniciados *in vitro*.
- Tratamiento: El definido como “Bulb Formation from Scales”
- Fecha Inicio: Junio 2014
- Duración: 6 a 10 meses dependiendo de la reacción del material vegetal al protocolo.

El protocolo de desinfección e iniciación para este ensayo fue descrito en los informes anteriores, siendo similar al utilizado en los otros experimentos pero con la salvedad que se realizó división del bulbo inicial en dos mitades al momento de establecerlos en condiciones *in vitro* (Figura 5)



Figura 5. Preparación de explante de bulbo de *Leucocoryne spp.* genotipo C516, para ser establecido en condiciones de cultivo *in vitro* en el Experimento 13.

Los dos explantes de bulbos (dos mitades de cada bulbo) fueron establecidas en un frasco de vidrio de 200mL, con 30mL de medio de cultivo M535 con adición de 90 g·L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos, 1 mg·L⁻¹ de Bencilaminopurina (BAP), 6 g·L⁻¹ de agar como agente gelificante y 2ml·L⁻¹ de PPM®, ajustado el pH a 5,7 (medio PA1). Posteriormente los bulbos fueron

dispuestos en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ para su brotación y crecimiento.

Las evaluaciones fueron presentadas en los informes previos y el experimento se dio por finalizado. Como conclusión la división al momento de la iniciación de los bulbos para aumentar el número de explantes parece tener un efecto negativo, ya que los explantes mostraron un bajo porcentaje de brotación, problemas de contaminación y muerte de tejidos, y en la mayoría de los que hubo algún tipo de respuesta solo ocurrió en una de las mitades iniciales (Cuadro 9 y Figura 6), esto a pesar que al momento de la iniciación se trató de asegurar que ambas mitades fueras equivalentes y que tuvieran parte tanto del punto de crecimiento como también de sección de plato basal.

Cuadro 9. Evaluación de brotación y formación de bulbos de *Leucocoryne spp.* genotipo C516, transcurridas 31 semanas desde el establecimiento en condiciones *in vitro*.

Semana	Material	Bulbos	Explantes	Explantes a la	Brotación		Formación de
		iniciales	iniciales	fecha	N°	%	bulbo
		N°	N°	N°			N°
3	C516 FIA13	10	20	20	7	35	1
6	C516 FIA13	10	20	16	7	35	0
9	C516 FIA13	10	20	14	7	35	2
18	C516 FIA13	10	20	12	4	20	0
23	C516 FIA13	10	20	12	5	25	4
27	C516 FIA13	10	20	12	4	20	2
31	C516 FIA13	10	20	12	5	25	4

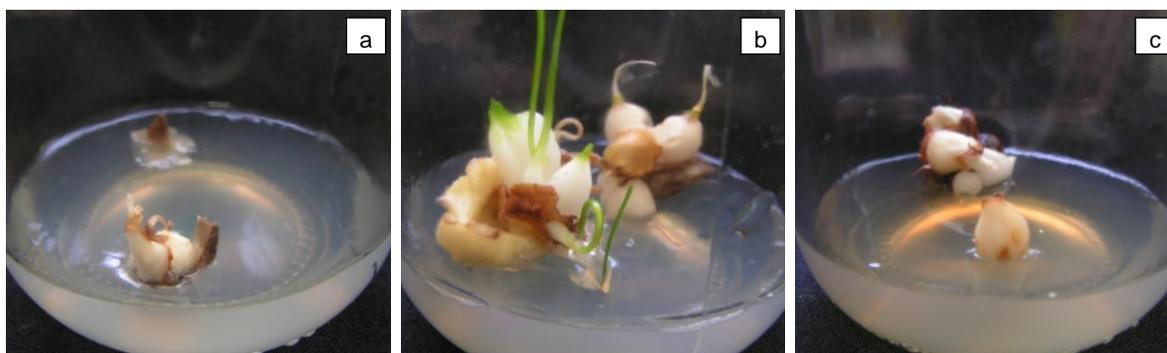


Figura 6. Evaluación visual de brotación y formación de bulbos de *Leucocoryne spp.*, de tres genotipos luego de 31 semanas de establecidos en el Experimento 13: a.C507; b.C509 y c.C516.

Conclusiones Experimento FIA13

- La técnica de división de los bulbos al momento de iniciación de los explantes no es una técnica adecuada ni conveniente para aumentar el número de explantes en corto tiempo, siendo necesario una previa estabilización y crecimiento de los bulbos *in vitro* antes de realizar la división de estos.
- La respuesta de cada una de las mitades utilizadas como explante puede ser considerada errática, aunque se trate de asegurar que el corte del bulbo inicial sea equitativo para ambos explantes no se puede asegurar la respuesta positiva en brotación o multiplicación en cada una de ellas.

EXPERIMENTO FIA14. Efecto del pH en la formación de nuevos bulbos de *Leucocoryne spp.* a partir de división de bulbos iniciados previamente *in vitro*.

- Nº de Genotipos: 2 (C149: *Leucocoryne* “Sirius” y C150: *Leucocoryne* “Caravelle”)
- Pretratamiento: Bulbos provenientes de experimentos FIA12.1 y FIA12.2
- Tratamiento: División de bulbos y Efecto de pH
- Fecha Inicio: Junio 2015
- Duración: 5 meses dependiendo de la reacción del material vegetal
- Resultado Esperado: Formación de nuevos bulbillos adventicios.

Los explantes provenientes de los experimentos FIA12.1 y FIA12.2 que se encontraban en medio PA1 (M535 con adición de $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP) después de 21 semanas del ciclo 3, fueron traspasados a medios frescos PA1 pero con menor concentración de sacarosa $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y dos pH diferentes (5,8 y 6,8) según lo acordado en la última reunión realizada en Abril del 2015 y posteriores propuestas acordadas por medio de correos electrónicos (Figura 7). Cada bulbo antes de ser establecido en el nuevo medio de cultivo fue pesado y posteriormente dividido por la mitad. Cada mitad de cada bulbo fue pesada y establecidas en tubos de ensayo con 20mL de medio PA1 con ambos pH. De esta forma el material proveniente de cada bulbo se traspasó entonces a medios con dos pH diferentes (Figura 8). El tratamiento con pH 5,8 se le denominó T0 mientras que al tratamiento en que se ajustó el pH a 6,8 se le denominó T1. Se utilizaron 11 bulbos (22 mitades) en el caso del genotipo C150 y 22 bulbos (44 mitades) para el genotipo C149.

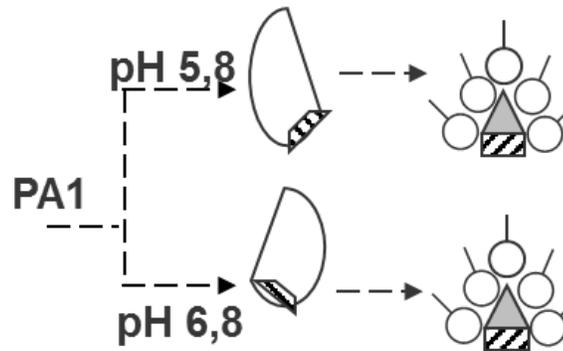


Figura 7. Esquema de la estrategia de traspaso y producción esperada de bulbos de *Leucocoryne* spp. genotipos C150 y C149 en experimento FIA14.

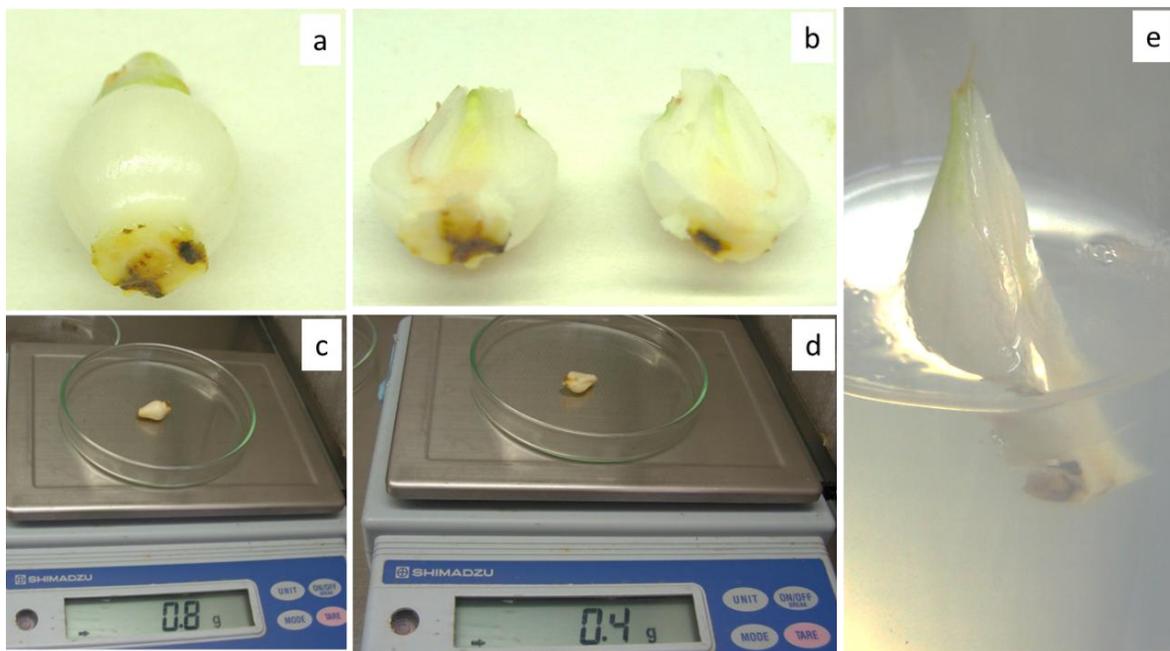


Figura 8. Pesaje de bulbos y mitades de bulbos de *Leucocoryne* spp. en el traspaso de explantes para iniciar el experimento FIA14. a. Bulbo proveniente de cultivo *in vitro*, b. División de bulbo en dos mitades, c. Peso de bulbo entero, d. Peso de mitad de bulbo y e. Explante para experimento FIA14 correspondiente a mitad de bulbo.

Después de siete semanas de cultivo bajo las condiciones del nuevo experimento se realizó la evaluación de los explantes para poder observar su respuesta de brotación y cuantificar cuantos explantes (mitades de bulbos) mostraron actividad en el periodo señalado.

Para el caso del genotipo C150 se observó la respuesta de 12 explantes, correspondiendo 5 al tratamiento con pH 5,8 (T0) y 7 con pH 6,8 (T1). Se logró observar que en 4 casos respondieron las dos mitades provenientes de cada bulbo inicial, mientras que en 4 casos solo se observó respuesta en una de las mitades y en tres casos no se observó respuesta en ninguna de las mitades utilizadas como explantes (Cuadro 10 y Figura 9).

Cuadro 10. Evaluación de la brotación de los explantes (mitades de bulbos) de *Leucocoryne spp.* C150 después de 7 semanas de cultivo del experimento FIA14.

N° semanas	N° tubo	Brotación		N° de mitades con brote
		T0	T1	
	1	0	1	1
	2	1	1	2
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5	1	1	2
7	6	1	1	2
	7	1	1	2
	8	0	1	1
	9	0	1	1
	10	1	0	1
	11	0	0	0
Total		5	7	12

En el genotipo C149 se observó que 26 explantes presentaron brotación, 14 de ellos correspondientes a T0 y 12 al tratamiento T1. Al igual que en el caso del genotipo C150 se puede observar que la respuesta a la brotación de las mitades utilizadas como explantes varió con respecto a su origen, teniendo 9 casos en que brotaron ambas mitades, 8 en que solo brotó una de las mitades y 5 casos en que no existió respuesta en ninguna de las mitades (Cuadro 11 y Figura 9).

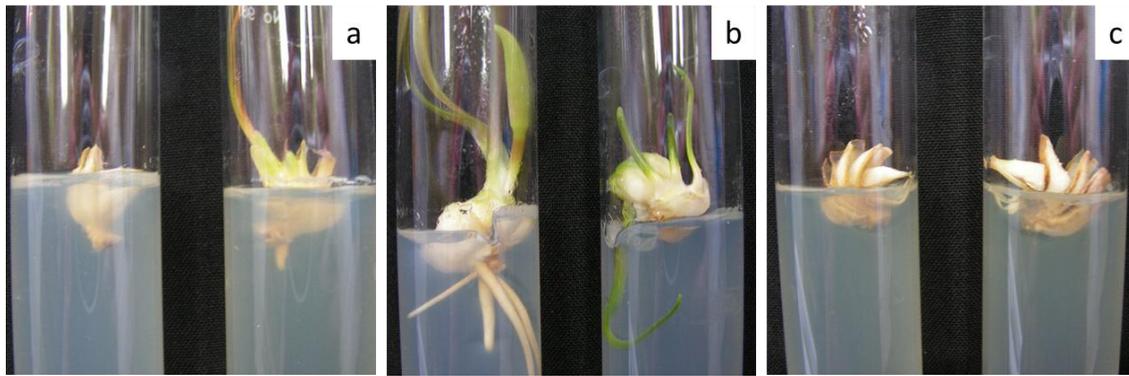


Figura 9. Respuesta de brotación a las 7 semanas de iniciado el ensayo. a. Explantes de C150 en T0 sin brotación y T1 con brotación simple, b. Explantes de C149 en T0 con brotación simple con escapo floral y T1 con brotación múltiple, c. Explantes de C149 en T0 y T1 sin brotación.

Cuadro 11. Evaluación de la brotación de los explantes (mitades de bulbos) de *Leucocoryne spp.* C149 después de 7 semanas de cultivo del experimento FIA14.

N° semanas	N° tubo	Brotación		N° de mitades con brote
		T0	T1	
	1	1	1	2
	2	0	0	0
	3	1	1	2
	4	1	0	1
	5	1	0	1
	6	0	1	1
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	1	1
	10	1	0	1
7	11	1	1	2
	12	1	1	2
	13	0	0	0
	14	1	1	2
	15	0	1	1
	16	1	1	2
	17	1	1	2
	18	1	1	2
	19	1	1	2
	20	0	0	0
	21	1	0	1
	22	1	0	1
Total		14	12	26

En el Cuadro 12 y en el Cuadro 13 se puede observar el tipo de brotación que se presentó para cada tratamiento para el genotipo C150 y C149 respectivamente. En el caso de C150 el tratamiento T0 no presentó brotación múltiple mientras que en T1 si se pudo observar dos explantes que contaban con más de un brote. En el genotipo C149 se observó presencia de brotación múltiple en los dos tratamientos de pH.

Cuadro 12. Resumen evaluación de la brotación de los explantes (mitades de bulbos) de *Leucocoryne spp.* C150 después de 7, 14 y 21 semanas de cultivo, según pH en el experimento FIA14.

Sem.	Trat.	Explantes	1 Brote	Brote múltiple	Sin brote	Brotación	Form. de raíces		Form. de Bulbo	
							N°	%	N°	%
7	5,8	11	5	0	6	45,5	4	36,4	0	0,0
7	6,8	11	5	2	4	63,6	4	36,4	0	0,0
14	5,8	11	3	2	7	45,5	2	18,2	0	0,0
14	6,8	11	4	4	3	72,7	5	45,5	2	18,2
21	5,8	11	1	4	6	45,5	2	18,2	5	45,5
21	6,8	11	3	5	3	72,7	2	18,2	6	54,5

Cuadro 13. Resumen evaluación de la brotación de los explantes (mitades de bulbos) de *Leucocoryne spp.* C149 después de 7, 14 y 21 semanas de cultivo, según pH en el experimento FIA14.

Sem.	Trat.	Explantes	1 Brote	Brote múltiple	Sin brote	Brotación	Form. de raíces		Form. de Bulbo	
							N°	%	N°	%
7	5,8	22	10	4	8	63,6	6	27,3	0	0,0
7	6,8	22	9	3	10	54,5	4	18,2	0	0,0
14	5,8	22	10	4	7	63,6	10	45,5	1	4,5
14	6,8	22	9	4	9	59,1	8	36,4	1	4,5
21	5,8	22	8	6	8	63,6	9	40,9	15	68,2
21	6,8	22	8	6	8	63,6	9	40,9	15	68,2

A la semana 21 se realizó un traspaso a medio fresco, en donde se procedió a eliminar los explantes que no tenían respuesta de brotación, que estaban muertos

o presentaban contaminación y se separaron los bulbillos en los casos en los que se produjo multiplicación. El número de explantes que siguieron en cultivo y la respuesta de brotación que se obtuvo a las 5 semanas posteriores al traspaso se puede observar en el cuadro 14 y el cuadro 15.

Cuadro 14. Evaluación de la brotación de los explantes de *Leucocoryne spp.* C150 después de 5 semanas de cultivo, según pH en el experimento FIA14.

Sem. N°	Trat. pH	Explantes N°	1	Brote	Sin	Brotación %	Form. de		Form. de	
			Brote	múltiple	brote		raíces	Bulbo		
			N°	N°	N°		N°	%	N°	%
5	5,8	8	3	2	3	62,5	2	25,0	7	87,5
5	6,8	20	11	3	6	70,0	4	20,0	19	95,0

Cuadro 15. Evaluación de la brotación de los explantes de *Leucocoryne spp.* C149 después de 5 semanas de cultivo, según pH en el experimento FIA14.

Sem. N°	Trat. pH	Explantes N°	1	Brote	Sin	Brotación %	Form. de		Form. de	
			Brote	múltiple	brote		raíces	Bulbo		
			N°	N°	N°		N°	%	N°	%
5	5,8	24	10	6	8	66,7	7	29,2	24	100,0
5	6,8	29	13	8	8	72,4	9	31,0	29	100,0

Conclusiones Experimento FIA14.

- La respuesta al pH que presentaron los explantes se vio interferida por el factor de haber realizado cortes por la mitad de los explantes iniciales, lo que provoca una desuniformidad en la respuesta, ya que en se presentaron casos en que ninguna mitad respondió, otras en que sólo una mitad respondió y otras en que ambas mitades presentaron brotación, lo que finalmente terminó afectando cualquier conclusión con respecto al efecto del pH.
- En el caso del genotipo C150 el pH 6,8 obtuvo un porcentaje de 72,7% versus el 45,5 % obtenido en el medio con el pH ajustado a 5,8. Mientras que en caso de del genotipo C149 no existió diferencia en la brotación alcanzando en ambos un 63,6%.

- La manipulación excesiva para realizar los cortes y pesar cada uno de explantes afectó negativamente, lo que conllevó a la aparición de contaminación. Esto agregado a los explantes que no presentaron actividad hizo variar bastante el número y uniformidad de los explantes que siguieron en cultivo.
- En los explantes que siguieron en cultivo no se percibió diferencias significativas en los porcentajes de brotación en ninguno de los dos genotipos.
- En el caso de utilizar la técnica de división de bulbos se recomienda que se haga lo más rápido posible y con la menor manipulación, para evitar daños del explante o la aparición de contaminación.

EXPERIMENTO FIA15. Efecto de la antigüedad del medio de cultivo en la formación de nuevos bulbos de *Leucocoryne spp.*

- Nº de Genotipos: 1 (C150: *Leucocoryne* “Caravelle”)
- Pretratamiento: Bulbos provenientes de experimentos FIA12.1 PA2
- Tratamiento: Antigüedad del medio de cultivo
- Fecha Inicio: Octubre 2015
- Duración: 2 meses dependiendo de la reacción del material vegetal
- Resultado Esperado: Formación de nuevos bulbillos adventicios.

Los explantes del genotipo C150 provenientes del experimento FIA12.1 que se encontraban en medio PA2 (M535 con adición de $90\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa y $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP) después de 42 semanas del ciclo 3, fueron traspasados a medios PA1 ($1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP) con concentración de sacarosa de $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Agar y pH 5,8. Se utilizaron dos grupos de medios de cultivos que presentaban las mismas concentraciones y características con la salvedad que la mitad correspondía a medios antiguos elaborados tres meses antes de utilizarlos, los que se denominaron como PA1A y la otra mitad de explantes se traspasó a medios de cultivo PA1F que correspondían a medios frescos con menos de una semana de elaboración. Para cada caso se utilizaron 63 explantes de características similares. La razón para utilizar estos medios “antiguos” PA1A fue en busca de

simular las características en que se encuentran los explantes después de tres meses de cultivo, para de esta forma ver la posibilidad de acelerar el tiempo en que se demoran los explantes en comenzar a producir brotación múltiple o producción de bulbillos laterales, presumiblemente por algún estrés como por ejemplo la menor disponibilidad de agua en el medio de cultivo.

Cabe mencionar que a partir del experimento FIA12.1 PA2 se obtuvieron 236 bulbos de desuniforme tamaño (Figura 10), por lo que para montar este experimento se trató de elegir bulbos de características similares, mientras que el resto fue traspasado a otros medios de cultivo, sólo para su mantención. De esta forma entonces en este experimento se establecieron 63 explantes para cada tratamiento sumando un total de 126 bulbos, los que se encuentran en la actualidad en condiciones de cámara de crecimiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ con fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad.



Figura 10. Bulbos de *Leucocoryne* genotipo C150 obtenidos en Experimento FIA12.1 provenientes de medio PA2 de los cuales se obtuvo el material para el establecimiento del Experimento 15.

Se realizó una evaluación de los explantes a las 5 semanas de cultivo no encontrándose mayores diferencias en la brotación y producción de bulbos laterales, pero si en la producción de raíces (Cuadro 16 y Figura 11). Cumplidas las 7 semanas se traspasará la mitad de los explantes de cada uno de los tratamientos a medios sin reguladores de crecimiento (PA0) según lo acordado en la última reunión, para ver de esta forma si hay algún efecto en el endurecimiento o entrada en receso de los bulbos versus los que continuaran en medios de cultivo con adición de BAP.

Cuadro 16. Evaluación de la brotación de los explantes de *Leucocoryne sp.* C150 después de 5 semanas de cultivo, según medio de cultivo en el experimento FIA15.

Sem. N°	Medio cultivo	pH	Bulbos	1 Brote	Brote	Sin	Brotación	Form. de		Bulbo	
			Iniciales N°	N°	múltiple N°	brote N°		raíces N°	%	lateral N°	%
5	PA1A	5,8	63	41	2	20	68,3	3	4,8	1	1,6
5	PA1F	5,8	63	40	1	22	65,1	11	17,5	1	1,6

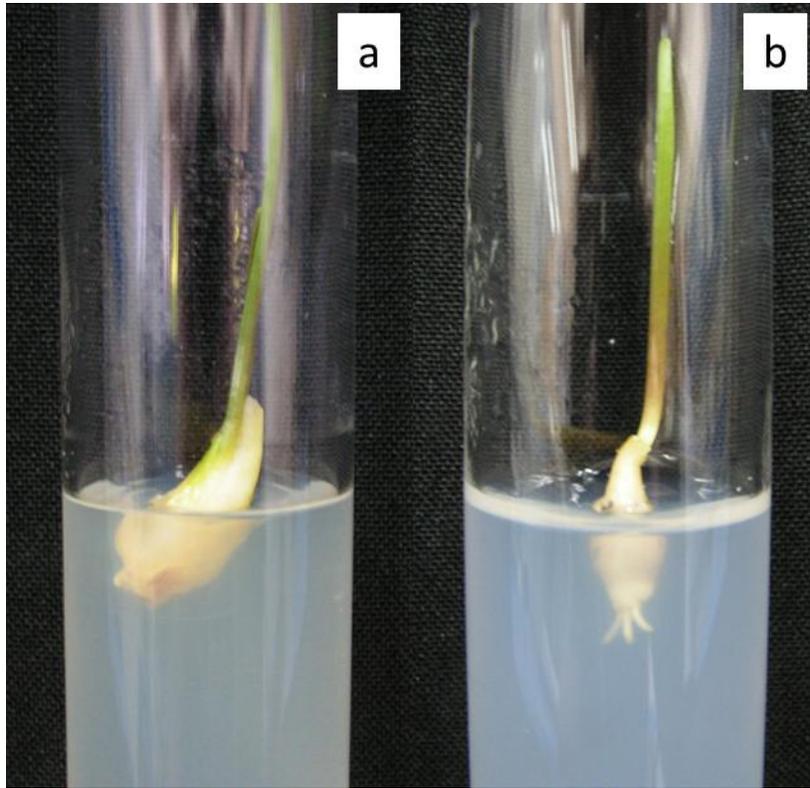


Figura 11. Respuesta de brotación de bulbos de *Leucocoryne* a las 5 semanas de iniciado el Experimento FIA15. a. Explante de genotipo C150 en medio PA1A y b. Explante de genotipo C150 en medio PA1F.

Conclusiones Experimento FIA15

- A la fecha no se ha podido observar algún efecto de la antigüedad del medio de cultivo en la brotación, ni en la producción de bulbillos o multiplicación. Se deberá observar por un tiempo mayor para ver si se produce algún efecto.

- El porcentaje de formación de raíces fue de 17,5% para los explantes establecidos en medio fresco versus al 4,8% observado en el medio antiguo. Esta última respuesta es llamativa ya que en ambos tratamientos los medios tienen la adición de BAP que por lo general tiene un efecto negativo sobre la formación o crecimiento de raíces.
- Falta por observar en este experimento el efecto que tendrá el traspasar la mitad de los explantes a medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (PA0) y evaluar si presenta alguna ventaja en la senescencia o endurecimiento de los explantes para su aclimatación a condiciones ex vitro.

Anexo II-2i



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS VEGETALES
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA Y MEJORAMIENTO GENETICO

INFORME DE AVANCE 2

“Ensayo de micropropagación *Leucocoryne purpurea*”

08 de enero, 2016

1. Introducción.

El ciclo de vida natural de las especies pertenecientes al género *Leucocoryne* es de al menos tres años, que comprende desde el estadio de semilla a bulbo floral, pero puede variar levemente entre especies. El ciclo se inicia en agosto con la germinación de las semillas a temperaturas entre 10°C y 15°C . Aproximadamente 45 días después comienza la formación del bulbo, 90 días después de germinación el bulbo llega a tener un diámetro aproximado de 4-6 mm y un peso de 60 mg, entrando en receso en el mes de noviembre. En la segunda temporada de crecimiento, sin necesidad de agua, el bulbillo brota desarrollando un par de hojas. La planta detiene su crecimiento entre los 100 a 120 días posteriores a la brotación. A la tercera temporada de crecimiento, entre 90 y 100 días posteriores a emergencia, con un peso mayor a 300 mg, la planta puede producir uno o dos escapos florales cada uno con cinco a ocho flores y 25 a 40 semillas por flor (Mansur *et al.*, 2002). Resultados de estudios realizados anteriormente por Ohkawa (1999), señalan que bulbos con un peso superior a 300 mg florecen en un 100% y las varas florales pueden utilizarse como flor de corte y aquellos bulbos que no alcanzan el peso deben cultivarse un año más.

La técnica de propagación *in vitro* en leucocoryne, se usa como una herramienta de multiplicación masiva sin embargo, no se ha logrado inhibir la entrada en receso de los bulbos después de 12 – 13 semanas post-germinación. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar el desempeño de esta técnica ajustando las variables que favorezcan el crecimiento y multiplicación de los bulbos. Las mejoras más relevantes a la fecha, han sido el ajuste de la variable temperatura (≤ 20 °C, recomendable 15 °C) y la variable de uso de citoquinina en el medio (1 mg/L) que favorecen la brotación y crecimiento continuo del bulbo. Dentro de las variables que influyen en el cultivo *in vitro*, que no han sido evaluados en leucocoryne y que podrían permitir un nuevo avance, se encuentra la concentración de sacarosa, el pH y la frecuencia de repique. Estas variables debidamente ajustadas, han permitido un buen crecimiento *in vitro* en otra planta bulbosa, *Zephyra elegans* (Vidal *et al.*, 2012), que se desarrolla en la mismas condiciones que algunas especies de leucocoryne. En consecuencia, se espera que el ajuste de las variables como concentración de sacarosa, pH y frecuencia de repique, tengan un efecto favorable en el crecimiento y multiplicación de bulbos de leucocoryne.

2. Objetivo general.

Optimizar la técnica de la propagación *in vitro* de *Leucocoryne purpurea* para aumentar el crecimiento y multiplicación de bulbos.

3. Objetivo específicos.

- Evaluar el efecto de la sacarosa y del pH en la multiplicación y aumento de biomasa de los bulbillos.
- Evaluar el efecto de la frecuencia de repique en el crecimiento de los bulbos.

4. Metodología.

4.1 Material vegetal.

Se utilizaron semillas de *Leucocoryne purpurea* cosechadas en noviembre del 2014.

4.2 Germinación *in vitro* (etapa finalizada)

La germinación *in vitro* se realizó a 15°C de acuerdo con el protocolo desarrollado anteriormente (informe final entregado en julio de 2014). Se utilizaron 320 semillas (5 semillas por frasco) en medio MS al 12,5% con 30 g/L de sacarosa. Se evaluó el porcentaje de germinación y de bulbificación.

4.3 Establecimiento y multiplicación (etapa en desarrollo).

Los bulbos formados después de nueve semanas desde siembra, se utilizaron para establecer el ensayo de multiplicación en el medio MS-535 al 25% con 1 mg/L de BAP y ocho tratamientos (Cuadro 1), cada uno con 20 repeticiones, donde la unidad experimental corresponde a un tubo con un bulbillito. El cultivo se realizó en cámara de crecimiento a 15 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz. Los bulbos formados se cambiaron a medio fresco cada 4 semanas (1 ciclo).

Cuadro 1: Tratamientos para evaluar el efecto de la concentración de sacarosa y pH en la multiplicación y aumento de biomasa de los bulbos.

Tratamiento	Sacarosa (g/L)	pH
T1	30	5,8
T2	60	5,8
T3	90	5,8
T4	120	5,8
T5	30	6,8
T6	60	6,8
T7	90	6,8
T8	120	6,8

Al término del primer ciclo de cultivo se evaluó el diámetro y número de bulbos en receso, definiendo como entrada en receso la aparición de catafilo de color castaño. Al final del segundo ciclo de cultivo se evaluó el diámetro, la biomasa, la tasa de multiplicación de bulbos y el número de bulbos en receso. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey ($p \leq 0,05$) utilizando el programa computacional InfoStat.

5. Resultados.

5.1 Germinación y bulbificación:

La germinación de semillas comenzó a la segunda semana después de siembra finalizando a la sexta semana con un total de 170 semillas germinadas, lo que corresponde a un 54% de germinación. A su vez, la formación progresiva de bulbos comenzó en la cuarta semana de cultivo obteniéndose un total de 93,6 % de plántulas con bulbos después de nueve semanas; material que fue utilizado para iniciar el ensayo multiplicación (Figura 2 y 3).

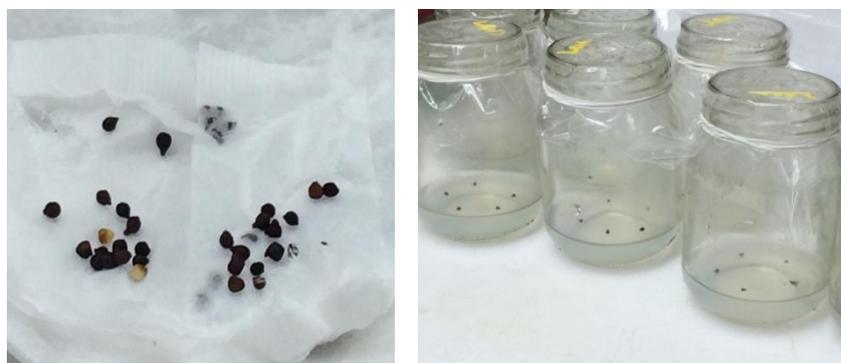


Figura 1: Establecimiento de semillas en medio de germinación *in vitro*. **A.** Semillas después del proceso de desinfección e imbibición. **B.** Semillas sembradas en frascos para germinación a 15°C.

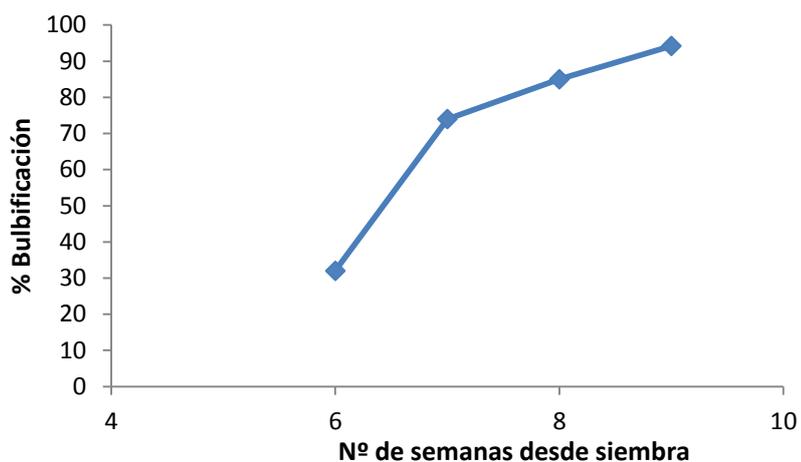


Figura 2: Periodo de bulbificación *in vitro* de plántulas de *Leucocoryne purpurea*.



Figura 3: Bulbos formados después de nueve semanas de cultivo *in vitro* desde siembra.

5.2 Ensayo de multiplicación y aumento de biomasa de bulbos de *L. purpurea*.

Para montar el ensayo de multiplicación se estimó la biomasa de los bulbos recién formados tomando una muestra de 10 bulbos seleccionados al azar, cuyo promedio resultó ser 24,8 mg (Figura 4). Este resultado fue levemente mayor a lo reportado en otros genotipos (Informe Final, julio, 2014), donde se obtuvo un promedio de 23,8 mg a las trece semanas de cultivo.

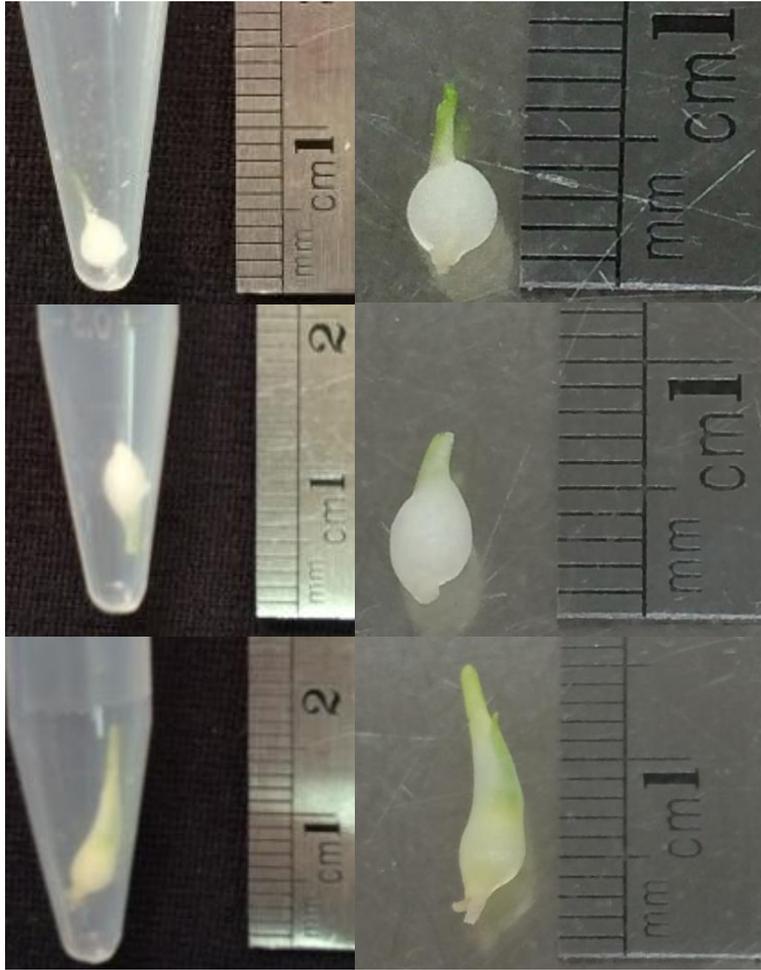


Figura 4: Tamaño y forma de bulbos al inicio del ensayo de multiplicación y aumento de biomasa.

Después de dos ciclos de cultivo, en todos los tratamientos realizados se observó un aumento en el diámetro de los bulbos. Sin embargo, bulbos cultivados en medios con pH 5,8 fueron levemente mas grandes que los cultivados a pH 6,8 (Figura 5). Los bulbos de mayor diámetro promedio se formaron en el medio con 90 g/L de sacarosa y pH 5,8 (T3) aunque el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los ocho tratamientos.

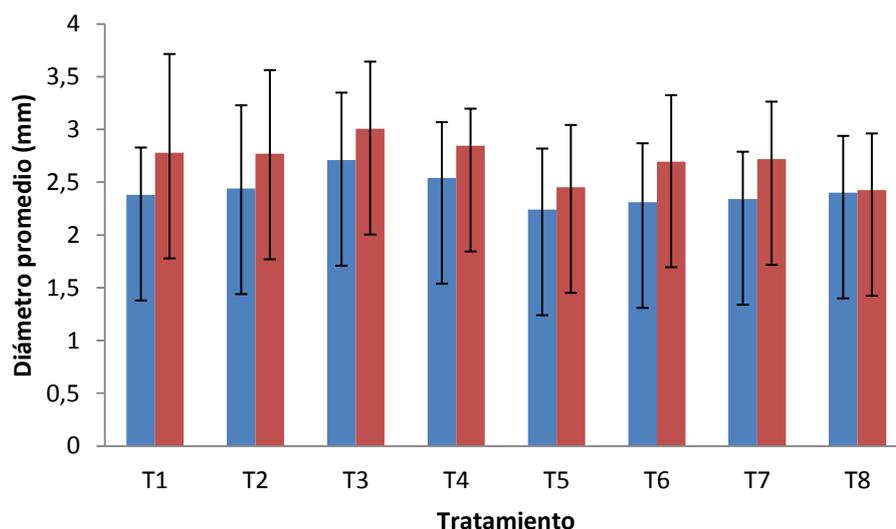


Figura 5. Diámetro de bulbos en cada tratamiento. Barras azules y rojas corresponden a evaluación del diámetro en el primer ciclo y segundo ciclo, de cultivo respectivamente.

La biomasa promedio de los bulbos aumentó respecto a la estimada al iniciar el ensayo. Se observaron diferencias entre los tratamientos, donde los bulbos con mayor biomasa se obtuvieron en el tratamiento T3 (Cuadro 2). Sin embargo, según el análisis estadístico realizado no existe una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Uno de los factores más importantes que se evaluó en este ensayo fue la multiplicación de bulbos por el efecto de la bencilaminopurina con distintas concentraciones de sacarosa y dos pHs. En los tratamientos T1, T2, T3 y T5 se comenzó a observar la formación de nuevos bulbos al segundo ciclo de cultivo (Figura 6). Sin embargo, a pesar de la respuesta de multiplicación, en todos los tratamientos también se pudieron observar bulbos con síntomas de receso. El mayor número de bulbos se presentó con 120 g/L de sacarosa, independiente del pH del medio de cultivo (Cuadro 2).

Cuadro 2: Multiplicación, biomasa y receso de bulbos en respuesta a diferentes concentraciones de sacarosa y pH después de dos ciclos de cultivo (ocho semanas).

Tratamiento	N° bulbos	N° de bulbos en multiplicación	N° bulbos receso	Peso promedio (mg)	Desv. estándar
T1	19	1	4	42,5	56,1
T2	20	1	3	35,2	20,7
T3	21	3	4	47,7	11,5
T4	18	0	7	38,4	15,1
T5	20	1	2	41,8	15,1
T6	21	0	4	33,4	4,3
T7	17	0	5	36,1	19,5
T8	20	0	6	24,3	11,4



Figura 6. Estado de los bulbos en el medio de cultivo. **A.** bulbo con brote en crecimiento. **B.** Bulbos en multiplicación. **C.** Bulbos en receso.

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos después de ocho semanas de cultivo en los diferentes tratamientos nos permiten decir, que el efecto de la concentración de sacarosa y el pH no son incidentes en el aumento de biomasa de los bulbos.

La inducción de nuevos bulbos recién se visualiza durante el segundo ciclo de cultivo especialmente en los tratamientos que tienen pH 5,5 sin embargo es necesario continuar el cultivo para tener una respuesta más clara. Se espera que la formación de nuevos bulbos vaya aumentando en los siguientes ciclos.

Negativamente, la entrada en receso de algunos bulbos se puede observar en todos los tratamientos al final del primer ciclo de cultivo, siendo un poco mayor cuando la concentración de sacarosa alcanza los 90 g/L.

7. Cronograma

Como se puede observar en el Cuadro 3, el cronograma de actividades original fue modificado debido a que las semillas se recibieron dos meses después de lo programado. Se continuará el ensayo hasta fines de febrero para poder responder a los objetivos planteados entregando el último informe los primeros días de marzo de 2016.

Cuadro 3. Cronograma de actividades.

CRONOGRAMA PROPUESTO	Mes																																	
	Junio					Julio					Agosto					Septiembre					Octubre					Noviembre								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26								
Germinación y bulbificación.																																		
Tratamiento 1 al 8: Multiplicación y aumento de biomasa de bulbillos.																																		
CRONOGRAMA	Mes																																	
	Ago				Septiembre					Octubre					Noviembre					Diciembre					Enero					Febrero				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26								
Germinación y bulbificación.																																		
Tratamiento 1 al 8: Multiplicación y aumento de biomasa de bulbillos.																																		

7. Referencias.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Mansur, L., Zoellner, O., Riedemann, P., Verdugo, G., Harrison, C. (2002). "Leucocoryne, un género native chileno y su uso como planta de jardín". Oficina de transferencia tecnológica Universidad Católica de Valparaíso. 49p.
- Ohkawa, K. (1999). Propagación y control de la floración de Zephyra y Leucocoryne. FIA. Los geófitos nativos y su importancia en floricultura, 27-40p.
- Vidal, A., Han, D., Nakano, M., Niimi, Y. (2012). Decreased time from seed to flowering corm size in *Zephyra elegans* via *in vitro* cultivation. Cien. Inv. Agr. 39:577-584.

Anexo II-2j

Hijuellas, 31 de Diciembre de 2015.

ATENCIÓN

Dr. Levi Mansur

Mansur Agricultural Service Ltda

Ref: Tercer informe sobre asesoría en propagación comercial de *Leucocoryne* sp.

Estimado Sr. Mansur:

Junto con saludarle, nos dirigimos a usted para entregar los resultados del experimento de cultivo *in vitro* de *Leucocoryne* sp. El cual se ejecutó en las instalaciones de SMRL por tres ciclos de cultivo de multiplicación (32 semanas)

Con el objetivo de mejorar la eficiencia de propagación de *Leucocoryne in vitro*, se diseñaron y ejecutaron 3 ensayos: evaluación de distintas combinaciones de pH/contenido de azúcar para maximizar la tasa de multiplicación de la especie *in vitro*. Análisis de la entrada en dormancia de los microbulbos, efecto de bajas temperaturas (crecimiento a 15°C) y hormonas. Finalmente se realizó un experimento para determinar el tipo de citoquinina más adecuado para potenciar la tasa de multiplicación de los bulbos. En cada ensayo se midió la tasa de multiplicación y estimando en cada caso la producción de bulbos bien formados y deformes (macizos de multiplicación con microbulbos poco diferenciados de o simplemente material deforme).

Le saludan atentamente,

Dra. Maria Jose Montañola
Investigador CIDI

MSc. Pablo Morales
Jefe comercial del área de Servicios

A continuación presentamos los principales resultados obtenidos

Ensayo nº 1: Determinar la mejor combinación pH/contenido de sacarosa

El objetivo del experimento es determinar la mejor combinación pH/ contenido de sacarosa para aumentar la tasa de multiplicación de *Leucocoryne sp. in vitro*. Para esto se realizó un experimento factorial completamente al azar con 4 niveles de contenido de sacarosa (30, 60, 90 y 120 g) y con dos niveles de pH (5,7 y 6,7), se evaluó un total de 8 tratamientos con 20, 25 y 35 repeticiones en cada ciclo de cultivo (ciclo 1, 2 y 3).

Mediante análisis de varianza se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne sp.* debido a la interacción de los factores analizados: contenido de sacarosa y pH del medio de cultivo en ninguno de los tres ciclos analizados. Por esto se evaluó cada factor en forma independiente.

En cuanto a la acción del contenido de azúcar en la tasa de multiplicación se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0015$; $p=0,0002$ y $p=0,009$ en los ciclos 1, 2 y 3 respectivamente). Se obtuvo la mayor tasa de multiplicación al utilizar 60 g/L de sacarosa en todos los ciclos de cultivo llegando a un promedio de formación de bulbos de 2,36. Respecto de la proporción de bulbos bien formados no se observó una tendencia clara entre ciclos de cultivo (gráficos 1, 2 y 3), en el primer ciclo no se registraron diferencias significativas entre tratamientos, en el segundo el tratamiento de 60 g/l de sacarosa produjo la menor cantidad de bulbos bien formados mientras que en el tercer ciclo fue este tratamiento el que mayor cantidad de bulbos de buena calidad produjo.

Al analizar el efecto del pH del medio de cultivo no se observaron tendencias claras en la tasa de multiplicación ni en la producción de bulbos de buena calidad en los tres ciclos de cultivo.

De los antecedentes presentados se puede concluir que la reducción del contenido de sacarosa en el medio de cultivo de *Leucocoryne sp.* desde 90g/l a 60 g/l permitiría aumentar la tasa de multiplicación *in vitro* de la especie (pasar desde una tasa de 1,9 a una de 2,36), sin perjuicio del tipo de material que se logra multiplicar (obtención de una muy buen cantidad de bulbos bien formados). Se concluye también que el aumento de pH del medio no tendría un efecto claro en la tasa de multiplicación de la especie ni en el tipo de material obtenido, por lo que se recomienda seguir trabajando con el pH standard de 5,7.

Gráficos 1 y 2: Efecto del contenido de Sacarosa en la formación de bulbos de *Leucocoryne* sp.

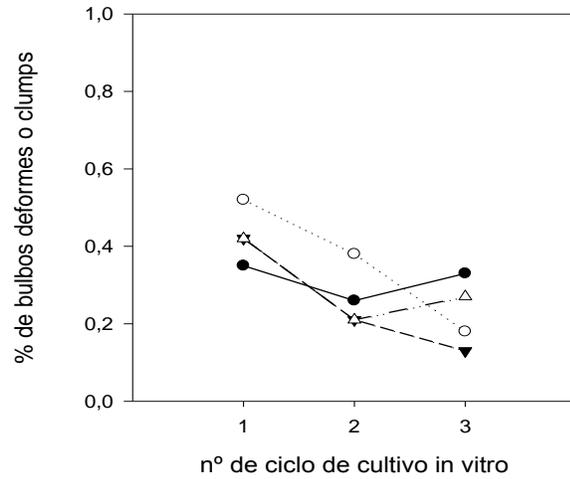
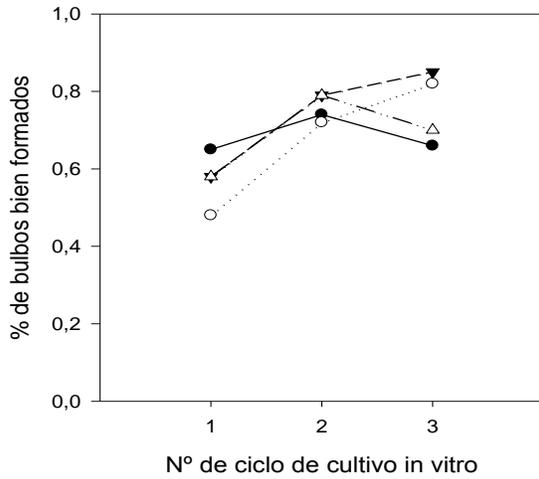
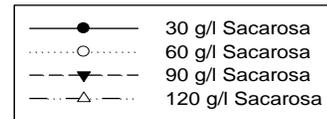
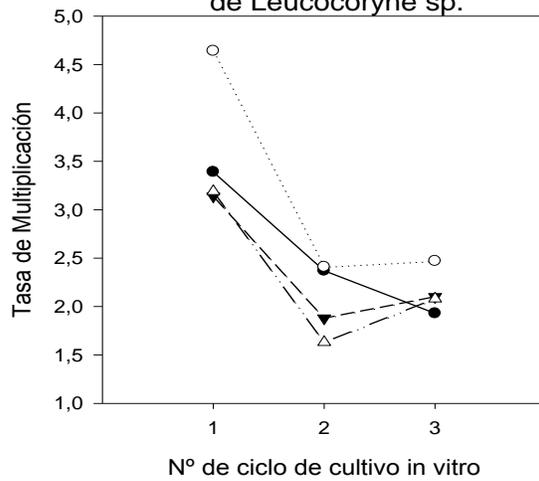


Gráfico 3: Efecto del contenido de sacarosa en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne* sp.



Gráficos 4 y 5: Efecto del pH en la formación de bulbos de *Leucocoryne* sp.

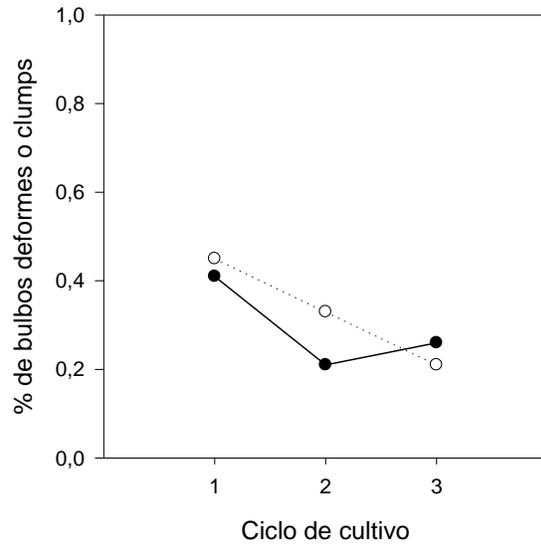
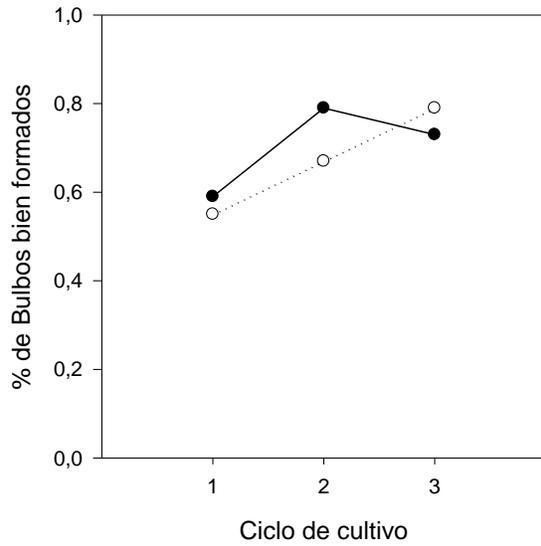
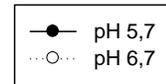
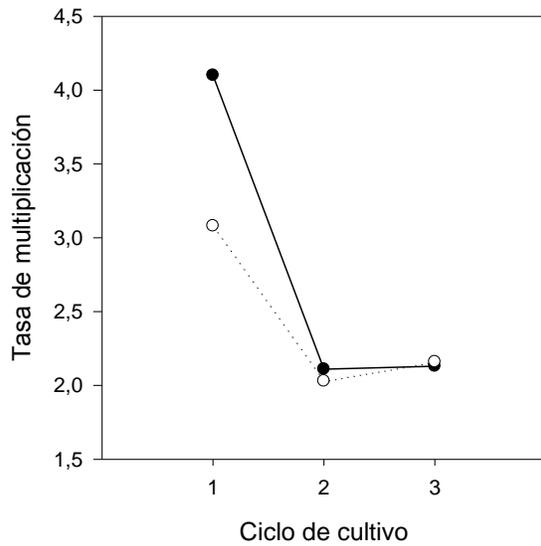


Gráfico 6: Efecto pH del medio de cultivo en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne* sp.



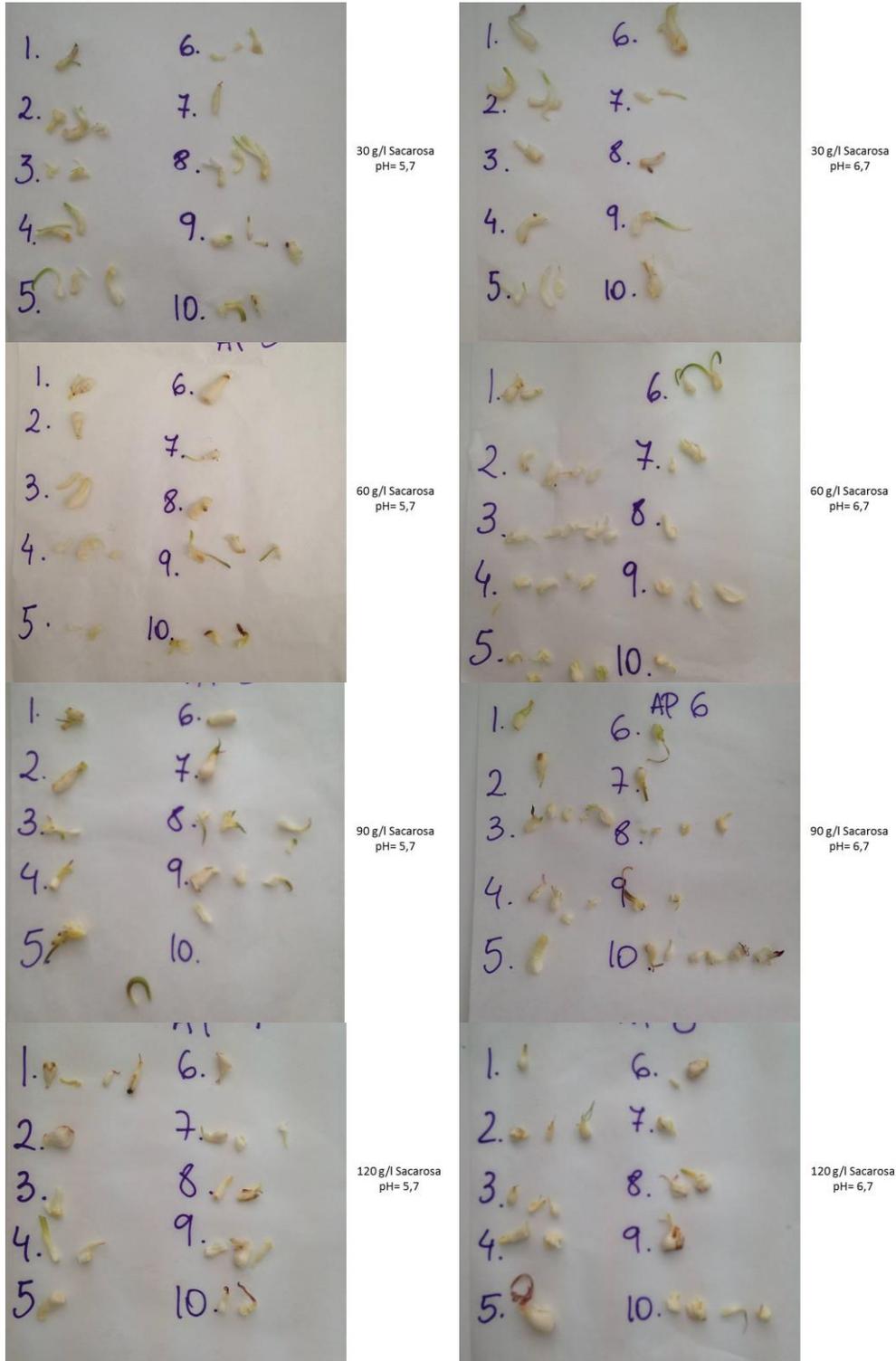


Figura 1: Evaluación tasa de multiplicación y calidad de bulbos de *Leucocoryne* sp. Cultivados bajo 4 concentraciones de sacarosa y dos niveles de pH.

Ensayo nº 2: Determinación del efecto de bajas temperaturas y suplementación con citoquininas/giberelinas sobre la inhibición de la dormancia de bulbos *in vitro* de *Leucocoryne*, para alargar el periodo de crecimiento del bulbo.

Con el objetivo de comparar el efecto de dos temperaturas ambientales y la adición reguladores de crecimiento del tipo citoquininas y giberelinas al medio cultivo de *Leucocoryne* sp., se estableció un ensayo factorial con dos niveles de temperatura (15 y 25°C) y tres tratamientos de hormonas (medio libre de hormonas; 0, 1mg/l de BAP; 0,5 mg/L de BAP + 1 mg/l de Ácido giberélico).

Mediante análisis de varianza se determinó que no existen diferencias significativas estadísticamente en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne* sp. debido al efecto de la interacción de los factores combinación de hormonas y temperatura de incubación en ninguno de los tres ciclos de cultivo. En el caso del efecto independiente de la combinación de reguladores del crecimiento utilizados (gráfico 9) sólo se detectaron diferencias significativas ($p=0,035$) en el tercer ciclo de cultivo siendo la mezcla de BAP con GA3 la que menor tasa de multiplicación presentó.

En cuanto a la proporción de bulbos formados y deformes en ambos factores las respuestas obtenidas no presentaron tendencias claras. En el primer ciclo se observaron diferencias debido al tipo de hormona utilizada (gráficos 7 y 8). En el segundo ciclo hubo diferencias estadísticamente significativas en la interacción de los factores lo que implica que el efecto de la hormona depende de las temperaturas de cultivo y viceversa. En el tercer ciclo de cultivo sólo se detectaron diferencias debido a la temperatura de cultivo. En términos generales, los bulbos cultivados a una menor temperatura presentaron una mejor formación y una tasa de multiplicación levemente menor (gráficos 10, 11 y 12). Respecto al efecto de la combinación de hormonas no se desprende ninguna tendencia clara.

Del estudio realizado se puede concluir que el uso de BAP o de BAP en combinación con GA no presenta diferencias en lo que se refiere a tasa de multiplicación de bulbos de *Leucocoryne* sp ni en la calidad del material obtenido, ya sea al ser utilizadas a 15° C ó a 25°C, por lo que no tendrían el efecto esperado en retardar o acelerar la entrada o salida en receso de los bulbos. En forma paralela el uso de bajas temperaturas induce una menor tasa de multiplicación y una mejor formación de los bulbos.

Gráficos 7 y 8: Efecto del contenido de la combinación de hormonas en la formación de bulbos de *Leucocoryne sp.*

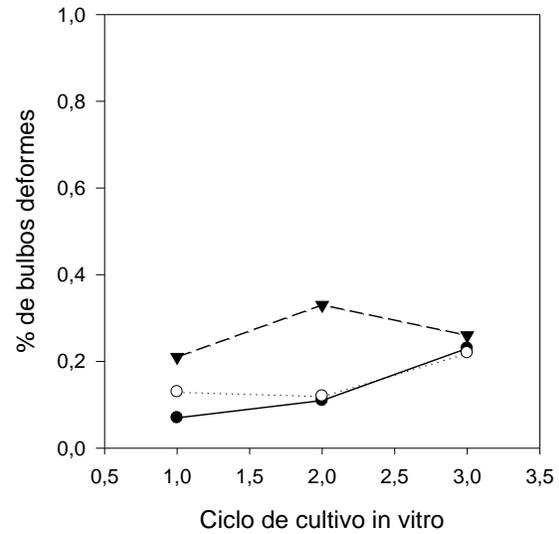
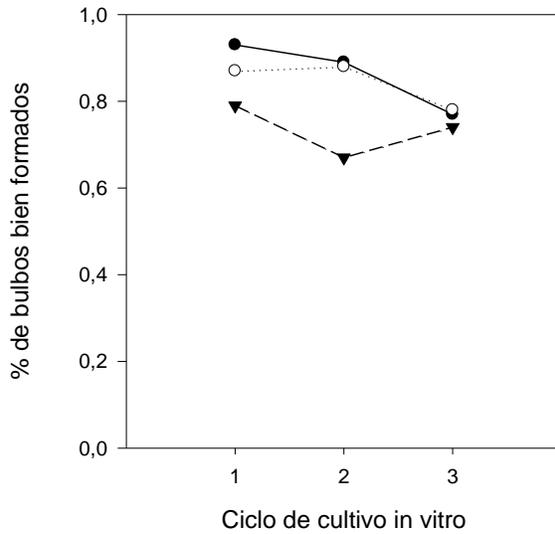
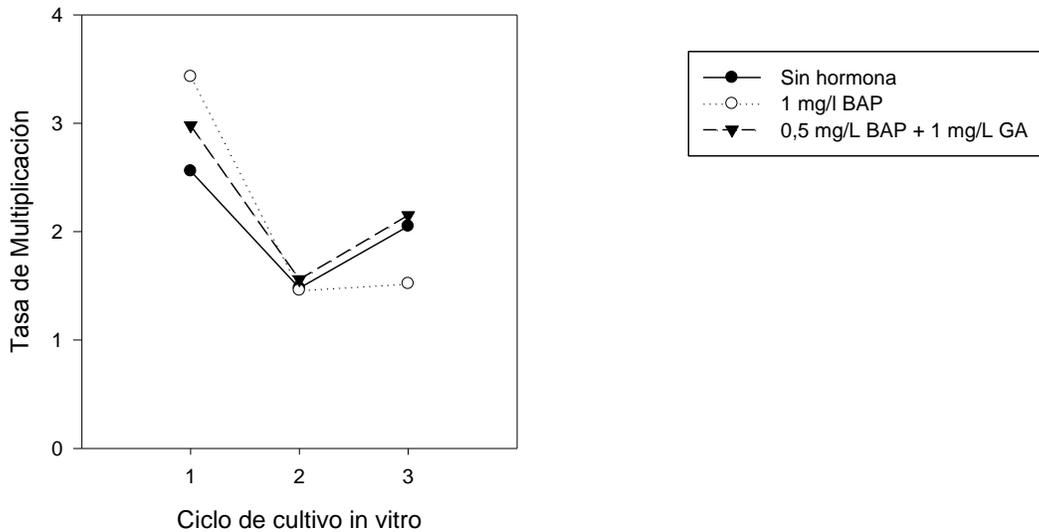


Gráfico 9: Efecto del contenido de la combinación de hormonas en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne sp.*



Gráficos 10 y 11: Efecto del contenido de la temperatura de incubación en la formación de bulbos de *Leucocoryne sp.*

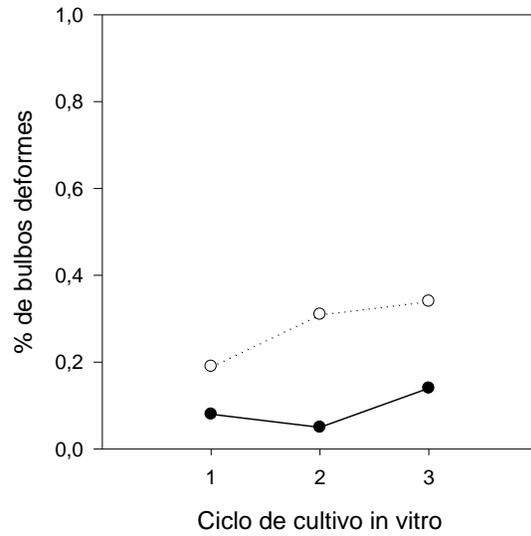
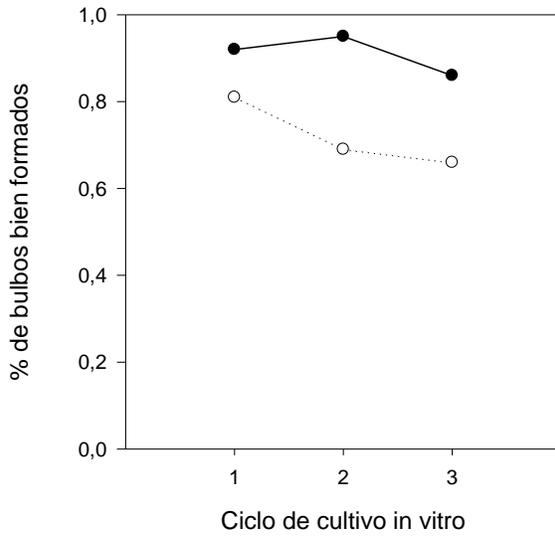
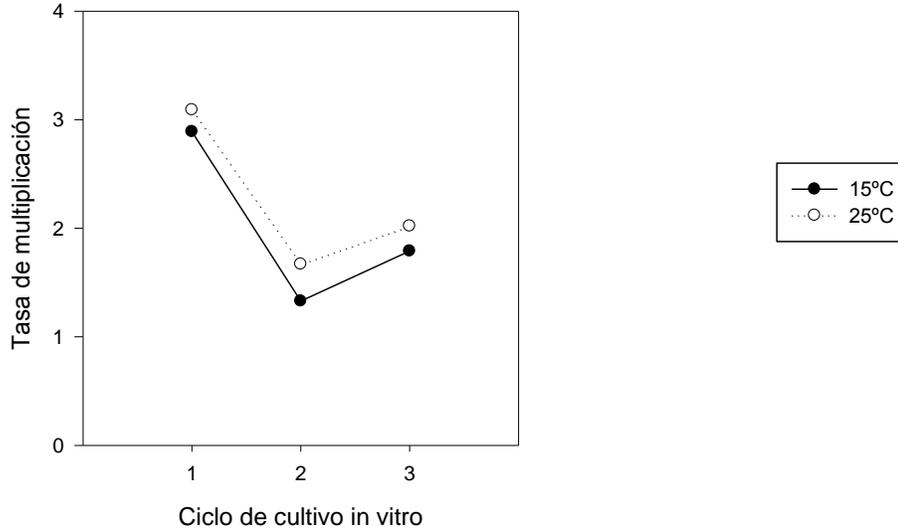
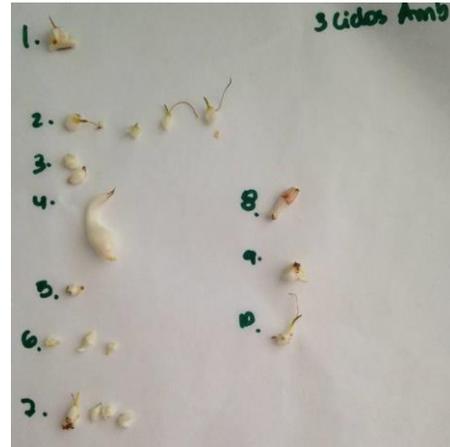


Gráfico 12: Efecto del contenido de la temperatura de incubación en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne sp.*





15°C
Sin
Hormona



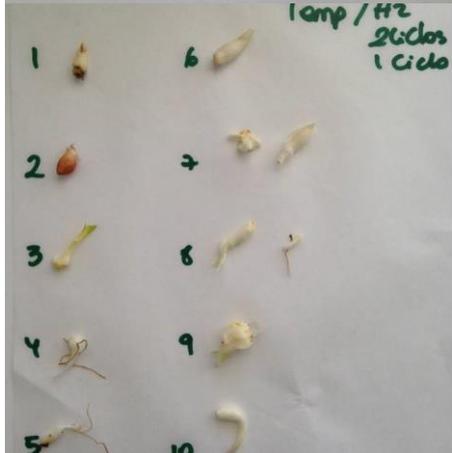
25°C
Sin
Hormona



15°C
0,5 mg/l BAP
+
1mg/l GA



25°C
1 mg/l BAP



15°C
1 mg/l BAP

Imagen nº 2: Evaluación tasa de multiplicación y calidad de bulbos de *Leucocoryne* sp. cultivado en 3 combinaciones de hormona a dos temperaturas de cultivo.

Ensayo n°3: Determinación del regulador de crecimiento del tipo Citoquinina para ser utilizado en micropropagación de *Leucocoryne* sp.

El objetivo del experimento es comparar el efecto de distintas citoquininas en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne* sp. Se estableció un ensayo completamente al azar con 50 repeticiones. Se probaron los reguladores de crecimiento kinetina, BAP, zeatina y meta-topolín a razón de 1mg/l.

Sólo en el tercer ciclo de multiplicación se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de multiplicación de bulbos debido al tipo de hormona citoquinina utilizada ($p < 0,0001$), siendo la hormona zeatina (4,28 bulbos) la que mayor tasa indujo seguida por la hormona BAP con una tasa de 3,62. Esta tendencia había sido observada durante los dos primeros ciclos de cultivo, sin embargo no mostraba significancia estadística en ese momento. Al analizar la proporción de bulbos bien formados que se obtuvieron, medición realizada en los ciclos 2 y 3 solamente, se puede concluir que las hormonas kinetina y metatopolín inducen la producción de una mayor cantidad de bulbos bien formados ($p < 0,0001$ en ambos ciclos) mientras que BAP y zeatina produjeron la mayor cantidad de material deforme, particularmente el material cultivado con zeatina presentó algo de vitrificación y gran producción de clumps (macizos de multiplicación con microbulbos poco diferenciados) y deformidades. A su vez, el material cultivado con metatopolin produjo gran cantidad de hojas, lo que tiende a entorpecer las labores de multiplicación y repique.

Con tales antecedentes se puede concluir que la hormona que permite obtener la mayor tasa de multiplicación de material bien formado es la hormona BAP en una concentración de 1mg/l.

Gráficos 13 y 14: Efecto del tipo de hormona en la formación de bulbos de *Leucocoryne* sp.

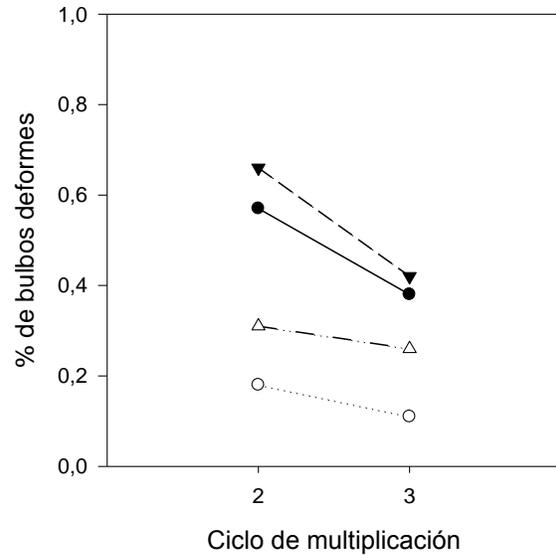
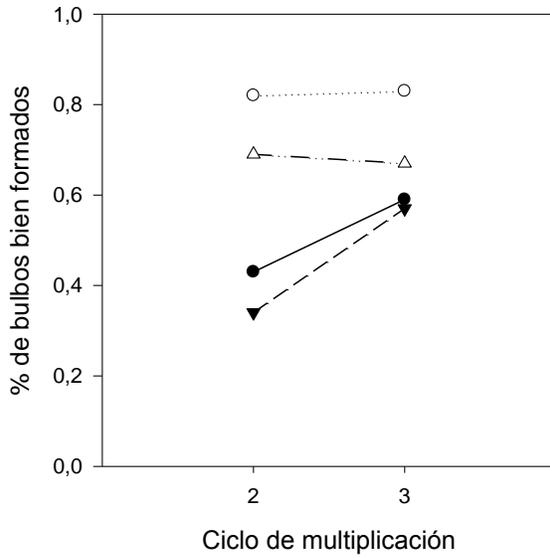
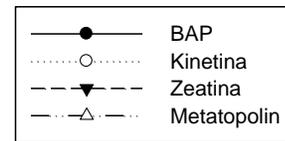
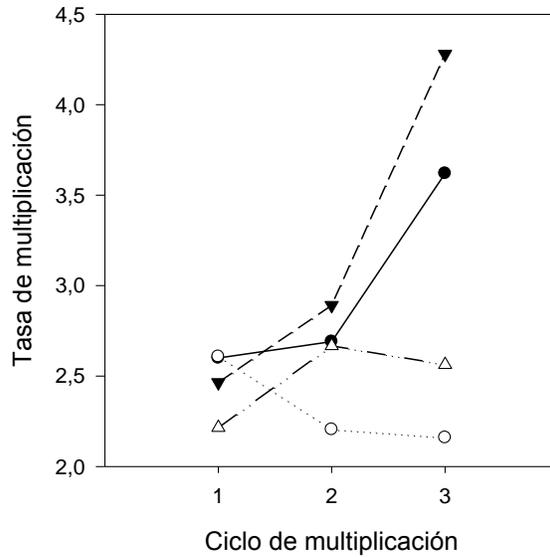


Gráfico 15: Efecto del tipo de hormona en la tasa de multiplicación de *Leucocoryne* sp.



Anexo II-3

INFORME

Evaluación Costo/Beneficio de la Técnica Mejorada de Propagación In Vitro de Bulbos de Leucocoryne

**PROYECTO CÓDIGO
PYT-2012-0079**

**Mejoramiento de la técnica de propagación in vitro
para producción comercial de planta nativa chilena Leucocoryne.**

Julio 2015 - Noviembre 2015.

1.- INTRODUCCIÓN

OBJETIVO y METODOLOGÍA

Se ha preparado el informe Evaluación Costo/Beneficio de la Técnica Mejorada de Propagación In Vitro de bulbos del *Leucocoryne* teniendo presente el cumplimiento del objetivo específico y la metodología comprometida.

Como ayuda memoria se muestra tabla con objetivo, descripción de metodología y actividades mencionadas en el Plan de Trabajo.

Objetivo N° 3	Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.
Basado en los antecedentes de la técnica mejorada de cultivo in vitro que se obtendrá en el OE N°2 y antecedentes de la producción a escala piloto del OE N°4 se podrá hacer un cálculo de costo relacionada con la producción de bulbos de <i>Leucocoryne</i> por medio de la técnica mejorada de propagación in vitro. Se implementarán los registros de costos y manejo técnico correspondientes para evaluar protocolo y sistema de producción desarrollados.	

Actividad
3.1.- Evaluación costo/beneficio de la técnica mejorada de propagación in vitro.

2.1.- ANTECEDENTES DE LA SITUACIÓN DE MERCADO

Basado en Informe Situación de Mercado del Leucocoryne, se entrega el siguiente resumen:

- El principal uso del Leucoryne es como flor de jardín y como flor de corte.
- El principal proveedor de bulbos de Leucocoryne es Holanda. El precio unitario promedio por bulbo es USD 0,10 a nivel de proveedor mayorista (www.bulbonawire.com). La unidad de comercialización es de 1.000 a 5.000 bulbos por bolsa.
- Como flor de jardín, se comercializan en los principales mercados mundiales (Europa, Estados Unidos y Japón) bulbos secos de Leucocoryne en bolsas con 5 a 20 bulbos con un precio unitario por bulbo de USD 0,50 a USD 1,00 por bulbo.
- Flores de corte de Leucocoryne son, principalmente, producidas y comercializadas en Japón.
- A nivel nacional, el precio a productor por flores de corte de Leucocoryne podría ser de USD 0,20.
- La producción de flores de corte de Leucocoryne es tan competitivo como lo es la producción de flores de Fresia.
- Es extraordinariamente relevante para la rentabilidad del productor de flores la capacidad de reutilizar los bulbos de Leucocoryne durante más de dos temporadas.

MÁS ANTECEDENTES DE SITUACIÓN DE MERCADO

Tamaño de Mercado Internacional

- Según Mr. Henk Beentjes de la empresa BulbsOnaWire (www.bulbonawire.com), Alkmaar, Holanda, el tamaño del mercado es de 1.500.000 bulbos/año (julio, 2013) con una estimación de crecimiento de 12,5% anual durante los próximos 5 años.
- Según Mr. Nozomu Nishio, Gerente de División Flores de la empresa Yokohama UEKI Co. Ltd., Japón, la importación de bulbos de Leucocoryne al mercado japonés es de 300.000 bulbos/año (diciembre, 2013). En visita realizada a Chile en abril 2015 indicó que las variedades ofrecidas por los holandeses no son del gusto del mercado japonés. Mr. Nishio manifestó su deseo de que se desarrollen nuevas variedades, adecuadas al gusto del mercado japonés, que seguramente traerán como consecuencia un incremento sustantivo de la demanda.
- La empresa nacional comercializadora de bulbos Paz y Flora Ltda. (<http://www.pazyflora.cl/>) comunicó el interés de empresa sudafricana Hadeco® (<http://www.hadecoshop.com/>) de importar 50.000 bulbos (febrero, 2014) como primera experiencia de importación.
- Existe un alto potencial de mercado en el estado de California, Estados Unidos, que no ha sido desarrollado.

Experiencias en Mercado Nacional

- Bulbos para jardín. Durante las temporadas 2014 y 2015 se han comercializado 1.200 bulbos anuales (US\$ 0,20/bulbo) por medio de empresa Paz y Flora Ltda. (<http://www.pazyflora.cl/>) quién los ha comercializado en la sección de jardín de Homecenter en bolsas con 5 bulbos cada una (precio al consumidor final \$4.500 la bolsa, US\$ 1,5/bulbo).
- Bulbos para macetas. En visita realizada por Sra. Anne Kamp de Vivero Pochay (www.viveropochay.cl), octubre 2015, manifiesta interés de comprar 5.000 bulbos a US\$ 0,20 cada uno para ofrecer Leucocoryne en macetas para próxima temporada.

2.2.- ANTECEDENTES DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA EN CAMPO

El bulbo floral (bulbo madre) del *Leucocoryne* tiene la característica de que al término de la temporada de cultivo conserva o aumenta su tamaño pudiendo ser reutilizado como bulbo floral en la siguiente temporada de cultivo.

El bulbo floral (bulbo madre) del *Leucocoryne* tiene la característica de que durante su cultivo produce nuevos bulbos. Dependiendo de la especie, genotipo y tamaño del bulbo, un bulbo floral (bulbo madre) de *Leucocoryne* puede presentar una Tasa de Multiplicación Vegetativa en Campo [(nº bulbos nuevos + bulbo madre)/(bulbo madre)] en un año en un rango de 1,1 a 2,5 pudiendo en algunos individuos superar el valor 4.

Es deseable que las variedades clonales de *Leucocoryne* presenten la característica de una alta Tasa de Multiplicación Vegetativa en Campo en un año ($\geq 2,5$). La empresa Mansur Agricultural Service Ltda. ha identificado variedades clonales (flor de corte, maceta y jardín) que cumplen con esta característica (Anexo 1 y 2).

Ejemplo de distintas Tasas de Multiplicación Vegetativa en Campo se presentan en Fig. 1.

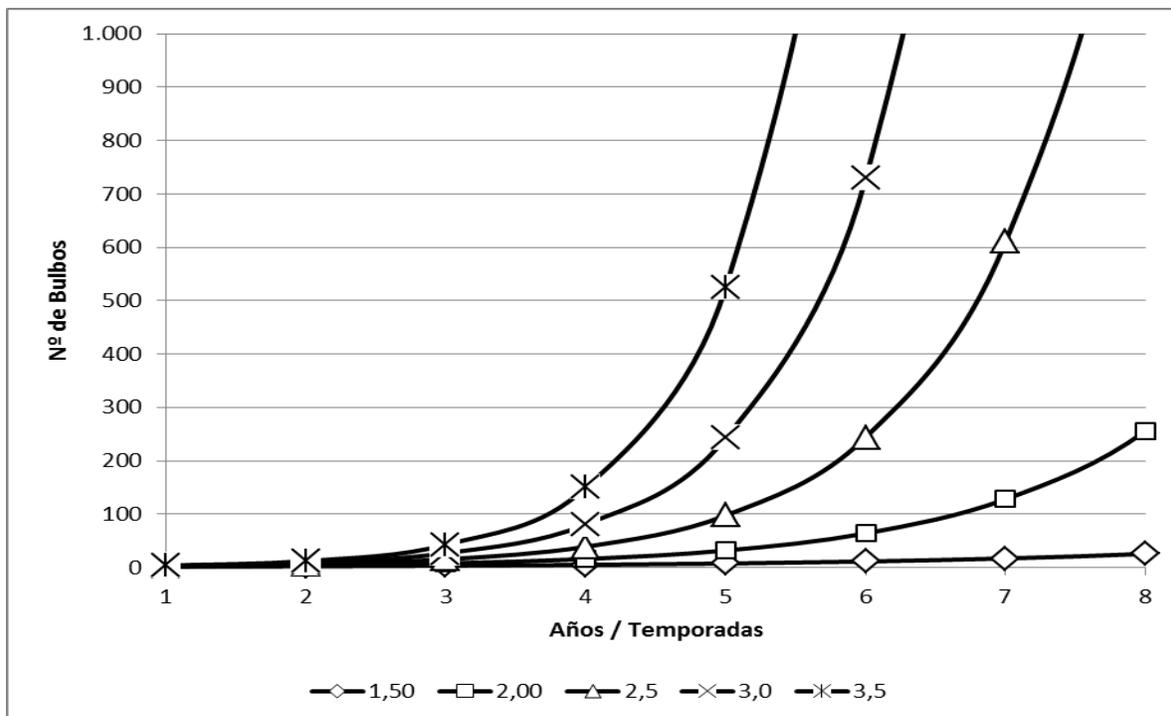


Fig. 1. Incremento del Número de Bulbos de *Leucocoryne* según Tasa de Multiplicación Vegetativa Anual en Campo.

2.3.- ANTECEDENTES DE LA PROPAGACIÓN IN VITRO

Grandes avances se han realizado durante la ejecución del proyecto FIA PYT-2012-0079. De acuerdo a lo informado, en una primera etapa se logró obtener una Tasa de Multiplicación In Vitro de 300 bulbos / explante / 3 años. No obstante, según resultados preliminares de recientes experimentos encargados al Centro de Investigación, Desarrollo e Innovación (CIDI) del Grupo Hijuelas se ha logrado mejorar la tasa. Actualmente, a nivel experimental, se cuenta con una Tasa de Multiplicación In Vitro de Bulbos de Leucocoryne de 300 bulbos / explante / 2 años cumpliendo con el OE2.

En última visita (diciembre, 2015) realizada al CIDI-Grupo Hijuelas con ejecutivo FIA, Sr. René Martorell, la opinión técnica de los investigadores del CIDI (Ing. Agr. Ph.D. María José Montañola y del Ing. Agr. M.Sc. Pablo Morales) es que la tasa de multiplicación para etapa de multiplicación in vitro es similar al Liliium.

Se adjunta en Anexo 3, cotización actualizada de producción de 30.000 bulbos in vitro de Leucocoryne entregada por el CIDI-Grupo Hijuelas a partir de 50 a 100 bulbos indicándose tiempo y ciclos de multiplicación requeridos.

Importante destacar que en opinión del experto Dr. Arie Petersen, fitomejorador de plantas bulbosas de la empresa holandesa Gerb Vletter & Demm Han, una alta Tasa de Multiplicación In Vitro es deseable pero no debiera considerarse una condición limitante para el desarrollo de variedades clonales de bulbosas como el Leucocoryne. Más detalles se encuentran en Anexo 3.

3.1.- IMPORTANCIA DEL CULTIVO IN VITRO

Una alta Tasa de Multiplicación In Vitro permite la obtención de un número importante de bulbos en menos tiempo. La situación actual del *Leucocoryne*, considerando una Tasa de Multiplicación In Vitro de 300 bulbos/explante/2años y una Tasa de Multiplicación en Campo de 2,5, permite una ganancia de 3 años.

A modo de ejemplo, se presenta el caso de incremento del número de bulbos de *Leucocoryne* a partir de 100 bulbos (Fig. 2). Se asume que el primer año en que los bulbos provenientes de cultivo in vitro son cultivados en condiciones de campo, estos solamente incrementaran su peso sin formar nuevos bulbos.

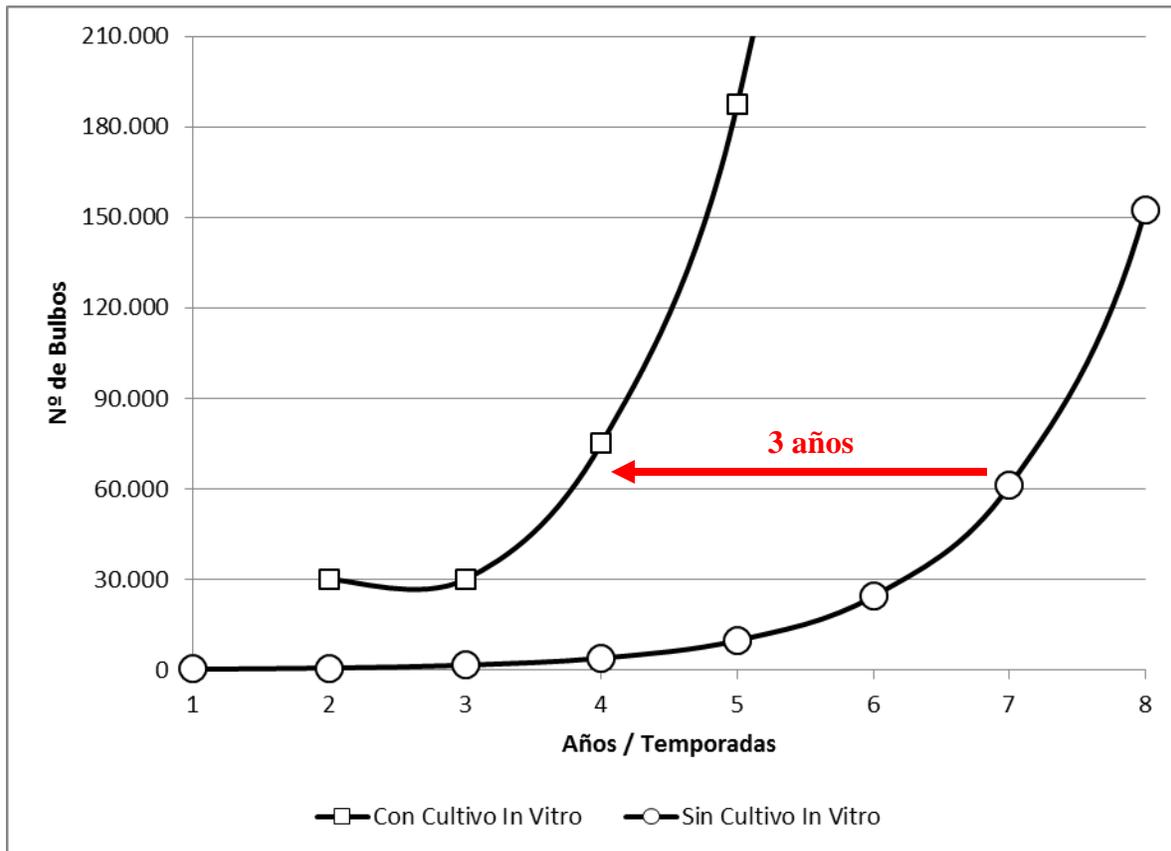


Fig. 2. Incremento del Número de Bulbos de *Leucocoryne* con y sin etapa *in vitro* (2 años) seguido de años de multiplicación en campo.

3.2.- IMPORTANCIA DEL CULTIVO EN CAMPO

Un bulbo producido in vitro es caro y el caso del *Leucocoryne* no es la excepción. Un bulbo de *Leucocoryne* producido in vitro puede llegar a costar \$250 pesos (USD 0,36) y no es viable su comercialización. Al igual que sucede en otras especies bulbosas comerciales como el *Lilium*, para poder llegar a obtener un bulbo a precios competitivos se debe incurrir en sucesivos periodos de cultivo en campo que permitan incrementar su número y reducir el costo unitario del bulbo.

El cultivo en campo de *Leucocoryne* debe permitir obtener bulbos cuyo costo de producción para el agricultor sea de \$25 pesos (USD 0,036) por bulbo plantado. Lo anterior lo logran agricultores holandeses gracias a una buena elección de áreas con clima favorable junto con un alto nivel de mecanización en labores de plantación, cosecha y selección de bulbos. El precio unitario promedio por bulbo, a nivel de proveedor mayorista, es USD 0,10.

Otro elemento importante es que las variedades clonales utilizadas se deben caracterizar por presentar una alta Tasa de Multiplicación en Campo en un año ($\geq 2,5$).

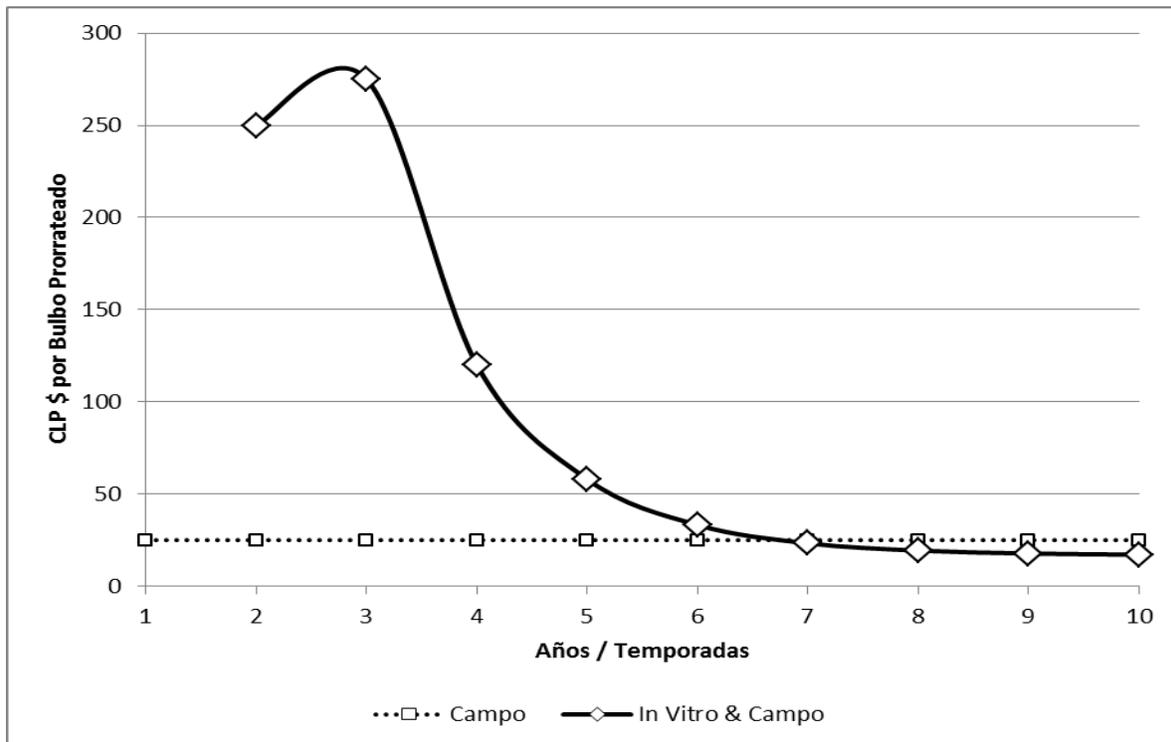


Fig. 3. Precio del bulbo en CLP de *Leucocoryne* prorrateado en el tiempo. Supuesto: Tasa de Multiplicación In Vitro = 300 bulbos/explante/2años; Tasa de Multiplicación Vegetativa en Campo = 2,5 bulbos/año.

4.- SIMULACIÓN DE UNA PRODUCCIÓN COMERCIAL DE BULBOS

Como una manera de evaluar económicamente el uso de la técnica de cultivo in vitro en la producción comercial de bulbos de *Leucocoryne*, se ha desarrollado la siguiente simulación con los siguientes antecedentes:

Mercado

Considerando que el valor de venta promedio de un bulbo de *Leucocoryne* a nivel de proveedor mayorista en Holanda es de USD 0,10 (CLP 70), se asume que el valor de venta promedio de un bulbo de *Leucocoryne* a nivel de productor en Holanda es de USD 0,06 (CLP 42). A nivel nacional, la empresa Mansur Agricultural Service Ltda., como proveedor mayorista de bulbos, los ha comercializado desde USD 0,20 (CLP 140).

Técnico

El *Leucocoryne* puede ser multiplicado in vitro a una tasa de 300 bulbos / explante / 2 años y un costo de USD 0,36 (CLP 250). Durante la primera temporada de cultivo en campo, se espera que los bulbos provenientes de cultivo in vitro ganen peso y no se multipliquen. En las siguientes temporadas de cultivo, se espera que presenten su Tasa de Multiplicación en Campo característica.

El *Leucocoryne* puede ser multiplicado en campo a una tasa de 2,5 bulbos por año y a un costo de USD 0,036 (CLP 25) por bulbo plantado (valor estimado basado en realidad holandesa). A nivel nacional, no existe experiencia de una producción comercial de bulbos de *Leucocoryne*. Si se considera que el cultivo del *Leucocoryne* es similar al ajo, el costo de producción por bulbo plantado se estima en USD 0,020 (CLP 14).

Evaluación Financiera

Para la evaluación financiera de la producción de bulbos se calculará el VAN y el TIR.

Basado en los antecedentes técnicos se ha simulado una producción de bulbos de *Leucocoryne* que, en un horizonte de 10 años, permitirá ofrecer a la venta 525.000 bulbos / año producidos en una superficie de 0,5 ha. (Tabla 1).

Se han utilizado como escenario base una situación similar a un productor holandés (producción mecanizada, precio y costo productor holandés estimado).

Tabla 1. Producción y venta de bulbos de Leucocoryne a partir de 30.000 bulbos in vitro en un horizonte de 10 años.

Año / Temporada	Nº Bulbos Inicio	Superficie Requerida	Nº Bulbos Término	VENTA Nº Bulbos
1	100			
2			30.000	
3	30.000	0,04	30.000	
4	30.000	0,04	75.000	5.000
5	70.000	0,10	175.000	35.000
6	140.000	0,20	350.000	140.000
7	210.000	0,30	525.000	245.000
8	280.000	0,40	700.000	350.000
9	350.000	0,50	875.000	525.000
10	350.000	0,50	875.000	525.000

Lo anterior permite calcular el flujo de efectivo del proyecto en el escenario base (Tabla 2) que demanda una inversión de CLP 8.346.000. El proyecto presenta un VAN de \$10.296.468 a una tasa de 10%. y un TIR de 22%.

Tabla 2. Flujo de efectivo (CLP) de la producción de bulbos de Leucocoryne en un horizonte de 10 años para escenario a) Producción Mecanizada.

Año / Temporada	Ingresos	Egresos	Flujo Efectivo
0		6.750.000	- 6.750.000
1			
2			
3		756.000	- 756.000
4	210.000	756.000	- 546.000
5	1.470.000	1.764.000	- 294.000
6	5.880.000	3.528.000	2.352.000
7	10.290.000	5.292.000	4.998.000
8	14.700.000	7.056.000	7.644.000
9	22.050.000	8.820.000	13.230.000
10	22.050.000	8.820.000	13.230.000

Un análisis de sensibilidad con un costo de USD 0,020 (CLP 14) por bulbo plantado (valor estimado basado en comparación con cultivo de ajo), el proyecto presenta un VAN de \$17.994.008 a una tasa de 10%. y un TIR de 28%.

Un análisis de sensibilidad con un precio de bulbo USD 0,20 (CLP 140) (valor estimado basado en precio de comercialización obtenidos por la empresa Mansur Agricultural Service Ltda.), el proyecto presenta un VAN de \$44.662.400 a una tasa de 10%. y un TIR de 40%.

Se entrega copia digital de archivo de simulación en MS Excel para estimación de nuevos escenarios.

...

5.- EVALUACIÓN COSTO/BENEFICIO CON TÉCNICA IN VITRO

Se entregan las principales ideas sobre la evaluación costo/beneficio de producir bulbos de variedades clonales apoyados con técnica de cultivo in vitro.

- Es deseable que las variedades clonales de Leucocoryne presenten la característica de una alta Tasa de Multiplicación Vegetativa en Campo en un año ($> 2,5$).
- La actual Tasa de Multiplicación In Vitro de bulbos de Leucocoryne es de 300 bulbos / explante / 2 años. Similar a la presentado por Lilium.
- Una alta Tasa de Multiplicación In Vitro es deseable pero no debiera considerarse una condición limitante para el desarrollo de variedades clonales de bulbosas como el Leucocoryne (opinión de experto Dr. Arie Petersen, Septiembre 2015).
- La actual Tasa de Multiplicación In Vitro de bulbos de Leucocoryne permite una ganancia de tiempo de 3 años.
- Un bulbo producido in vitro es caro, pero se puede reducir su costo luego de sucesivas temporadas de cultivo en campo.
- Simulando una producción piloto de 525.000 bulbos/año en 0,5 ha, se requiere una inversión de CLP 8 millones. Se estima un VAN de CLP 10 millones a una tasa de 10% y un TIR de 22%.

VARIEDADES DE FLOR DE CORTE – Colección de germoplasma UCV-MAS

<p>Gabriela ®</p>	 <p>E529</p>	 <p>E531</p>	 <p>E532</p>
<p>Paulina ®</p>	 <p>E528</p>	 <p>E626</p>	 <p>E627</p>
<p>Elena ®</p>	 <p>E501</p>	 <p>E607</p>	 <p>E609</p>
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Blanco</i></p>	 <p>E526</p>		
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Pastel</i></p>	 <p>E527</p>	 <p>E420</p>	
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Rayado Lila</i></p>	 <p>E624</p>		
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Lila</i></p>	 <p>E402</p>		

<p>Var. Potencial</p> <p><i>Tépalo color pastel ligeramente rayado</i></p>	 <p>E630</p>	 <p>E539</p>	
<p>Var. Potencial</p> <p><i>Tépalo ligeramente rayado</i></p>	 <p>E633</p>	 <p>E542</p>	

Potenciales VARIEDADES DE JARDÍN – Colección de germoplasma UCV-MAS

Tipo Flor Jardín	Tépalo Color Blanco	Tépalo Color Lila	Tépalo Rayado
Alto (50 a 70 cm)	 <p>E523</p>  <p>E524</p>	 <p>E618</p>	
Bajo (30 a 40 cm)	 <p>E552</p>  <p>E555</p>	 <p>E104</p>  <p>E621</p>  <p>E622</p>	 <p>E122</p>  <p>E414</p>  <p>E637</p>
Bajo c / aroma	 <p>E548</p>  <p>E625</p>	 <p>E560</p>	

Anexo II-4

Hijuelas, 18 de enero de 2016.

ATENCIÓN

Dr. Levi Mansur

Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Ref: Cotización servicio de propagación masiva de *Leucocoryne* sp..

Estimado Sr. Mansur:

Junto con saludarle, nos dirigimos a usted para entregar la cotización por el servicio de propagación masiva de *Leucocoryne* sp.

El ciclo de cultivo a realizar sería el siguiente:

1. Iniciaciones: enero de 2016 lotes de 50 o 100 bulbos. (semanas 1 a 16). Proceso en el cuál se procede a esterilizar el material y establecer el cultivo in vitro de microbulbos.
2. Multiplicación: 7 ciclos de multiplicación semanas 16 a 72. Proceso en el cual se multiplica en forma exponencial los microbulbos.
3. Engorda: 1 ciclo de engorda. Proceso en el cual todo el material bien formado es subcultivado para aumentar su masa fresca y seca.
4. Entrega de bulbos de a lo menos 0,5 gr en Agosto de 2017.

Se adjunta cotización por cultivo y multiplicación de una sola variedad.

I. Cotización:

Ítem	Valor unitario	unidades	Valor total
Iniciación			
Planta terminada*			
Subtotal			
IVA			
TOTAL			

*Planta terminada corresponde a bulbo de a lo menos 0,5 gr, listos para pasar a la etapa de aclimatación.

Se solicita ajustarse al siguiente calendario de pago del servicio en 3 cuotas, los montos indicados más abajo corresponden a la multiplicación de multiplicar una variedad de Leucocoryne.

- Ene 2016: (IVA incluido)
- Sep 2016: (IVA incluido)
- Ago 2017: (IVA incluido)

Sra. Patricia Sone

Presidente CIDI

Anexo II-5a

VARIETADES DE FLOR DE CORTE – Colección de germoplasma UCV-MAS

<p>Gabriela ®</p>	 <p>E529</p>	 <p>E531</p>	 <p>E532</p>
<p>Paulina ®</p>	 <p>E528</p>	 <p>E626</p>	 <p>E627</p>
<p>Elena ®</p>	 <p>E501</p>	 <p>E607</p>	 <p>E609</p>
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Blanco</i></p>	 <p>E526</p>		
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Pastel</i></p>	 <p>E527</p>	 <p>E420</p>	
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Rayado Lila</i></p>	 <p>E624</p>		
<p>Var. Potencial <i>Tépalo Color Lila</i></p>	 <p>E402</p>		

<p>Var. Potencial</p> <p><i>Tépalo color pastel ligeramente rayado</i></p>	 <p>E630</p>	 <p>E539</p>	
<p>Var. Potencial</p> <p><i>Tépalo ligeramente rayado</i></p>	 <p>E633</p>	 <p>E542</p>	

Anexo II-5b

Potenciales VARIEDADES DE JARDÍN – Colección de germoplasma UCV-MAS

Tipo Flor Jardín	Tépalo Color Blanco	Tépalo Color Lila	Tépalo Rayado
Alto (50 a 70 cm)	 E523  E524	 E618	
Bajo (30 a 40 cm)	 E552  E555	 E104  E621  E622	 E122  E414  E637
Bajo c / aroma	 E548  E625	 E560	

Anexo VII-1

RESPUESTA DE DIFERENTES GENOTIPOS DEL GÉNERO *Leucocoryne* EN EL DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE MULTIPLICACIÓN CLONAL MASIVA IN VITRO

Alejandro Altamira(1)*, Levi Mansur(2), Eduardo Olate(1)

1 Depto. de Cs. Vegetales, Facultad de Agronomía e Ing. Forestal, PUC.
2 Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

FORMATO PRESENTACIÓN

Poster

TIPO DE TRABAJO

Investigación

LÍNEA TEMÁTICA

Domesticación

I. INTRODUCCIÓN

Leucocoryne es un género de plantas geófitas endémico de Chile, perteneciente a la familia Alliaceae. Existen alrededor de 15 a 20 especies distribuidas desde zonas desérticas cercanas a Antofagasta hasta zonas húmedas de la región del Biobío, aunque su mayor diversidad se encuentra en las regiones de Coquimbo y de Valparaíso. Las plantas de este género poseen pequeños bulbos del tipo tunicado y presentan un escapo floral de 30 a 80 cm de altura, con una inflorescencia del tipo umbela con 3 a 12 flores. Su ciclo de vida por lo general toma tres a cuatro años desde semilla hasta la producción de bulbo floral.

El género *Leucocoryne* es conocido nacionalmente por el nombre común de “huilli” y a nivel internacional como “Glory of the Sun”, y presenta cualidades excepcionales para ser utilizado como flor de corte, en macetas y paisajismo, esto debido a que posee una larga vida en florero y una gran variedad fenotípica, que queda de manifiesto en la diversidad de formas, diseños, colores y aromas. Su valor ornamental ha determinado que ya esté siendo estudiado y comercializado en Japón, Holanda y Nueva Zelanda. Con el fin de aprovechar el potencial comercial y proteger el patrimonio genético se ha desarrollado un programa de mejoramiento genético en la P. Universidad Católica de Valparaíso, el cual a la fecha ha patentado y registrado a nivel internacional

tres cultivares de flor de corte. Debido a las desventajas que presenta la propagación vegetativa convencional y la heterogeneidad de la propagación por semillas, este trabajo apunta hacia uno de los desafíos todavía pendientes, que es la creación y optimización de protocolos eficientes de propagación clonal masiva in vitro para la comercialización de nuevos cultivares.

II. METODOLOGÍA

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Cultivo in vitro y Ornamentales, en la Facultad de Agronomía e Ing. Forestal de la P. Universidad Católica de Chile. Se establecieron bulbos de 4 genotipos de *Leucocoryne* en condiciones in vitro. Para este fin, se eliminó las túnicas protectoras y posteriormente fueron lavados bajo flujo de agua corriente. Al ingresarlos a la cámara de flujo laminar se asperjaron con etanol 70%, posteriormente se desinfectaron con cloro comercial (50 g•L⁻¹ NaOCl) y luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. La preparación de los explantes consistió en la eliminación de todas las catáfilas de reserva hasta llegar al punto de crecimiento, eliminando además la parte más externa del plato basal. Luego de esto fueron establecidos en tubos de ensayo con 20mL de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) con adición de 1,0 mg•L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA), 30 g•L⁻¹ de sacarosa como fuente de carbohidratos, 6 g•L⁻¹ de agar como agente gelificante y se ajustó el pH a 5,7.

Posteriormente fueron trasladados a cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta la semana 27 en que fueron trasladados a cámara de crecimiento con similares condiciones pero a $15\pm 2^{\circ}\text{C}$. Se realizaron transferencias a medios frescos cada 10 semanas. Los genotipos iniciados correspondieron a *Leucocoryne vittata*, y las selecciones clonales *Leucocoryne* spp. 'Marina', SPM-753 y SPM-157 (estas dos últimas provenientes del programa de Mejoramiento Genético de la PUCV). Se evaluó brotación, contaminación y multiplicación para cada genotipo, hasta 16 meses luego de iniciados los cultivos.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de establecimiento in vitro de los bulbos, la brotación alcanzó su máximo nivel para cada genotipo una vez transcurrido un mes desde que fueron iniciados. Los porcentajes variaron entre 67% y 100%, para los genotipos SPM157 y *Leucocoryne* spp. 'Marina', respectivamente. Una etapa crítica en la iniciación de material in vitro es la estabilización, lo que corresponde a la obtención de explantes viables y libres de contaminación. En este caso el máximo porcentaje de contaminación se observó en los genotipos SPM753 y SPM157 (33%), mientras que en *Leucocoryne vittata* solo se observó un 14%.

En cuanto a la capacidad de multiplicación se observó gran diferencia entre los genotipos. *Leucocoryne vittata* alcanzó una tasa de multiplicación de 6,71 tras 16 meses (70 semanas) de cultivo. Este genotipo presentó dos máximos distinguibles en la fase de multiplicación, alcanzando tasas de 2,50 y 2,75 al momento del segundo y cuarto ciclo de cultivo respectivamente. El primero de los peaks podría estar relacionado con una posible influencia del ritmo circadiano y el segundo peak podría estar asociado a la influencia del cambio en la T° de cultivo de 20°C a 15°C . En el genotipo SPM753

también se observó un peak en la tasa de multiplicación (3,20) después de la disminución en la temperatura de cultivo. El genotipo SPM157 obtuvo una tasa de multiplicación acumulada de 1,11 mientras que en *Leucocoryne* spp. 'Marina' dicho valor alcanzó solo 0,40 dado que en este caso no se logró multiplicar el material y, por el contrario, se observó una pérdida de explantes inicialmente estabilizados durante el transcurso del trabajo experimental.

IV. CONCLUSIONES

Mediante un adecuado proceso de desinfección fue posible establecer material in vitro de *Leucocoryne*. Dicho material fue estabilizado y posteriormente multiplicado exitosamente en tres de los cuatro genotipos evaluados. La eficiencia en la tasa de multiplicación in vitro varía notablemente entre genotipos. Este estudio es un aporte a la optimización en el desarrollo de protocolos de multiplicación clonal masiva in vitro para el género *Leucocoryne*.

V. BIBLIOGRAFÍA

- Araneda, L., Salas, P. y Mansur, L. 2004. Chromosome numbers in the Chilean endemic genus *Leucocoryne* (Huilli). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (1). 77-80.
- De la Cuadra, C. y Mansur, L. 2004. Descripción de la primera etapa del ciclo de vida de tres genotipos de *Leucocoryne* sp.: semilla a bulbo. *Agricultura técnica (Chile)*. 64(2):205-212 .
- Mansur, L., Zöellner, O., Riedemann, P., Verdugo, G. y Harrison, C. 2002. *Leucocoryne*: un género nativo chileno y su uso como planta de jardín. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile. REIMCO Ltda. Viña del Mar, Chile. 49 p. (Serie Manuales de Innovación Tecnológica para la Agricultura. Manual N ° 1).
- Olate, E. and Bridgen, M. 2005. Techniques for the in vitro propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* sp. In: *Proc IXth Intl. Symp. On Flower Bulbs*. Eds. Okubo, H., Miller, W.B. and Chastagner, G.A. *Acta Horticulturae (ISHS)* 673:335-342.
- Olate, E. and Schiappacasse, F. 2013. Geophyte Research and Production in Chile. In: Kamenetsky R. and Okubo H.(ed) *Ornamental Geophytes: From Basic Science to Sustainable Production*. Taylor and Francis Group, Boca Raton, pp 449-470
- Schiappacasse, F., Peñalillo, P. y Yañez, P. 2002. *Propagación de Bulbosas Chilenas Ornamentales*. Universidad de Talca. Primera edición. Chile. 65p.

Anexo VII-2

Modalidad:

Presentación en poster : X	Presentación Oral:
----------------------------	--------------------

indique con X

Título:

Efecto de la temperatura en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos de tres genotipos de *Leucocoryne* en condiciones *in vitro*.

en español, use mayúsculas y minúsculas, cursivas y sub/superíndice cuando corresponda

Autores:

Alejandro Altamira¹, Carlos De la Cuadra², Levi Mansur², Eduardo Olate¹,
Marlene Gebauer¹

Primer nombre (opcional: iniciales de otros nombres), Apellido, destaque en negritas el autor que presenta el trabajo (inscripto), indicar con superíndice sus afiliaciones

Filiaciones institucionales de los coautores:

¹ Facultad de Agronomía e Ing. Forestal. Pontificia Universidad de Católica de Chile.
² Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Resumen:

El género *Leucocoryne* pertenece a la familia Alliaceae, es endémico de Chile y está constituido por plantas del tipo geófitas. Las plantas de este género poseen pequeños bulbos del tipo tunicado y presentan flores con una gran diversidad de formas, diseños, colores y aromas, además de una larga vida en florero, por lo que presentan gran potencial para el rubro ornamental. Debido a este interés y para conservar su diversidad genética, se ha desarrollado un programa de Mejoramiento Genético, que a la fecha tiene aún pendiente el desafío de propagar masivamente el material genético. En búsqueda de optimizar el proceso de propagación se están evaluando diferentes factores para generar protocolos de multiplicación *in vitro*. Este trabajo se enfoca en el efecto de la temperatura en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos en condiciones *in vitro* en diferentes genotipos de *Leucocoryne*. Para esto se evaluó el cultivo bajo dos tratamientos de temperaturas 15°C y 20°C. Se utilizó medio MS aumentando su concentración de 12,5%, 25% y 50% en cada traspaso. Para el caso del tratamiento con 15°C la germinación observada fue entre 85% y 99% y se obtuvo entre 117 y 144 bulbos formados dependiendo del genotipo, mientras que con el tratamiento de 20°C la germinación

varió entre 49% y 84% obteniendo la formación de entre 67 y 107 bulbos. Se logró entonces optimizar un protocolo de iniciación en condiciones *in vitro* y se pudo observar que el tratamiento de menor temperatura tuvo efecto positivo en la germinación de semillas, formación y crecimiento de bulbos. Este estudio es una contribución al desarrollo de protocolos de micropropagación y cultivo en condiciones *in vitro* en el género *Leucocoryne*.

Agradecimientos:

Proyecto FIA: "Mejoramiento de la técnica de propagación *in vitro* para producción comercial de planta nativa chilena *Leucocoryne*" código PYT-2012-0079".

máx. 300 palabras incluido agradecimientos

Área temática:

Domesticación, Mejoramiento genético y Biotecnología

elija solo una de las siguientes:

Conservación, Servicios Ecosistémicos y Mitigación ambiental / Sanidad y Protección de Recursos Vegetales / Domesticación, Mejoramiento genético y Biotecnología / Fitoquímica y Bioprospección / Paisajismo y Educación Ambiental / Emprendimiento y Negocios en Plantas Nativas

Anexo VII-3

Modalidad:

Presentación en poster :	X	Presentación Oral:	
--------------------------	----------	--------------------	--

indique con X

Título:

Efecto de la Temperatura sobre la Germinación de Semillas del Género *Leucocoryne*.

en español, use mayúsculas y minúsculas, cursivas y sub/superíndice cuando corresponda

Autores:

C. de la Cuadra¹, K. Vidal¹, S. Lefimil², L. Mansur¹

Primer nombre (opcional: iniciales de otros nombres), Apellido, destaque en negritas el autor que presenta el trabajo (inscripto), indicar con superíndice sus afiliaciones

Filiaciones institucionales de los coautores:

¹ Escuela de Agronomía. Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

² Instituto de Biología. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

Resumen:

El género *Leucocoryne* es endémico de Chile, pertenece a la familia *Alliaceae*, y tiene potencial ornamental. En este trabajo, se analizó la germinación de semillas a 10, 15, 20 y 25 °C. Se utilizaron dos grupos: *Leucocoryne dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea*, *L. aff. vitatta*, *L. aff. violacescens* y *L. ixioides* previamente almacenadas por cuatro meses y; semillas de *L. purpurea*, *L. vittata*, *L. aff. vitatta* and *L. ixioides* previamente almacenadas por 16 meses. Para análisis de los datos de germinación se usó el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$, desarrollado por Mobayen (1980), en donde p es el porcentaje de germinación en el tiempo t , A es el máximo de germinación, t_0 es el tiempo estimado de germinación de la primera semilla, k es la medida de la extensión del tiempo de germinación y $1/t_{A/2}$ es la velocidad media de germinación. Cada curva de germinación tuvo un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0,89. Como resultado, los valores más altos de

germinación fueron obtenidos a temperaturas bajas (10 o 15°C) al comparar con temperaturas altas (20 o 25°C). En semilla almacenada por cuatro meses, cuando la temperatura se incrementó de 10 o 15°C a 20°C, A disminuyó un mínimo de 30% y fue casi cero a 25°C. Similar respuesta fue observada en semilla almacenada por 16 meses, pero A disminuyó aproximadamente un 20% a 20°C y fue casi cero a 25°C. Cuando no existieron diferencias en A para 10 y 15°C, se utilizaron los parámetros t_0 , k y $1/t_{A/2}$ para buscar diferencias y los datos sugieren que 15°C sería la mejor condición. Se concluye que este hábito de germinación es una adaptación a su hábitat natural. Se discute algún tipo de dormancia a nivel de semilla podría estar presente y nuevos experimentos se requieren para un mejor entendimiento.

Agradecimientos: Proyecto FIA N° PTY-2012-0079

máx. 300 palabras incluido agradecimientos

Área temática:

Domesticación, Mejoramiento genético y Biotecnología

elija solo una de las siguientes:

Conservación, Servicios Ecosistémicos y Mitigación ambiental / Sanidad y Protección de Recursos Vegetales / Domesticación, Mejoramiento genético y Biotecnología / Fitoquímica y Bioprospección / Paisajismo y Educación Ambiental / Emprendimiento y Negocios en Plantas Nativas

Efecto de la Temperatura sobre la Germinación de Semillas del Género *Leucocoryne* (Alliaceae)

De la Cuadra^{1*}, C.; Vidal¹, K.; Lefimil¹, S. y Mansur¹, L.

¹Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

El *Leucocoryne* es una bulbosa endémica. Su hábitat se extiende de Iquique (lat. 20° S) a la Región de Los Lagos (lat. 39° S) (Muñoz, 2000; Zoellner, 1972). Presenta un alto valor ornamental (Jara et al., 2006; De la Cuadra et al., 2002); a 20 °C la germinación es cercana a cero para *L. coquimbensis*, *L. purpurea* y *L. ixiooides* (Schiappacasse et al., 2005); y a 25 °C la germinación es inhibida totalmente para *L. purpurea* (Jara et al., 2006).

GERMINACIÓN

A 10 °C se obtiene germinación sobre el 85% en *L. coquimbensis* y *L. purpurea* (Jara et al., 2006; De la Cuadra et al., 2002); a 20 °C la germinación es cercana a cero para *L. coquimbensis*, *L. purpurea* y *L. ixiooides* (Schiappacasse et al., 2005); y a 25 °C la germinación es inhibida totalmente para *L. purpurea* (Jara et al., 2006).

Este trabajo tiene como objetivo conocer el efecto de la temperatura (10, 15, 20 y 25 °C) considerando siete genotipos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas cosechadas en Quillota (lat. 32° S) y almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente (20 ± 5 °C).

La germinación se realizó en papel húmedo en oscuridad. Se utilizó cuatro repeticiones con 50 semillas cada una por genotipo por cada temperatura. Se consideró germinada cuando la radícula fue de 2 mm. Si el genotipo no alcanzó el 85% de germinación en al menos una temperatura, se realizó un test de tetrazolium (ISTA, 2003).

Los datos de germinación de cada combinación genotipo temperatura de cada experimento fue ajustada según el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$ desarrollado por Mobayen (1980), en donde p es el porcentaje de germinación en el tiempo (t).

RESULTADOS

Las curvas de germinación se ajustan al modelo descrito por Mobayen (1980) presentando altos coeficientes de determinación (R^2).

En semilla almacenada por 4 meses, todos los genotipos alcanzan su máxima germinación a 10 °C. A 15 °C, *L. aff. violascens* y *L. ixiooides* disminuyen en 30%. A 20 °C, disminuye significativamente, siendo nula a 25 °C. (Tabla 1)

Si la semilla es almacenada por 16 meses, todos los genotipos alcanzan su máxima germinación a 10 y 15 °C. A 20 °C, disminuye un 30%, siendo nula a 25 °C. (Tabla 2)

Todos los genotipos alcanzaron una germinación superior al 88% a excepción de *L. dimorphopetala* con 53%. Test de tetrazolium indicó viabilidad de 84%.

Tabla 1. Efecto de la temperatura en la germinación de semilla de *Leucocoryne* almacenada por cuatro meses usando el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$.

A = porcentaje máximo de germinación t_0 = tiempo de germinación de primera semilla
k = medida de dispersión de la germinación $1/A_{0.2}$ = velocidad media de germinación

Temperatura	R ²	A (%)	t ₀ (d)	k(d ⁻¹)	1/A _{0.2} (d ⁻¹)
<i>L. dimorphopetala</i>					
10°C	0.98	48 a ^y	6.4 a	0.164 b	0.094 a
15°C	0.91	53 a	4.7 a	0.417 ab	0.157 a
20°C	0.91	12 b	3.8 a	0.361 a	0.176 a
25°C	† ^z	0			
<i>L. coquimbensis</i>					
10°C	0.95	93 a	8.3 a	0.319 a	0.096 a
15°C	0.99	92 a	5.2 a	0.459 a	0.149 a
20°C	0.95	59 b	6.8 a	0.214 a	0.099 a
25°C	†	0			
<i>L. purpurea</i>					
10°C	0.96	85 a	7.8 a	0.342 a	0.102 a
15°C	0.97	89 a	5.2 a	0.604 a	0.158 a
20°C	0.99	54 b	4.2 a	0.309 a	0.155 a
25°C	†	1			
<i>L. aff. violascens</i>					
10°C	0.96	96 a	8.7 a	0.355 a	0.094 a
15°C	0.93	68 b	6.0 a	0.498 a	0.135 a
20°C	†	0			
25°C	†	0			
<i>L. aff. vittata</i>					
10°C	0.96	94 a	8.1 a	0.518 a	0.106 a
15°C	0.97	95 a	5.3 a	0.837 ab	0.164 a
20°C	0.91	30 b	7.7 a	0.205 b	0.090 a
25°C	†	0			
<i>L. ixiooides</i>					
10°C	0.97	88 a	8.6 a	0.213 ab	0.084 b
15°C	0.99	58 b	5.2 a	0.225 a	0.120 a
20°C	0.97	17 c	5.8 a	0.172 b	0.102 ab
25°C	†	2			

[†] No se ajustó el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$ por escasez de puntos de la curva de germinación.
^z Valores seguidos de letras iguales no presentan diferencias significativas con $\alpha \leq 0.05$.

Tabla 2. Efecto de la temperatura sobre la germinación de semilla de *Leucocoryne* almacenada por 16 meses usando el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$.

A = porcentaje máximo de germinación t_0 = tiempo de germinación de primera semilla
k = medida de dispersión de la germinación $1/A_{0.2}$ = velocidad media de germinación

Temperatura	R ²	A (%)	t ₀ (d)	k(d ⁻¹)	1/A _{0.2} (d ⁻¹)
<i>L. purpurea</i>					
10°C	0.99	92 a ^y	9.2 b	0.471 b	0.094 b
15°C	1.00	93 a	4.9 a	0.659 a	0.168 a
20°C	0.96	72 b	3.2 a	0.465 b	0.214 a
25°C	† ^z	3			
<i>L. vittata</i>					
10°C	0.90	94 a	7.5 a	0.338 ab	0.105 a
15°C	0.98	94 a	4.5 a	0.622 a	0.177 a
20°C	0.98	81 b	2.9 a	0.295 b	0.191 a
25°C	†	1			
<i>L. aff. vittata</i>					
10°C	0.95	93 a	8.3 a	0.383 a	0.099 a
15°C	0.96	91 a	4.9 a	0.683 a	0.170 a
20°C	0.90	62 b	4.9 a	0.211 b	0.122 a
25°C	†	1			
<i>L. ixiooides</i>					
10°C	0.91	87 a	6.7 a	0.128 b	0.083 a
15°C	0.98	81 a	5.8 a	0.390 a	0.131 a
20°C	0.89	67 b	6.9 a	0.185 b	0.094 a
25°C	†	1			

[†] No se ajustó el modelo $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$ por escasez de puntos de la curva de germinación.
^z Valores seguidos de letras iguales no presentan diferencias significativas con $\alpha \leq 0.05$.

DISCUSIONES

Las semillas de *Leucocoryne* se comportan de manera similar a las de una especie anual de invierno.

L. dimorphopetala presentaría algún mecanismo de dormancia. Presenta la distribución más al norte y pertenece a un linaje distinto (Jara-Arancio et al., 2014).

Al comparar semillas almacenadas por 4 con 16 meses, se observa una mejora en la germinación a 20 °C a mayor tiempo de almacenaje (Fig. 1). Semillas de *Leucocoryne* responderían al *after-ripening* (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006)

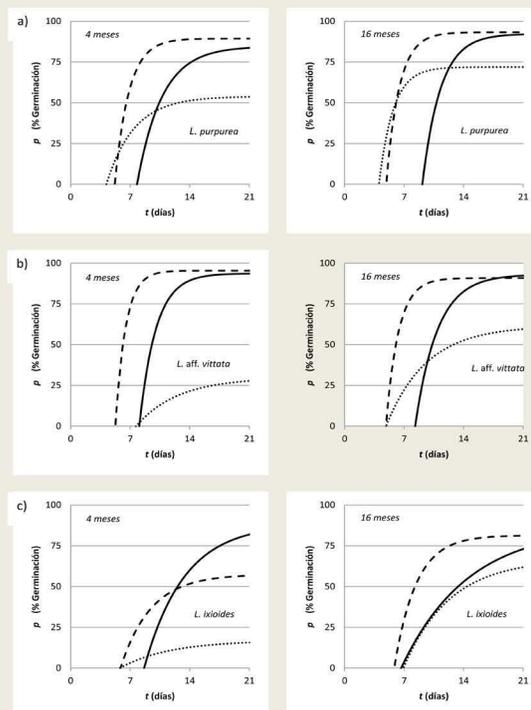


Fig. 1. Efecto de la temperatura 10 (—), 15 (---) y 20°C (.....) en semillas de (a) *L. purpurea*, (b) *L. aff. vittata* and (c) *L. ixiooides* almacenadas por 4 y 16 meses.

LITERATURA CITADA

Bridgen, M., E. Olate, and F. Schiappacasse. 2002. Flowering geophytes from Chile. Act. Hort. 570:75-80. Catley, J.L. 2003. Temperature and irradiance effects on flowering of two species of *Leucocoryne*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:809-814. De la Cuadra, C., L. Mansur, G. Verdugo, and L. Arriagada. 2002. Deterioro de las semillas de *Leucocoryne* spp. en función del tiempo de almacenaje. Agricultura Técnica 62:46-55. Finch-Savage, W.E. and G. Leubner-Metzger. 2006. Seed dormancy and the control of germination. New Phytologist 171:501-523. International Seed Testing Association. 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing. Vol. 1. ISTA, Bassersdorf, Switzerland. Jara, P., G. Arancio, R. Moreno, and M. Carmona. 2006. Factores abióticos que influyen la germinación de seis especies herbáceas de la zona árida de Chile. Revista Chilena de Historia Natural 79:309-319. Jara-Arancio, P., M.T.K. Arroyo, P. Guerrero, L. Hinojosa, G. Arancio, and M. Méndez. 2014. Phylogenetic perspectives on biome shifts in *Leucocoryne* (Alliaceae) in relation to climatic niche evolution in western South America. J. Biogeogr. 43:328-338. Kim, H.H. and K. Ohkawa. 2001. Introduction of two Chilean geophytes, *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil. and *Zephyra elegans* D. Don as new ornamentals. Act. Hort. 552:179-183. Mansur, L., O. Zoellner, P. Riedemann, G. Verdugo, and C. Harrison. 2004. *Leucocoryne*, a native Chilean genus and its use as a garden plant. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso - Reimco Ltd., Chile. Mobayen, R.G. 1980. Germination and emergence of citrus and tomato seeds in relation to temperature. J. Hort. Sci. 55:291-297. Muñoz, M. 2000. Consideraciones sobre los géneros endémicos de monocotiledóneas de Chile. Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile, 343:16-27. Schiappacasse, F., P. Peñailillo, P. Yañez, and M. Bridgen. 2005. Propagation studies on Chilean geophytes. Acta Hort. 673:121-126. Zoellner, O. 1972. El género *Leucocoryne*. Anales Museo Historia Natural, Valparaíso, Chile, 5:9-83.

Anexo VII-4

1 **COVER PAGE**

2 A) Temperature Effect on Seed Germination in the Genus *Leucocoryne* (Alliaceae)

3

4 B) Carlos De la Cuadra, Alexis K. Vidal, and Leví M. Mansur¹

5 C) School of Agronomy, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso,

6 Quillota, Chile.

7

8 B) Susana Lefimil

9 C) Biology Institute, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

10 Valparaíso, Chile.

11

12 D) This study was funded by the *Fundación para la Innovación Agraria* (Project PYT-2012-
13 0079), Ministry of Agriculture, Chile.

14

15

16

17 **MANUSCRIPT SECTIONS (for blind review)**

18

19 E) *Subject Category:* Propagation and Tissue Culture

20

21 F) Temperature Effect on Seed Germination in the Genus *Leucocoryne* (Alliaceae)

22

23 G) *Additional index words.* Glory of the Sun, huilli, supraoptimal germination temperature,
24 adaptive strategy.

25

26 H) *Abstract.* *Leucocoryne* is a Chilean endemic genus from the Alliaceae family. It is an
27 emerging crop with some registered varieties, currently oriented to a niche
28 ornamental market. In the present work, seed germination in *Leucocoryne*
29 *dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea*, *L. aff. vittata*, *L. aff. violacescens* and *L.*
30 *ixioides* for seeds stored for four months and in *L. purpurea*, *L. vittata*, *L. aff. vittata*
31 and *L. ixioides* for seeds stored for up to 16 months was analyzed at 10, 15, 20 or 25 °C.
32 Germination data was analyzed by the previously developed time-germination model
33 $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$. Each germination curve had a coefficient of determination (R^2)
34 higher than 0.89, except when there was lack of germination. Results show that higher
35 germination was better achieved at lower (10 or 15 °C) rather than at the higher
36 temperatures (20 or 25 °C). When comparing germination results at temperatures of
37 10 and 15 with results at 20 °C, germination decreased by at least 30% and became
38 near zero at 25 °C in seed stored for four months. Similarly when seeds were stored for
39 16 months, germination decreased by approximately 20% at 20 °C, and again was near
40 zero for germination at 25 °C. These germination habits of *Leucocoryne* are interpreted

41 as an adaptive strategy to its natural habitats. In addition, *L. dimorphopetala* presents
42 a type of dormancy and other species (*L. purpurea*, *L. ixioides* and *L. aff. vittata*) may
43 be sensitive to after-ripening changes during storage.

44

45 **I)**

46 **a)** The genus *Leucocoryne* Lindley is endemic to Chile and is one of the 12 genus in the
47 *Alliaceae* family from South America (Rahn, 1998). Its habitat extends from the
48 northern Atacama desert of Chile, near the city of Iquique (lat. 20° S) (Muñoz, 2000;
49 Zoellner, 1972) to the southern region of the Humid Lake District (lat. 39° S) (Muñoz
50 and Moreira, 2000). Cytologically it has been divided into two mayor plant groups with
51 chromosome numbers of $2n = 10$ ($n = 5$) or $2n = 18$ ($n = 9$) (Araneda et al., 2004; Crosa,
52 1998; Jara-Arancio et al., 2012). This geophyte genus has been shown to have high
53 ornamental value due to its long-vase life, various colors and shapes and its ability to
54 grow in pots or gardens alongside cacti with limited irrigation (Bridgen et al., 2002;
55 Catley, 2003; Kim and Ohkawa, 2001; Mansur et al., 2004). There are three commercial
56 varieties currently available in Chile and several others in Holland. Bulbs are
57 commercially available in Chile, Japan, Holland, the United States and others. The
58 understanding of seed germination, growth and development is important for
59 breeding purposes and sexual propagation of these species as an ornamental crop (De
60 la Cuadra et al., 2002; De la Cuadra and Mansur, 2004; Kim et al., 1998a, 1998b).

61 It is known that seed germination over 85% of *Leucocoryne coquimbensis* and *L.*
62 *purpurea* happens at 10 °C (Jara et al., 2006; De la Cuadra et al., 2002); for *L.*
63 *coquimbensis*, *L. purpurea* and *L. ixioides* germination is near zero at 20 °C
64 (Schiappacasse et al., 2005); and in *L. purpurea* is totally inhibited at 25 °C (Jara et al.,

65 2006). Although optimal germination temperature is unknown, the studies above
66 indicate that temperatures at or above 20 °C inhibit germination and at 10 °C
67 germination is enhanced. Our work aims to achieve further precision of the effect of
68 temperature on seed germination, in five species and two species affinis originating
69 from Central (lat. 33° S) to the far North of Chile (lat. 20° S).

70

71 **b) Materials and Methods**

72 Seven genotypes were studied including *L. dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L.*
73 *purpurea*, *L. vittata*, *L. ixioides*, *L. aff. vittata*, and *L. aff. violacescens* (Fig. 1). All these
74 have been described by Araneda et al. (2004) and De la Cuadra et al. (2002). *L. aff.*
75 *vittata* and *L. aff. violacescens* are still taxonomically unresolved, and have been
76 classified in previous studies as ecotypes Pichicuy and Alcones respectively (Araneda et
77 al., 2004; Mansur et al., 2004; De la Cuadra et al., 2002).

78 Seeds of the genotypes studied in the present work were harvested in 2013 (then
79 stored for four months) and 2012 (then stored for 16 months) from *ex situ* bulb
80 collection grown in unheated greenhouse at the School of Agronomy of the Pontificia
81 Universidad Católica de Valparaíso, in Quillota (lat. 32°53' S; long. 71°12' W), Chile.
82 Manual seed cleaning was performed after harvest and seeds of uniform size from
83 each genotype were obtained for the experiments.

84 Before sowing, seeds were disinfected with captan (Captan® 50WP; N-
85 Trichloromethylthio-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide; Arysta LifeScience North
86 America, LLC, Cary, NC) at 1 g/100 mL for 3 minutes and rinsed 3 times with distilled
87 water. Germination was performed on moist paper in Petri dishes, under dark
88 conditions at 10, 15, 20 or 25±2 °C. Each replicate consisted of a Petri dish containing

89 50 seeds of a given genotype. A complete randomized design was used with four
90 replicates randomly distributed inside the incubator corresponding to the temperature
91 treatment. Germination evaluation was performed every two days. Seeds were
92 considered as germinated when the radicle was 2 mm or longer. If a genotype did not
93 reach 85% germination in at least one of the temperature treatments, a tetrazolium
94 test was performed to check seed viability (International Seed Testing Association,
95 2003).

96 Two independent experiments were conducted, one with seed stored for four months
97 (harvested in 2013) and a second with seeds stored for 16 months (harvested in 2012).
98 Experiment 1. This was performed on seeds of *L. dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L.*
99 *purpurea*, *L. aff. vittata* and *L. aff. violascens* and *L. ixioides*, stored for four months
100 after harvest. Dry storage was performed at room temperature (20 ± 5 °C) and relative
101 humidity between 50 and 70%, under dark conditions in paper bags.

102 Experiment 2. This was performed on seeds of *L. purpurea*, *L. vittata*, *L. aff. vittata* and
103 *L. ixioides* under the same temperature treatments with seeds stored for 16 months
104 under the same conditions as the previous experiment.

105 The germination data for each treatment in each experiment was fitted to the model
106 $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$ developed by Mobayen (1980), where p is germination percentage
107 at every determined time (t), A is the final maximum germination achieved, t_0 is the
108 estimated time to the first germinated seed and k is measure of the spread of
109 germination time. High and low values of k indicate short and long time required from
110 the first to the last seed to germinate, respectively. Median germination rate is
111 determined as $1/t_{A/2}$, where $t_{A/2}$ is the time required to reach median seed germination
112 and is calculated as $t_0 + 0,693/k$.

113 A confidence interval for proportions was used for final maximum germination (A) at P
114 ≤ 0.05 . Differences for t_0 , k and $1/t_{A/2}$ were tested by calculating the corresponding
115 regression coefficients confidence intervals (Walpole and Meyers, 1992).

116

117 c) Results

118 The seed germination process in *Leucocoryne* did fit the seed germination model
119 described by Mobayen in 1980 (Fig. 2). Each germination curve had a coefficient of
120 determination (R^2) higher than 0.89, except when there was lack of germination data
121 at 25 °C for all genotypes, and at 20 °C for *L. aff. violacescens* (Table 1 and 2).

122 When seed was stored for four months, the highest germination percentages were
123 achieved at 10 °C for all species studied. At 15 °C, the results show that *L.*
124 *dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea* and *L. aff. vittata* were not significantly
125 different than at 10 °C. However, for *L. aff. violacescens* and *L. ixioides*, final maximum
126 germination (A) decreased by approximately 30% when compared to germination at
127 10 °C. When temperature was raised to 20 °C, A decreased by at least 30% and
128 inhibited germination almost completely in *L. aff. violacescens*. Finally, germination
129 was nearly zero at 25 °C for all genotypes (Table 1). For seed stored for 16 months,
130 higher germination was observed at lower (10 or 15 °C) rather than at the higher
131 temperatures (20 or 25 °C). A similar trend was observed, where increasing
132 temperature to at 20 °C, decreased germination by around 20% for most genotypes
133 and 13% in the case of *L. vittata* (Table 2).

134 Considering both experiments, the final germination at either 10 or 15 °C was over
135 88%. The only exception was *L. dimorphopetala* in experiment 1, where germination
136 reached a maximum of only 53%. A tetrazolium test performed showed a seed

137 viability of 84% for *L. dimorphopetala* and 91% for *L. vittata* which was used as control
138 in the test.

139 To differentiate the performance of the germination process between 10 and 15 °C,
140 the remaining parameters t_0 , k and $1/t_{A/2}$ were considered. In cases where differences
141 for these parameters were significant, they always show that 15 °C is a better
142 condition than 10 °C for seed germination (Table 1 and 2). At 15 °C, the estimated time
143 to the first germinated seed (t_0) was shorter. On the other hand, the measure of the
144 spread of germination time (k) and median germination rate ($1/t_{A/2}$) were higher.

145 Discussion

146 *Leucocoryne* is a geophyte adapted to grow in the Desert and Mediterranean climate
147 of Chile being an important component of the Blooming Desert (Jara et al., 2006;
148 Muñoz and Moreira, 2000; Zoellner, 1972). In natural habitat, if rainfall is over 40 mm
149 (Vidiella and Armesto, 1989), the bulbs sprout from fall to winter, then flower, and set
150 seed at approximately 100 to 120 days from sprouting (Kim et al., 1998a). After the
151 plant reaches maturity the seeds remain in the soil until next winter and if it rains, they
152 will germinate and form a small bulb (De la Cuadra and Mansur, 2004; Mansur et al.,
153 2004). Based on our field observations and the data presented in this work, we
154 conclude that *Leucocoryne* seeds in the first year seem to behave as a winter annual,
155 germinating in the winter and senescing in late spring or early summer.

156 It would be logical to expect that seeds of *Leucocoryne* have acquired some adaptive
157 strategy as a way to survive in its natural habitat where summers are hot and dry, and
158 winters are have mild temperatures with unpredictable rain (Novoa and Villaseca,
159 1989). For all species germination is almost totally inhibited at temperatures of 25 °C.
160 This could be interpreted as an adaptation to their natural habitats, where avoiding

161 germination during hot dry summers would be determinant for the survival of the
162 species (Baskin and Baskin, 1998; Figueroa et al., 2004). If a late spring or summer rain
163 event does occur, it is usually not followed by later similar events that would allow the
164 germinated plantlet to complete its cycle.

165 Notably in *L. dimorphopetala* germination at 10 or 15 °C was only 50%, yet the seed
166 was 84% viable after four months of storage at 20 ± 5 °C, indicating that a type of seed
167 dormancy mechanism is present in this species. *L. dimorphopetala*, unlike the other
168 species studied in this work, is characteristic from desert climate and based on
169 molecular data (Jara-Arancio et al., 2014) and flower morphology (L. Mansur,
170 unpublished data) belongs to a different lineage. Under the extreme dryness of the
171 Atacama Desert, inhibition of germination during winters with lack of rain and
172 successive hot summers could be a determinant factor of its survival strategy where its
173 seeds can only germinate when the phenomena of Blooming Desert occurs (Gutiérrez
174 and Meserve, 2003).

175 When comparing germination of seeds stored for four months versus 16 months,
176 inhibition observed at 20 °C decreased after the longer storage (Fig. 3). Germination
177 requirements may change during storage at 20 ± 5 °C, where at supraoptimal
178 temperatures, older seeds (stored for 16 months) have higher germination rate than
179 fresh seeds (stored for four months). *Leucocoryne* seeds may be sensitive to after-
180 ripening changes in dry seed, characterized by widening the temperature range or
181 window permissive for germination (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

182 This work and that of Jara et al. (2006) shows that *L. purpurea*, as well as *L.*
183 *dimorphopetala*, *L. coquimbensis*, *L. purpurea*, *L. vittata*, *L. ixioides*, *L. aff. vitatta* and *L.*
184 *aff. violacescens* are able to achieve their maximum germination values (A) at 10 °C.

185 For most of the genotypes analyzed them, 15 °C can also be considered optimal. For all
186 of the species them, data suggests that 20 °C and higher are supraoptimal
187 temperatures for germination. When working on laboratory experiments, creating
188 conditions similar to those that the species are adapted to in nature may help
189 achieving optimum growth objectives (Vidal et al., 2012), which in this case are high
190 maximum rate (A), fast (t_0 and $1/t_{A/2}$) and uniform germination (k) which in nature
191 occurs from late fall to early spring, when temperatures are around 10 to 15 °C (Novoa
192 and Villaseca, 1989).

193

194 **d)** Literature Cited

- 195 Araneda, L., P. Salas, and L. Mansur. 2004. Chromosome numbers in the Chilean
196 endemic genus *Leucocoryne* (Huilli). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129:77-80.
- 197 Baskin, C.C., and J.M. Baskin, 1998. Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of
198 Dormancy and Germination. Academic Press. San Diego.
- 199 Bridgen, M., E. Olate, and F. Schiappacasse. 2002. Flowering geophytes from Chile.
200 Acta Hort. 570:75-80.
- 201 Catley, J.L. 2003. Temperature and irradiance effects on flowering of two species of
202 *Leucocoryne*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:809-814.
- 203 Crosa, O. 1998. Los cromosomas de nueve especies del género chileno *Leucocoryne*
204 Lindley, (Alliae-Alliaceae). Bol. Invest. Fac. Agrom. Univ. de la República Uruguay 17:1-12.
- 205 De la Cuadra, C. and L. Mansur. 2004. Descripción de la primera etapa del ciclo de vida
206 de tres genotipos de *Leucocoryne sp.*: semilla a bulbo. Agricultura Técnica 64:205-212.

207 De la Cuadra, C., L. Mansur, G. Verdugo, and L. Arriagada. 2002. Deterioro de las
208 semillas de *Leucocoryne spp.* en función del tiempo de almacenaje. Agricultura Técnica
209 62:46-55.

210 Figueroa J.A., P. León-Lobos, L.A. Cavieres, H.W. Pritchard, and M. Way. 2004.
211 Ecofisiología de semillas en ambientes contrastantes de Chile: Un gradiente desde
212 ecosistemas desérticos a templado-húmedos, p- 81-98. In: M. Cabrera (ed.). Fisiología
213 Ecológica y Evolutiva de Plantas: Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas.
214 Ediciones Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

215 Finch-Savage, W.E. and G. Leubner-Metzger, 2006. Seed dormancy and the control of
216 germination. *New Phytologist* 171:501-523.

217 Gutiérrez, J.R., and P.L. Meserve, 2003. El Niño effects on soil seed bank dynamics in
218 north-central Chile. *Oecologia* 134:511–517.

219 International Seed Testing Association. 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium
220 Testing. Vol. I. ISTA, Bassersdorf, Switzerland.

221 Jara, P., G. Arancio, R. Moreno, and M. Carmona. 2006. Factores abióticos que
222 influyen la germinación de seis especies herbáceas de la zona árida de Chile. *Revista
223 Chilena de Historia Natural* 79:309-319.

224 Jara-Arancio, P., M.T.K. Arroyo, P. Guerrero, L. Hinojosa, G. Arancio, and M. Méndez.
225 2014. Phylogenetic perspectives on biome shifts in *Leucocoryne* (Alliaceae) in relation
226 to climatic niche evolution in western South America. *J. Biogeogr.* 41:328-338.

227 Jara-Arancio, P., P. Jara-Seguel, C. Palma-Rojas, G. Arancio, and R. Moreno. 2012.
228 Karyological study in fifteen *Leucocoryne* taxa (Alliaceae). *Biologia* 67:289-295.

229 Kim, H.H. and K. Ohkawa. 2001. Introduction of two Chilean geophytes, *Leucocoryne*
230 *coquimbensis* F. Phil. and *Zephyra elegans* D. Don as new ornamentals. Act. Hort.
231 552:179-183

232 Kim, H.H., K. Ohkawa, and E. Nitta. 1998a. Effects of bulbs weight on the growth and
233 flowering of *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil. Acta Hort. 454:341-346.

234 Kim, H.H., K. Ohkawa, and E. Nitta. 1998b. Fall flowering of *Leucocoryne coquimbensis*
235 F. Phil. after long-term bulb storage treatments. HortScience 33:18-20.

236 Mansur, L., O. Zoellner, P. Riedemann, G. Verdugo, and C. Harrison. 2004. *Leucocoryne*,
237 a native Chilean genus and its use as a garden plant. Pontificia Universidad Católica de
238 Valparaíso, Valparaíso, Chile.

239 Mobayen, R.G. 1980. Germination and emergence of citrus and tomato seeds in
240 relation to temperature. J. Hort. Sci. 55:291-297.

241 Muñoz, M. 2000. Consideraciones sobre los géneros endémicos de monocotiledóneas
242 de Chile. Noticiario Mensual Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile,
243 343:16-27.

244 Muñoz, M. and A. Moreira. 2000. Géneros endémicos de monocotiledóneas de Chile.
245 *Chloris chilensis*. 18 August 2015.
246 <<http://www.chlorischile.cl/Monocotiledoneas/leucocoryne.htm>>.

247 Novoa, R. and S. Villaseca. 1989. Mapa agroclimático de Chile. Inia, Santiago, Chile.

248 Rahn, K. 1998. Alliaceae, p. 70-78. In: K. Kubitzki (ed.). The families and genera of
249 flowering plants 3. Springer, Verlag, Berlin, Germany.

250 Schiappacasse, F., P. Peñailillo, P. Yañez, and M. Bridgen. 2005. Propagation studies on
251 Chilean geophytes. Acta Hort. 673:121-126.

252 Vidal, A.K., D.S. Han, M. Nakano, and Y. Niimi. 2012. Decreased time from seed to
253 flowering corm size in *Zephyra elegans* via in vitro cultivation. *Cien. Inv. Agr.* 39:577-
254 584.

255 Vidiella, P.E., and J.J. Armesto, 1989. Emergence of ephemeral plant species from soil
256 samples of the Chilean coastal desert in response to experimental irrigation. *Revista*
257 *Chilena de Historia Natural* 62: 99-107

258 Walpole, R.E., and R.H. Myers. 1992. *Probability and statistics for engineers and*
259 *scientists*. 4th ed. McMillan, Mexico.

260 Zoellner, O. 1972. El género *Leucocoryne*. *Anales Museo Historia Natural, Valparaíso,*
261 *Chile*, 5:9-83.

262

263 j) Tables

264

Table 1. Temperature effect on germination of *Leucocoryne* seeds stored for 4 months before sowing. *A* is the final maximum germination achieved, t_0 is the estimated time to the first germinated seed and *k* is measure of the spread of germination time, $1/t_{A/2}$ corresponds to median germination time.

Temperature	R ²	A (%)	t_0 (d)	<i>k</i> (d ⁻¹)	$1/t_{A/2}$ (d ⁻¹)
<i>L. dimorphopetala</i>					
10°C	0.98	48 a ^y	6.4 a	0.164 b	0.094 a
15°C	0.91	53 a	4.7 a	0.417 ab	0.157 a
20°C	0.91	12 b	3.8 a	0.361 a	0.176 a
25°C	† ^z	0			
<i>L. coquimbensis</i>					
10°C	0.95	93 a	8.3 a	0.319 a	0.096 a
15°C	0.99	92 a	5.2 a	0.459 a	0.149 a
20°C	0.95	59 b	6.8 a	0.214 a	0.099 a
25°C	†	0			
<i>L. purpurea</i>					
10°C	0.96	85 a	7.8 a	0.342 a	0.102 a
15°C	0.97	89 a	5.2 a	0.604 a	0.158 a
20°C	0.99	54 b	4.2 a	0.309 a	0.155 a
25°C	†	1			
<i>L. aff. violacescens</i>					
10°C	0.96	96 a	8.7 a	0.355 a	0.094 a
15°C	0.93	68 b	6.0 a	0.498 a	0.135 a
20°C	†	0			
25°C	†	0			
<i>L. aff. vittata</i>					
10°C	0.96	94 a	8.1 a	0.518 a	0.106 a
15°C	0.97	95 a	5.3 a	0.837 ab	0.164 a
20°C	0.91	30 b	7.7 a	0.205 b	0.090 a
25°C	†	0			
<i>L. ixioides</i>					
10°C	0.97	88 a	8.6 a	0.213 ab	0.084 b
15°C	0.99	58 b	5.2 a	0.225 a	0.120 a
20°C	0.97	17 c	5.8 a	0.172 b	0.102 ab
25°C	†	2			

265

266 ^z Mobayen's model, $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$, does not fit due lack of germination data.

267 ^y Values in the same column in the same genotype, followed by the same letter have no

268 statistically significant difference at $P \leq 0.05$.

269

270

271 Table 2. Temperature effect on germination of *Leucocoryne* seeds stored for 16 months before
 272 sowing. *A* is the final maximum germination achieved, t_0 is the estimated time to the first
 273 germinated seed and *k* is measure of the spread of germination time, $1/t_{A/2}$ corresponds to
 274 median germination time.

Temperature	R ²	A (%)	t_0 (d)	$k(d^{-1})$	$1/t_{A/2}(d^{-1})$
<i>L. purpurea</i>					
10°C	0.99	92 a ^y	9.2 b	0.471 b	0.094 b
15°C	1.00	93 a	4.9 a	0.659 a	0.168 a
20°C	0.96	72 b	3.2 a	0.465 b	0.214 a
25°C	† ^z	3			
<i>L. vittata</i>					
10°C	0.90	94 a	7.5 a	0.338 ab	0.105 a
15°C	0.98	94 a	4.5 a	0.622 a	0.177 a
20°C	0.98	81 b	2.9 a	0.295 b	0.191 a
25°C	†	1			
<i>L. aff. vittata</i>					
10°C	0.95	93 a	8.3 a	0.383 a	0.099 a
15°C	0.96	91 a	4.9 a	0.683 a	0.170 a
20°C	0.90	62 b	4.9 a	0.211 b	0.122 a
25°C	†	1			
<i>L. ixiooides</i>					
10°C	0.91	87 a	6.7 a	0.128 b	0.083 a
15°C	0.98	81 a	5.8 a	0.390 a	0.131 a
20°C	0.89	67 b	6.9 a	0.185 b	0.094 a
25°C	†	1			

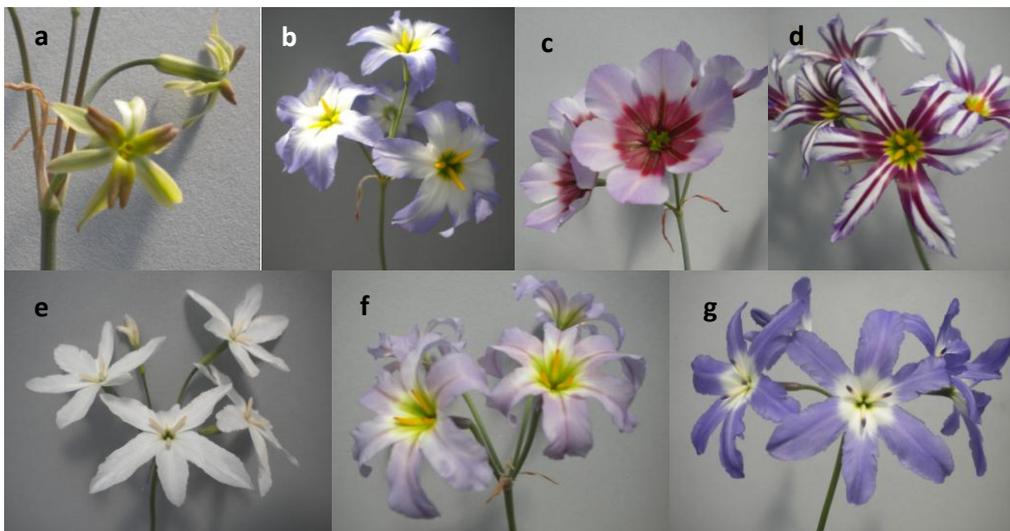
275

276 ^z Mobayen's model, $p=A\{1-\exp[-k(t-t_0)]\}$, does not fit due lack of germination data.

277 ^y Values in the same column in the same genotype, followed by the same letter have no
 278 statistically significant difference at $P \leq 0.05$.

279

280 k) Figures



281

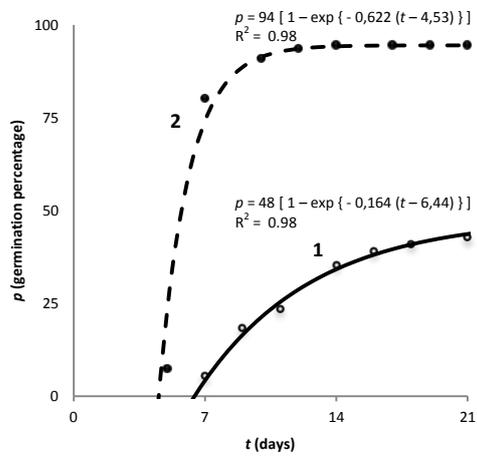
282 Fig. 1. *Leucocoryne* genotypes: a) *L. dimorphopetala*, b) *L. coquimbensis*, c) *L. purpurea*, d) *L.*

283 *vittata*, e) *L. ixioides*, f) *L. aff. vittata*, and g) *L. aff. violacescens*.

284

285

286



287

288 Fig. 2. Example of typical germination curves fitted to Mobayen's model. (1) Seeds of *L.*

289 *dimorphopetala* stored for 4 months and germinated at 10°C. (2) Seeds of *L. vittata* stored for

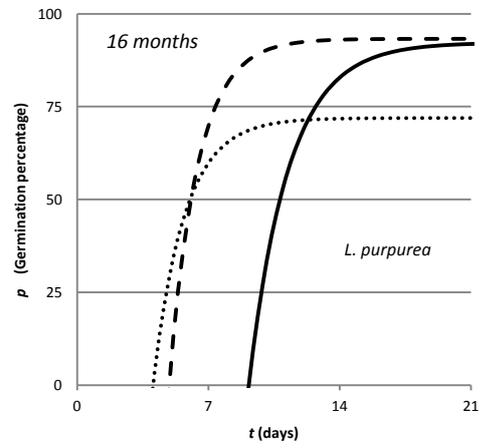
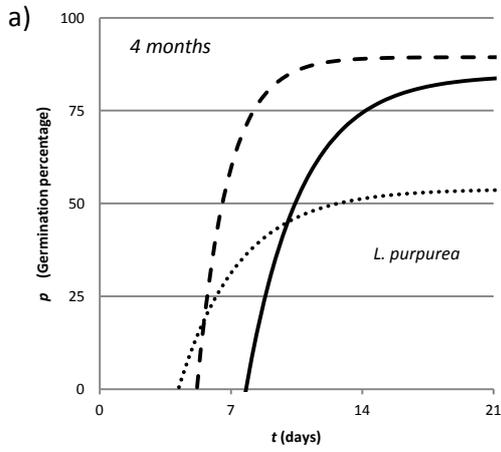
290 16 months and germinated at 15°C.

291

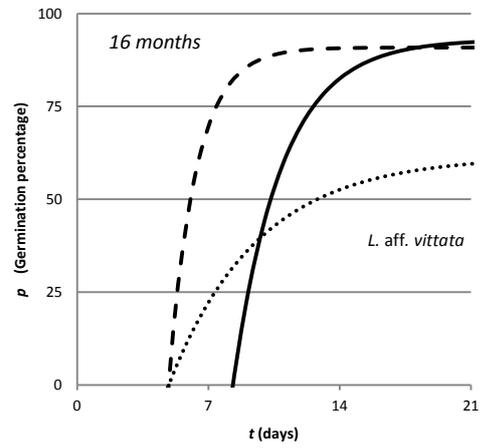
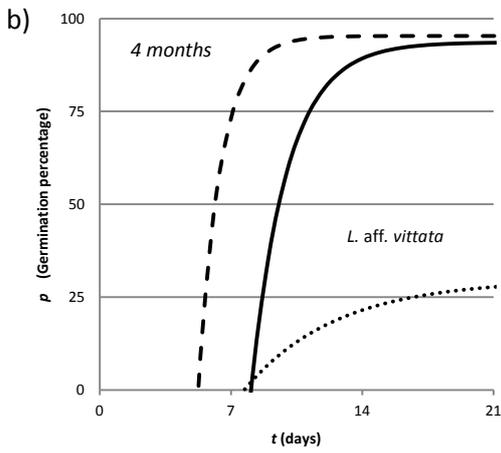
292

293

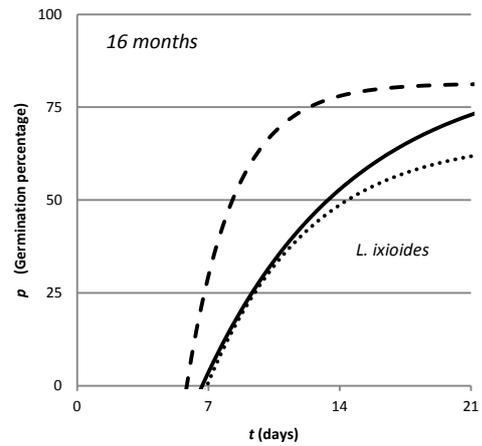
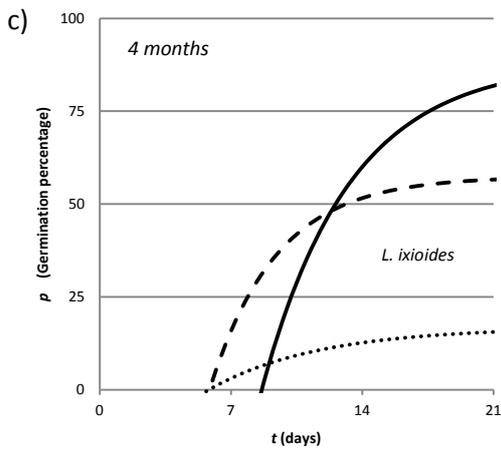
294



295



296



297

298 Fig. 3. Effect of temperatures of 10 (—), 15 (— -) and 20°C(.....) on seeds of (a) *L. purpurea*,

299 (b) *L. aff. vittata* and (c) *L. ixioles* stored for 4 or 16 months.

300

Anexo VIII-1

CURRICULUM VITAE

Carlos de la Cuadra Izquierdo
Ingeniero Agrónomo - UCV

Interés

Trabajar en el área de I+D+i del rubro semillas de hortalizas y flores, particularmente en programas de mejoramiento genético de plantas, que me permita agregar valor basado en el desarrollo mis habilidades de liderazgo, trabajo en equipo, comunicación y gestión operacional.

Experiencia Profesional

2007 – Junio 2011.
Flower Breeding Station. Región Valparaíso.
Syngenta Flower Oficina Central, Holanda.

Flower Breeder

Responsable de entregar soporte operacional a los programas globales de mejoramiento de flores desarrollados en Chile por la empresa, junto con desarrollar variedades comerciales en los cultivos asignados en línea con la estrategia global de la empresa.

Responsable de la planificación de ensayos; evaluación de variedades experimentales; elaboración de informes; selección de plantas, multiplicación y propagación de material vegetal; llevar adecuadamente información relacionada a mejoramiento genético; entregar instrucciones generales y específicas de cultivo a trabajadores; y apoyar con entrega de material vegetal e información a los departamentos de producción y marketing durante el proceso de introducción de nuevas variedades.

Experiencia Profesional

2006 – 2007
Escuela de Agronomía.
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Quillota.

Profesor Titular

Asignatura obligatoria “Teoría de Sistemas” y asignatura optativa “Gestión de Proyectos con MS Project” de la carrera de Agronomía.

Experiencia Profesional

2002 – 2006
Escuela de Agronomía.
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Quillota.

Asistente de Investigación

He participado en el Programa de Conservación y Mejora del Huilli (Leucocoryne) iniciado en 1996 con apoyo de fondos concursables del Estado de Chile como también de empresas privadas. Participé en desarrollar nuevas variedades de flores de corte y de jardín usando como base especies endémicas de Chile (www.leucocoryne.cl). Mis responsabilidades incluyeron el cultivo, descripción y documentación del material vegetal incluyendo la ejecución del

programa de mejoramiento. Frecuentemente, me correspondía informar al Genetista de la ejecución del programa y supervisar el trabajo de campo de estudiantes y obreros.

Publicaciones

de la Cuadra, C., y L. Mansur. 2004. Descripción de la primera etapa del ciclo de vida de tres genotipos de *Leucocorune* sp.: semilla a bulbo. *Agricultura Técnica* 64:205-212.

de la Cuadra, C., L. Mansur, G. Verdugo, y L. Arriagada. 2002. Deterioro de las semillas de *Leucocoryne* spp. en función del tiempo de almacenaje. *Agricultura Técnica* 60:38-45.

Educación Universitaria

2003–2005 P. Universidad Católica de Valparaíso Valparaíso.

Magister en Ingeniería Industrial Mención Gestión, Escuela de Ingeniería Industrial, Facultad de Ingeniería. He completado la totalidad de cursos obligatorios y optativos. Tesis pendiente. Modalidad vespertina.

1994–2000 P. Universidad Católica de Valparaíso Quillota.

Ingeniero Agrónomo. Mención Hortalizas y Flores. Promedio General de Notas: 5.2 (escala de 1 a 7). Examen de Título: *Aprobado con Distinción Unánime*.

Otros Antecedentes

Dominio idioma Inglés: bueno. De Febrero a Junio 2001 estudié en Bournemouth Teaching Service, en Bournemouth, Inglaterra. Al final del curso rendí el IELTS obteniendo un 6,5 (nivel intermedio avanzado).

Otros Antecedentes

Manejo a nivel Intermedio de programas MS Word, MS Excel, MS Power Point, MS Access (Base de Datos), MS Project (Administración de Proyectos) y MINITAB (Análisis Estadístico).

Otros Antecedentes

2005
Integrante de Grupo Study Exchange (GSE), Cleveland, Ohio, Estados Unidos de América. Programa perteneciente a The Rotary Foundation
GSE es una oportunidad única de intercambio cultural y vocacional para profesionales jóvenes. Por cuatro semanas, los integrantes del grupo conocen las instituciones y estilo de vida del país anfitrión, observan como se desarrollan sus propias profesiones, desarrollan contactos personales y profesionales, e intercambian ideas.

Anexo VIII-2

LEVI MANSUR VERGARA
Fitomejorador/Genetista Ph.D.

Web page : www.mas-plantbreedingservices.com

TÍTULOS:

Agronomist Colorado State University USA 1981

GRADOS ACADÉMICOS:

Bachelor of Science Colorado State University USA 1981
Master of Science en Agronomía Washington State University USA 1983
Doctor of Philosophy en Genética University of California, Davis USA 1987

CARGOS ACTUALES

Profesor Titular (desde 1996) P. Universidad Católica de Valparaíso (PUCV)
Empresario (desde 1995) Fundador y Dueño Mansur Agricultural Service Ltda.
Empresa de Servicios de Mejoramiento Genético para universidades y empresas multinacionales

CARGOS ACADEMICOS RELEVANTES

Institución	Cargo	Desde	Hasta
IOWA STATE UNIVERSITY (USA)	Assistant Professor	1987	1991
UNIVERSITY OF UTAH (USA)	Research Assistant Professor	1991	1993

PRINCIPALES ESTUDIOS Y CONSULTORÍAS

Temas	Contratante	Desde	Hasta
GENÉTICA DE MAIZ	MAS	2003	Presente
MAPEO GENETICO DE SOYA	MAS	1996	Presente
MAPEO GENETICO DE SOYA	University of Utah	1991	1996
MAPEO GENETICO DE SOYA I	Iowa State University	1987	1991
EVALUADOR DE PROYECTOS	Fondecyt, Fondef, Corfo Innova	1996	PRESENTE
EVALUADOR DE MANUSCRITOS	Crop Science, Electronic J. of Biotec	1993	
PRESENTE	Chilean Journal of Agricultural Research, Agric. Técnica, FONCyT		

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS EN REVISTAS CON COMITÉ EDITORIAL

RECURSOS GENETICOS CHILENOS

- Roman Kubec, Petra Krejčová, [Mansur, L.](#), and Nicolás García. 2011. Distribution of S-substituted cysteine derivatives in Alliaceae species. *Phytochemistry (In review)*
- [Mansur, L.](#) and M. Cisternas 2005. *Leucocoryne talinensis* (Alliaceae), a New Species from Chile. *Novon* 15:324-326.
- Salas P. and [L Mansur](#). 2004. Gene flow between parents with different ploidy levels in a natural population of *Leucocoryne*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:833-835.
- Mansur L., M. González, I. Rojas, P. Salas. 2004. Self incompatibility in the Chilean endemic genus *Leucocoryne* (Huilli). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:836-838.
- De la Cuadra and [L. Mansur](#). 2004. Descripción de la primera etapa del ciclo de vida de *Leucocoryne purpurea* Gay y dos ecotipos: semilla a bulbo. *Agricultura Técnica* 64:205-212.
- Araneda L. P. Salas, and [L. Mansur](#). 2004. Chromosomes numbers in the Chilean endemic genus *Leucocoryne* (Huilli). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:77-80.

[Mansur Leví](#). 2002. Discovery, access, and ownership of genes in the era of molecular biology. Electronic Journal of Biotechnology www.ejb.org Mayo 2002.
De la Cuadra, [L. Mansur](#), G. Verdugo, y L. Arriagada. 2002. Deterioro de las semillas de *Leucocoryne* spp. en función del tiempo de almacenaje. Agricultura Técnica 60:38-45.

GENETICA DE SOYA

Salas, P., J.C. Oyarzo-Llaipen, D. Wang, K. Chase, and [L. Mansur](#). 2006. Genetic mapping of seed shape in three recombinant inbred lines of soybean. Theor. And Appl. Gen. 113: 1459-1466.

Terry, L.I., K. Chase, T. Jarvik, J. Orf, [L. Mansur](#), K.G. Lark. 2000. Soybean quantitative trait loci for resistance to insects. Crop Science 40: 375-382.

Terry, L.I., K. Chase, T. Jarvik, J. Orf, [L. Mansur](#), K.G. Lark. 2000. Insect resistance to insects in recombinant inbred soybean lines derived from non resistant parents. Entomol. Exp. Appl. 91:465-476.

Orf, J.H., K. Chase, T Jarvik, [L.M. Mansur](#), P.B. Cregan, F.L. Adler, and K.G. Lark. 1999. Genetics of soybean agronomic traits: I. comparison of three related recombinant inbred populations. Crop Sci. 39:655-659.

Orf, J.H., K. Chase, [L.M. Mansur](#), F.L. , Adler, and K.G. Lark. 1999. Genetics of soybean agronomic traits: II. Interactions between yield quantitative trait loci in soybean. Crop Sci. 660-665.

[Mansur L.M.](#), J. Orf, and K.G. Lark. 1996. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbreds lines of soybean (*Glycine max* L. [Merr.]). Crop Sci. 36:1327-1336.

Lark K.G., K. Chase, F. Adler, [L.M. Mansur](#), and J. Orf. 1995.

Interactions between quantitative traits loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. Proc. Nat. Acad. of Sci. 92:4656-4660.

[Mansur L.M.](#) and J. Orf. 1995. Evaluation of soybean recombinant inbreds for agronomic performance in northern USA and Chile. Crop Sci. 35:422-425.

Lark, K.G., J. Orf, and [L.M. Mansur](#). 1994. Epistatic expression of quantitative trait loci (QTL) in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] determined by QTL association with RFLP alleles. Theor. Appl. Genet. 88:485-489.

Keim , P. W.D. Beavis, J.M. Shupp, B.M. Baltazar, [L.M. Mansur](#), R.E.

Freestone. 1994. RFLP analysis of breeding populations: I. Genetic structure differences due to inbreeding methods. Crop Sci. 34:55-62.

Hawbaker, M.S., W.R. Fehr, [L.M. Mansur](#), R.C. Shoemaker, and

R.G. Palmer. 1993. Genetic variation for quantitative traits in soybean lines derived from tissue culture. Theor. Appl. Genet. 87:49-53.

[Mansur L.M.](#), K.G. Lark, H. Kross, and A. Oliveira. 1993. Interval mapping of quantitative trait loci for reproductive, morphological and seed traits in (*Glycine max* L.). Theor. Appl. Genet.86:907-913.

- [Mansur L.M.](#), J. Orf, and K.G. Lark. 1993. Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theor. Appl. Genet.* 86:914-918.
- [Mansur, L.M.](#), A. Carriquiry and A. P. Rao-Arelli. 1992. Generation mean analysis of resistance to race 3 of the soybean cyst nematode. *Crop Sci.* 33:1249-1253.
- [Mansur L.M.](#) 1992. Resistance in PI 437654 to iron-deficiency chlorosis deficiency. *Crop Sci.* 32:1137-1138.
- Baltazar, B. and [L.M. Mansur](#). 1992. Identification of restriction fragment length polymorphisms (RFLP's) to map soybean cyst nematode resistance genes in soybean. *Soybean Genetic Newsletter* 19:67-69.
- Diers, B., [L.M. Mansur](#), and R. Shoemaker. 1992. Mapping Phytophthora resistance loci with restriction fragment length polymorphism markers. *Crop Science* 32:377-383.
- [Mansur, L.M.](#), H. Tachibana, S. Rodriguez de Cianzio, W. Fehr, S. Schultz, K. Bidne, and R. Ruff. 1991. Registration of 'Newton' soybean. *Crop Science* 31:848.
- Cianzio, S.R., H. Tachibana, [L.M. Mansur](#), W. R. Fehr, T.L. Niblack S.P. Shultz and R. Ruff. and S.P. Schultz. 1991. Registration of A20 soybean resistant to brown stem rot, iron-deficiency chlorosis, and soybean cyst nematode. *Crop Science* 31:1713-1714.
- [Mansur L.M.](#), K. Hadder, and J.C. Suárez. 1990. Computer program to calculate population size necessary to recover any number of individuals exhibiting a trait. *J. of Heredity* 81:407-408.
- [Mansur, L.M.](#), C.O. Qualset, D. Kasarda, and R. Morris. 1990. Effects of 'Cheyenne' chromosomes on milling and breadmaking quality of 'Chinese Spring' wheat in relation to glutenin and gliadin storage protein fractions. *Crop Sci.* 30:593-602.
- [Mansur, L.M.](#), C.F. Konzak, A. Grama, Z. Gerechter-Amitai, and A. Blum. 1986. Quantitative variation in the kernel proteins among 841 accessions of *Triticum dicoccoides* estimated by SDS-PAGE. *Theor. Appl. Genet.* 72: 296-301.
- [Mansur, L.M.](#), C.F. Konzak, A. Grama, Z. Gerechter-Amitai and A. Blum. 1985. Computer assisted analysis of the kernel protein genetic variability in *Triticum dicoccoides* collections. *Theor. Appl. Genet.* 69: 79-86.

CAPÍTULOS EN LIBROS

- [Mansur Leví](#). 2003. Computer program to calculate population size. In: Handbook of formulas and software for plant geneticists and breeders. Manjit Kang Ed.
- [Mansur Leví](#). 2003. *Leucocoryne*: Life cycle, self-incompatibility and genetic plasticity in the design and color of *Leucocoryne* flowers. In: *Leucocoryne*: A native Chilean genus and its use as a garden plant. 1ª ed. Remco Ltda. Viña del Mar, Chile. 45 pp.
- [Mansur Leví](#). 2002. *Leucocoryne*: Ciclo de vida, autoincompatibilidad y plasticidad genética en diseño y color de sus flores, pp. 9-15. In: *Leucocoryne*, un género nativo chileno y su uso como planta de jardín. 1ª ed. Remco Ltda. Viña del Mar, Chile. 50 pp.
- [Mansur LM](#) et al. 2000. Mejoramiento genético genético en *Leucocoryne* spp. In: Seminario. In: Los geófitos nativos y su importancia en la floricultura. P. Peñailillo, F. Schiappacasse eds. Universidad de Talca. Talca. Chile.
- Chang J.F. R.C. Cantrell, [L.M. Mansur](#), F. Marquez-Sanchez, C. Mungoma, J.Niederhauser, R. Sevilla. 1992. Tactical strategies for building international multidisciplinary research teams. In

International Crop Sci. I p. 863-865. D.R. Buxton, R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen, and R.F. Wilson eds. Crop Science Society of America Wisconsin, USA.

[Mansur Leví](#), K. Lark, and J. Orf. 1995. Enhancing collaborative genetic research using recombinant inbred lines. In: Biotecnología en relación con técnicas mutagénicas para el mejoramiento genético vegetal. Carlos Muñoz Schick Ed. INIA, Serie La Platina No 64, Santiago, Chile.

OTRAS PUBLICACIONES CIENTIFICAS RELACIONADAS A RECURSOS GENETICOS CHILENOS

- [Mansur, L.](#) y C. de la Cuadra. 2004. El caso *Leucocoryne*. Bulbosas chilenas: conservación, mejoramiento y propiedad intelectual. Tierra Adentro (Chile) Julio-Agosto p. 44-47.
- Arriagada, [L.](#), [Mansur L.](#), Zoellner, O., Verdugo G., de la Cuadra, C., Chellet V., Vergara R., y Quiroz, M. 2000. Creación Ex Situ de una colección del género *Leucocoryne*. Gayana Botánica Vol. 57 p. 90.
- Chellet V., [Mansur L.](#), Verdugo G. Arriagada L., Zoellner O., de la Cuadra, C. y Vergara R. 2000. Ganancia de peso fresco y producción de bulbillos en relación al peso inicial del bulbo madre y el tipo de invernadero en *Leucocoryne ssp.* Gayana Botánica Vol. 57 p.90.
- de la Cuadra, C., [Mansur L.](#), Verdugo G., Arriagada, L., Zoellner, O., Chellet V., Quiroz, M. y Vergara R. 2000a. Efecto del tiempo de almacenaje sobre la germinación de Huilli (*Leucocoryne spp.*) Gayana Botánica Vol. 57 p. 32.
- de la Cuadra, C., [Mansur L.](#), Verdugo G., Arriagada, L., Zoellner, O., Chellet V., Quiroz, M. y Vergara R. 2000b. Descripción de la fenología y del crecimiento de *Leucocoryne spp.* Semilla a bulbo. Gayana Botánica Vol. 57 p. 94.
- Quiroz, M., [Mansur L.](#), Gresshoff, P., Zoellner, O., y Arriagada, L., . 2000. DNA amplification fingerprinting como herramienta para la clasificación taxonómica del género *Leucocoryne* (Liliaceae). Gayana Botánica Vol. 57 p. 25.
- [Mansur L.](#), de la Cuadra Carlos, Chellet Victoria, Verdugo Gabriela, Arriagada Luis, Quiroz Mauricio. 2000. Mejoramiento Genético en *Leucocoryne spp.* Simposio Los geófitos nativos y su importancia en la agricultura. Univ. de Talca Noviembre 1999.
- [Mansur, L.](#), G. Verdugo, L. Arriagada, O. Zoellner, C. de la Cuadra, V. Chellet, M. Quiroz, y R. Vergara. 1999. Bases para un programa de mejoramiento genético del Huilli (*Leucocoryne spp.*) Congreso No 50 de la Sociedad Agronómica de Chile. Pucón, Chile.

PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Ha presentado más de 100 seminarios en reuniones científicas en Latinoamérica, Medio Oriente, Estados Unidos y Europa.

OTROS LOGROS

Pionero en mapeo genético con marcadores moleculares en soya. Desarrolla la primera población de líneas recombinantes homocigotas de soya siendo esta (Minsoy x Noir I) la población referencial de la USDA (EEUU) y de mayor tamaño y densamente mapeada del mundo. Es también autor de la población de mapeo genético más importante de la empresa Pioneer, una de las semilleras mas grandes del mundo (BSR 101 x PI 437654). Es co-autor de las siguientes variedades de soya: Hardin 91, Kenwood BC, Conrad BC, Newton, IA1006, IA 2008, IA2014, IA2015, IA 3003, y IA3005. Logra las primeras patentes por chilenos en USA de variedades ornamentales a partir de plantas nativas chilenas.

PATENTES

Co-autor de tres variedades de *Leucocoryne* (planta nativa y endémica chilena) patentadas en USA.

Anexo VIII-3

CURRICULUM VITAE
ELIAS MANSUR O´DOWD

EDUCACION SUPERIOR:

Licenciado en Psicología y Comunicaciones, University of California, Davis, USA, 2003-2006.

Associate Degree (dos años) en Ciencias Sociales, Sacramento City College, California, USA, 2001-2003.

Técnico en Administración de Empresas con especialización en Marketing y Finanzas, Instituto Nacional de Capacitación (INACAP), Santiago, Chile, 1996-1998.

EXPERIENCIA PROFESIONAL:

2011- Presente: Mansur Agricultural Service Ltda. Subgerente de Finanzas. Asiste en la administración en empresa familiar de exportación de semillas y servicios de mejoramiento genético. Responsabilidades incluyen: gestión comercial, finanzas, presupuestos, coordinar con contador planificación tributaria.

2007-2010: Law Office of Roni Lynn Deutch, Sacramento, California

Ejecutivo de ventas bilingüe (Español-Inglés) de servicios de asesorías legales. Llegó a ser el mejor de 36 vendedores demostrable el año 2009.

2006-2007: Visa, Bank of America, Sprint, Earthlink others companies

Coordinador de Promociones de Marketing. Coordina la puesta en marcha de promociones de lanzamientos de nuevos productos utilizando técnicas de marketing.

2001-2006: Dueño, Mansur Service Company - Davis, California, USA.

Emprende con una pequeña empresa de servicios para ancianos y discapacitados de manera de obtener ingresos para costear sus estudios universitarios.

Agosto 1998-Junio 2001 Subgerente Mansur Agricultural Services Ltda. - Los Andes, Chile

www.mas-plantbreedingservices.com.

Encargado de administración en empresa familiar de exportación de semillas y servicios de mejoramiento genético. Responsabilidades incluyen adquisiciones presupuestos, salarios, coordinar con contador planificación tributaria.

Otros cursos:

Curso intensivo de Contabilidad, INACAP, Santiago, Chile, 2001

Curso intensivo de computación nivel usuario (Word, Excel, Power Point etc.), INACAP, Chile, 2001.

Anexo VIII-4

CURRICULUM VITAE

EDUARDO ALEJANDRO OLATE MUÑOZ

I. ESTUDIOS UNIVERSITARIOS

Posgrado

Mayo 2006. Grado de Ph.D. tesis "**CHILEAN GEOPHYTES: MICROPROPAGATION AND CUT FLOWER PRODUCTION**". Department of Plant Science, University of Connecticut, USA.

Pregrado

Abril 1993. Tesis de Grado "**Efecto del calcio sobre la actividad del glifosato**", Título Profesional de **Ingeniero Agrónomo** y el grado académico de **Licenciado en Agronomía**. Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile.

II. PUBLICACIONES

Científicas ISI

2012. Aros, D., S. Valdés, **E. Olate** and R. Infante. **Gamma irradiation on *Alstroemeria aurea* G. in vitro rhizomes: An approach to the appropriate dosage for breeding purposes**. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Cuyo. Aceptada.

2012. Peña, E., Olate, E., Chorbajian, R.A., Rosales, I. 2012. **First report of Alfalfa mosaic virus infection in *Viburnum tinus* L. in Chile**. Plant Disease. Aceptada.

2008. Luis H. Escobar, Miguel Jordan, **Eduardo Olate**, Luis Barrales, Marlene Gebauer. **In-vitro regeneration of *Leucocoryne purpurea* (Alliaceae), a Chilean ornamental geophyte**. Propagation of Ornamental Plants 8(2): 59-64.

2006. Ortega, R., M. Correa y **E. Olate**. **Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* spp. para flor de corte**. Agrociencia 40: 77-88.

Científicas No-ISI

2010. **Olate, E.**, L.H. Escobar, C. Sepúlveda, C. Rios and P. Errandonea. **Advances and strategies for micropropagation of Proteaceae species**. Acta Horticulturae 869: 157-164.

2005. **Olate, E.** and M. Bridgen. **Techniques for the in vitro propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* spp.** Acta Horticulturae 673: 335-339.

2001. Bridgen, M.P., **E. Olate**, and F. Schiappacasse. **Flowering geophytes of Chile**. Proceedings of the 8th International Symposium on Flowerbulbs. ISHS. Acta Horticulturae 570: 75-80.

2000. **Olate, E.**, Ly, D., Elliott, G. and Bridgen, M.P. **Influence of the timing of propagation and cold storage on the growth and development of *Alstroemeria* pot plants**. The International Plant Propagators' Society Combined Proceedings. Volume 50: 379-391.

Libros y capítulos

Olate, E. and F. Schiappacasse. 2012 (Aceptado en revisión). **Emerging production regions: Chile**. In Kamenetsky, R. and H. Okubo (eds.) 2012. Ornamental geophytes: from basic science to sustainable horticultural production. Taylor and Francis Group Pub. Oxford, UK.

III. PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA

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.

2007 – 2009. Investigador Asociado Proyecto CORFO-INNOVA "**Sistema de producción forzada de cala de color (*Zantedeschia* spp.) para flor de corte en la zona de Ovalle (IV Región)**". Empresa Agrícola Las Mercedes, Ovalle.

2005 – 2009. Investigador Principal Proyecto de Innovación “**Unidad Especializada de Propagación In Vitro en Especies Ornamentales de Difícil Multiplicación**”. FIA-PI-C-2005-1-A-067. Fundación para la Innovación Agraria, Ministerio de Agricultura, Chile.

2005 – 2006. Co-investigador Proyecto “**Late summer and fall production of cut lily flowers**”. Proyecto financiado por The Fred C. Gloeckner Foundation Inc. Harrison, NY, USA.

2005 – 2008. Investigador Asociado proyecto INNOVA “**Mejoramiento y Desarrollo de nuevos híbridos patentables a través de cruza intergenéricas (Copihue x Coicopihue) e interespecífico en *Rhodophiala* sp. apoyado por herramientas biotecnológicas**”. Empresa Novazel-CORFO (asignado a PUC: \$5.700.000).

2000 – 2003. Co-investigador Proyecto “**Breeding and production of the new cut flower crop *Leucocoryne* (Glory-of-the-Sun)**”. Proyecto financiado por The Fred C. Gloeckner Foundation Inc. Harrison, NY, USA.

2003 – 2006. Asesor Técnico Proyecto FIA “**Introducción de Proteáceas como alternativa productiva al secano de la Quinta Región**”, FIA-PI-C-2002-1-A-38.

IV. DOCENCIA UNIVERSITARIA

Pregrado

2001 a la fecha. Profesor responsable curso “**Producción de Flores y Ornamentales**”, Facultad de Agronomía e Ing. Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Posgrado

2001 a la fecha. Profesor responsable curso “**Cultivo de Tejidos Vegetales**”, Programa Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción de Cultivos. Facultad de Agronomía en Ing. Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

2002 – 2004. Profesor responsable curso “**Biotecnología Vegetal**”. Programa Magíster en Ciencias Agropecuarias, Mención Producción de Cultivos. Facultad de Agronomía en Ing. Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

V. TESIS DE PRE Y POSGRADO (selección)

Posgrado

2006. Profesor guía Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Mención Fisiología y Producción de Cultivos “**Regeneración *in vitro* de *Leucocoryne purpurea* (Alliaceae), geófito endémico de uso ornamental**”. Luis Humberto Escobar Torres. Ing. Agr., M.Sc.

2003. Profesor guía Tesis Magíster en Ciencias Vegetales, Mención Fisiología y Producción de Cultivos “**Evaluación de la germinación *in vitro* de *Leucocoryne coquimbensis* F. Phil., geófito endémico con potencial ornamental**”. Felipe Ham Jara Ing. Agr., M.Sc.

VI. PRESENTACIÓN DE TRABAJOS EN REUNIONES DE SOCIEDADES CIENTÍFICAS (selección)

2011. 2º Congreso de Flora Nativa, 14 al 16 de Abril, Quillota, Chile. Presentación del trabajo (oral): “**Efecto de Benzilaminopurina y de diferentes estados físicos del medio de cultivo en la etapa de multiplicación *in vitro* de *Puya* spp**” (E. Olate y F. Amiama).

2011. 19th Biennial Meeting of the New Zealand Branch of the IAPB, 8 – 11 Diciembre, Hanmer Springs, New Zealand. Presentación oral especial (*Keynote presentation*): “**Use of plant tissue culture to enhance the Chilean ornamental industry**” (E. Olate).

2010. 57º Congreso Agronómico de Chile. Septiembre, Santiago, Chile. Presentación del trabajo: “**Uso de un sistema de inmersión temporal y efecto de dos reguladores de crecimiento vegetal en la tasa de multiplicación *in vitro* para *Alstroemeria* spp.**” (E. Olate, S. García, C. Jofré, L. Escobar, y C. Sepúlveda).

2009. VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe: Conservación, valoración y uso sustentable. 28 – 30 Octubre, Pucón, Chile. Presentación del trabajo (póster): “**Utilización de distintos explantes iniciales en el rescate y propagación *in vitro* de especies**

del género *Alstroemeria*” (E. Olate, C. Sepúlveda, L.H. Escobar, C. Encina, M.U. Wilmans, C. Jaramillo, C. Soto).

2006. 57° Congreso Agronómico de Chile. Octubre, Santiago, Chile. Presentación de los trabajos: **“Respuesta morfogénica *in vitro* de *Leucocoryne purpurea* (Alliaceae), geófita endémica de uso ornamental”** (L.H. Escobar, E. Olate, M. Jordan, M. Gebauer y L. Barrales);

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.

VII. ACTIVIDADES DE EXTENSIÓN Y RELACIÓN CON EL MEDIO EXTERNO

2011. Charla **“Especies geófitas en parques y jardines”**. Ciclo Seminarios “Proyectando el Paisaje”. Facultad de Arquitectura, Diseño y Estudios Urbanos. Pontificia Universidad Católica de Chile.

VIII. ACTIVIDADES DE PERFECCIONAMIENTO, ASISTENCIA A CONFERENCIAS Y SIMPOSIOS

2011. Mini sabático realizado en Plant and Food Research, Lincoln, Nueva Zelanda. Investigador anfitrión Dr. Mary Christey. Tema: uso de herramientas biotecnológicas como apoyo al mejoramiento genético de especies ornamentales.

2001. Curso **“Bases Fisiológicas para el Cultivo de Flores Bulbosas”** dictado por los profesores Marcel Le Nard y Pierre Allemand, INRA-Francia. INIA-Carillanca/ FIA. Trailanqui, Temuco. Chile.

Febrero, 2012

Anexo VIII-5

CURRICULUM VITAE

Gabriela Verdugo Ramírez se titula **Ingeniero Agrónomo** en 1976 en la Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Valparaíso, en 1988 se gradúa de **Magíster en Ciencias Agropecuarias** en la Pontificia Universidad Católica de Chile, desde 1994 es profesor titular ejerciendo las cátedras de floricultura y fundamentos de horticultura

Desde 1978 realiza investigación en manejo de flores cortadas, con especial énfasis en especies nativas y poscosecha. Ha dirigido proyectos con aporte institucional como Métodos de conservación y multiplicación de toromiro (*Sophora toromiro*), a través de la injertación, Evaluación agronómica de dos ecotipos y semillas F1 de Leucocoryne, Examinación y circunscripción de algunas especies de chloraea (Orchidaceae) e híbridos naturales presentes en Chile: Evidencias morfológicas, moleculares y citológicas. Ha dirigido proyectos presentados a concursos nacionales como Fondef: Producción de propágulos (o plantas fundación) de bulbos de flores, Fondo SAG: Defensa del patrimonio genético del Leucocoryne a través del mejoramiento genético y su introducción como cultivo para flor de corte. Fundación para la Innovación Agraria (FIA): Centro demostrativo de producción y evaluación de nuevas alternativas de flores cortadas, acompañamiento y follaje para pequeños productores de la X Región y Mejoramiento genético de orquídeas chilenas del género *Chloraea* Fundación Copec UC: Caracterización, multiplicación, selección y formación de un vivero de *Fabiana imbricata* y *Glandularia spp*

Participa en la edición del Manual de uso del leucocoryne en paisajismo 2002 Editado por OTT UCV (MANSUR, VERDUGO, ZOELLNER, RIDERMAN, HARRINSON). El año 2006 en el Manual de poscosecha de flores cortadas. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Fundación para la Innovación Agraria. Valparaíso Alvimpres 79 pp mas 21 fichas técnicas. VERDUGO G ; BIGGI M; MONTESINOS A; SORIANO C; CHAHIN G

Premios y distinciones, en 1989 Participa en el Congreso Agronómico presenta la investigación: Efecto de tres tipos de injerto sobre el desarrollo anatómico y continuidad de la unión en rosa (rosa spp) cvs Sonia y Mercedes sobre rosa Canina. Esta investigación obtiene el premio al mejor trabajo presentado en la comisión Hortalizas y Flores de ese año. Co-autores Juan Fajardo, Aurelio Villalobos y Verónica Poblete. El año 2000 Recibe el Premio Nacional del Colegio de Ingenieros Agrónomos a la actividad científica y el 2006 recibe el premio Ministerio de Agricultura FIA a la profesional innovadora

Publicaciones de los últimos años:

CISTERNAS, M. A., SALAZAR, G. A., **VERDUGO, G.**, NOVOA, P., CALDERÓN, X. and NEGRITTO, M. A. (2012), Phylogenetic analysis of Chloraeinae (Orchidaceae) based on plastid and nuclear DNA sequences. Botanical Journal of the Linnean Society. doi: 10.1111/j.1095-8339.2011.01200.x

Steinfort,U.,**Verdugo,g.**,Besoain,X.,Cisternas,M.A. 2010 Mycorrhizal association and symbiotic germination of the terrestrial orchid *Bipinnula fimbriata* (Peopp.) Johnst (Orchidaceae) FLORA vol205 issue 12: [811-817](#)

Valdivia, e., Cisternas, M. y **G. Verdugo**. 2010 Reproductive biology aspects of two species of the genus *Gavilea* (Orchidaceae, Chloraeinae) in populations from central Chile. Gayana Botanica 67 (1) 43-50.

Graber, M.F., Pérez-Correa, J.R., **Verdugo, G.**, Del valle, J.M. y E agosín 2010 Spinning cone column isolation of rosemary essential oil. Food Control 21 820101) 615-619

VERDUGO G, J MARCHANT, M CISTERNAS, X CALDERON y P PEÑALOZA 2007 Cacterización morfolométrica de la germinación de *Chloraea crispa* Lindl usando análisis de imagen Gayana Botanica 64(2):230-236

VERDUGO G, C Mesa, M CISTERNAS y X CALDERON 2007 Preliminar evaluation of acclimatization systems in *Chloraea criapa* Lind (Orchidaceae) from inoculated seeds. Proceedings of the Second International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants ISHS Acta Horticulturae 748 : 147-150

Araneda L y **G Verdugo** 2007 Effect of auxin on rooting during acclimatization of *Leucocoryne* bulbs. Proceedings of the Second International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants ISHS Acta Horticulturae 748 : 121-125

Verdugo G y Texiera Da Silva J 2006. From wild to table: *Leucocoryne* and *Chloraea*. Floriculture Ornamental and plant Biotechnology Global Science Book vol 4 : 356-359.

Anexo VIII-6

CURRICULUM VITAE

Name: Eric Frank WALTON

Academic Qualifications: B Hort Sc (Hons I) Lincoln College, University of Canterbury, New Zealand (1981)

PhD University of California, Davis, USA; Plant Physiology (1988)

Present Position: Enterprise Manager, Auckland University of Otago

Key Competencies:

- Strategic development, planning and tactical implementation
- New business development; proven expertise in identifying and exploring commercial opportunities; perseverance to ensure they can be brought to fruition
- Establishing and sustaining mutually beneficial relationships with key stakeholders
- Understanding the requirements and imperatives of the business world.
- Strong interpersonal and team leadership skills. High professional and ethical standards. Good mentor and motivator of staff
- Success in securing investment for projects from both public and private sources
- Excellent research, communication and editorial skills. .

Professional positions held:

2007- present	Enterprise Manager, University of Otago, Auckland Centre.
2002 - 2007	Senior Scientist, Horticulture and Food Research Institute of New Zealand, Mt Albert Research Centre, Auckland.
1996 - 2002	Senior Scientist, Horticulture and Food Research Institute of New Zealand, Ruakura Research Centre, Hamilton.
1992 - 1996	Scientist, Horticulture and Food Research Institute of New Zealand, Ruakura Research Centre, Hamilton.
1988 - 1992	Scientist, Ruakura Research Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries, Hamilton.
1984 - 1988	Study leave; University of California, Davis, USA; PhD in Plant Physiology with Dr Ted DeJong, Department of Pomology.
1981 - 1984	Scientist (Horticultural Production), Agricultural Research Division, Ministry of Agriculture and Fisheries, Whangarei, New Zealand.

Research interests:

- Regulation of dormancy and budbreak in kiwifruit – Focused on defining what dormancy is in kiwifruit and identifying and characterising genes that regulate the breaking of dormancy and shoot outgrowth. Ultimately, these genes will be used as markers in breeding programmes so that low chill kiwifruit cultivars can be developed. To achieve this, a multifaceted approach has been adopted, including a series of microarrays, proteomics experiments and candidate genes e.g. transcription factors. In addition, a study to determine whether *Arabidopsis* seed dormancy/germination displays genetic parallels with kiwifruit bud dormancy and outgrowth is underway. The microarray and proteomic experiments are based on comparisons between hydrogen cyanamide induced and natural budbreak, and predicted budbreak patterns.
- Flowering in kiwifruit – Defined the timing of floral evocation by describing axillary bud and floral primordia morphogenesis, and the expression patterns of floral meristem identity genes (i.e. the kiwifruit homologues to leafy and apetala1).
- Floricultural crop development – The programme is aimed at enhancing existing and developing new export flower crops for New Zealand and is focused on three species: peony, *Leucocoryne* and *Zephyra*. The peony research is directed towards gaining a better understanding the effects of temperature on growth and flowering, and seasonal the dynamics of carbon storage and utilisation in the plant, but particularly during flower development and senescence. The *Leucocoryne* and *Zephyra* work is focused on describing flower initiation and development in relation to the annual cycle of growth and dormancy and developing suitable postharvest handling protocols.
- Carbon economy of kiwifruit – Determined the carbon demands for fruit and plant growth by determining the seasonal costs of carbon skeletons and growth and maintenance respiration.

Refereed Publications:

1. Wu R-M, Walton EF, Richardson AC, Wood M, Hellens RP, Varkonyi-Gasic E. 2011. Conservation and divergence of four kiwifruit SVP-like MADS-box genes suggest distinct roles in kiwifruit bud dormancy and flowering. *Journal of Experimental Botany* (in press).
2. Walton EF, Bolding HL, McLaren GF, Williams MH, Jackman R. 2010. The dynamic of starch and sugar utilisation in cut peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) stems during storage and vase life. *Postharvest Biology and Technology* 58: 142-146.
3. Richardson AC, Walton EF, Meekings JS, Bolding HL. 2010. Carbohydrate changes in kiwifruit buds during the onset and release from dormancy. *Scientia Horticulturae* 123: 463-468.
4. Judd MJ, Meyer DH, Meekings J, Richardson AC, Walton EF. 2010. An FTIR study of the induction and release of kiwifruit buds from dormancy. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1071-1080.
5. Walton EF, Wu R-M, Richardson AC, Davy M, Hellens RP, Thodey K, Janssen BJ, Gleave AP, Rae GM, Wood M, Schaffer RJ. 2009. A rapid transcriptional activation is induced by the dormancy-breaking chemical hydrogen cyanamide in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) buds. *Journal of Experimental Botany* 60: 3835-3848.
6. Crowhurst RN, Gleave AP, MacRae EA, Ampomah-Dwamena C, Atkinson RG, Beuning LL, Bulley SM, Chagne D, Marsh KB, Matich AJ, Montefiori M, Newcomb RN, Schaffer RJ, Usadel B, Allan AC, Bolding HL, Bowen JH, Davy MW, Eckloff R, Ferguson AR, Fraser LG, Gera E, Hellens RP, Janssen BJ, Klages K, Lo KR, MacDiarmid RM, Nain B, McNeilage MA, Rassam M, Richardson AC, Rikkerink EHA, Ross GS, Schröder R, Snowden KC, Souleyre EJF, Templeton MD, Walton EF, Wang D, Wang MY, Wang YY, Wood M, Wu R-M, Yauk Y-K, Laing WA. 2008. Analysis of expressed sequence tags from *Actinidia*: applications of a cross species EST database for gene discovery in the areas of flavor, health, color and ripening. *BMC Genomics* 9: 351.
7. Walton EF, Wu R-M, Sutherland P. 2008. Bulb and inflorescence development in *Leucocoryne ixioides* (Hook.) Lind. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 574-580.
8. Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3: 12.
9. Walton EF, Wu R-M, Schaffer RJ, Thodey K, Janssen BJ, Richardson AC, Hellens RP, Rae GM, Wood M. 2007. Genetic regulation of budbreak in kiwifruit. *Acta Horticulturae* 753: 561-566.
10. Richardson AC, Walton EF, Bolding HL, Meekings JS. 2007. Seasonal carbohydrate changes in dormant kiwifruit buds. *Acta Horticulturae* 753: 567-572.

11. Pichler FB, Walton EF, Davy M, Triggs C, Janssen BJ, Wünsche JN, Putterill J, Schaffer RJ. 2007. Relative developmental, environmental and tree-to-tree variability in buds from field-grown apple trees. *Tree Genetics and Genomics* 3: 329-339.
12. Hall AJ, Catley JL, Walton EF. 2007. The effect of forcing temperature of peony shoot and flower development. *Scientia Horticulturae* 113: 188-195.
13. Walton EF, McLaren GF, Boldingh HL. 2007. Seasonal patterns of starch and sugar concentrations in the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82: 365-370.
14. Snelgar WP, Clearwater MJ, Walton EF 2007. Flowering of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) is reduced by long photoperiods. *New Zealand Journal Crop and Horticultural Science* 35: 33-38.
15. Newcomb RD, Crowhurst RN, Gleave AP, Rikkerink EHA, Allan AC, Beuning LL, Bowen JH, Gera E, Jamieson KR, Janssen BJ, Laing WA, McArtney S, Nain B, Ross GS, Snowden KC, Souleyre EJF, Walton EF, Yauk Y-K. 2006. Analyses of expressed sequence tags from Apple (*Malus pumila* Mill.). *Plant Physiology* 141: 147-166.
16. Follet JM, Proctor JTA, Walton EF, Boldingh HL, McNamara C, Douglas JA. 2004. Carbohydrate and ginsenoside changes in ginseng roots grown in Bay of Plenty, New Zealand. *Journal of Ginseng Research* 28: 165-172.
17. Elgar HJ, Fulton, TA, Walton EF 2003. Response of *Leucocoryne* inflorescences to postharvest treatments, temperature and exogenous ethylene. *Postharvest Biology and Technology* 55: 127-130.
18. Walton EF, Podivinsky, E, Wu RM 2001. Bimodal patterns of floral gene expression over the two seasons that kiwifruit flowers develop. *Physiologia Plantarum* 111: 396-404.
19. Jordan RB, Walton EF, Klages KU, Sealey RJ. 2000. Post harvest fruit density as an indicator of dry matter and ripened soluble solids of kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology* 20: 163-173.
20. Lancaster JE, Martin ML, Walton EF 2000. S-Alk(en)yl-L-cysteine sulphoxides, alliinase and aroma in *Leucocoryne*. *Phytochemistry* 55: 127-130.
21. Smith GS, Walton EF. 2000. Kiwifruit. In: Temperate Fruit Crops in Warm Climates, A Erez (editor), Kluwer, Netherlands, pp 367-379.
22. Walton EF, Richardson AC, Waller JE, Dow BW. 2000. The effect of time of initiation on the fruitfulness of kiwifruit canes. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 271-275.
23. Walton EF, Wünsche JN, Palmer JW. 1999. Estimation of the costs of organ synthesis in apple. *Physiologia Plantarum* 106: 129-134.

24. Walton EF and Wu RM 1999. Buds on *Actinidia arguta* shoots do contain axillary meristems. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 27: 181-185.
25. Greaves AJ, Henton SM, Piller GJ, Meekings JS, Walton EF 1999. Carbon supply from perennial reserves to spring growth: Modelling spatial patterns in kiwifruit. *Annals of Botany* 83: 431-439.
26. Walton EF, Podivinsky E, Wu RM, Reynolds PHS, Young LW. 1998. Regulation of proline accumulation in kiwifruit buds with and without hydrogen cyanamide treatment. *Physiologia Plantarum* 102: 171-178.
27. Walton EF, Fowke PJ, Weis K, McLeay PL. 1997. Shoot axillary bud morphogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Annals of Botany* 80: 13-21.
28. Walton EF. 1996. Occurrence of multiple shoots bearing flowers arising from single axillary buds on kiwifruit canes treated with hydrogen cyanamide. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 24: 95-97.
29. Walton EF. 1995. Occurrence of secondary floral shoots in summer on *Actinidia eriantha* Benth. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 341-343.
30. Walton EF, Fowke PJ. 1995. Estimation of the annual cost of kiwifruit vine growth and maintenance. *Annals of Botany* 76: 617-623.
31. Smith GS, Klages KU, Green TGA, Walton EF. 1995. Changes in abscisic acid concentration, surface conductance, and water content of developing kiwifruit. *Scientia Horticulturae* 61: 13-27.
32. Podivinsky E, Walton EF, McLeay PL. 1994. Extraction of RNA from kiwifruit tissues. *BioTechniques* 16: 396-398.
33. Walton EF, Fowke PJ. 1993. Effect of hydrogen cyanamide on kiwifruit shoot flower number and position. *Journal of Horticultural Science* 68: 529-534.
34. Walton EF, Clark CJ, Bolding HL. 1991. Effect of hydrogen cyanamide on amino acid profiles in kiwifruit buds during budbreak. *Plant Physiology* 97: 1256-1259.
35. Walton EF, DeJong TM. 1990. Growth and compositional changes in kiwifruit berries from three Californian locations. *Annals of Botany* 66: 285-298.
36. Walton EF, DeJong TM, Loomis RS. 1990. Comparison of four methods calculating the seasonal pattern of plant growth efficiency of a kiwifruit berry. *Annals of Botany* 66: 299-307.
37. Walton EF, DeJong TM. 1990. Estimating the bioenergetic cost of a developing kiwifruit berry and its growth and maintenance components. *Annals of Botany* 66: 417-424.
38. Buwalda JG, Walton EF, Smith GS. 1990. A carbon balance model for the kiwifruit vine. *Acta Horticulturae* 276: 87-95.

39. Walton EF, DeJong TM. 1990. Estimation of the bioenergetic cost to grow a kiwifruit berry. *Acta Horticulturae* 276: 231-237.

Anexo VIII-7

TÍTULOS Y GRADOS

Magister en Ciencias con mención en Botánica. Universidad de Concepción, 1991.

Lic. en Biología. Universidad de Concepción, 1984.

JERARQUÍA ACADÉMICA.

2009 - 2015 Profesor Asistente Adjunto (J.C.), Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

1999 - 2009 Profesor Asistente (J.C.), Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

1997-1999 Instructor Asociado (J.C.), Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

EXPERIENCIA PROFESIONAL.

DOCENCIA.

2005 – 2014 Curso AGC-3665. Biotecnología Vegetal. Programa de Magister en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

2011 – 2014 Curso AGP-3104. Seminario de Posgrado. Programa de Magister en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad

Católica de Chile.

- 2006 - 2014 Curso AGL-203. Genética y Biotecnología. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1997 - 1998 Curso AGC-3150. Metabolismo Intermediario de Plantas. Programa de Magister en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1996 - 1998 Curso AGC-2285. Biotecnología Agropecuaria. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, P. Universidad Católica de Chile.
- 1991 - 1996 Curso Morfotaxonomía Vegetal. Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor.
- 1991 - 1993 Curso Botánica. Facultad de Ciencias Silvoagropecuarias, Universidad Mayor.
- 1988 Profesor ayudante en el Departamento de Botánica, Universidad de Concepción.
- 1984 - 1987 Ayudante-graduado del Departamento de Botánica de la Universidad de Concepción en los cursos: Botánica General, Plantas no vasculares; Botánica General, Plantas vasculares; Fisiología Vegetal.

INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.

- 2014- 2016 Coinvestigadora Proyecto FONDEF- IDeA. Aseguramiento de la calidad sanitaria de *Lilium* a través de la implementación de herramientas biotecnológicas para la identificación, diagnóstico y saneamiento de virus y patógenos subvirales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2013 - 2021 Investigadora Alterna Proyecto INNOVA, Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. “Establecimiento de un programa de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) tempranas y tardías que satisfagan los requerimientos productivos y de poscosecha de la industria chilena en la zona centro y centro sur del país”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2013 - 2021 Investigadora Alterna Proyecto INNOVA, Consorcio Tecnológico de la
-

- Industria Hortofrutícola. “Obtención de nuevas variedades de duraznero, nectarino y ciruelo japonés para el mercado de exportación Fase II”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2011 - 2014 Co-investigadora Proyecto FONDECYT N°1110535. “Risk index for herbicide resistance of GMO crops in Chile“. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2012 – 2015 Coinvestigadora Proyecto FIA PYT-2012-0021. Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola S.A. “Reducción del tiempo de obtención de variedades de duraznero, nectarino y ciruelo japonés, mediante la implementación de una plataforma de evaluación comercial de selecciones avanzadas, provenientes de un Programa de Mejoramiento Genético.
- 2012 - 2013 Investigadora Alterna Proyecto Puente INNOVA, Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. “Establecimiento de un programa de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) tempraneras y tardías que satisfagan los requerimientos productivos y de poscosecha de la industria chilena en la zona centro y centro sur del país”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2012 - 2013 Investigadora Alterna Proyecto Puente INNOVA, Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. “Obtención de nuevas variedades de duraznero, nectarino y ciruelo japonés mediante mejoramiento genético tradicional”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2010 - 2011 Investigadora Alterna Proyecto Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. “Establecimiento de un programa de mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) tempraneras y tardías que satisfagan los requerimientos productivos y de poscosecha de la industria chilena en la zona centro y centro sur del país”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2007 - 2011 Investigadora Alterna Proyecto Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. “Obtención de nuevas variedades de duraznero, nectarino y ciruelo japonés mediante mejoramiento genético tradicional”. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2007 - 2009 Investigadora alterna proyecto COPEC-UC 0035. “Producción intensiva de cultivares híbridos de *Alstroemeria* nativa, para flor en maceta y parques y jardines, para el mercado nacional y norteamericano”. Dpto. de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia
-

Universidad Católica de Chile.

- 2006 - 2008 Investigadora alterna proyecto Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola. "Implementación de un programa de mejoramiento genético en vides de mesa destinadas al mercado de exportación." Facultad de Ciencias Biológicas y Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2005 - 2009 Investigadora alterna proyecto FIA. "Unidad especializada de propagación *in vitro* en especies ornamentales de difícil multiplicación". Dpto. de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2005 - 2008 Co-investigadora proyecto FONDECYT 1050807 "Determinación de índices de resistencia a herbicidas inhibidores ALS en malezas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) y su caracterización molecular". Dpto. de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1999-2001 Investigadora responsable proyecto FONTEC "Implementación de un sistema de masificación de las ganancias genéticas en *Pinus radiata* D. Don a través del proceso de embriogénesis somática". Dpto. de Ciencias de los Recursos Naturales, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1998-1999 Coinvestigadora proyecto FONDEF I2010 "Manejo forestal y uso industrial del Quillay "Facultad de Ingeniería y Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1997-1998 Investigadora responsable Proyecto DIPUC 97/10E "Implementación de un sistema de embriogénesis somática en *Pinus radiata* D. Don." Unidad de Biotecnología Agropecuaria, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1996-1998 Investigadora proyecto "Micropropagación de *Pinus radiata* D. Don. "Convenio Forestal MININCO S.A. - Pontificia Universidad Católica de Chile. Unidad de Biotecnología Agropecuaria, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1993-1996 Investigadora proyecto FONDEF AN09 "Utilización de Ingeniería Genética para la producción de plantas transgénicas de papa *Solanum tuberosum* con resistencia a bacterias patógenas". Unidad de Biotecnología Agropecuaria, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1993 Investigadora proyecto FONTEC "Detección y saneamiento de virus de clavel
-

(*Dianthus caryophyllus*). Unidad de Biotecnología Agropecuaria, Facultad de Agronomía, Pontificia Universidad Católica de Chile.

- 1989 Preparación de muestras para la Xiloteca (CONCw). Departamento de Botánica, Universidad de Concepción.
- 1986 Preparación de muestras para el Herbario (CONC). Departamento de Botánica. Universidad de Concepción.

DIRECCIÓN DE TESIS.

- 2014 **Castro, F.** “Estandarización de un protocolo para la detección de virus en segregantes de ciruelo japonés, duraznero y cerezo dulce”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2014 **Fernández, C.** “Cultivo *in vitro* y saneamiento vegetal de bulbos de liliium”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2014 **León, R.** “Identificación del gen ALS en biotipos de *Sorghum halepense* resistentes y susceptibles a nicosulfuron. Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- 2014 **Meneses, M.** “Análisis de variabilidad genética en un banco de germoplasma de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.), mediante marcadores moleculares”. Tesis para optar al título profesional de Bioquímico. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile. Enero, 2014.
- 2013 **Flores, S.** “Optimización de un protocolo de micropropagación de tres genotipos de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.)”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. 04 de octubre de 2013.
- 2012 **Ramos, P.** “Análisis de variabilidad genética en un banco de germoplasma de duraznero (*Prunus persica* (L) Batsch) y nectarino (*Prunus persica* (L) Batsch var *nucipersica* (Suckow) c.k. Schneid), mediante el uso de microsatélites (SSR). “Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía, Universidad Católica de Temuco. 08 de diciembre de 2012.
- 2011 **Soto, C.** “Optimización de la obtención de progenies de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) mediante germinación *in vitro* y *ex vitro* en diferentes fechas de cosecha y dos periodos de estratificación. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal,
-

Pontificia Universidad Católica de Chile.

- 2009 **Agurto, M.** “Obtención de plántulas de *Prunus persica* (L.) Batsch mediante rescate de embriones y germinación forzada de semillas.” Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2009 **Altamira, A.** “Influencia del período de estratificación, ácido giberélico y bencilaminopurina en el rescate de embriones de duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch).” Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2009 **Bascuñán, P.** “Regeneración de brotes adventicios en *Prunus* sp.” Seminario de Investigación para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2009 **Lara, D.** “Determinación de posibles parentales, de una progenie de *Prunus persica* (L.) Batsch de polinización abierta, mediante ISSRs.” Seminario de Investigación para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- 2009 **Morales, P.** “Identificación de posibles polinizadores mediante marcadores moleculares ISSR, en *Prunus salicina*.” Seminario de Investigación para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile
- 2008 **Erpel, P.** “Comprobación de resistencia a bensulfuronmetilo en hualtata (*Alisma plantago-aquatica*) mediante ensayos de actividad de la enzima acetolactato sintetasa”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile
- 2008 **Tamayo D.** “Desarrollo de un protocolo de multiplicación *in vitro* y regeneración de plantas a partir de hojas de *Prunus* sp.” Proyecto de Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas con mención en Fruticultura. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2008 **Meier, A.** “Establecimiento y multiplicación *in vitro* de *Prunus* sp.” Seminario de Título para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2007 **González, A.** “Introducción del gen del aroma y su detección mediante un marcador de tipo SNP en la variedad de arroz Diamante”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía e Ingeniería
-

Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.

- 2006 **Bustamante, K.** “Establecimiento de un protocolo de marcadores moleculares de tipo AFLP en *Alisma plantago-aquatica* L., maleza del cultivo de arroz en Chile”. Seminario de Título para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2006 **Cordovéz, G.** “Determinación de la actividad de la enzima Aceto lactato sintetasa en biotipos de hualtata provenientes del cultivo de arroz”. Seminario de Título para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2006 **Pereda, S.** “Identificación de polimorfismos asociados a fertilidad en vides de mesa (*Vitis vinifera* L.) mediante marcadores moleculares tipo ISSR y AFLP”. Memoria para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 2005 **Vita, J.M.** “Caracterización fenotípica y molecular de distintos ecotipos de arroz”. Proyecto de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Agronómicas con mención en Fisiología y Producción de Cultivos. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 1998 **Jones, F.** “Implementación de un sistema de embriogénesis somática en *Pinus radiata*”. Proyecto de Título para optar al título profesional de Ingeniero Forestal. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. 67p.

PUBLICACIONES.

- 2014 Fredes, C.; Yousef, G.; Robert, P.; Grace, M.H.; Lila, M.A.; Gómez, M.; **Gebauer, M.** and Montenegro, G. Anthocyanin profiling of wild maqui berries (*Aristotelia chilensis* [Mol.] Stuntz) from different geographical regions in Chile. J Sci Food Agric 94: 2639-2648.
- 2013 Carrasco, B.; Meissel, L.; **Gebauer, M.**; García-González, R. and Silva, H. Breeding in peach, cherry and plum: from a tissue culture, genetic, transcriptomic and genomic perspective. Biol Res 46: 219-230.
- 2012 Carrasco, B.; Díaz, C.; Moya, M.; **Gebauer, M.**; García-González, R. Genetic characterization of Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.) using SSR and ISSR molecular markers. Ciencia e Investigación Agraria 39 (3): 533 – 543.
-

- 2010 San Martin, R.; de la Cerda, T.; Uribe, A.; Basilio, P.; Jordan, M.; Prehn, D and **Gebauer, M.** Evaluation of guindilla oil (*Guindilia trinervis* Gillies ex Hook. et Arn.) for biodiesel production. *Fuel* 89(12): 3785-3790.
- 2010 Jordan, M.; Prehn, D.; **Gebauer, M.**; Neumann, J.; Parada, G.M.; Velozo, J. and San Martin, R. Adventitious root initiation in adult and juvenile cuttings of *Guindilia trinervis*, an endemic plant of Chile suitable for biodiesel production. *Bosque (Valdivia)* 31(3):195-201.
- 2009 Agurto, M.; Altamira, A.; Carrasco, B.; Ayala, M.; Zoffoli, J.P y **Gebauer, M.** Obtención de nuevas variedades de *Prunus persica* (L.) Batsch mediante rescate de embriones provenientes de cruzamientos controlados VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Ministerio de Agricultura, Chile. 1: 553-554.
- 2009 Jordan, M.; **Gebauer, M.**; Neumann, J.; Parada, G.; Prehn, D.; Velozo, J. y San Martin, R. Regeneration responses of *Guindilia trinervis* Gillies ex Hook. et Arn. (Sapindaceae), an endemic Chilean plant for biodiesel production". VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Ministerio de Agricultura, Chile. 1: 159 -160.
- 2009 **Gebauer, M.**; Mejía, N.; Muñoz, L.; Hewstone, N. y Hinrichsen, P. A genetic linkage map of seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.) developed for the analysis of seedlessness y fruit quality QTLs. *Acta Hort.* 827: 369-376.
- 2008 Figueroa, R; **Gebauer, M**; Fischer, A. y Kogan M. "Resistance to Bensulfuron-methyl in Water Plantain (*Alisma plantago-aquatica*) Populations from Chilean Paddy Fields." *Weed Technology* 22: 602-608.
- 2008 Aquea, F.; Poupin, M.J.; Matus, J.T.; **Gebauer, M.** y Arce-Johnson, P. "Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*". *Biotechnol Lett* 30: 1847-1852.
- 2008 Escobar, L.H.; Jordán, M.; Olate, E.; Barrales, L. y **Gebauer, M.** "Direct y indirect *in vitro* organogenesis of *Leucocoryne purpurea* (Alliaceae) a chilean ornamental geophyte." *Propagation of Ornamental Plants* 8(2): 59-64.
- 2007 Mejía, N.; **Gebauer, M.**; Muñoz, L.; Hewstone, N. y Hinrichsen, P. "Identification of QTLs for seedlessness, berry size, y ripening date in a seedless x seedless table grape progeny." *Am. J. Enol. Viticult.* 58: 499-507.
- 2002 Cerda, F., Aquea, F., **Gebauer, M.**, Medina, C. y Arce-Johnson, P. "Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*." *Plant Cell Tissue y Organ Culture* 70: 251-257.
-

- 2002 **Gebauer, M.**, Aquea, F; Medina, C. y Arce-Johnson, P. "Compleat plant regeneration from somatic embryos of *Pinus radiata*." In. Taji, A. y Williams, R. (ed.). "The importance of plant tissue culture y biotechnology in plant sciences. " University of New Engly Publications Unit, Australia. 385-390 pp.
- 2000 Serrano, C., Arce-Johnson, P., Torres, H., **Gebauer, M.**, Gutierrez, M., Moreno, M., Jordana, X., Venegas, A., Kalazich, J. y Holuigue, L. "Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora* subs. *atroseptica*." Amer. J. of Potato Res. 77: 191-199.
- 1999 Stange, C.; Prehn, D.; **Gebauer, M.** y Arce-Johnson, P. "Optimization of *in vitro* culture conditions for *Pinus radiata* embryos y histological characterizations of regenerated shoots." Biological Research 32(1): 19-28.
- 1999 Arce-Johnson, P.; Moreno, M; Acuña, I.; **Gebauer, M.**; Dell Orto, P.; Torres, H.; Oligier, P.; Venegas, A.; Jordana, X.; Kalazich, J. y Holuige, L. "Enhanced resistance to bacterial infection in transgenic potato plants expressing the attacin y the cecropin SB-37 gene." Amer. J. of Potato Res. 76: 169-177.
- 1995 Oligier, P., Parraguez, L., **Gebauer, M.** y Arce-Johnson, P. "Micropropagación y estudios regenerativos in vitro de mora cultivada (*Rubus spp.*)." Ciencia e Investigación Agraria 22(3): 123-130.
- 1991 **Gebauer, M.** "Estudio anatómico del xilema secundario y anatomía foliar de las especies chilenas del género *Azara* Ruiz et Pavón (Flacourtiaceae)". Tesis de Grado. Director: Dr. Roberto Rodríguez R. Programa de Magíster en Ciencias mención Botánica. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Universidad de Concepción. 96 p.
1989. Rivera, P., **Gebauer, M.** y Barrales, H. "Guía de referencias y distribución para la clase Bacillariophyceae en Chile entre 18°28' S y 58° S. Parte II. Datos desde 1982 a 1988". Gayana Bot. 46(3-4):155-198.
- 1989 Rivera, P. y **Gebauer, M.** "Diatomeas chilenas en las colecciones de Boyer, Cleve y Moeller, Schulze y Smith, depositadas en la Academia de Ciencias Naturales de Filadelfia Estados Unidos". Gayana Bot. 46(1-2): 889-116.
- 1984 **Gebauer, M.** "Cultivo *in vitro* de meristemas apicales e hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* cultivar Porrillo Sintético P-556. Unidad de Investigación. Licenciatura en Biología. Universidad de Concepción. 60 p.
-

PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTÍFICAS.

- 2015 Carrasco, B.; **Gebauer, M.**; Klagges, C. y Silva, H. Development of a saturated linkage map in *Prunus salicina* L. using genotyping by sequencing (GBS). XXIII Animal and Plant Genome Conference, San Diego USA. January 10-15, 2015.
- 2014 Carrasco, B.; **Gebauer, M.** y Silva, H. SNPs, SSR, ISSR and phenotypic evaluation of Japanese plum (*Prunus salicina* L.) cultivars. IX Reunión de Biología Vegetal, La Serena, Chile. 1-4 de Diciembre del 2014.
- 2014 Carrasco, B.; **Gebauer, M.**; García-González, R. y Silva, H. Genetic and morphological analysis of the endangered austral papaya (*Vasconcellea chilensis* (Planch. ex A. DC.) Solms). IX Reunión de Biología Vegetal, La Serena, Chile. 1-4 de Diciembre del 2014.
- 2013 Morales, P., Figueroa, R., Carrasco, B., **Gebauer M.** Genetic diversity in susceptible nicosulfuron populations of *Sorghum halepense* (L.) Pers. VIII Reunión de Biología Vegetal, 02-05 de Diciembre, Pucón, Chile.
- 2013 León, R., Hernández, M.J., Figueroa, R., **Gebauer M.** Mutations of acethydroxiacyd synthase (AHAS) gene endowing nicosulfuron resistance in *Sorghum halepense* (L.) Pers. VIII Reunión de Biología Vegetal, 02-05 de Diciembre, Pucón, Chile.
- 2013 Meneses M., Morales P., González M., Silva H., **Gebauer M.**, Carrasco B. Genetic diversity and paternity test in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) VIII Reunión de Biología Vegetal, 02-05 de Diciembre, Pucón, Chile.
- 2013 **Gebauer, M.**; Tamayo, D.; Bascuñán, P. and Fernández, C. Micropropagation of Japanese plum, European plum and the rootstock Mariana 2624. 8th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding (IVCHV). June 02-07, 2013. University of Coimbra, Portugal.
- 2013 Hernández, M., **Gebauer, M.**, Gilabert, H., Figueroa, R. Johsongrass (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) resistant accessions to ALS-inhibiting herbicides from Chilean corn fields. Pp.73. Program and Abstracts: Global Herbicide Resistant Challenge. February 18-22, 2013. Perth, Australia.
- 2012 Hernández, M., **Gebauer, M.**; Gilabert, H.; Figueroa, R. Resistencia cruzada a herbicidas ALS en biotipos de maicillo (*Sorghum halepense*) asociados a semilleros de maíz. En: Libro Resúmenes. 63° Congreso Agronómico de Chile. 6-9 de Noviembre de 2012. Temuco, Chile.
-

- 2012 Moya M., González-Arroyo M., Defilippi B., Salazar E., **Gebauer M.** Silva H. and Carrasco B. Isolation of genes differentially expressed during refrigerated storage involved in internal breakdown of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) fruits. 6th International Rosaceae Genomics Conference. September, 2012. Italy
- 2012 M. González, E. Salazar, M. Moya **M. Gebauer**, B. Carrasco. Gene expansions and conserved clades in R2R3 – myb subfamily across Rosaceae and Arabidopsis genomes: An *in silico* approach to regulation and synthesis of flavonoids compound. 6th International Rosaceae Genomics Conference. September, 2012. Italy.
- 2011 Carrasco, B.; Díaz, C.; Moya, M.; **Gebauer, M.** and García-González, R. Genetic variability in Japanese plum cultivars (*Prunus salicina* Lindl.) using SSR and ISSR. Biotechnological Advances in: In Vitro Horticultural Breeding, IVCHB. September, 2011. Ghent, Bélgica.
- 2010 A. Altamira, M. Agurto, M. Ayala, B. Carrasco J.P. Zoffoli y **M. Gebauer**. Rescate de embriones de cultivares tempraneros de duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch) y ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl). VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria, REDBIO. 01 - 05 de Noviembre de 2010, Guadalajara. México.
- 2010 C. Díaz, M. Moya, **M. Gebauer** y B. Carrasco. Análisis de la variabilidad y relaciones genéticas de ciruelo japonés (*Prunus salicina* Lindl.) mediante marcadores moleculares SSR e ISSR. VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria, REDBIO. 01 - 05 de Noviembre de 2010, Guadalajara. México.
- 2010 B. Carrasco, M. Ayala, **M. Gebauer**, J.P. Zoffoli, M. Faruh, A. Altamira, M. Agurto, y J. Mardones. Stone Fruit Breeding Program: Creating new varieties for the Chilean export industry. 28th International Horticulture Congress. 22 – 27 Agosto 2010. Lisboa, Portugal.
- 2010 M. Moya, **M. Gebauer** y B. Carrasco. Molecular characterization of S-alleles associated with self-incompatibility in Japanese Plum. 5th International Rosaceae Genomics Conference. 14-17 noviembre de 2010. Stellenbosch, Sudafrica.
- 2009 M. Agurto, A. Altamira, M. Ayala, B. Carrasco, Zoffoli, J.P. y **M. Gebauer**. Obtención de nuevas variedades de *Prunus persica* (L.) Batsch mediante rescate de embriones provenientes de cruzamientos controlados. VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. 28 - 30 de octubre de 2009, Pucón. Chile.
-

- 2009 D. Prehn, **M. Gebauer**, M. Jordán, G. Parada y R. San Martín. Germination potential and vegetative propagation of (*Guindilia trinervis* Gillies ex Hook. & Arn.). Reunión Biología Vegetal. La Serena, Chile.
- 2009 M. Jordan, **M. Gebauer**, J. Neumann, G. Parada, D. Prehn, J. Velozo, y R. San Martín. Regeneration responses of *Guindilia trinervis* Gillies ex Hook. et Arn. (Sapindaceae), an endemic Chilean plant for biodiesel production". VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y el Caribe. 28-30 de octubre de 2009, Pucón, Chile.
- 2008 Figueroa, R., Kogan, **M. Gebauer**, M. y A. Fischer. Weed species in paddy rice soils in Chile y their response to sulfonylurea herbicides. 5th International Weed Science. Congress, Canadá, Vancouver, 23-27 June 2008. IWSS Abstract 5: 108.
- 2007 **Gebauer, M.** Asistencia a reunión internacional del grupo "North American Grape Breeders, NAGB" en el marco de las actividades programadas para el proyecto Consorcio, "Mejoramiento genético de vides de mesa". Universidad de California. Davis CA, Estados Unidos.
- 2006 Figueroa, R., Azocar, M.P., Kogan, M. y **M. Gebauer**. Weed community in paddy fields y seed dormancy degrees. 57th Annual Congress of Chilean Agronomist Society. Chile, Santiago, 16-20 October 2006. Simiente 76(3-4): 62.
- 2006 **Gebauer, M.**, Cordovéz, G., Figueroa, R. y Kogan, M. Comprobación de resistencia a bensulfuron en plántulas de hualtata (*Alisma plantago-aquatica*) mediante ensayo enzimático in vivo de ALS. 57° Congreso Agronómico de Chile. Santiago, Chile. 16-20 Octubre 2006. Simiente 76(3-4): 63-64.
- 2006 Kogan, M.; Muñoz, A.; Figueroa, R.; y **Gebauer, M.** *Alisma plantago-aquatica* resistente a metsulfuron y bensulfuron (sulfonilureas) y sensible a penoxulam (triazolopirimidina), todos herbicidas inhibidores ALS recomendados en el cultivo del arroz. 57° Congreso Agronómico de Chile. Santiago, Chile. 16-20 octubre 2006. Simiente 76(3-4): 63.
- 2006 **Gebauer, M.**; Mejía, N.; Muñoz, L.; Hewstone, N. y Hinrichsen, P. A genetic linkage map of seedless table grapes (*Vitis vinifera* L.) developed for the analysis of seedlessness y fruit quality QTLs. 9th International Conference on Grapevine Genetics y Breeding. Udine, Italia.
- 2005 **Gebauer, M.** Asistencia a: International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops y Tropical Species, ISHS, en el marco de las actividades programadas para el Consorcio Tecnológico de la Industria Hortofrutícola de Exportación. Daytona Beach Florida, Estados Unidos.
- 2005 Vita, J.M., Bustamante, K. y **Gebauer, M.** Caracterización fenotípica y molecular en individuos fuera de tipo de arroz en Chile. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de
-

Biología de Chile. Pucón, Chile.

- 2005 Mejía, N., **Gebauer, M.**, Muñoz, L., Hewstone, N. y Hinrichsen P. Construcción de un mapa de ligamiento genético y detección de QTLs asociados a estenoespermocarpia en uva de mesa (*Vitis vinifera* L.) VI Simposio Nacional de Biotecnología. REDBIO. Buenos Aires, Argentina.
- 2002 **Gebauer, M.** y Hinrichsen P. Desarrollo de marcadores moleculares asociados a la estenoespermocarpia en *Vitis vinifera* L. XLV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Puyehue, Chile.
- 2002 **Gebauer, M.**; Aquea, F.; Medina, C. y Arce-Johnson, P. Complete plant regeneration from somatic embryos of *Pinus radiata*. International Association for Plant Tissue Culture y Biotechnology. Australian Branch 7th Meeting. University of New Engly, Armidale NSW, Australia.
- 2001 **Gebauer, M.**; Aquea, F.; Tichauer, J.; Klein, A.; Medina, C. y Arce-Johnson, P. "Implementación de un sistema de regeneración de *Pinus radiata* D. Don a través del proceso de embriogénesis somática." IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Goiania, Brasil.
- 2001 Cerda, F.; Aquea, F.; **Gebauer, M.**; Medina, C. y Arce- Johnson P. "Stable transformation of embryogenic tissue of *Pinus radiata* D. Don by *Agrobacterium tumefaciens*." IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Goiania, Brasil.
- 2000 Prehn, D.; Serrano, C.; Berríos, C.; **Gebauer, M.** Cruz, G. y San Martín, R. "Micropropagación de quillay (*Quillaja saponaria* Mol.) a partir de semillas cultivadas *in vitro*." 51^º Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile. Talca, Chile.
- 1998 Arce-Johnson, P., **Gebauer, M.**, Cerda, F. y Delgado, J. "Transformación genética de *Pinus radiata* para resistencia a la polilla del brote: Posibilidades y avances logrados." XI SILVOTECNA. Biotecnologías aplicadas a la silvicultura de especies forestales de rápido crecimiento. CORMA, Concepción, Chile.
- 1998 Torres, H., Mansilla, S., Gutiérrez, M., Acuña, I., Serrano, C., Moreno, M., **Gebauer, M.**, Oliger, P., Venegas, A., Jordana, J., Arce-Johnson, P., Rojas, J., Holuigue, L. y Kalazich, J. "Evaluación de líneas transgénicas de papa a la infección por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*". IV Congreso Nacional de Biotecnología, Talca, Chile.
- 1998 Serrano, C., Moreno, M., **Gebauer, M.**, Acuña, I., Oliger, P., Venegas, A., Jordana, X., Kalazich, J. y Holuigue, L. "Enhanced resistance to bacterial infection in transgenic potato plants expressing chicken lisozyme, attacin y cecropin SB-37 genes". III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. La Habana, Cuba.
-

- 1998 Stange, C.; Prehn, D.; **Gebauer, M.** y Arce, P. Optimización de las condiciones del cultivo *in vitro* de embriones de *Pinus radiata*. Tercer Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal. REDBIO. La Habana, Cuba.
- 1998 Stange, C.; Prehn, D.; **Gebauer, M.** y Arce-Johnson, P. Caracterización morfológica y molecular de clones de *Pinus radiata* regenerados *in vitro*. Tercer Encuentro Latinoamericano de Biotecnología vegetal. REDBIO. La Habana, Cuba.
- 1997 Prehn, D.; Stange, C. y **Gebauer, M.** Variación fenotípica en clones de *Pinus radiata* D. Don cultivados *in vitro*. XL Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile. Pucón, Chile.
- 1996 Oligier, P., **Gebauer, M.**, Stipo, A., Tesser, B., Apablaza, G. y Arce, P. Evaluación de resistencia a *Erwinia* en papas transgénicas (*Solanum tuberosum*) que portan genes bactericidas. 47º Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile. Santiago, Chile.
- 1996 Prehn, D., Arce, P., Stange, C. y **Gebauer, M.** Micropropagación de *Pinus radiata* D. Don. 47º Congreso Anual de la Sociedad Agronómica de Chile. Santiago, Chile.
- 1995 Oligier P., **Gebauer, M.**; Stipo, A. y Arce, P. Development of a virus cleaning program for export carnations in Chile (*Dianthus caryophyllus*). Segundo Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO. Puerto Iguazú, Argentina.
- 1994 Oligier, P.; Stipo, A.; Santalices, M. y **Gebauer, M.** Identification of the main viruses in cultivated carnations (*Dianthus caryophyllus*). Cuarto Congreso de la Asociación Iberoamericana de Fitopatología. Santiago, Chile.
- 1993 Oligier, P.; **Gebauer, M.**; Stipo, A.; Santalices, M. y Hernández, G. Detección y saneamiento de virus en clavel (*Dianthus caryophyllus*). Tercer Congreso Latinoamericano y Nacional de Biotecnología. INTA, Santiago, Chile.
- 1988 Rivera, P. y **Gebauer, M.** Diatomeas chilenas en las colecciones de Boyer, Cleve & Moeller, Schulze y Smith, depositadas en la Academia de Ciencias Naturales de Filadelfia, Estados Unidos. VII Reunión Nacional de Botánica, Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.
- 1984 **Gebauer, M.** Cultivo *in vitro* de meristemas apicales e hipocotilos de *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Porrillo sintético P-556". V Reunión Nacional de Botánica. Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
-

CURSOS / TALLERES.

- 2011 Taller "Discusiones en clases: Cómo diseñarlas y conducir las para que sean efectivas". 26 de abril y 03 de mayo de 2011. Centro de Desarrollo Docente UC. Programa de Habilidades Docentes.
- 2011 Taller "Diseño y Planificación de Cursos" 17– 21 de enero de 2011. Centro de Desarrollo Docente UC. Programa de Habilidades Docentes.
- 2003 Curso internacional de entrenamiento en análisis de datos genético-moleculares: Genética de poblaciones y mapeo de QTLs. Universidad de Carolina del Norte. INIA Quilamapu, Chillán.
- 1993 "Curso avanzado de transformación de plantas". UNIDO/UNESCO/CIGB, La Habana, Cuba.
- 1988 "Métodos modernos de la sistemática vegetal". Profesores: Dr. Tod F. Stuessy y Dr. David Crawford, The Ohio State University, E.E.U.U. Universidad de Concepción, Concepción.
- 1986 "Taxonomía experimental". Profesor: Dr. Tod F. Stuessy, The Ohio State University, E.E.U.U. Universidad de Concepción, Concepción.
- 1984 "Tópicos sobre diatomeas (Bacillariophyceae)". Profesor: Dr. Charles W. Reimer, Academia de Ciencias Naturales de Filadelfia, E.E.U.U. Universidad de Concepción, Concepción.

OTROS

- 2011 – 2014 Asesor experto del "Comité de Evaluación de Riesgo para la Introducción de Vegetales Genéticamente Modificados" del Servicio Agrícola Ganadero de Chile.
- 2013 Par evaluador para la acreditación de la carrera de Biotecnología molecular de la Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. Agencia AcreditaAcción.
- 2013 Comité de Biotecnología del International Life Sciences Institute Sur-Andino.
-