



## Informe Técnico de Avance

Nombre del proyecto	Tecnología eficiente de propagación acelerada de álamos ( <i>Populus spp.</i> ) mediante Bioreactores de Inmersión Temporal (BITs)
Código del proyecto	PYT-2012-0073
Nº de informe	6
Período informado	1 Noviembre 2014 hasta 30 Abril 2015
Fecha de entrega	7 Mayo 2015
Revisión	R2: 15 Octubre 2015

OFICINA DE PROYECTOS FIA
RECEPCIONADO
Fecha .....
Hora .....
Nº Ingreso .....

14 OCT. 2015  
15:30.  
24404

## CONTENIDO

1.	ANTECEDENTES GENERALES .....	3
2.	EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO .....	3
3.	RESUMEN DEL PERÍODO.....	4
4.	OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO .....	5
5.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE) .....	5
6.	RESULTADOS ESPERADOS (RE) .....	6
7.	CAMBIOS Y/O PROBLEMAS .....	11
8.	ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO .....	12
9.	HITOS CRÍTICOS DEL PERÍODO.....	13
10.	CAMBIOS EN EL ENTORNO .....	14
11.	DIFUSIÓN .....	14
12.	CONCLUSIONES .....	15
13.	ANEXOS.....	16

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

Nombre Ejecutor:	Universidad Católica del Maule
Nombre(s) Asociado(s):	Sociedad Agrícola y Forestal PROPLANTAS LTDA
Coordinador del Proyecto:	Ariel D. Arencibia Rodríguez
Regiones de ejecución:	Maule - Bio Bio
Fecha de inicio iniciativa:	01 de Agosto de 2012
Fecha término Iniciativa:	01 de Julio de 2015

## 2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

Costo total del proyecto		
Aporte total FIA		
Aporte Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	
	Total	

Acumulados a la Fecha		Monto (\$)
Aportes FIA del proyecto		
1. Aportes entregados	Primer aporte	
	Segundo aporte	
	Tercer aporte	
	Cuarto aporte	
	Quinto aporte	
	Sexto aporte	
2. Total de aportes FIA entregados (suma N°1)		
3. Total de aportes FIA gastados		
4. Saldo real disponible (N°2 – N°3) de aportes FIA		
Aportes Contraparte del proyecto		
1. Aportes Contraparte programados	Pecuniario	
	No Pecuniario	
2. Total de aportes Contraparte gastados	Pecuniario	
	No Pecuniario	
3. Saldo real disponible (N°1 – N°2) de aportes Contraparte	Pecuniario	
	No Pecuniario	

## 2.1 Saldo real disponible en el proyecto

Indique si el saldo real disponible, señalado en el cuadro anterior, es igual al saldo en el Sistema de Declaración de Gastos en Línea (SDGL):

SI	x
NO	

## 2.2 Diferencia entre el saldo real disponible y lo ingresado en el SDGL

En el caso de que existan diferencias, explique las razones.

--

## 3. RESUMEN DEL PERÍODO

Durante el periodo se avanzó en el escalado productivo (PROPLANTAS Ltda) de los clones de álamos UCH5, UCH6, UCH7. Para cumplir este objetivo se utilizaron los *stocks* de vitroplantas establecidos previamente en la UCM, por lo que entre los meses de Noviembre 2014- Enero 2015 se micropropagaron en las estaciones BITs del asociado PROPLANTAS Ltda los siguientes volúmenes productivos/clon: UCH5: 36.850 vitroplantas; UCH6: 31.700 vitroplantas; UCH7: 32.650 vitroplantas, totalizando 101.200 unidades durante aproximadamente 3 meses de micropropagación en BITs.

Se explica que esta etapa se desarrolló durante el período de mayor intensidad luminosa en Chile (verano), demostrándose diferencias en el comportamiento entre los genotipos para la variable coeficiente de multiplicación en BITs, con los siguientes resultados/clon: UCH5 (8,1:1); UCH7 (6,5:1); UCH6 (6,3:1).

Después de 4-5 semanas en el ciclo de multiplicación en BITs, se realizaron tratamientos de inducción del enraizamiento (disminución de Carbono en el medio) durante 7 días. Posteriormente las vitroplantas fueron extraídas de los BITs, lavadas con agua e inoculadas con micorrizas por 10 minutos en una solución  $1 \times 10^6$  de esporas/ml de un pool de hongos que incluyen *Scleroderma spp.* y *Pisolithus tinctorius*. Posterior a la micorrización se realizó el proceso de adaptación a condiciones ambientales siguiendo el procedimiento de *speedlings* establecido en PROPLANTAS Ltda. La eficiencia de enraizamiento medida por la capacidad de adaptación a condiciones de invernadero fue 96% (97.152 plantas adaptadas). La eficiencia de micorrización deberá ser determinada en individuos creciendo en condiciones de campo (próxima etapa).

Actualmente se mantiene un stock de plantas de los tres clones para realizar el escalado en BITs en los meses de Junio-Agosto, período de muy baja intensidad luminosa natural en Chile (invierno) lo que aportaría datos básicos para el manejo de la tecnología en condiciones productivas. En este período se deberán producir las aproximadamente 50 000 plantas restantes comprometidas en el proyecto.

Desde inicios de Marzo 2015 se realizan experimentos para diversificar el uso de los BITs a otras especies comerciales de interés del asociado PROPLANTAS Ltda, en este caso, arándano, frambuesa y mora. Los resultados son promisorios e indican la plasticidad de la tecnología para diversos cultivos, lo que aportaría a incrementar la eficiencia del sistema de producción con BITs a escala de Biofábrica.

#### 4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Establecer una tecnología eficiente de producción de plantas de álamo (*Populus spp*) basada en la micropropagación en Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs) y micorrización de plantas *in vitro*.

#### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)

##### 5.1 Porcentaje de Avance

El porcentaje de avance de cada objetivo específico se calcula luego de determinar el grado de avance de los resultados asociados a éstos. El cumplimiento de un 100% de un objetivo específico se logra cuando el 100% de los resultados asociados son alcanzados.

Nº OE	Descripción del OE	% de avance a la fecha
1	Diseñar y construir las estaciones automatizadas de Bioreactores de Inmersión Temporal (BITs).	108,5
2	Optimizar protocolos para la regeneración directa y multiplicación de plantas en híbridos comerciales de álamo ( <i>Populus spp</i> ).	200
3	Establecer los parámetros para la micropropagación del álamo ( <i>Populus spp</i> ) en BITs	105
4	Establecer las condiciones para la micorrización de plantas <i>in vitro</i> de álamo ( <i>Populus spp</i> ).	101,5
5	Lograr la viabilidad económica (rentabilidad) mediante una mayor eficiencia económica de la tecnología para la micropropagación de álamo ( <i>Populus spp</i> ) en BITs - micorrización de plantas <i>in vitro</i> .	80

## 6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

### 6.1 Cuantificación del avance de los RE a la fecha

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
1	1	Estantes (estaciones automatizadas) de BITs instalados en una cámara de crecimiento modificada para favorecer la fotosíntesis <i>in vitro</i> .	BITs		150 BITs	100 BITs	15-9-2014	150
	2	Producción de vitroplantas de álamos a escala piloto pre comercial.	Producción de los BITs instalados		101.200 producidas 97152 adaptadas	150.000 vitroplantas anuales	-	67

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Asociado PROPLANTAS Ltda:

Durante las etapas de experimentación y escalado se micropropagaron en las estaciones BITs del asociado PROPLANTAS Ltda se obtuvieron los siguientes volúmenes productivos por cada clon (Tabla 1): UCH5: 36.850 vitroplantas; UCH6: 31.700 vitroplantas; UCH7: 32.650 vitroplantas. **TOTAL : 101.200 vitroplantas**

Se resume que durante la etapa de **experimentación** los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- Inoculo ( 6 plantas x 4 explantes) x 4 coef multiplicación promedio= **96 plantas / BITs**

Por otra parte durante la etapa de **escalado** los resultados obtenidos fueron los siguientes

- Inoculo (6 plantas x 4 explantes) x 7 coef promedio = **120 plantas/BITs x 35 BITs x 6 etapas**

Para obtener los resultados anteriores se ensayaron diferentes concentraciones de los fitoreguladores TDZ y BAP (Tabla 2). Por los mejores valores estadísticos de la variable número de brotes (coeficiente de multiplicación) se seleccionó para el escalado en BITs el medio compuesto por sales MS + 0.2 mg/L TDZ.

Por otra parte, para la inoculación de los bioreactores se pueden utilizar entre 20 (5 x4) a 24 (6 x 4) explantes por c/u BITs (Tabla 3).

El medio de cultivo MS + 0.2 mg/L TDZ es además suplementado con 15 gr/L sacarosa para el escalado productivo en BITs (Tabla 4), Debido a las condiciones de alta luminosidad ( $300-350 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) de la cámara de crecimiento de PROPLANTAS (Figura 1; 2), así como por el intercambio de aire + CO<sub>2</sub> característica de la tecnología BITs, se posibilita disminuir las concentraciones de fuentes de carbono en el medio de cultivo, incrementando los valores de parámetros relacionados a la actividad fotosintética (Figura 3). La obtención de altos valores de clorofila fluorescente y flujo de CO<sub>2</sub> en plantas de *Populus spp* (clon 7) micropropagadas en 15 gr/L sacarosa evidencia el carácter fotomixotrófico de los cultivos BITs, en este caso con valores más cercanos al control de plantas creciendo en condiciones *ex vitro*, por tanto, con valores de actividad fotosintética autótrofos obtenidos en ambiente real.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

RE1: Corresponde a Figura 1, Figura 2, Figura 3

RE2: Corresponde a Tabla 1, Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
2	3	Plantas de álamos regeneradas en condiciones de cultivo convencional (agar) con un coeficiente de multiplicación estándar.	Coeficiente de multiplicación en agar		8:1	4:1	Dic 2013	200

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Se describirá el protocolo puesto a punto en la UCM y escalado en PROPLANTAS Ltda.

- 1.- Seleccionar estacas sanas procedentes de tocones (banco de donantes) plantados en condiciones de campo.
- 2.- Sembrar los tocones en bolsas con mezcla de tierra : compost relación 1:1. Mantener humedad del suelo en 70% aproximadamente mediante riegos diarios.
- 3.- A partir de las yemas brotadas (rejuvenecidas~1 mes) seleccione las estaquillas que serán llevadas al laboratorio. Lavar con detergente y enjuagar con abundante agua.
- 4.- Desinfectar con hipoclorito de sodio (2%) durante 20 minutos. Enjuagar 4 veces con agua destilada estéril.
- 5.- Secar los materiales vegetales (explantes) durante 10 min sobre placas Petri con papel absorbente estéril en la cabina de flujo laminar.
- 6.- Seccionar cuidadosamente las estaquillas en entrenudos de una sola yema. Utilizar instrumentos estériles en la cabina de flujo laminar.
- 7.- Colocar explantes de una yema (S0) en tubos conteniendo medio MS + 0.2 mg/l TDZ + 30 gr /L. sacarosa. Mantener la temperatura entre 22-25 °C y alta intensidad luminosa.
- 8.- Seccionar los brotes (S1) de entre 10-15 días de los explantes y transferir a medio fresco. Durante el 1er subcultivo generalmente las tasas de multiplicación son de 1: 2.
- 9.- Por intervalos de 3-4 semanas realizar subcultivos a medio fresco separando cuidadosamente las plantas de los clusters así como seccionando los entrenudos que estas generan. Los coeficientes de multiplicación oscilan desde 1:6 hasta 1:8 (dependiendo del genotipo) a partir del 4<sup>to</sup> - 5<sup>to</sup> subcultivo (Figura 4; Tabla 5).
- 10.- Estas plantas deberán ser utilizadas como: a.- Explantes para la micropropagación en BITs; b.- Explantes para la ulteriores subcultivos en medio sólido; c.- Tratamientos controles (cultivos heterotróficos).

NOTA: Con el objetivo de manejar la posibilidad de ocurrencia de variabilidad genética (inducida y/o evidenciada) se deben evitar más de 15-20 subcultivos. (Arencibia y col. 2005. Plant Science 169 (3) : 478-486.

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

RE 3: Figura 4; Tabla 5

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
3	4	Plantas de álamos multiplicadas en BITs con un coeficiente de multiplicación superior al estándar	Coeficiente de multiplicación en BITs		6,9 : 1  (Estándar actual de multiplicación convencional en agar reportados en la literatura.)	6 : 1	6,9 : 1 Obtenido UCM Septiembre 2014  <u>Resultado en producción BITs Enero 2015</u> - UCH5- 8,1: 1 - UCH7- 6,5: 1 - UCH6- 6,3: 1	145
	5	Eficiencia productiva del BITs en álamo	Productividad de los BITs		1,7 plantas / mL de medio	5 plantas / mL de medio	<u>Resultado en producción BITs Enero 2015</u>	34
	6	Multiplicar plantas de álamos en BITs con capacidad inducida para el enraizamiento <i>ex vitro</i> .	Tasa de enraizamiento de los explantes.		97,3 %	90%	<u>Resultado en producción BITs Marzo 2015</u>	136

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Asociado PROPLANTAS Ltda:

Durante el período de mayor intensidad luminosa (verano en Chile) Noviembre 2014- Enero 2015, se demostraron diferencias en el comportamiento entre los genotipos para la variable coeficiente de multiplicación en BITs, con los siguientes resultados/clon: UCH5- 8.1: 1; UCH7- 6.5: 1; UCH6- 6.3: 1 (Tabla 6). Los resultados demostrados tanto en la fase experimental como en el escalado se consideran superiores a los previamente obtenidos en la UCM, explicado porque la cámara de crecimiento de PROPLANTAS Ltda tiene mayor incidencia de luz natural ( $300-350 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ). La disminución de la fuente de carbono en BITs (15 gr/l sacarosa), posibilitó el establecimiento de cultivos mixotróficos lo que relacionado a la posterior inoculación con micorrizas explica los altos índices de adaptabilidad (enraizamiento), aspecto esperado según la hipótesis de trabajo del proyecto. Un resumen del proceso se muestra en la figura 5. Por su parte la figura 6 muestra la reproducibilidad en los índices de multiplicación de álamos obtenidos en BITs.

En la etapa de escalado se estandarizó el parámetro frecuencia de inmersión, aspecto directamente relacionado al principio de la tecnología BITs que plantea que la planta debe estar en mayor contacto con el aire y con el mínimo de humedad posible.

En este caso se seleccionó la frecuencia de inmersión de 8 h que demuestra mayores valores estadísticamente significativos para el coeficiente (tasa) de multiplicación con mayor tiempo de las plantas en contacto con el aire (Tabla 7).

La tabla 8 muestra la comparación para la eficiencia de enraizamiento en bandejas de vitroplantas de *Populus*

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
3	4	Plantas de álamos multiplicadas en BITs con un coeficiente de multiplicación superior al estándar	Coeficiente de multiplicación en BITs		6,9 : 1  (Estándar actual de multiplicación convencional en agar reportados en la literatura.)	6 : 1	6,9 :1 Obtenido UCM Septiembre 2014  <u>Resultado en producción BITs Enero 2015</u> - UCH5- 8,1: 1 - UCH7- 6,5: 1 - UCH6- 6,3: 1	145
	5	Eficiencia productiva del BITs en álamo	Productividad de los BITs		1,7 plantas / mL de medio	5 plantas / mL de medio	<u>Resultado en producción BITs Enero 2015</u>	34
	6	Multiplicar plantas de álamos en BITs con capacidad inducida para el enraizamiento <i>ex vitro</i> .	Tasa de enraizamiento de los explantes.		97,3 %	90%	<u>Resultado en producción BITs Marzo 2015</u>	136

*spp* utilizando las diferentes estrategias de micropropagación *in vitro* establecidas en el proyecto. Las plantas micropropagadas en TIBs + 15 gr/L sacarosa y que fueron micorrizadas muestran mayores valores estadísticamente significativos de eficiencia de enraizamiento *ex vitro*.

En resumen para esta etapa el protocolo propuesto es:

- Seleccionar vitroplantas de *Populus spp* de aproximadamente 5-6 cm de altura del 4<sup>to</sup> - 5<sup>to</sup> subcultivo en medio sólido.
- Seccionar un total 6 plantas en aproximadamente 4 explantes-entrenudos c/u. Tomar cuidado de no dañar las yemas axilares.
- Inocular los explantes en BITs de 1L conteniendo aproximadamente 200 ml de medio MS + 0.2 mg/l TDZ + 15 gr/l sacarosa.
- Programar la estación para una frecuencia de inmersión de 8 h con 5 min de inmersión de las plantas en el medio de cultivo.
- Mantener durante 15 días aproximadamente a temperatura de 25-26 °C y luminosidad natural (parámetro establecido para el período de verano en Chile (Noviembre-Enero).

Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)

Tabla 6; Tabla 7; Tabla 8  
Figura 5; Figura 6

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
4	7	Vitroplantas aclimatadas y micorrizadas durante el paso a vivero	Coeficiente de micorrización		97,3	80	Abril 2015	122
			Producción de plantas micorrizadas		97.152 plantas adaptadas e inoculadas	120 000	Abril 2015	81

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

Para la preparación de los inoculantes se procedió al aislamiento de raíces de plantas de clones *Populus spp* de 5 años de edad procedentes del banco de donantes del proyecto localizado en los campos de Proplantas Ltda. Se seleccionaron al azar secciones de raíces (5 plantas) a una profundidad entre 5-10 cm en el perfil del suelo. Se seccionaron segmentos de raíces de aproximadamente 1cm longitud que fueron llevados al laboratorio y lavados con abundante agua. Las muestras fueron maceradas en 10 ml de agua destilada estéril. Alícuotas del macerado fueron inoculados en placas Petri (20 placas) conteniendo medio sólido PDA (comúnmente usado para el crecimiento de hongos) para verificar el crecimiento de estos microorganismos. Las placas se incubaron a la oscuridad a 28 °C durante 15 días. Desde los 4-5 días comenzó a observarse crecimiento de colonias de hongos y se seleccionaron dos con el fenotipo más frecuente. Resultados preliminares basados en el fenotipo de las colonias que crecieron, permiten predecir que las dos colonias más frecuentes pertenecen a *Scleroderma spp.* y *Pisolithus tinctorius*, aspecto que se deberá corroborar por métodos moleculares.

Para la inoculación (micorrización) de las vitroplantas de *Populus spp* se siguió la metodología descrita por Bernal y col (2008) en plantas de caña de azúcar producidas en BITs con un procedimiento similar al establecido en este proyecto. [Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by temporary immersion bioreactors (TIBs). SugarTech 10 (1): 42-47]. Para ello se realizaron inoculaciones de 1 ml de macerado en erlenmeyers conteniendo 50 ml de medio líquido PDA. A los 10 días de cultivo a 28 °C, oscuridad, 100 rpm,  $2 \times 10^6$  de esporas/ml, se adicionaron 50 ml de agua destilada estéril quedando una dilución (1:1)

La tabla 9 muestra que la influencia de un pre-tratamiento de secado (deshidratación) por 20 min-30 min antes de la micorrización aumenta significativamente el % de plantas enraizadas. Por otra la tabla 10 muestra que el tiempo de inmersión o contacto con la solución de micorrizas de entre 10 min y 30 min incrementa significativamente la eficiencia de enraizamiento *ex vitro* de los clones de *Populus spp* estudiados.

Las vitroplantas fueron extraídas de los BITs, lavadas con agua e inoculadas con el cultivo previamente descrito durante 10 minutos ( solución  $1 \times 10^6$  de esporas/ml). La inoculación se realizó colocando las vitroplantas sobre papel de filtro embebiendo en 100 ml de cultivo del pool de hongos (previamente descrito).(Figura 5C). Posteriormente las plantas inoculadas fueron transplantadas a bandejas conteniendo compost y llevadas a invernadero).(Figura 5D). Las plántulas de aproximadamente 10-15 cm fueron transplantadas a raíz desnuda en bandejas de fibrocemento (Figura 7).

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Tabla 9; Tabla 10  
Figura 5 C; D; Figura 7.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
5	8	Tecnología rentable (eficiente) de micropropagación y aclimatación de álamos ( <i>Populus spp</i> ) a escala de biofábrica.	Eficiencia de la tecnología BITs y de la producción de varetas de álamos		(0.68 USD)	(0,31 USD)		85
			Rentabilidad estimada para una estación productora de un millón de plantas de álamos.		15%	20 %		75

Descripción y justificación del avance de los resultados esperados a la fecha.

En un análisis preliminar se estimaron valores productivos para 3 y 6 meses a partir de la posible utilización de BITs de 3L y 5L; supuestos que serían factibles considerando las dimensiones de los estantes construidos en Proplantas Ltda (Tabla 11). Se evidencia que para llegar a un volumen de producción de + 1 millón de plantas de álamos /temporada se requerirían BITs de una capacidad igual o mayor a 5L (~2000 ml de medio). Se destaca que las relaciones ml medio/planta producida se incrementan a medida que aumenta el volumen de los frascos (Tabla 12), este aspecto podría permitir algún incremento en las tasas de multiplicación en BITs de 5L, supuesto que se debe demostrar en la práctica.

Al finalizar esta etapa faltarían por considerar los siguientes aspectos (a incluir en el informe final):

- Producción de álamos en períodos de menor intensidad luminosa (en curso).
- Producción diversificada de otros cultivos de importancia económica como un concepto de Biofábrica (se incluirá en un punto del análisis del informe final), donde los costos unitarios y valores productivos se medirían a escala individual (tipo de planta) y a su vez en el conjunto de toda la producción.

La tabla 13 muestra el flujo de caja para la producción de vitroplantas de álamos en BITs de 1L-200 ml de medio. Los supuestos utilizados fueron: análisis a 10 años; producción a partir del año 2 con 95 mil plantas, llegando al año 10 con 180 mil plantas.

Costo de producción de las vitroplantas obtenidas: por vitroplanta 2015.

Precio actual vareta método tradicional:

Línea base del indicador costo producción vareta (año 2012)

Documentación de respaldo (indique en que nº de anexo se encuentra)

Tabla 11; 12; 13

## 7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS

Especificar los cambios y/o problemas en el desarrollo del proyecto durante el período informado.

Describir cambios y/o problemas	Consecuencias (positivas o negativas), para el cumplimiento del objetivo general y/o específicos	Ajustes realizados al proyecto para abordar los cambios y/o problemas
<p>1- Se planifica la producción en BITs de alrededor de 50 000 plantas de álamos para los meses de menor intensidad luminosa en la cámara de crecimiento establecida en PROPLANTAS Ltda.</p> <p>2- Se ensaya la multiplicación en BITs-fotomixotróficos de otros cultivos de importancia económica para el asociado PROPLANTAS Ltda (arándano, frambuesa, mora).</p>	<p>Se esperan consecuencias positivas ya que adicionalmente se dispondrá de información que permitiría manejar eficientemente la tecnología en condiciones de invierno.</p>	<p>No se realizaron ajustes significativos en los procedimientos establecidos en el laboratorio.</p>

## 8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

### 8.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas en el período del informe

- Seleccionar cepa(s) de micorriza(s) por su capacidad de colonización en condiciones de vivero
- Establecer experimentos factoriales considerando combinaciones de:
  - a.- Concentración del inoculo;
  - b.- Etapa de desarrollo de las vitroplantas;
  - c.- Tiempo y forma de inoculación.
- Evaluar variables relacionadas a las tasas de adaptabilidad y crecimiento de las plantas en condiciones de invernadero.

### 8.2 Actividades programadas y no realizadas en el período del informe

- Determinar la presencia (efectividad) de micorrización (*biopriming*) tanto en vivero como en condiciones de campo.
- Determinar la eficiencia económica de la tecnología integrada de micropropagación en BITs/micorrización a escala de 150 000 plantas anuales.

### 8.3 Actividades programadas para otros períodos y realizadas en el período del informe

- Evaluar capacidad de inducción de enraizamiento *ex vitro*.
- Validar las mejores combinaciones en tres genotipos comerciales.
- Escalar el resultado en Proplantas.

### 8.4 Actividades no programadas y realizadas en el período del informe

- Evaluar capacidad de multiplicación en BITs-fotomixotróficos de otros cultivos de importancia económica para el asociado PROPLANTAS Ltda (arándano, frambuesa, mora).

## 9. HITOS CRÍTICOS DEL PERÍODO

Hitos críticos	Fecha programada de cumplimiento	Cumplimiento (SI / NO)	Documentación de respaldo (indique en que n° de anexo se encuentra)
Construcción y puesta en funcionamiento de las estaciones automatizadas con 100 unidades de Bioreactores de Inmersión Temporal (BITs) que permitan alcanzar un volumen precompetitivo de 150 000 vitroplantas de álamos anuales (50 000 por cada uno de los tres genotipos que se seleccionen).	31 Julio 2013	SI 15 Septiembre 2014	Figura 1; Figura 2;
Establecimiento de las condiciones (protocolos) para la regeneración/multiplicación en BITs de plantas de álamos con coeficientes de multiplicación cercanos a 1:6. Constituye la principal novedad del proyecto que tiene alcance mundial para el caso de plantas de álamos.	30 Sept 2014	SI 30 Enero 2015	Tabla 2, Tabla 3; Tabla 4; Tabla 5; Tabla 7; Figura 3; Figura 4; Figura 6;
Establecimiento de las condiciones fotomixotróficas y balance hormonal que permitan la inducción del enraizamiento <i>ex vitro</i> y posterior micorrización de las plantas multiplicadas en BITs.	31 Ene 2015	Si 30 Marzo 2015	Tabla 1; Tabla 6; Tabla 8; Tabla 9; Tabla 10; Figura 5; Figura 7

**9.1 En caso de hitos críticos no cumplidos en el período, explique las razones y entregue una propuesta de ajuste y solución en el corto plazo.**

A pesar del avance en esta etapa el Hito Crítico 3 no se da por cumplido porque aún falta por verificar la eficiencia de micorrización de las plantas en condiciones de campo. Esta evaluación está en curso y se entregarán los resultados en el informe final del proyecto.

El NO cumplimiento de este hito es consecuencia del retraso en el cumplimiento de los hitos anteriores. No es necesario realizar ajustes significativos para dar cumplimiento al hito en el período restante del proyecto.

**10. CAMBIOS EN EL ENTORNO**

Indique si han existido cambios en el entorno que afecten el proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros

- Se mantiene una alta demanda potencial de biomasa forestal, cada vez con mayor optimismo por los avances científicos y tecnológicos que se reportan en la obtención y producción del denominado etanol de 2<sup>da</sup> generación a partir de celulosa. Este aspecto se corroboró durante nuestra participación en el taller "Second Generation Bioethanol 2014", celebrado en Campinas, Brasil, los días 10-11 Noviembre de 2014 (ver anexos). Como estrategia para informar sobre estos resultados y su potencial aplicación comercial en el mediano plazo en Chile, se planifica invitar a dos destacados investigadores de la UFSCar (Universidad Federal de San Carlos, Sao Paulo) al seminario de difusión de nuestro proyecto

- Por otra parte, a partir de revisiones de solicitudes de patentes en fuentes nacionales e internacionales se corrobora la necesidad de continuar la innovación tecnológica en la industria biotecnológica de la micropropagación de plantas, en este caso en el uso y aplicaciones de los sistemas BITS.

**11. DIFUSIÓN**

**11.1 Describa las actividades de difusión programadas durante el período:**

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Documentación Generada

**11.2 Describa las actividades de difusión realizadas durante el período:**

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes*	Documentación Generada*

\*Debe adjuntar en anexos material de difusión generado y listas de participantes

## 12. CONCLUSIONES

### 12.1 ¿Considera que los resultados obtenidos hasta la fecha permitirán alcanzar el objetivo general del proyecto?

Si, explicado por los siguientes argumentos:

- La infraestructura tecnológica (BITs) en Proplantas está lista para continuar el escalado productivo de vitroplantas de álamos.
- En esta instalación, durante aproximadamente 3 meses correspondientes al presente informe (verano 2014-2015) se produjeron 101.200 vitroplantas de los clones UCH5, UCH6 y UCH7, mientras 97.152 plantas de álamos fueron adaptadas (96% de eficiencia) a condiciones de invernaderos y posteriormente a campo. Este hecho nos permite estimar que con las instalaciones creadas se puede superar el objetivo del proyecto para el período de 1 año.
- Se argumenta que se decidió postergar para el período invernal (menos horas luz/día) el resto de las vitroplantas que quedan por producir para cumplimentar el objetivo del proyecto (150 000 *in vitro*; 120 000 micorrizadas y adaptadas). La razón es disponer de datos primarios a escala productiva en este período de baja intensidad luminosa, aspecto que nos permitiría manejar con mayor eficiencia la tecnología BITs a escala de biofábrica en condiciones reales.

### 12.2 ¿Considera que el objetivo general del proyecto se cumplirá en los plazos establecidos en el plan operativo?

Si, en correspondencia con lo explicado anteriormente (12.1)

### 12.3 ¿Ha tenido dificultades o inconvenientes en el desarrollo del proyecto?

No han existido dificultades mayores en la etapa correspondiente a este Informe Técnico No 5.

### 12.4 ¿Cómo ha sido el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

Excelente, en correspondencia con la experiencia de trabajo de más de 2 años de proyecto.

### 12.5 En relación a lo trabajado en el período informado, ¿tiene alguna recomendación para el desarrollo futuro del proyecto?

No

### 12.6 Mencione otros aspectos que considere relevante informar, (si los hubiere).

No

## ANEXOS

**Tabla 1.** Resumen correspondiente al número de plantas de álamos producidas en PROPLANTAS Ltda durante las etapas de experimentación y escalado en BITs.

Plantas producidas (Experimentación en BITs: Sept-Oct 2014)					Plantas producidas en escalado 35 BITs/etapa/clon (3 meses Nov 2014-Ene 2015 / etapas de 15 días)							
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Sub Total	1er Nov	2da Nov	1er Dic	2da Dic	1er Ene	2da Ene	Sub Total	TOTAL
UCH 5	250	300	320	870	5860	5900	5980	5950	6100	6190	35 980	36.850
UCH 6	230	310	300	840	5100	5110	5120	5200	5190	5140	30 860	31.700
UCH 7	210	290	310	810	5250	5210	5230	5280	5450	5420	31 840	32.650
Sub Total	690	900	930	2 520	16210	16220	16330	16430	16740	16750	98 680	101.200

**Tabla 2.** Optimización del balance hormonal en el medio de cultivo para la micropropagación de *Populus spp* en BITs. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda.

Clon / Variable		Tratamientos (Balance hormonal)						
		MS (Control)	MS + 0.2 mg/L TDZ	MS + 0.4 mg/L TDZ	MS + 0.6 mg/L TDZ	MS + 0.5 mg/L BAP	MS + 1 mg/L BAP	MS + 2 mg/L BAP
UCH 5	Número de brotes	1.2 <sup>d</sup> (±0.43)	6.4 <sup>a</sup> (±1.23)	4.7 <sup>b</sup> (±0.80)	1.1 <sup>d</sup> (±0.22)	4.6 <sup>b</sup> (±0.72)	3.2 <sup>c</sup> (±0.74)	2.1 <sup>cd</sup> (±0.65)
	Altura (cm)	3.2 <sup>ns</sup> (±0.95)	2.6 <sup>ns</sup> (±0.88)	2.4 <sup>ns</sup> (±0.91)	3.5 <sup>ns</sup> (±1.20)	2.7 <sup>ns</sup> (±0.84)	2.9 <sup>ns</sup> (±0.78)	3.4 <sup>ns</sup> (±1.03)
UCH 6	Número de brotes	0.9 <sup>d</sup> (±0.39)	5.5 <sup>a</sup> (±1.21)	4.2 <sup>b</sup> (±0.62)	1.4 <sup>d</sup> (±0.49)	3.3 <sup>c</sup> (±0.92)	2.4 <sup>c</sup> (±0.86)	1.6 <sup>d</sup> (±0.57)
	Altura (cm)	2.9 <sup>ns</sup> (±0.42)	2.4 <sup>ns</sup> (±0.43)	3.1 <sup>ns</sup> (±0.68)	3.9 <sup>ns</sup> (±1.09)	3.9 <sup>ns</sup> (±1.13)	3.2 <sup>ns</sup> (±0.98)	3.5 <sup>ns</sup> (±0.92)
UCH 7	Número de brotes	1.3 <sup>c</sup> (±0.42)	6.8 <sup>a</sup> (±1.25)	4.0 <sup>b</sup> (±1.60)	1.5 <sup>c</sup> (±0.54)	4.1 <sup>b</sup> (±1.35)	2.2 <sup>c</sup> (±0.72)	1.8 <sup>c</sup> (±0.73)
	Altura (cm)	3.3 <sup>ns</sup> (±0.94)	2.6 <sup>ns</sup> (±0.64)	3.3 <sup>ns</sup> (±0.99)	3.8 <sup>ns</sup> (±0.83)	3.2 <sup>ns</sup> (±0.79)	3.7 <sup>ns</sup> (±1.13)	3.8 <sup>ns</sup> (±0.96)

**Tabla 3.** Optimización de la densidad de explantes iniciales (inoculo) para la micropropagación de *Populus spp* en BITs. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda.

Clon / Coeficiente de multiplicación (1: X)	Tratamientos (Densidad de explantes /BITs) (No plantas x No entrenudos) / BITs			
	3 x 4	4 x 4	5 x 4	6 x 4
	UCH 5	4.0 <sup>b</sup> (±0.31)	4.5 <sup>b</sup> (±1.13)	7.6 <sup>a</sup> (±0.8)
UCH 6	3.8 <sup>b</sup> (±0.22)	4.1 <sup>b</sup> (±0.91)	6.5 <sup>a</sup> (±0.61)	6.6 <sup>a</sup> (±0.82)
UCH 7	3.2 <sup>b</sup> (±0.54)	3.9 <sup>b</sup> (±0.50)	5.7 <sup>a</sup> (±0.32)	5.9 <sup>a</sup> (±0.42)

**Tabla 4.** Optimización de la concentración de sacarosa para el establecimiento de cultivos fotomixotróficos *Populus spp* en BITs. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda.

Clon / Variable		Tratamientos (Concentración de sacarosa)				
		5 gr/L	10 gr/L	15 gr/L	25 gr/L	30 gr/L
UCH 5	Plantas enraizadas (%)	57.3 <sup>d</sup> (±7.23)	81.2 <sup>b</sup> (±6.32)	<b>98.3<sup>a</sup></b> (±8.51)	73.2 <sup>c</sup> (±7.01)	70.1 <sup>c</sup> (±6.53)
	Plantas cloróticas (%)	38.4 <sup>d</sup> (±8.32)	17.3 <sup>c</sup> (±5.56)	<b>6.2<sup>b</sup></b> (±2.12)	2.6 <sup>a</sup> (±0.94)	0.9 <sup>a</sup> (±0.31)
UCH 6	Plantas enraizadas (%)	48.2 <sup>c</sup> (±8.43)	90.6 <sup>a</sup> (±6.69)	<b>97.5<sup>a</sup></b> (±7.65)	72.9 <sup>b</sup> (±7.82)	70.5 <sup>b</sup> (±8.01)
	Plantas cloróticas (%)	39.9 <sup>d</sup> (±7.55)	15.2 <sup>c</sup> (±4.08)	<b>7.5<sup>b</sup></b> (±2.76)	5.8 <sup>b</sup> (±2.42)	1.2 <sup>a</sup> (±0.44)
UCH 7	Plantas enraizadas (%)	50.5 <sup>c</sup> (±6.91)	93.4 <sup>ab</sup> (±7.41)	<b>97.2<sup>a</sup></b> (±7.58)	87.2 <sup>b</sup> (±6.50)	79.3 <sup>b</sup> (±6.51)
	Plantas cloróticas (%)	46.3 <sup>d</sup> (±8.39)	18.4 <sup>c</sup> (±5.21)	<b>8.2<sup>b</sup></b> (±3.47)	5.3 <sup>b</sup> (±1.98)	1.1 <sup>a</sup> (±0.41)

**Tabla 5.** Coeficientes de multiplicación de *Populus spp* en cultivo *in vitro* convencional (medio sólido) en diferentes subcultivos.

Establecimiento de explantes	RO *	Subcultivos de brotes (plantas) / coeficientes de multiplicación					
		S1	S2	S3	S4	S5	S6
UCH 5	0.8	1	3	4	6	6	8
UCH 6	0.7	1	2	4	5	6	6
UCH 6	0.7	1	3	4	6	6	6

\* Refiere al número de yemas brotadas, no a las pérdidas por contaminación.

**Tabla 6.** Reproducibilidad en las tasas de multiplicación de *Populus spp* obtenidas en las mejores variantes experimentales y durante la etapa de escalado productivo.

CLON	Reproducibilidad: Coeficiente de multiplicación	
	Fase experimental (Sept-Oct)	Etapa de escalado (Nov-Ene)
	UCH 5	7.6
UCH 6	6.5	6.3
UCH 7	5.7	6.5

**Tabla 7.** Optimización de la frecuencia de inmersión para el establecimiento de cultivos fotomixotróficos *Populus spp* en BITs. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda.

Clon / Coeficiente de multiplicación (1: X)	Tratamientos (Frecuencia de inmersión/horas)					
	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h	8 h
<b>UCH 5</b>	5.1 <sup>b</sup> (±0.91)	5.5 <sup>b</sup> (±1.13)	5.6 <sup>b</sup> (±1.02)	6.8 <sup>ab</sup> (±1.23)	7.9 <sup>a</sup> (±1.47)	<b>7.4<sup>a</sup></b> (±1.14)
<b>UCH 6</b>	3.2 <sup>c</sup> (±0.72)	4.3 <sup>b</sup> (±0.91)	4.8 <sup>b</sup> (±0.80)	5.3 <sup>ab</sup> (±1.42)	6.7 <sup>a</sup> (±1.21)	<b>6.8<sup>a</sup></b> (±1.18)
<b>UCH 7</b>	2.4 <sup>c</sup> (±0.34)	4.1 <sup>b</sup> (±0.50)	4.0 <sup>b</sup> (±0.42)	5.3 <sup>a</sup> (±0.73)	5.8 <sup>a</sup> (±1.06)	<b>5.6<sup>a</sup></b> (±1.12)

**Tabla 8.** Eficiencia de enraizamiento de *Populus spp* utilizando diferentes estrategias de micropropagación *in vitro*. Experimentos fueron realizados en PROPLANTAS Ltda.

TRATAMIENTOS (Clon 7)	Eficiencia de enraizamiento (%)
<b>TIBs + 15 gr/L Sacarosa + micorrizas</b>	<b>97.3<sup>a</sup></b> (±3.80)
<b>TIBs + 30 gr/L Sacarosa + micorrizas</b>	81.8 <sup>b</sup> (±4.45)
<b>Agar + 30 gr/L Sacarosa +micorrizas</b>	78.5 <sup>bc</sup> (±5.01)
<b>Control (Agar + 30 gr/L Sacarosa - micorrizas)</b>	69.8 <sup>c</sup> (±6.32)

**Tabla 9.** Optimización de la eficiencia de enraizamiento en cultivos fotomixotróficos de *Populus spp* en BITs mediante pretratamiento de secado. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda

Clon / Plantas enraizadas (%)	Pre-tratamientos (Secado/deshidratación → micorrización)		
	10 min	20 min	30 min
<b>UCH 5</b>	80.2 <sup>b</sup> (±4.23)	<b>96.8<sup>a</sup></b> (±3.13)	97.4 <sup>a</sup> (±2.32)
<b>UCH 6</b>	79.0 <sup>b</sup> (±5.42)	<b>94.5<sup>a</sup></b> (±4.19)	93.7 <sup>a</sup> (±4.76)
<b>UCH 7</b>	81.1 <sup>b</sup> (±5.63)	<b>95.5<sup>a</sup></b> (±3.44)	94.4 <sup>a</sup> (±4.88)

**Tabla 10.** Optimización de la eficiencia de enraizamiento en cultivos fotomixotróficos de *Populus spp* en BITs mediante micorrización. Experimentos realizados en PROPLANTAS Ltda

Clon / Plantas enraizadas (%)	Tratamientos (Tiempo inmersión en solución de micorrizas)			
	5 min	10 min	20 min	30 min
UCH 5	85.1 <sup>b</sup> (±3.41)	97.5 <sup>a</sup> (±2.32)	97.6 <sup>a</sup> (±2.08)	96.6 <sup>a</sup> (±2.43)
UCH 6	87.2 <sup>b</sup> (±2.27)	96.2 <sup>a</sup> (±3.21)	95.4 <sup>a</sup> (±2.62)	95.4 <sup>a</sup> (±3.22)
UCH 7	82.4 <sup>b</sup> (±4.23)	98.3 <sup>a</sup> (±1.60)	97.0 <sup>a</sup> (±1.82)	95.8 <sup>a</sup> (±3.13)

**Tabla 11.** Estimados de producción de plantas de álamos en utilizando BITs de diferentes capacidades en períodos de 3 y 6 meses (alta intensidad luminosa).

	REAL 3 meses (Nov-Ene)	ESTIMADO 3 meses (Nov-Ene)	ESTIMADO 6 meses (Oct-Mar)
150 TIBs 1L → 200 ml medio	98 680		197 360
150 TIBs 3L → 800 ml medio		324 000	648 000
150 TIBs 5L → 2000 ml medio		702 000	1 404 000

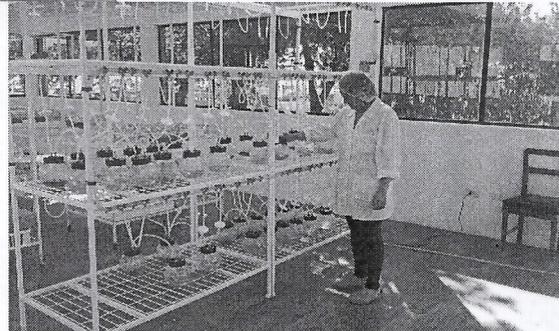
200 ml -  $5 \times 4 \times 6 = 120 \times 6 = 720 \times 150 = 108\ 000$  - 9320 contaminadas = 98 680

800 ml -  $15 \times 4 \times 6 = 360 \times 6 = 2120 \times 150 = 324\ 000$

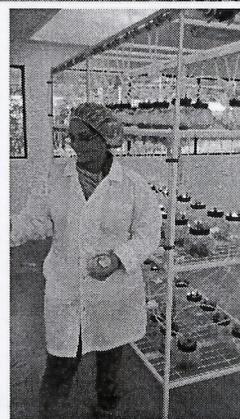
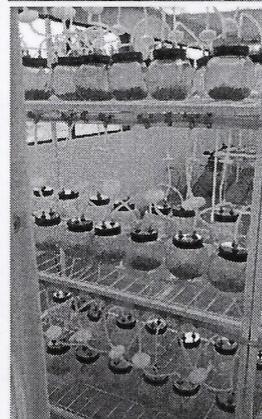
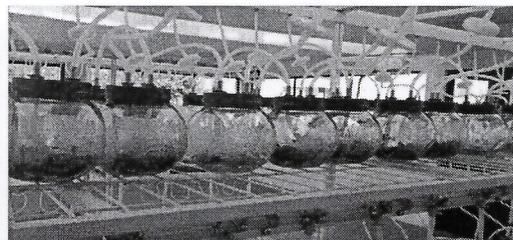
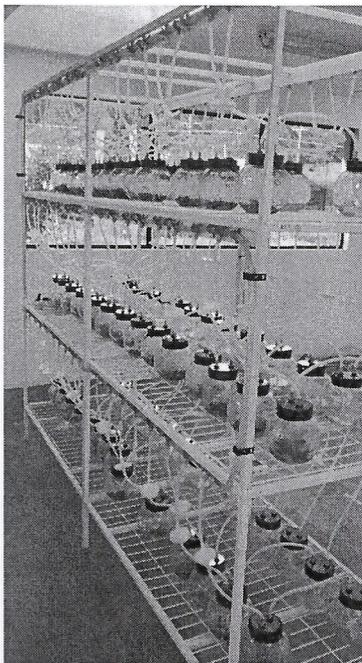
2000 ml -  $30 \times 4 \times 6.5 = 780 \times 6 = 4680 \times 150 = 702\ 000$

**Tabla 12.** Relación real y estimada referida al volumen de medio de cultivo/No plantas de álamos en BITs de diferentes capacidades.

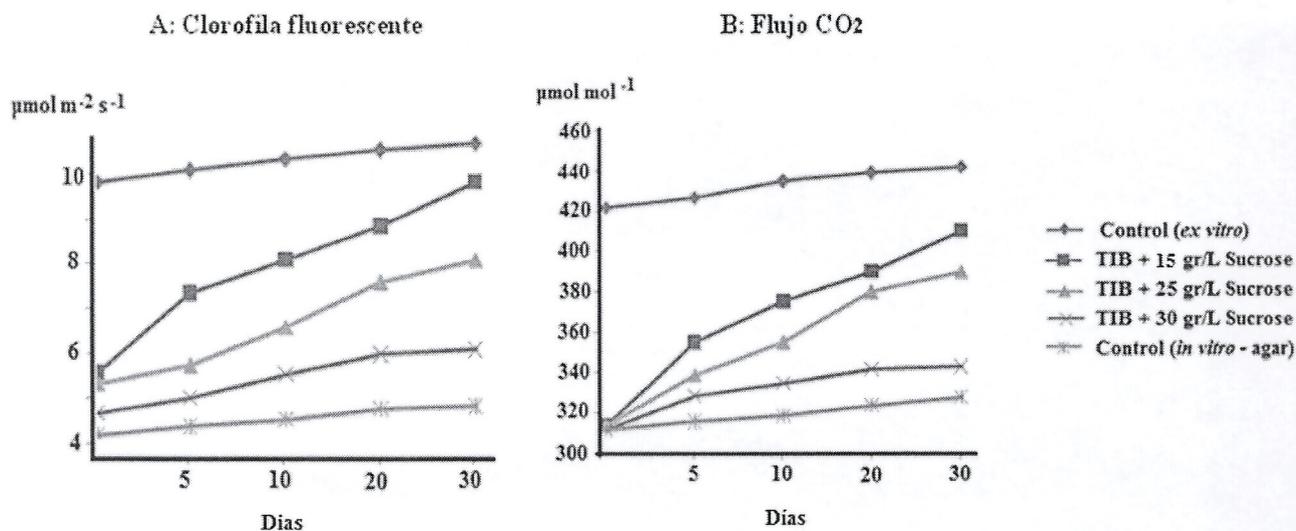
	Total de plantas	Relación ml medio/planta
REAL TIBs 1L → 200 ml medio	120	1.7
ESTIMADO TIBs 3L → 800 ml medio	360	2.2
ESTIMADO TIBs 5L → 2000 ml medio	780	2.6



**Figura 1.** Personal especializado del asociado Proplantas durante el proceso de montaje y optimización de los BITs (fase de pruebas).



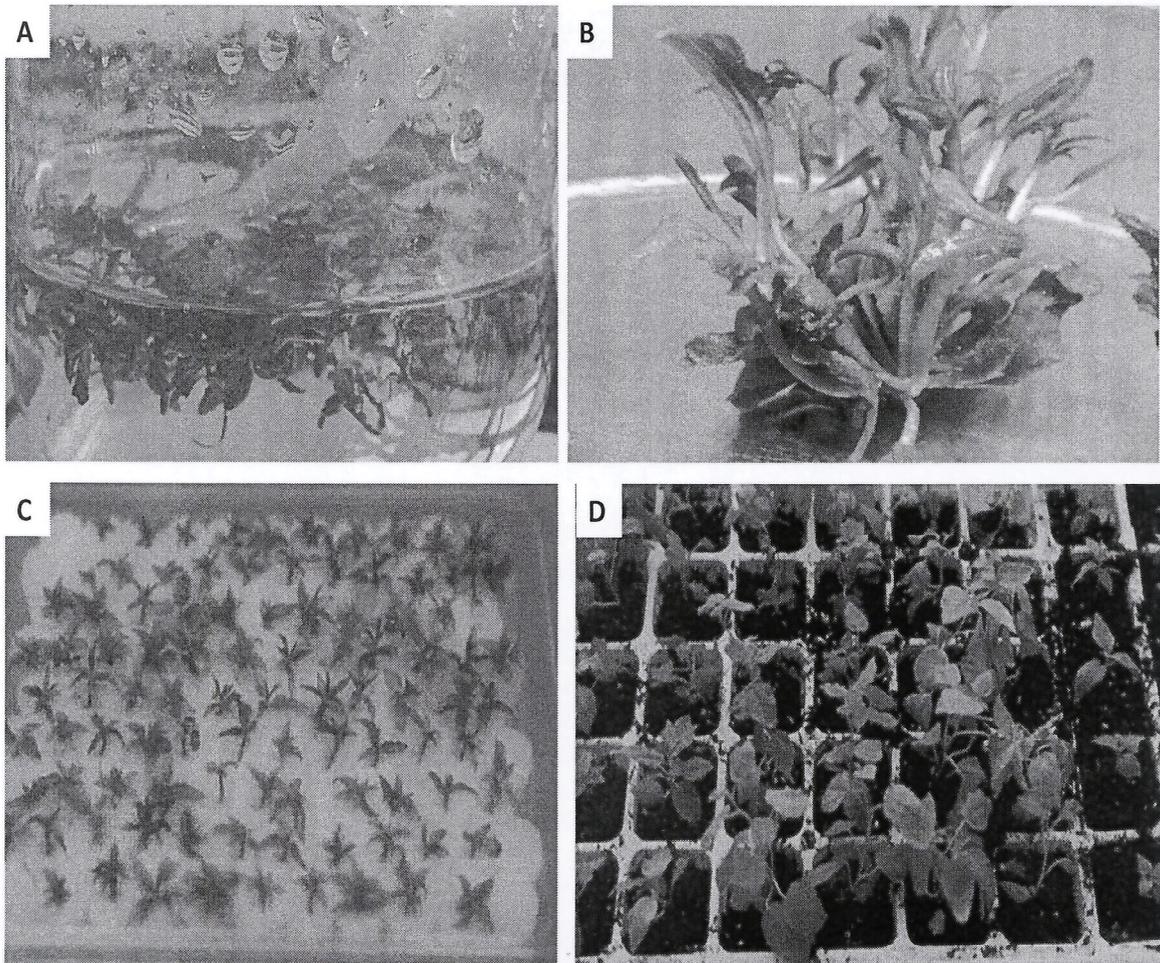
**Figura 2.** Estaciones BITs en funcionamiento durante la etapa final de micropropagación de plantas *in vitro*. Note la elevada incidencia de luz natural en la cámara de crecimiento y multiplicación, característica distintiva del proyecto PYT 2012-0073 que posibilita el desarrollo de cultivos fotomixotróficos (incremento de la fotosíntesis *in vitro*).



**Figura 3.** Determinación de la actividad fotosintética en plantas de *Populus spp* (clon 7) en BITS con diferentes concentraciones de sacarosa. Las muestras fueron evaluadas en la segunda quincena de Enero 2015 (alta intensidad luminosa en PROPLANTAS Ltda) y fotoperiodo de 16 horas siguiendo protocolos previamente reportados por Arencibia y col. (2013). *Scientiae Horticulturae* 160: 49-53; *American Journal of Plant Sciences* 4: 1022-1028.



**Figura 4.** Cultivos en medio sólido de plantas de *Populus spp* utilizados para explantes en la micropropagación en BITS y como tratamiento control de este proyecto. En la foto el Sr Leopoldo Quezada (Jr) verificando los coeficientes de multiplicación obtenidos en medio sólido (MS + 0.2 mg/l TDZ + 30 gr/L sacarosa).



**Figura 5.** Resumen del proceso de micropropagación de álamos (*Populus spp*) en BITs y adaptación a condiciones ambientales semicontroladas.

**A:** Vitroplantas de álamos durante el período de inmersión temporal (3 min) en medio de multiplicación.

**B:** *Cluster* de plantas de álamos que demuestra el coeficiente de multiplicación obtenido en el proyecto (1: 6-8).

**C:** Vitroplantas de álamos durante el proceso de colonización (micorrización). Las plántulas son colocadas durante 10 minutos en una bandeja con papel de filtro embebido en una solución  $1 \times 10^6$  de esporas/ml de hongos.

**D:** Vitroplantas de álamos durante la adaptación a condiciones ambientales siguiendo el procedimiento de *speedlings* establecido en PROPLANTAS Ltda.



**Figura 6.** Vista a contraluz de *clusters* de vitroplantas de álamos donde se demuestra la repetitividad en los coeficientes de multiplicación en BITs obtenidos en el proyecto.



**Figura 7:** Plantas de álamos obtenidas en BITs durante el proceso de adaptación a invernadero por el método de siembra directa. En este caso se ensayó la variante de plantación a raíz desnuda en condiciones de campo.



**Figura 8:** Durante el taller "Second Generation Bioethanol 2014", celebrado en el CTBE Campinas,, Brasil en Noviembre 10-11, 2014.

**Izquierda:** Dr Flavio H Silva Coordinador del Proyecto Bioenergía en la UFSCar (Universidad Federal de Sao Carlos- SP, Brasil).

**Derecha.** Dr Ariel D Arencibia Director del Proyecto FIA PYT 2012-0073-UCM, Chile.