



**CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN INIA CARILLANCA
TEMUCO - REGIÓN DE LA ARAUCANÍA**

Informe Técnico Final.

Modernización del cultivo del avellano europeo a partir del desarrollo de porta injertos clonales (Hazel-Rootstock INIA) que permitan la reducción de vigor y el manejo de huertos en alta densidad para superar el potencial de rendimiento.

CÓDIGO DEL PROYECTO PYT-2014-0031

**INIA - CARILLANCA
OCTUBRE - 2018
TEMUCO - CHILE**



| | |
|---|-------------|
| OFICINA DE PARTES 2 FIA RECEPCIONADO | |
| Fecha | 30 OCT 2018 |
| Hora | 10:15 |
| Nº Ingreso | 52446 |

INFORME TECNICO FINAL

| | |
|---|---|
| Nombre del proyecto | Modernización del cultivo del Avellano Europeo a partir del desarrollo de porta injertos clonales (Hazel-Rootstock INIA) que permitan la reducción de vigor y el manejo de huertos en alta densidad para superar el potencial de rendimiento. |
| Código del proyecto | PYT-2014-0031 |
| Informe final | Informe Final |
| Período informado (considerar todo el período de ejecución) | desde el Enero de 2015 hasta el Octubre 2018. |
| Fecha de entrega | 26 de octubre de 2018 |

| | |
|---------------------------|---------------|
| Nombre coordinador | Miguel Ellena |
| Firma | |

INSTRUCCIONES PARA CONTESTAR Y PRESENTAR EL INFORME

- Todas las secciones del informe deben ser contestadas, utilizando caracteres tipo Arial, tamaño 11.
- Sobre la información presentada en el informe:
 - Debe dar cuenta de todas las actividades realizadas en el marco del proyecto, considerando todo el período de ejecución, incluyendo los resultados finales logrados del proyecto; la metodología utilizada y las modificaciones que se le introdujeron; y el uso y situación presente de los recursos utilizados, especialmente de aquellos provistos por FIA.
 - Debe estar basada en la última versión del Plan Operativo aprobada por FIA.
 - Debe ser resumida y precisa. Si bien no se establecen números de caracteres por sección, no debe incluirse información en exceso, sino solo aquella información que realmente aporte a lo que se solicita informar.
 - Debe ser totalmente consistente en las distintas secciones y se deben evitar repeticiones entre ellas.
 - Debe estar directamente vinculada a la información presentada en el informe financiero final y ser totalmente consistente con ella.
- Sobre los anexos del informe:
 - Deben incluir toda la información que complemente y/o respalde la información presentada en el informe, especialmente a nivel de los resultados alcanzados.
 - Se deben incluir materiales de difusión, como diapositivas, publicaciones, manuales, folletos, fichas técnicas, entre otros.
 - También se deben incluir cuadros, gráficos y fotografías, pero presentando una descripción y/o conclusiones de los elementos señalados, lo cual facilite la interpretación de la información.
- Sobre la presentación a FIA del informe:
 - Se deben entregar tres copias iguales, dos en papel y una digital en formato Word (CD o pendrive).
 - La fecha de presentación debe ser la establecida en el Plan Operativo del proyecto, en la sección detalle administrativo. El retraso en la fecha de presentación del informe generará una multa por cada día hábil de atraso equivalente al 0,2% del último aporte cancelado.
 - Debe entregarse en las oficinas de FIA, personalmente o por correo. En este último caso, la fecha válida es la de ingreso a FIA, no la fecha de envío de la correspondencia.

- El FIA se reserva el derecho de publicar una versión del Informe Final editada especialmente para estos efectos.

CONTENIDO

| | | |
|-----|---|----|
| 1. | ANTECEDENTES GENERALES | 5 |
| 2. | EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO | 5 |
| 3. | RESUMEN EJECUTIVO | 7 |
| 4. | OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO | 12 |
| 5. | OBJETIVOS ESPECÍFICOS (OE)..... | 12 |
| 6. | RESULTADOS ESPERADOS (RE) | 13 |
| 7. | CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO | 33 |
| 8. | ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO..... | 37 |
| 9. | POTENCIAL IMPACTO | 46 |
| 10. | CAMBIOS EN EL ENTORNO | 47 |
| 11. | DIFUSIÓN | 48 |
| 12. | PRODUCTORES PARTICIPANTES | 49 |
| 13. | CONSIDERACIONES GENERALES | 50 |
| 14. | CONCLUSIONES | 52 |
| 15. | RECOMENDACIONES..... | 52 |
| 16. | ANEXOS..... | 53 |
| 17. | BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA | 80 |

1. ANTECEDENTES GENERALES

| | |
|-----------------------------|-----------------------|
| Nombre Ejecutor: | INIA Carillanca |
| Nombre(s) Asociado(s): | Avellanos del Sur S.A |
| Coordinador del Proyecto: | Miguel Ellena D. |
| Regiones de ejecución: | Araucanía |
| Fecha de inicio iniciativa: | 02-01-2014 |
| Fecha término Iniciativa: | 31-03-2018 |

2. EJECUCIÓN PRESUPUESTARIA DEL PROYECTO

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

| Acumulados a la Fecha | |
|---|----------------|
| 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°1 – N°8) de aportes FIA | |
| Aportes Contraparte del proyecto | |
| 1. Aportes Contraparte programado | Pecuniario |
| | No Pecuniario |
| 2. Total de aportes Contraparte gastados | Pecuniario |
| | No Pecuniario |
| 3. Saldo real disponible (N°1 – N°7) 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.

No existe diferencia entre el saldo real disponible y los gastos ingresados al sistema de gestión de proyectos.

3. RESUMEN EJECUTIVO

3.1 Resumen del período no informado

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante el período comprendido entre el último informe técnico de avance y el informe final. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

El periodo no informado se extiende desde el 09 de noviembre de 2017 hasta 26 de octubre de 2018.

Durante el periodo se continúa desarrollando la etapa de aclimatación tanto para portainjertos provenientes de micro estaquillas (RST1 y RST2); porta-injertos provenientes de embriones y variedades Barcelona y Tonda di Giffoni. Esta etapa en general es crítica para la producción de plantas proliferadas y enraizadas in vitro. Considerando las bajas tasas de aclimatación obtenidas con la tecnología de speedling bajo túneles, se inicia la evaluación de la tecnología de aclimatación de plantas individuales encapuchadas en bolsas de polietileno. Los primeros resultados obtenidos señalan que durante los primeros 30 días en los cuales la planta permanece cubierta con capucha, las tasas de sobrevivencia de los patrones clonales se mantienen altas para los embriones (93%) y bajas (24%) para los portainjertos RST1 y RST2. Finalmente, las plantas descubiertas y puestas en condiciones ambientales normales presentaron una caída significativa de la sobrevivencia de todos los materiales en aclimatación.

Se opta por emplear una tecnología que permita el control de las condiciones medioambientales del área de aclimatación y el manejo de plantas en forma masiva. El principal cambio desarrollado tiene relación con el control de humedad relativa a través del sistema de humidificación, el cual, se caracteriza por atomizar las gotas de agua, con alta presión, y con ello formar una niebla que cubre el 100% del espacio asignado, saturando el aire seco con humedad. Lo anterior, impidió la deshidratación inicial de los materiales por un mayor periodo de tiempo, permitiendo finalmente generar una planta funcional. El uso de esta tecnología permitió lograr altas de aclimatación de los portainjertos RST1, embriones TGL3 y las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni, todas ellas con tasas superiores al 40% de sobrevivencia en aclimatación. Aún quedan algunos desafíos metodológicos para mejorar la tasa de aclimatación de algunos materiales, particularmente el embrión Giffoni 1.

Se inicia la etapa final de micro-injertación y que cierra el proceso de la obtención de protocolos de propagación y enraizamiento in vitro, aclimatación y micro-injerto de la combinación portainjerto variedad, el cual permitirá obtener una planta injertada que permitan establecer huertos en mayor densidad de plantación. Los resultados obtenidos durante el primer ensayo muestran que las combinaciones Barcelona RST1 y Giffoni RST1, logran obtener tasas de prendimiento superiores al 50%, por lo que permita hacer viable el desarrollo de esta metodología de injertación proveniente de materiales in vitro.

Finalmente, durante el periodo se llevan a cabo dos actividades masivas de difusión de las nuevas tecnologías. Se desarrolló un día de campo en INIA Carillanca y Fundo Santa Teresa, de la comuna de Vilcún, en el cual se da a conocer a cerca de 80 productores el proceso de producción de plantas in vitro, los resultados de ensayos de investigación en alta densidad, sobre patrones clonales RST1, RST2, RST3 y RST4 y fueron comparados con los resultados de ensayos en alta densidad en marco dinámico con plantas autoradicadas.

Se desarrolla también una actividad masiva de difusión de los resultados del proyecto con participación de cerca de 220 productores, en Seminario: Avances en investigación: "Tecnologías para el impulso de la fruticultura en el sur de Chile". Finalmente se edita el libro "El cultivo del Avellano en Chile: Diez años de recopilación e investigación", en el cual se dan a conocer en detalle los resultados de este proyecto en los capítulos 8 y 9.

3.2 Resumen del proyecto

Informar de manera resumida las principales actividades realizadas y los principales resultados obtenidos durante todo el período de ejecución del proyecto. Entregar valores cuantitativos y cualitativos.

Durante el periodo de ejecución del proyecto (Enero 2015-Octubre 2018) fueron desarrollados los protocolos de micropropagación in vitro, aclimatación y micro-injertación. Durante el proceso de multiplicación in vitro fueron estudiadas las etapas de establecimiento de microestacas y embriones; proliferación en medios sólidos y proliferación, enraizamiento en medio líquido. Dichas etapas fueron desarrolladas sobre portainjertos clonales provenientes de microestaquillas, originadas de plantas madre seleccionadas por bajo vigor. Paralelamente, fueron estudiados portainjertos clonales provenientes de embriones obtenidos a partir de un proceso de selección (Giffoni 1, TGL3 y Trebizonda 7) y las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni, originadas de microestacas, provenientes de plantas madre seleccionadas de campo de colección de INIA Carillanca.

Una vez ajustado el protocolo de cada una de las etapas, el tiempo requerido para la obtención de una planta aclimatada a partir de microestaquillas fue de 458 días para portainjerto RST1 y 453 días para portainjerto RST2. A su vez para las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni se requieren 436 y 530 días, respectivamente. La obtención de una planta aclimatada proveniente de embriones seleccionados mediante la metodología de rescates de embriones alcanza los 490 días para Embrión TGL 3 y 406 días para embrión Trebizonda 7.

La etapa de establecimiento in vitro comprende en promedio un 45% del tiempo del proceso de obtención de una planta aclimatada. Entre las dificultades que hubo que superar esta etapa destaca la alta tasa de mortalidad de explantes provenientes de plantas de campo. A su vez, se disponía de sólo una planta madre, la cual proveía una limitada disponibilidad de material de alta calidad de brotes meristemáticos. Lo anterior ocasionó retrasos en el inicio de la etapa de proliferación. Para superar dichas dificultades, fueron realizados ajustes sucesivos en el protocolo de desinfección superficial. Del mismo modo se realizaron diversos ensayos empleando distintos agentes desinfectantes de alta eficacia y distintas fuentes antioxidantes. Para la obtención de material de alta calidad fueron realizados injertos de púas originados de plantas madres, tanto de portainjertos como de variedades provenientes de microestaquilla, los cuales fueron aislados y tratados con un programa fitosanitario, lo que permitió bajar la carga de

contaminantes y superar con éxito esta compleja etapa.

Los explantes sobrevivientes a la etapa de desinfección tanto de portainjertos y variedades muestran lenta reactividad y baja tasa de proliferación en medios de cultivos sólidos. Se realiza un cambio en la tecnología de proliferación de explantes desde medio sólido hacia medios líquidos a través la incorporación del sistema de inmersión temporal. Esta tecnología permite superar ampliamente la brecha tecnológica presupuestada, incluso duplicando las tasas de proliferación esperadas. De esta manera, bajo el sistema de inmersión temporal la tasa promedio de proliferación alcanzó un incremento mensual 5.64 explantes. En contraste, la tasa promedio de proliferación en medio sólido fue de tan solo 1.5.

A la luz de los resultados, es posible señalar que el cambio tecnológico propuesto y desarrollado en este proyecto permite hacer viable la multiplicación masiva de esta especie a escala comercial. Estos resultados representan un avance significativo en el campo de la propagación de esta especie, la cuál por décadas, ha usado métodos tradicionales de baja eficiencia, impidiendo el desarrollo de huertos en alta densidad que permitan la modernización del cultivo en el mundo.

En cuanto a la etapa de enraizamiento, el método más eficiente fue el de inmersión temporal en medio líquido cuyas tasas superaron en promedio el 70% de enraizamiento para los portainjertos y 89% para las variedades. Al mismo tiempo, se observa que a través de este sistema las plántulas enraizadas muestran un mayor vigor y una mejor calidad de planta, la cual posee mayores condiciones de adaptación al periodo crítico de aclimatación.

Para la etapa de aclimatación fueron utilizadas distintas tecnologías tales como el speedling bajo invernadero, uso de bolsas de polietileno tipo capucha, para aclimatación de plantas individuales y finalmente aclimatación en cámara bajo condiciones ambientales controladas. Los mejores resultados fueron obtenidos en cámara controlada. El uso de la tecnología produce incrementos significativos en las tasas de aclimatación, respecto al uso de plantas encapuchadas. En el caso de las variedades, Barcelona muestra un 53% y Tonda di Giffoni 70% de sobrevivencia de plantas una vez finalizada la aclimatación. En relación con los portainjertos provenientes de microestacas, hubo diferencias importantes. Así, RST1 alcanzó un 47% de aclimatación y RST2 sólo un 13%. Los portainjertos provenientes de embriones, muestran diferencias entre el embrión Giffoni 1, que no sobrevive en esta etapa, y el embrión TGL3 y Trebizonda 7 que alcanzan valores de 22% y 48%, respectivamente.

Una vez concluida la etapa de aclimatación, fue desarrollado un indicador que dio cuenta de la eficiencia del proceso producción de plantas desde proliferación hasta la aclimatación. El factor de eficiencia señala que por cada planta que inicia el proceso de proliferación en medio sólido, terminan 4.13 plantas para Tonda di Giffoni; 2.68 plantas para Barcelona; 0.07 plantas RST2; 1.93 plantas RST1; 0.88 Trebizonda 7; 2.04 plantas TGL3 y 0 plantas del embrión Giffoni 1.

En cuanto a los resultados de microinjertación los mayores porcentajes sobrevivencia post injerto fue alcanzado por Tonda di Giffoni (70%), a pesar de presentar tasa de prendimiento del injerto de un 85%. Barcelona injertada muestra una tasa de 75% de prendimiento de injerto, sin embargo, en el tiempo la sobrevivencia alcanzó un 50% post-injerto. Estas tasas son normales si son comparadas con un injerto tradicional, realizado en campo para avellano europeo. Este ensayo es una primera aproximación, pero que preliminarmente son promisorios, considerando los problemas de cicatrización característicos a nivel del punto de injerto de esta especie

Durante el periodo de desarrollo del proyecto fueron evaluados en campo huertos en alta densidad de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni, bajo distintas combinaciones de portainjertos y densidades de plantación.

Entre los resultados más importantes, la combinación Barcelona RST3, en densidad de 1.333 pl/ha, da inicio la entrada en producción consistentemente durante la primera temporada post-establecimiento.

Las demás combinaciones de portainjerto y densidades evaluadas, inician su producción a la segunda temporada post-establecimiento. En contraste, la variedad Tonda di Giffoni/RST4, para todas las densidades, da inicio la entrada en producción durante temporada de establecimiento. El testigo de Tonda di Giffoni, al igual que el testigo Barcelona, ambos auto radicados, inician su entrada en producción a partir de la segunda temporada post-establecimiento.

En cuanto a las evaluaciones de productividad fue posible determinar en Barcelona, que el efecto de un patrón de mediano vigor y viverizado durante una temporada, produce rendimientos acumulados significativamente superiores, al ser comparado con los portainjertos RST1 y RST2 de menor vigor y sin pasar por la etapa de viverización. Al comparar estos últimos con el tratamiento testigo (auto radicado) los rendimientos acumulados son muy inferiores. Así, los rendimientos alcanzados por la mejor combinación RST3 en marco de plantación 5x1.5 metros, obtuvo un rendimiento de 95,5 kg/ha. Este resultado está lejos de alcanzar los resultados programados de (375 Kg/ha) a la segunda temporada de evaluación post-establecimiento.

Para Tonda di Giffoni, el uso de patrones en alta densidad produce incrementos significativos en los rendimientos acumulados. Claramente se aprecia que el efecto de injerto anticipa la entrada en producción respecto a la planta auto radicata. La meta propuesta (375 kg/ha) es superada largamente por las combinaciones RST4-Giffoni, en el marco 5x1 y 5x1.5 m, 398 y 634 kg/ha, respectivamente.

Se realizó un estudio de costeo para definir el costo unitario de una planta de Avellano europeo, provenientes tanto la variedad (Giffoni) como el portainjerto (RST1) para una capacidad instalada de 35.000 plantas. El costo unitario de producción alcanza un valor de \$4.002, al cabo de 38 meses de producción.

Al evaluar un proyecto de 100 ha de Tonda di Giffoni, actualmente la variedad más valorada en el mercado, con el uso o no de la tecnología, se observa que la inversión inicial con tecnología se duplica al pasar de 500 pl/ha a 1.333 pl/ha. De esta manera la inversión en plantas de un huerto en alta densidad es de (\$6.644.738), respecto a la situación sin proyecto con un valor con un costo de plantas de (\$964.800).

Fue realizada la estimación de ingresos, en una situación con proyecto, a partir del cual se tomó como ejemplo el mejor resultado productivo de la combinación Giffoni/RST4 obtenido hasta la temporada 3. Los siguientes periodos corresponde a una estimación de producción en alta densidad a partir del cual se espera obtener producciones del orden de 4.000 Kg/ha en pleno régimen productivo, a partir del año 9, acumulando un rendimiento por hectárea de 21.968 Kg. La situación sin proyecto, sobre la base de los rendimientos potenciales de un huerto de Avellano, alcanza los 2.500 kg/ha, acumulando en el periodo de evaluación un total de 12.800 kg. En la medida que se cumpla el supuesto anterior, el uso de la tecnología, podría agregar valor a los proyectos en un menor periodo de tiempo. De esta forma, a los 10 de años de evaluación, la situación con proyecto produce un VAN/Ha de \$3.222.981, una tasa interna de retorno al 10%, de 14% y un periodo de recuperación de capital de 7 años. A diferencia de la situación sin proyecto, cuyos indicadores financieros señalan que un proyecto a los 10 años genera un VAN negativo de (-2.278.094) y una tasa interna de retorno de (5%), y en dicho periodo no es posible

recuperar completamente el capital invertido.

Finalmente, la brecha tecnológica planteada en el proyecto no es posible ser determinada, debido a que solamente existen 3 temporadas de evaluación con el uso de la tecnología. Por lo tanto, la brecha tecnológica que actualmente existe es validar en campo, los ensayos de investigación actualmente en desarrollo, y a la espera de financiamiento, para determinar la curva de producción a 10 años cuando el huerto inicie su pleno régimen productivo.

4. OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Incrementar el rendimiento potencial del avellano europeo, mediante la densificación del cultivo a partir de porta-injertos enanizantes (Hazel-Rootstock INIA), para mejorar la competitividad en la industria.

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 al término del proyecto ¹ |
|-------|---|--|
| 1 | Obtener plantas injertadas de Avellano Europeo sobre porta-injertos clonales enanizantes (Hazel-Rootstock INIA), a partir de la validación de la técnica micro-injerto in vivo , para la obtención de un alto volumen de plantas en espacios reducidos y en cortos periodos de tiempo. | 100% |
| 2 | Incrementar la densidad de plantación de dos variedades de avellano europeo injertadas sobre porta-injertos clonales enanizantes (Hazel-Rootstock INIA), para anticipar la entrada en producción e incrementar el rendimiento potencial de los huertos. | 100% |
| 3 | Evaluar económicamente la producción plantas injertadas y la producción de nuez con las tecnologías desarrolladas. | 100% |
| 4 | Difundir y transferir las tecnologías desarrolladas a empresas asociadas y productores de avellano europeo en Chile. | 100% |
| | | |

¹ Para obtener el porcentaje de avance de cada Objetivo específico (OE) se promedian los porcentajes de avances de los resultados esperados ligados a cada objetivo específico para obtener el porcentaje de avance de éste último.

6. RESULTADOS ESPERADOS (RE)

Para cada resultado esperado debe completar la descripción del cumplimiento y la documentación de respaldo.

6.1 Cuantificación del avance de los RE al término del proyecto

El porcentaje de cumplimiento es el porcentaje de avance del resultado en relación con la línea base y la meta planteada. Se determina en función de los valores obtenidos en las mediciones realizadas para cada indicador de resultado.

El porcentaje de avance de un resultado no se define según el grado de avance que han tenido las actividades asociadas éste. Acorde a esta lógica, se puede realizar por completo una actividad sin lograr el resultado esperado que fue especificado en el Plan Operativo. En otros casos se puede estar en la mitad de la actividad y ya haber logrado el 100% del resultado esperado.

| Nº OE | Nº RE | Resultado Esperado ² (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | Fecha alcance meta real ⁸ | % de cumplimiento |
|--|-------|--|------------------------------------|--|--|---|--|--------------------------------------|-------------------|
| | | | Nombre del indicador ³ | Fórmula de cálculo ⁴ | Meta del indicador ⁵ (situación esperada) | Meta del indicador ⁶ (situación final) | Fecha alcance meta programada ⁷ | | |
| 1 | 1 | Obtención de 1 protocolo de multiplicación <i>In Vitro</i> de porta-injertos INIA RST1-2 con un 70% de eficiencia de enraizamiento. | % Enraizamiento del porta-injerto. | Nº explantes enraizados <i>In Vitro</i> / Nº explantes proliferados <i>In Vitro</i> *100 | 70% | 76% | Nov-2016 | Julio-2017 | 100% |
| 1 | 2 | Obtención de 1 protocolo de multiplicación <i>In Vitro</i> de 2 porta-injertos INIA proveniente de embriones , con un 70% de eficiencia de enraizamiento. | % Enraizamiento del porta-injerto | Nº explantes enraizados <i>In Vitro</i> /Nº explantes proliferados <i>In Vitro</i> *100 | 70% | 67% | Nov2016 | Mayo-2017 | 100% |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | |

² Resultado Esperado (RE): corresponde al mismo nombre del Resultado Esperado indicado en el Plan Operativo.

³ Nombre del indicador: corresponde al mismo nombre del indicador del Resultado Esperado descrito en el Plan Operativo.

⁴ Fórmula de cálculo: corresponde a la manera en que se calculan las variables de medición para obtener el valor del resultado del indicador.

⁵ Meta del indicador (situación final): es el valor establecido como meta en el Plan Operativo.

⁶ Meta del indicador (situación final): es el valor establecido como meta en el Plan Operativo.

⁷ Fecha alcance meta programada: es la fecha de cumplimiento de la meta indicada en el Plan Operativo.

⁸ Fecha alcance meta real: es la fecha real de cumplimiento al 100% de la meta. Si la meta no es alcanzada, no hay fecha de cumplimiento.

Proceso de obtención del resultado: Para lograr el resultado esperado fue necesario completar el siguiente flujo de procesos, el cual incluye las siguientes etapas:

- 1) Establecimiento de micro-estacas o embriones.
- 2) Proliferación Medio Sólido.
- 3) Proliferación en Medio líquido.
- 4) Enraizamiento en medio líquido.

Material Vegetal Propagado In Vitro: Fueron estudiados materiales distintos con dos funciones principales:

1.- Porta-injertos clonales: Su función principal será a través de un injerto disminuir el vigor de las variedades principales y con ello establecer huertos en alta densidad. El material estudiado tiene el siguiente origen:

Estaquillas:

RST 1 y RST2: patrones clonales proveniente de planta madres previamente seleccionadas.

Embriones:

Giffoni 1, TGL3 y Trebizonda 7: patrones clonales provenientes de 1 semilla, obtenida de la técnica de rescate de embriones, previo cruzamiento en campo.

2.- Variedades: serán utilizados como injerto en etapa posterior. De esta manera fueron estudiadas las principales variedades de producción en Chile cuyo origen fue el siguiente:

Estaquillas: Proveniente de planta madre previamente seleccionada.

cv Barcelona

cv Tonda de Giffoni.

Resultados:

En el Anexo 1; se muestran los resultados de los principales indicadores de eficiencia productiva, de cada una de las etapas de propagación, para cada uno de los materiales propagados, a partir de los cuales es posible obtener una planta enraizada. A continuación, serán analizadas cada una de las etapas y sus indicadores de logro:

Etapas 1: Establecimiento de micro-estacas y embriones: Esta etapa inicial es la más compleja, debido a que el material proveniente de micro-estacas, presenta bajísimos niveles de sobrevivencia, debido a las altas tasas de contaminación y oxidación de las micro-estacas. En una primera etapa de ajuste del protocolo de desinfección, las tasas de mortalidad alcanzaron un 100% (Mayor detalle; remitir a Informe 4 corregido; punto 1 Cambios y problemas; ajustes realizados en el proyecto). Luego de sucesivos ingresos de material, tanto de porta-injertos y variedades, la evaluación de diferentes ensayos de desinfección y oxidación (Ver más detalle en Informe 3; Anexo 3; cuadro 2) fue posible obtener un protocolo ajustado de acondicionamiento de material. Protocolo descrito en informe 5: Punto 3 Método, protocolo general de desinfección, establecimiento y proliferación de portainjertos y variedades, con modificaciones en Informe 6 Resultados esperados, pagina 7.

Como principal resultado se obtuvo en promedio un 18% de sobrevivencia de los porta-injertos RST1 y RST2 y un 18% de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni (Anexo 1; cuadro 1). Estos resultados son aceptables para la especie *Corylus avellana* y concuerdan con los resultados obtenidos por Ellena,1998; Nass y Read, 2004; Yu, 2004, Damiano *et al*, 2005, entre otros. En el anexo 1; cuadro 2 se muestra los días requeridos -bajo el protocolo ajustado-para que el material muestre la reactividad necesaria para dar paso a la siguiente etapa de proliferación, donde se incrementa el número de explantes gradualmente. Los resultados indican que en promedio se requieren 207 días, de acondicionamiento y saneamiento de material. Para los portainjertos provenientes de microestaquillas, esta etapa se extendió en promedio por 174 días y para las variedades la etapa se prolongó por un periodo de 220 días. Barcelona logró estabilizarse a los 184 días y Tonda di Giffoni a los 256 día. Esta última variedad presentó una baja reactividad en esta etapa. Durante este periodo de tiempo, fue necesario realizar eliminación de material muerto,

Informe Técnico Final

V 2018-06-29

continuos cambios de medios y sus respectivas desinfecciones superficial del material sobreviviente, con el cual fue posible dar término a esta etapa.

En el Anexo 1, cuadro 3, se muestra que esta etapa tiene una duración de un 45% del tiempo total requerido para el proceso de producción de una planta in vitro enraizada.

Etapa 2: Proliferación Medio Sólido de microestaquillas y embriones:

Los resultados obtenidos para los portainjertos provenientes de microestaquillas (Anexo 1; cuadro 4 y 5) fueron similares a los obtenidos por embriones clonales (Anexo 1; cuadros 6, 7 y 8) y para las variedades (Anexo 1; cuadros 9 y 10). En promedio las tasas de proliferación de los portainjertos provenientes microestaquillas (RST1 y RST2), muestran tasas de incremento promedio de 1.34 explantes por mes. Los portainjertos provenientes de embriones y las variedades muestran tasas de proliferación ligeramente superiores (1.66 y 1.63) respectivamente, al ser comparado con aquellas tasas de proliferación provenientes de microestaquillas. Como fue mencionado en el informe N°6, los explantes de los porta-injertos RST1 y RST2, si bien inician la etapa de proliferación, las tasas obtenidas a través de medios sólidos fueron muy bajas. Luego de reiterados intentos por ajustar distintas concentraciones de nutrientes, hormonas, minerales, antioxidantes y fuentes de carbohidratos (Ver detalle en: Informe N°6; Sección 3 Método; Punto 1.4 Multiplicación de material in vitro; página 21 y Punto 1.5 Repique página 22), se concluye que, a través del uso de medios sólidos, no se logra obtener tasas de proliferación que permitan la multiplicación masiva de estos materiales a una escala comercial.

Etapa 3: Proliferación en Medio líquido:

En el Anexo 1, gráfico 1, es posible observar el incremento significativo de las tasas de proliferación de los explantes de todos los materiales en estudio. De esta manera, bajo el sistema de inmersión temporal la tasa promedio de proliferación alcanzó un incremento mensual 5.64 explantes. En contraste, la tasa promedio de proliferación en medio sólido fue de tan solo 1.5. La diferencia fundamental de ambas tecnologías se debe principalmente a que al interior de los biorreactores se hace posible un mejor intercambio gaseoso hacia los explantes, a diferencia del medio sólido en el cual se produce una acumulación de gases nocivos al interior de los tubos. Asimismo, las frecuencias de inmersión completa producen una mayor superficie de contacto entre los explantes y el medio de cultivo, a diferencia del medio sólido, donde sólo la sección basal del explantes está en contacto directo con el medio de cultivo. No obstante, lo anterior, no es posible emplear este método, sin antes haber desarrollado un protocolo de proliferación en medio sólido, que permita disponer de material de partida, con explantes saneados y reactivos, condición obligatoria para obtener dichos resultados.

A la luz de los resultados, es posible señalar que el cambio tecnológico propuesto y desarrollado en este proyecto permite hacer viable la multiplicación masiva de esta especie a escala comercial. Estos resultados representan un avance significativo en el campo de la propagación de esta especie, la cual por décadas, ha usado métodos tradicionales de baja eficiencia, impidiendo el desarrollo de huertos en alta densidad que permitan la modernización del cultivo en el mundo. Esta conclusión fue compartida por el equipo del Dr. Praveen Saxena (experto en micropropagación SIT en Hazelnuts, Universidad de Guelph, Ontario Canadá) en comunicación personal durante el IX Congreso de Hazelnuts, Samsun, Turquía, realizado en el mes de agosto del 2017.

Etapa 4: Enraizamiento en medio líquido: Como se menciona en el informe N°8, fueron realizados ensayos de enraizamiento con distintos métodos, ex vitro (Informe 7; Anexo 5; cuadro 1 y 2; Informe 8; Anexo 1 cuadro 1y2), in vitro en medio sólido (Informe 7; Anexo 3; cuadro 1,3 y 4) e in vitro en medio líquido, tanto para variedad Barcelona (Informe 8; Anexo 2; cuadro 10); como portainjertos RST1 y RST2 (Informe n°8, Anexo 1; cuadro 3 y 6) y embriones clonales (Informe 8; Anexo 3; cuadro 16; 17 y 18).

El método más eficiente fue el de inmersión temporal en medio líquido cuyas tasas superaron en promedio el 70% de enraizamiento para los portainjertos y 89% para las Variedades (Anexo 1; Gráfico 2). Al mismo tiempo se observa que a través de este sistema las plántulas enraizadas muestran un mayor vigor y una mejor calidad de planta, la cual posee mayores condiciones de adaptación a periodo crítico de aclimatación. La duración promedio de la etapa de enraizamiento es de 30 días.

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

Anexo1. Cuadros: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. **Gráficos:** 1 y 2.

| Nº O E | Nº R E | Resultado o Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | | % de cumplimiento |
|--|--------------|---|------------------------------------|---|---------------|---|--|----------------------------------|----------------------|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | |
| 1 | 3 | Obtención de 1 protocolo de microinjerto In vivo en avellano europeo, con un 60% de prendimiento del injerto. | % Prendimiento del microinjerto | Nº microinjertos vivos/Nº explantes enraizados. | - | 60% | 31-03-2017 | 01-10-2018 | 100% |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | |

Resultados de Aclimatación.

Previamente a la micro-injertación se debe someter a las plantas salidas del vitro a una etapa de aclimatación. Esta etapa en general es crítica para la producción de plantas proliferadas y enraizadas en vitro. Esta planta que sale del laboratorio no es una planta funcional, por lo que es necesario que adapte al medio ambiente en forma gradual. Las tecnologías de aclimatación usadas en arándanos, como el speedling bajo invernadero, y el uso de bolsas de polietileno utilizadas en prunos (cerezos), fueron el punto de partida para definir qué tipo de tecnología es posible de usar eficientemente en plantas de Avellano europeo en fase de aclimatación. En el Anexo 2; cuadro 1 se muestra un resumen de las evaluaciones desarrolladas en la etapa de aclimatación y su vez los resultados obtenidos para las distintas tecnologías evaluadas. Como se informó en el Informe 7; Anexo 6; cuadro 1; a los 40 días de evaluación de tecnología speedling bajo túnel, fue posible observar que la tasa de supervivencia de los explantes, cuyo origen fue en medio sólido, fue de un 24%. Para el caso de explantes provenientes de medio líquido esta tasa arroja un valor de 13% de supervivencia. Posteriormente a los 60 días de evaluación las tasas de mortalidad alcanzan un 100% (Anexo 2; cuadro 1). Entre las causas más probables de no aclimatación de las plantas es la deshidratación de los tejidos foliares. Lo anterior debido a que la humedad relativa del aire que se produjo bajo el micro-túnel, no fue suficiente para evitar este proceso de deshidratación. Dicho proceso ocurrió antes de que la planta fuera funcional, es decir, acumulación de cera en las hojas, estomas y raíces funcionales.

Considerando los resultados anteriores, se evalúa la tecnología de aclimatación de plantas individuales encapuchadas en bolsas de polietileno. Esta tecnología permite mantener un mayor control de la humedad relativa al interior de las bolsas. Durante los primeros 30 días, en la cual la planta permanece cubierta con capucha, y dos cortes laterales, las tasas de supervivencia de los patrones clonales, se mantienen altas para los embriones (93%) y bajas (24%) para los portainjertos RST1 y RST2. Posteriormente, al dejar las plantas libres de capucha, y en condiciones ambientales bajo invernadero no climatizado, se produce una caída significativa de la supervivencia, particularmente de los portainjertos originados de embriones con valores menores al 5% de supervivencia (Anexo 2; cuadro 1). Por el contrario, alargar el periodo de aclimatación con las plantas encapuchadas, produce pérdidas de plantas por contaminación por hongos de pudrición. Por lo tanto, se concluye que la planta bajo este método de aclimatación no logra ser funcional e independiente con el paso desde un microambiente controlado a un ambiente normal para el desarrollo de plantas funcionales (hojas, estomas y raíces).

Debido a la dificultad de medir el momento óptimo entre el paso de la capucha a una sin capucha, y el alto costo de esta tecnología, que involucra el manejo individual de las plantas, se opta por un cambio tecnológico que permita controlar las condiciones climáticas (temperatura, humedad y fotoperiodo) desde el momento inicial de traslado de las plantas desde el laboratorio hasta la cámara de crecimiento. Por lo tanto, el único cambio propuesto fue trasplantar una plántula enraizada, desde el biorreactor hacia un contenedor individual, bajo condiciones ambientales controladas.

Como se observa en el Anexo 2; gráfico 1, el uso de la tecnología produce incrementos significativos en las tasas de aclimatación, respecto al uso de plantas encapuchadas. En el caso de las variedades, Barcelona muestra un 53% de aclimatación y Tonda di Giffoni 70% de supervivencia de plantas una vez finalizada la aclimatación. En relación con los portainjertos provenientes de microestacas, hubo diferencias importantes. Así, RST1 alcanzó un 47% de aclimatación y RST2 sólo un 13%. Los portainjertos provenientes de embriones, muestran diferencias entre el embrión Giffoni 1, que no sobrevive en esta etapa, y el embrión TGL3 y Trebizonda 7 que alcanzan valores de 22% y 48%, respectivamente.

Las razones que explican dicho incremento, respecto a la tecnología anterior, tienen relación con el sistema de humidificación, el cual, se caracteriza por atomizar las gotas de agua, con alta presión, y con ello formar una niebla que cubre el 100% del espacio asignado, saturando el aire seco con humedad. Lo anterior, impide la deshidratación inicial de los materiales por un mayor periodo de tiempo, hasta que la planta logra ser funcional.

En el gráfico 2, se muestra los periodos de tiempos en el cual se extienden cada uno de las cuatro etapas de propagación in vitro (establecimiento, proliferación sólida, líquida y enraizamiento), sumada a la etapa de aclimatación de plantas.

Como se observa para la producción de una planta se requiere un rango de 400 días para Trebizonda 7 y 530 días la variedad Tonda di Giffoni. Para la producción de portainjertos RST1 y RST2 se requieren 450 días para cumplir con todas las etapas de producción. Cabe destacar que el protocolo completo de producción de plantas in vitro desde la obtención de micro-estacas desde plantas madres o embriones requiere de este periodo de tiempo.

En el gráfico 3 se muestra la tasa de eficiencia de explantes obtenido durante el proceso de producción de plantas. De esta manera, el factor de eficiencia señala que por cada planta que inicia el proceso de proliferación en medio sólido, terminan 4.13 plantas para Tonda di Giffoni; 2.68 plantas para Barcelona; 0.07 plantas RST2; 1.93 plantas RST1; 0.88 Trebizonda 7; 2.04 plantas TGL3 y 0 plantas del embrión Giffoni 1.

Resultados de Micro-injertación:

Se realiza un ensayo de micro-injertación sobre el porta-injerto clonal RST1 y las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni. El experimento fue realizado bajo condiciones de invernadero sobre camas de propagación, con temperatura basal de 27°C durante los primeros 15 días de realizado el injerto. En el cuadro 2 se observa que los mayores porcentajes sobrevivencia post injerto fue alcanzado por Tonda di Giffoni (70%), a pesar de presentar tasa de prendimiento del injerto de un 85%. Barcelona injertada muestra una tasa de 75% de prendimiento de injerto, sin embargo, en el tiempo la sobrevivencia alcanzó un 50% post-injerto. Estas tasas son normales si son comparadas con un injerto tradicional, realizado en campo para avellano Europeo. Este ensayo es una primera aproximación, pero que preliminarmente son promisorios, considerando los problemas de cicatrización característicos a nivel del punto de injerto de esta especie.

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

Anexo 2. Cuadros: 1 y 2. Gráficos: 1, 2 y 3.

| Nº O E | Nº R E | Resultado o Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | | % de cumplimiento |
|--|--------|---|---------------------------------|---|------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|--|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | |
| 2 | 1 | Obtención de plantas maduras de avellano europeo injertadas in vivo sobre portainjertos derivados de estacas INA RST1 RST2 en un período de 18 meses | Tiempo de producción de plantas | Tiempo de producción de plantas (meses) | 32 meses | 18 meses | Junio 2015 | Marzo 2016 | Se discontinúa la línea de tiempo de evaluación. |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | |

Durante dos temporadas (2014-15) y (2015-16), se realizaron dos evaluaciones de enraizamiento in vivo de material proveniente de estacas previamente seleccionadas desde plantas madres RST 1, 2, 3 y 4. Los resultados de la primera temporada fueron los siguientes:

Resultados:

Temporada 1: 2014-2015:

Fueron establecidas 2.142 estacas provenientes de 4 portainjertos previamente seleccionados. A los 81 días de establecidas las estacas se obtuvo en promedio un 40% de enraizamiento. Posteriormente, a los 138 días de evaluación, se obtuvo en promedio un 17% de enraizamiento para los portainjertos RST1, RST2, RST3 y RST4. Se determinó que RST1 obtuvo el menor porcentaje de enraizamiento con un valor de 6%. RST2 presentó el valor más alto de enraizamiento con 30%. RST3 y RST4 presentaron valores de un 6% y 26% de formación de raíces, respectivamente. (Informe N°2; Anexo 1, cuadro 1).

Finalmente, transcurridos 13 meses desde el establecimiento de los ensayos, el promedio general de enraizamiento fue de tan sólo un 4%. Los porcentajes de enraizamiento por porta-injerto fueron: RST1 (1%); RST2 (18%) RST3 (2%) y RST4 (4%) (Informe N°4; O2R1; evaluación de enraizamiento de estacas in vivo; hoja 15 y 16).

No fue posible obtener el indicador de logro de 50% de enraizamiento programado. Por lo tanto, se propone desarrollar una segunda temporada de evaluación, estableciendo ensayos con distintas concentraciones de hormonas inductores del enraizamiento.

Temporada 2: 2015-2016

Se estableció un nuevo ensayo de dosis de hormona y los resultados fueron los siguientes:

- 1) Transcurridos cinco meses de establecimiento de estacas de origen apical fue posible observar que el porcentaje promedio de mortalidad para cada porta-injerto y de cada tratamiento fue de un 71%. El porcentaje de mortalidad menor correspondió a RST1 tratamiento 4 (IBA 1000+Putrexina 1000) con un 49%. El mayor porcentaje es RST4 tratamiento 3 (500 IBA+1000 Putrexina) con un 86% de mortalidad.
- 2) No se observó un efecto en el enraizamiento de estacas apicales, tras la aplicación de distintas fuentes y dosis de Auxinas y Putrexina.
- 3) Se observó una defoliación prematura de las yemas, particularmente en el porta-injerto RST1, el cual a los 30 días alcanzó un 67% de defoliación. Los demás porta-injertos y tratamientos aumentaron su porcentaje de defoliación en forma paulatina en el tiempo, sin embargo, a los 90 días el porcentaje promedio superó el 50%.
- 4) El porcentaje de enraizamiento promedio para todos los porta-injertos y todos los tratamientos fue de un 14%. Los tratamientos más altos fueron RST1 T1 y T2 (1.000 IBA); RST2 T2 (1.000 IBA); RST3 T4; (1000 IBA+1000 Putrexina), con un 19% de enraizamiento. El más bajo RST4 T3 (500 IBA+1000 Putrexina); con un 8% de enraizamiento (Informe 4 corregido; cuadro 3; Anexo 3).

- 5) El alto porcentaje de mortalidad (71%), debido a la alta defoliación y en consecuencia un bajo porcentaje de enraizamiento, obtenido para ambas temporadas, nos permite concluir que el método de propagación por estacas en Avellano europeo, no es un sistema eficiente de propagación de los materiales en estudio (Informe 4 corregido; cuadro 3; Anexo 3).

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

| Nº O E | Nº R E | Resultado o Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | | % de cumplimiento |
|--|--------------|--|---------------------------------|---|---------------|---|--|----------------------------------|--|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | |
| 2 | 1 | Obtención de plantas maduras de avellano europeo injertadas in vivo sobre portainjertos derivados de Acodos INIA RST1 RST2 en un período de 18 meses | Tiempo de producción de plantas | Tiempo de producción de plantas (meses) | 32 meses | 18 meses | Junio 2015 | Marzo 2016 | Se discontinúa la línea de tiempo de evaluación. |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | |

Para dar continuidad a la línea de investigación y establecer plantas injertadas en alta densidad, se han propagado in vivo acodos de porta-injertos de RST1, RST2 RST3 y RST4, los que fueron injertados sobre la variedad Barcelona y Tonda di Giffoni. Fueron realizadas dos temporadas de injerto para la obtención de material requerido para posteriormente dar inicio al establecimiento de ensayos en alta densidad:

Temporada 1: 2014-2015

El material proveniente de acodos de plantas madres RST1, RST2, RST3, RST4, fue injertado (injerto púa tipo inglés) sobre las variedades Barcelona y Giffoni. Para el cv Barcelona fueron injertadas 104 plantas con patrón RST1, 49 plantas con RST2 y 90 plantas con RST3. Para el cv Giffoni fueron injertadas 80 plantas RST4.

Temporada 2: 2015-2016

Para ello durante el mes de septiembre de 2015 fueron realizados injertos de los patrones RST1 y RST2 sobre las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni. En Barcelona fueron injertados 80 patrones RST 1 y 122 patrones RST2. En Tonda di Giffoni, se injertaron 65 RST1 y 50 RST2.

Resultados:

Como se observa en el anexo 3, cuadro 1, los mayores porcentajes de prendimiento de injertos se observaron para los portainjertos RST3 y RST4, cuyos valores alcanzan un 78% y 100% de prendimiento, respectivamente. Estos portainjertos provienen de acodos que permanecieron durante 1 año de crecimiento en vivero. Estas plantas presentaron calibres iguales o mayores a 19 mm de diámetro basal del eje principal y vigor homogéneo.

Los portainjertos RST1 y RST2, obtuvieron un 32% y 43% de prendimiento promedio durante las dos temporadas de evaluación. Los portainjertos son provenientes directamente material de acodo, sin tener previamente un año de viverización. Estos patrones al derivar de una (1) planta madre produce material heterogéneo, con distintos tamaños y calibres, lo cual se traduce en un menor porcentaje de prendimiento, lo cual se produce por una deficiente proliferación de tejido de callo y por consiguiente una débil cicatrización en el punto de injerto (Anexo 3; cuadro 1).

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

Anexo 3, Cuadro 1

| Nº O E | Nº R E | Resultado Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | | % de cumplimiento |
|--|--------|--|-----------------------------------|--|------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | |
| 2 | 2 | Entrada en producción del huerto 2015 a la segunda temporada de evaluación en <u>Vilcún</u> | Tiempo de inicio de la producción | Nº temporadas desde inicio de plantación | Tercera | Segunda | 01-06-2017 | 01-06-2017 | 100% |
| 2 | 3 | Aumento de la producción del huerto 2015 en alta densidad a la segunda temporada de evaluación en <u>Vilcún</u> | Rendimiento | Kg/HA | 0 | 375 kg/ha | 01-06-2017 | 01-06-2017 | 100% |
| 2 | 4 | Entrada en producción del huerto 2016 a la primera temporada de evaluación en <u>Vilcún y Gorbea</u> | Tiempo de inicio de la producción | Nº temporadas desde inicio de plantación | Segunda | Primera | 01-06-2017 | 01-06-2017 | 100% |
| 2 | 5 | Aumento de la producción del huerto 2016 en alta densidad a la primera y segunda temporada de evaluación en <u>Vilcún y Gorbea</u> | Rendimiento | Kg/HA | 0 | 50 kg/ha | 01-06-2017 31-3-2018 | 01-06-2017 31-3-2018 | 100% |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | |

Análisis de resultados:

1.- Entrada en producción del huerto.

Variedad Barcelona:

Establecimiento 2015-16: en el Anexo 4, cuadro 1, se observa que la combinación Barcelona RST3, en densidad de 1.333 pl/ha, da inicio la entrada en producción consistentemente durante la primera temporada post-establecimiento. El testigo y todas las combinaciones de Portainjerto y densidades evaluadas, inician su producción a la segunda temporada post-establecimiento.

Establecimiento 2016-17: en el Anexo 4, cuadro 2, se observa que la variedad Barcelona sobre el Portainjerto RST1 y RST2 no comienzan la entrada en producción durante la primera temporada post-establecimiento. Estos resultados coinciden con el establecimiento 2015-2016 donde la variedad con iguales combinaciones de portainjertos no inician su periodo productivo.

Variedad Tonda di Giffoni:

Establecimiento 2015-16: en el Anexo 4, cuadro 3, se observa que la combinación Tonda di Giffoni RST4, para todas las densidades, da inicio la entrada en producción durante temporada de establecimiento. Sin embargo, los rendimientos consistentes se visualizan a partir de la primera temporada post-establecimiento. El testigo de Tonda di Giffoni, al igual que el testigo Barcelona, ambos auto radicados, inician su entrada en producción a partir de la segunda temporada post-establecimiento.

Establecimiento 2016-17: en el Anexo 4, cuadro 4, se observa que la variedad Tonda di Giffoni, sobre el Portainjerto RST1 y RST2 no inicia la entrada en producción durante la primera temporada post-establecimiento. Estos resultados difieren con el establecimiento 2015-2016 donde la variedad sobre la combinación RST4 de portainjertos da inicio a su periodo productivo inmediatamente en la temporada de establecimiento. Es posible que estos resultados tengan una relación directa con el vigor y calidad de porta-injerto. En el anexo 3, cuadro 1 se muestra a RST4 como un porta-injerto de muy alto vigor y calibre homogéneo del eje, el cual *mostró un alto porcentaje de prendimiento del injerto*, debido a que fue manejado en viverización durante un año, previo al injerto. Esto a diferencia de RST1 y RST2, los cuales fueron injertados directamente, post extracción de acodo. En conclusión, acortar la etapa de viverización no permita anticipar la entrada en producción, y se espera que la entrada en producción comience a partir de la segunda temporada post establecimiento del huerto, al igual que el cultivar Barcelona.

2.- Aumento de la producción del huerto 2015 en alta densidad a la segunda temporada de evaluación:

Variedad Barcelona:

Establecimiento 2015-16: en el Anexo 4, cuadro 1, se muestra el rendimiento acumulado de tres temporadas de evaluación, considerando la temporada de establecimiento. Se observa que el efecto de un patrón de mediano vigor y viverizado durante una temporada, produce rendimientos acumulados significativamente superiores, al ser comparado con los portainjertos RST1 y RST2 de menor vigor y sin pasar por la etapa de viverización. Del mismo al comparar estos últimos con el tratamiento testigo (auto radicado) los rendimientos acumulados son muy inferiores. Se reitera que acortar la etapa de viverización, y partir con un injerto de acodo inmediatamente extirpado de la planta madre, produce efectos negativos sobre el desarrollo de la planta, y su productividad.

Por otro lado, se observa que para el patrón RST3, que sobre las 1333 plantas por hectárea se alcanzan los mayores rendimientos. Lo anterior se debe por el aumento del número de plantas por unidad de superficie, más que el efecto de competencia entre plantas, las cuales presentan suficiente espacio asignado.

Establecimiento 2016-17: para ninguno de los tratamientos se da inicio a la entrada de producción del huerto. Se espera el inicio de producción durante la segunda temporada post-establecimiento.

Variedad Tonda di Giffoni.

Establecimiento 2015-16

En el anexo 4; cuadro 3, es posible observar que el uso de patrones injertados en densidades altas produce incrementos significativos en los rendimientos acumulados. Claramente se aprecia que el efecto de injerto anticipa la entrada en producción respecto a la planta auto radicada. Esta última se caracteriza por tener periodos improductivos más prolongados, durante la formación del huerto, producto del efecto de juvenilidad, del acodo heredado de la planta madre que se encuentra en continuo proceso vegetativo. No existe un efecto claro de incremento de la densidad de plantación sobre la productividad. Por su parte las plantas aún no compiten entre sí, debido a que no completan su espacio asignado a nivel de copa. Por lo tanto, el efecto del marco 5x1.5 metros (1.333 pl/ha) estaría más bien asociado a variabilidad de estructura de planta y vigor de planta más que la densificación propiamente tal.

Establecimiento 2016-17

Al igual que los resultados obtenidos para la variedad Barcelona, no se produce entrada en producción a la primera temporada post establecimiento de aquellos portainjertos directamente injertados de acodos y de menor vigor respecto a RST3 y RST4. Se espera que durante la próxima temporada se inicie la entrada en producción de este ensayo.

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

Anexo 3, Cuadro 1

Anexo 4, Cuadro 1, 2, 3 y 4.

| Nº O E | Nº R E | Resultado o Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | % de cumplimiento |
|--|--------------|--|--|--------------------------|-------------------------------|---|------------|--|----------------------------------|----------------------|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | | | | |
| 3 | 1 | Informe con evaluación económica de la producción de plantas micro-injertadas. | Costos de producción de plantas in Vitro | \$/ unidad de producción | Costo Unitario \$1.000/planta | Costo (\$2.500/planta) | 01-06-2017 | 01-10-2018 | 100% | |
| Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto. | | | | | | | | | | |

En el Anexo 5, cuadro N°1, se presenta el flujo de procesos correspondiente 9 ciclos de propagación in vitro para las obtención de variedad Tonda di Giffoni y portainjerto RST1. Ambos materiales fueron usados como modelo debido a sus mejores indicadores de logro para cada una de las etapas de propagación in vitro. Se realizó un modelo de simulación en cual se ingresan 500 microestacas de cada material. El ciclo 1, que comprende desde la etapa de desinfección y termina en la etapa de injertación se prolonga por un periodo de 590 días (20 meses). Una vez que los explantes inician la etapa de proliferación in vitro, el ciclo de producción de plantas se acorta a 158 días, de continuas proliferaciones in vitro en medio líquido, bajo inmersión temporal a tasa de 5.7 explantes/explante ingresado. De esta manera la tasa de producción de plantas es exponencial en el tiempo. Así, en el mes 24 es posible producir en torno a las 587 combinaciones (Tonda di Giffoni-RST1), el mes 28 alrededor de 5.151, al mes 33 9.481 al mes 37 20.631 combinaciones. Cabe señalar que la producción de plantas considera las tasas de enraizamiento de un 72% para ambos individuos, 45% de plantas enraizadas se aclimatan, para ambos individuos y finalmente con una tasa de 60 % de prendimiento de los injertos.

En función de los indicadores previamente señalados se realizó un estudio de costeo para definir el costo unitario de una planta de Avellano europeo, provenientes tanto la variedad (Giffoni) como el portainjerto (RST1) para una capacidad instalada de 35.000 plantas. En el Anexo 5, cuadro 9 se presenta un resumen de los costos para cada una de las salidas de la etapa de injertación y costo de total de todo el proceso. Se observa el costo unitario de la producción de 35.000 plantas alcanza un valor de \$4.002, al cabo de 38 meses de producción.

Se observa que los costos fijos de producción representan un 95% de los costos totales. A su vez aproximadamente el 80% de los costos fijos totales lo representa los ítems recurso humano. El 20% de los costos fijos de operación lo representa la energía eléctrica requerida para el funcionamiento de todo el proceso de producción in vitro. Al analizar los costos variables (Anexo 5; cuadro 7 y 8), es posible observar que el uso de insumos de laboratorio representa solamente el 5% de los costos variables de operación. Por lo tanto las eficiencias de costos, pasan fundamentalmente por la eficiencia de la productividad de la mano de obra.

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

Anexo 5. Cuadros: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

| Nº O E | Nº R E | Resultado o Esperado (RE) | Indicador de Resultados (IR) | | | | | | % de cumplimiento |
|--------|--------|---|--|--|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------|
| | | | Nombre del indicador | Fórmula de cálculo | Línea base | Meta del indicador (situación final) | Fecha alcance meta programada | Fecha alcance meta real | |
| 3 | 2 | Informe con evaluación económica de la producción de huertos en alta densidad | Rentabilidad estimada proyecto inversión | VAN (10 años) TIR Periodo recuperación del capital | \$1.551.214/Ha 12% 7 | \$4.065.870/ha 17% 6 | 01-06-2017 31-3-2018 | 01-10-2018 | 100% |

Descripción y justificación del cumplimiento de los resultados del proyecto.

Se evaluó un proyecto de inversión de 100 ha de Avellano Europeo, a partir del cual se compara el uso de la tecnología (alta densidad) respecto a la tecnología actual (plantas autoradicadas). A partir del costo calculado de producción de una planta injertada (US\$ 5.97) se le agregó un margen comercial y el precio final estimado con tecnología fue de (US\$7.4/planta). En el anexo 6, cuadro 9, se presenta un resumen comparativo de algunos indicadores financieros. La inversión inicial con tecnología se duplica al pasar de 500 pl./ha a 1.333 pl./ha. Con esta densidad fue posible obtener los mejores resultados productivos al cabo de tres temporadas de evaluación incluyendo la temporada de establecimiento. De esta manera la inversión en plantas de un huerto en alta densidad es de (\$6.644.738), respecto a la situación sin proyecto con un valor con un costo de plantas de (\$964.800).

Para el cálculo de los ingresos, en una situación con proyecto, se tomó como ejemplo el mejor resultado productivo obtenido hasta la temporada 3. Los siguientes periodos corresponde a una estimación de producción en alta densidad a partir del cual se obtienen producciones del orden de 4.000 Kg/ha en pleno régimen productivo, a partir del año 9, acumulando un rendimiento por hectárea de 21.968 Kg. A diferencia de la situación sin proyecto, sobre la base de los rendimientos potenciales de un huerto de Avellano, alcanza los 2.500 kg/ha, acumulando en el periodo de evaluación un total de 12.800 kg. Por lo tanto, es preciso señalar que los indicadores planteados son parte de la validación de una hipótesis (desde el 4 al año 10), la cual se espera validar a través de proyecto formulado a FIA, y con ello dar continuidad a la línea de investigación.

En la medida que se cumpla el supuesto anterior, el uso de la tecnología, podría agregar valor a los proyectos en un menor periodo de tiempo. De esta forma, a los 10 de años de evaluación, la situación con proyecto produce un VAN/Ha de \$3.222.981, una tasa interna de retorno al 10%, de 14% y un periodo de recuperación de capital de 7 años. A diferencia de la situación sin proyecto, cuyos indicadores financieros señalan que un proyecto a los 10 años genera un VAN negativo de (-2.278.094) y una tasa interna de retorno de (5%), y en dicho periodo no es posible recuperar completamente el capital invertido (Anexo 5; cuadro 10). Para mayor detalle de costos e ingresos y flujos de cajas referirse al Anexo 6, cuadros 1 al 8.

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

Se debe considerar como información de respaldo: gráficos, tablas, esquemas y figuras, material gráfico, entre otros, que permitan visualizar claramente los antecedentes que sustentan las conclusiones y recomendaciones relevantes del desarrollo del proyecto.

6.2 Análisis de brecha.

Cuando corresponda, justificar las discrepancias entre los resultados programados y los obtenidos.

Objetivo 1 Resultado Esperado 1 y 2

Etapa 1: Establecimiento de microestacas y embriones: Los resultados de esta etapa son intermedios pero fundamentales para obtención del indicador principal de resultados. Los resultados expuestos, no presentan una brecha entre lo programado y lo obtenido. Como fue reportado, la mayoría de los estudios internacionales, respecto a esta etapa, dan cuenta de baja tasa de sobrevivencia de los explantes. En general la estrategia no apunta a disminuir la tasa de sobrevivencia, sino que más bien, el objetivo es salvar el material de la muerte e iniciar con al menos un individuo, saneado y reactivo, la etapa de proliferación.

Etapa 2: Proliferación Medio Sólido de microestaquillas y embriones: En esta etapa de resultados intermedios, se esperaba obtener al menos tasas de proliferación que sean superiores a 2. Es decir que el material in vitro se duplique una vez por mes. Este resultado no fue posible alcanzarlo con el uso de esta tecnología.

Etapa 3: Proliferación en Medio líquido: Debido a la brecha existente con la tecnología de propagación en medio sólido, tasas de proliferación promedio de 1.5 y la tasa de proliferación esperada 2.0, se realiza una modificación de la metodología y se incluye el uso de Sistema de Inmersión temporal, a través del uso de medio líquidos. Esta tecnología permite superar ampliamente la brecha tecnológica presupuestada, incluso duplicando las tasas de proliferación esperadas. Estas tasas son significativamente superiores a otras especies leñosas, tales como Castaño, Nogales y Pistachos.

Etapa 4: Enraizamiento en medio líquido: No existe brecha entre los programado y los resultados obtenidos desde el punto de vista del indicador de logro (% de enraizamiento). Sin embargo, más allá del indicador, la tecnología desarrollada, tiene relación con el tiempo, costos de producción y calidad de una planta. De esta manera, el enraizamiento de plantas ex vitro, es un método de bajo costo y exitoso en otras especies, dado que no requiere el uso de medio de cultivos, no presenta resultados eficientes del punto de vista comercial al mostrar tasas que no superan el 10%. Por otro lado, el enraizamiento de plantas in vitro en medio sólido, si bien logran resultados esperados de 60% promedio de enraizamiento, requiere duplicar el costo de mano de obra, debido a que es necesario el trasplante de materiales y cambio de medios de cultivos específicos. Por lo tanto, el sistema de enraizamiento directamente en los contenedores (SIT) evita el trasplante -menor costo de mano de obra- y solo requiere cambio de medio, acortando los tiempos y costos de producir una planta enraizada.

Objetivo 1 Resultado Esperado 3

Etapas de Aclimatación de Plantas in Vitro: Como se plantea en el capítulo de resultados de aclimatación, fue establecido un indicador que da cuenta del número de plantas aclimatadas a partir de una microestaca desde la fase de inicio de proliferación. Dicho indicador relaciona la tasa de proliferación de explantes en medio líquido, las tasas de enraizamiento y el porcentaje de aclimatación. Así se observa en el gráfico 2 que la brecha tecnológica a alcanzar es de al menos 4 plantas aclimatadas por cada microestacilla en proliferación en medio sólido. Es decir que la brecha tecnológica establecida para realizar un proceso eficiente proviene del mejor resultado obtenido. Así, se requieren tasas de proliferación in vitro en medio líquido superiores a 5, tasas de enraizamiento superiores a 80% y finalmente un 70% de las plantas aclimatadas, para alcanzar el indicador establecido.

De esta manera la brecha tecnológica de RST 1 es de 2,07 plantas; RST2 la más alta 3,3 plantas. Para porta-injertos derivados de embriones Trebizonda 7 el valor es de 3,12; 1.96 TGL 3 y 4 para Giffoni 1, esta última no ha sido posible desarrollar con éxito la etapa de aclimatación.

Etapas de micro-injerto in vitro: La brecha tecnológica de protocolo de micro-injerto in vivo (60%), sobre el patrón clonal RST1, es de un 10% para Barcelona y fue superada en un 10% por Tonda di Giffoni. Dado las bajas tasas de aclimatación de RST2, y el escaso material obtenido, no fue posible establecer un ensayo de micro-injerto con las variedades. De esta forma, incrementar las tasas de aclimatación de plantas RST2, es la brecha tecnológica para superar. Entre los factores de mejora observados, se relaciona con el tiempo de enraizamiento de las plantas en los bio-reactores. Se han obtenido mejores tasas de aclimatación (Proyecto selecciones clonales FIA), cuando el tiempo de enraizamiento se acorta, generando pelos radiculares más jóvenes y vigorosos, disminuyendo el tiempo que la planta requiere para lograr independencia funcional. No obstante, lo anterior dicha disminución va de la mano con la caída en la tasa de enraizamiento de los explantes.

Los embriones clonales, no fueron parte del experimento de micro-injertación, dado que el bajo número de plantas aclimatadas de Barcelona y Tonda di Giffoni, hizo privilegiar la combinación con portainjerto RST1.

Objetivo 2 Resultado Esperado 1

Obtención de portainjertos provenientes de estacas:

Transcurridas dos temporadas de evaluación de estacas apicales, es posible señalar que bajo las condiciones experimentales en que se realizó el estudio, no fue posible alcanzar las tasas de enraizamiento propuestas en el proyecto. Las tasas de enraizamiento no superan el 20% siendo la meta propuesta una tasa de 40%. Por lo tanto, la brecha entre lo programado y obtenido es de un 20%. Con la tecnología de manejo de la humedad ambiental utilizada, microaspersión, las plantas presentaron una defoliación prematura de las yemas vegetativas, posiblemente a causa de deshidratación, lo que finalmente impidió alcanzar mayores tasas de enraizamiento. Dicho fenómeno coincide con los resultados obtenidos en la etapa de aclimatación de plantas provenientes de vitro, utilizando el mismo sistema de microaspersión. Por lo tanto, se presume que la brecha tecnológica está relacionada con la tecnología de manejo de la humedad relativa. La humificación producida a partir de un compresor de presión genera una neblina que cubre de manera uniforme el ambiente a nivel foliar, evitando posiblemente la deshidratación, defoliación y bajas tasas de enraizamiento.

El tiempo requerido para lograr el enraizamiento de una estaca es de aproximadamente 5 meses. Por consiguiente, se observa además una lenta tasa de crecimiento de las estacas post enraizamiento, con periodos de tiempo mayores a los trece meses, para alcanzar un tamaño y calibre de eje adecuado para la injertación.

Las bajas tasas obtenidas y largo periodo de crecimiento de las estacas, generan un proceso de producción altamente costoso, inviable económicamente para la producción comercial de portainjertos para Avellano Europeo.

Obtención de portainjertos provenientes de Acodos: La brecha tecnológica tiene relación con el tiempo requerido para obtener una planta con el vigor, tamaño y calibre de eje suficiente para asegurar altos porcentajes de prendimiento de injerto. De esta manera, es necesario esperar un año de crecimiento de los patrones, una vez extirpados los acodos de la planta y no realizar directamente los injertos sobre portainjertos aún no terminados.

Objetivo 2 Resultados Esperados 2, 3, 4 y 5

Es posible aseverar que la brecha tecnológica es productiva por sobre la anticipación en la entrada en producción. De esta manera a la segunda temporada de producción post establecimiento, el rendimiento de RST1 y RST2, es significativamente menor a los portainjertos de mayor vigor RST3 Barcelona y RST4 Giffoni. Del mismo modo los rendimientos alcanzados son más bajos que una planta autoradicada.

Dicha brecha tecnológica está determinada fundamentalmente por la calidad y vigor de cada portainjerto. Un portainjerto de alta calidad debe ser viverizado al menos una temporada, luego de haber sido extraído de la planta madre. Durante este periodo el diámetro del eje debe ser superior a 20 mm y su sistema radicular debe contar con una biomasa con un gran número de pelos radiculares absorbentes.

Por su parte para el cultivar Barcelona, los rendimientos alcanzados por la mejor combinación RST3 en marco de plantación 5x1.5 metros, obtuvo un rendimiento de 95,5 kg/ha. Este resultado está lejos de alcanzar los resultados programados de (375 Kg/ha) a la segunda temporada de evaluación post-establecimiento.

No obstante, lo anterior, para la variedad Tonda di Giffoni, la meta propuesta (375 kg/ha) es superada por las combinaciones RST4-Giffoni, en el marco 5x1 y 5x1.5 m. Para la combinación RST4-Giffoni, en el marco 5x2 es 50 kg/ha menor a la meta programada.

Estos resultados dan cuenta de que un porta-injerto de mayor desarrollo RST4, presenta mayores tasas de prendimiento, mayores tasas de sobrevivencia post injerto, anticipan la entrada en producción y el rendimiento acumulado durante las dos primeras temporadas post establecimiento.

Es muy probable que dicho efecto esté más asociado en esta primera etapa al mayor tamaño y al incremento del número de plantas, respecto a la competencia entre plantas propiamente tal. Es de esperar que, durante la segunda etapa de formación del huerto, donde se produce un crecimiento vegetativo acelerado, las plantas ocupen completamente el espacio asignado. En dicha etapa, el mayor vigor de estos portainjertos podría afectar negativamente la productividad, por efecto de sombreamiento. Lo anterior podría causar un menor número de yemas y menor productividad por unidad árbol.

Por el contrario, es probable que los portainjertos de menor vigor, si bien inician su periodo productivo un año después comparados de los de mayor vigor, durante la etapa de crecimiento vegetativo acelerado y entrada del huerto en pleno régimen productivo, puedan lograr mayores rendimientos por unidad de superficie debido a que no presentan desequilibrios entre el espacio asignado, crecimiento vegetativo, inducción floral, llenado de fruta y cuaja, logrando una mejor combinación ente la producción de madera y fruta, tal como ocurre en otras especies frutales establecidas en media y alta densidad.

Objetivo 3 Resultado Esperado 1

Los resultados programados en cuanto a costos de producción de una planta injertada fueron de \$2.500 por planta y el resultado obtenido fue de \$4.000, por lo que la brecha es de \$1.500 por planta. El costo de producción programado fue calculado hace 5 años atrás, y se tomó como referencia una planta injertada de cerezo, proveniente de un patrón multiplicado in vitro y una variedad (púa) obtenida de una planta madre in vivo. A diferencia de lo anterior, el costo de producción obtenido no solo está relacionado con los cambios económicos, sino que tanto el portainjerto y la variedad son producido bajo protocolo in vitros, encareciendo significativamente los costos de producción.

Al analizar los costos de operación fue posible observar que la brecha tecnológica más importante para disminuir los costos se refiere fundamental a la automatización de los procesos en las diferentes etapas. Particularmente durante la etapa de repique, altamente demandante de mano obra entrenada y con destreza en una actividad que requiere, de aplicar correctamente los protocolos de higiene, para evitar grandes pérdidas de material por contaminación externa.

Objetivo 3 Resultado Esperado 2

La brecha tecnológica planteada en el proyecto no es posible ser comparada. Lo anterior debido a que solamente existen 3 temporadas de evaluación con el uso de la tecnología. Por lo tanto, la brecha tecnológica que actualmente existe es validar en campo, los ensayos de investigación actualmente en desarrollo, y a la espera de financiamiento, para determinar la curva de producción a 10 años cuando el huerto inicie su pleno régimen productivo.

7. CAMBIOS Y/O PROBLEMAS DEL PROYECTO

Especificar los cambios y/o problemas enfrentados durante el desarrollo del proyecto. Se debe considerar aspectos como: conformación del equipo técnico, problemas metodológicos, adaptaciones y/o modificaciones de actividades, cambios de resultados, gestión y administrativos.

| 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 |
|---|--|--|
| Objetivo 1: R1 y R2. Etapa Establecimiento. | | |
| -Alta tasa de mortalidad de explantes provenientes de plantas de campo. -Alta tasa de contaminación del material provenientes de plantas madre de campo. | Retraso en el inicio de la etapa de proliferación | Ajustes sucesivos en el protocolo de desinfección superficial. Se realiza ensayo 1, con distintos agentes desinfectantes sobre cv Barcelona. Ensayo 2: Se desarrollan ensayos con agente desinfectante de alta eficacia y distinta fuente antioxidantes. |
| -No es posible establecer el medio idóneo de establecimiento, debido a la persistente contaminación de agentes patógenos por parte de los explantes. | Retraso en el inicio de la etapa de proliferación | Ajustes en los medios de establecimiento hasta obtener medio estándares para el establecimiento de los portainjertos y variedades. |
| Baja disponibilidad de material de alta calidad (brotes meristemáticos) provenientes de plantas madre jóvenes. | Retraso en el inicio de la etapa de proliferación | Injerto de púas de material madre tanto de portainjertos como de variedades provenientes de microestaquilla. Traslado de plantas a cámara de crecimiento aislada y con un protocolo de manejo fitosanitario para bajar carga de patógenos exógenos. |
| Baja disponibilidad de material de alta calidad (brotes meristemáticos) provenientes de plantas madre jóvenes. | Retraso en el inicio de la etapa de proliferación | Se desarrolla un protocolo de extracción y establecimiento de embriones in vitro, cuyo fin fue contar con material con menos cargas de agentes patógenos y paralelamente |

| | | |
|---|---|--|
| | | dar con el medio de establecimiento idóneo para los materiales. |
| 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 |
| Objetivo 1. R2 y R3. Etapa de Proliferación. | | |
| Los explantes sobrevivientes a la etapa de desinfección tanto de portainjertos y variedades muestran lenta reactividad y baja tasa de proliferación | Retraso en el inicio de la etapa de enraizamiento de los portainjertos. | Se ajustan protocolos con distintos medios de cultivo para acelerar la tasa de proliferación de los explantes. |
| Los explantes sobrevivientes a la etapa de desinfección tanto de portainjertos y variedades muestran lenta reactividad y baja tasa de proliferación | Retraso en el inicio de la etapa de enraizamiento de los portainjertos. | Se realiza un cambio en la tecnología de proliferación de explantes desde medio sólido hacia medios líquidos a través del sistema de inmersión temporal. |
| Los explantes in vitro RST1 y 2 se contaminaron por microalga unicelular. | En el período mayo – julio de 2016, se produce una repentina y explosiva proliferación de microalga unicelular, que afectó drásticamente el desarrollo de los explantes. Se observa un estancamiento en el crecimiento de los explantes lo cual se atribuye a las reiteradas desinfecciones aplicadas a las plantas para la erradicación de la microalga. Se retrasa la etapa de proliferación y enraizamiento. | Se toma contacto con investigadores nacionales y extranjeros en búsqueda de una posible causa y solución al problema. Se concluye que un agente externo al laboratorio fue la causa de contaminación. Se intensifican los protocolos de lavado y auto-clavado de material de laboratorio. Se restringe la entrada al laboratorio de personas externas al equipo de trabajo. Se modifican los medios de cultivo añadiéndoles distintas dosis de cobre (como inhibidor de microorganismos patógenos), cambiando la concentración de Hierro y |

| | | |
|---|---|---|
| | | el tipo de fuente de carbono (para promover el crecimiento de los explantes). Se logra erradicar la microalga, luego de haber realizado numerosos tratamientos de desinfección, se toma la decisión de eliminar todo el material que no se logró desinfectar, para erradicar la microalga de manera definitiva de la cámara de crecimiento. |
| Objetivo 1 R3 | | |
| <u>Etapa de Aclimatación</u> | | |
| Alta tasa de mortalidad de origen vitro en la etapa de aclimatación | Retraso de la etapa de micro injerto in vivo | Se evalúan distintas tecnologías de aclimatación. 1.- Speedling bajo microtúnel. 2.- Bolsa individual tipo capucha 3.- Cámara de crecimiento con condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad, fotoperiodo). |
| | | Se realiza un cambio en el sistema de control de humedad relativa del ambiente. Se reemplaza micro jet por humidificador ambiental |
| <u>Objetivo 2: R1</u> | | |
| Etapa: estacas in vivo | | |
| Baja tasa de enraizamiento de estacas para propagación in vivo. | No será posible utilizar las estacas enraizadas como porta-injerto. Esto debido a la mala calidad del material obtenido. No fue posible determinar el tiempo de producción de plantas | Se propone desarrollar nuevos ensayos de enraizamiento con el uso de distintas concentraciones de hormonas. |

| | | |
|--|---|--|
| | terminadas. | |
| Objetivo 2: R2, R3, R4 y R5 | | |
| El principal problema metodológico enfrentado tiene relación con la insuficiente cantidad de material de buena calidad, proveniente de acodo, disponible para el desarrollo de los ensayos en campo. | No fue posible durante la primera temporada (2014) obtener el material requerido para el desarrollo de los ensayos de investigación en campo. | Se realizarán dos modificaciones a la metodología de trabajo. La primera de ellas será reducir el número de sitios experimentales para establecimiento de ensayos. De esta manera para la temporada 2015-2016, se realizará un primer ensayo en Vilcún con el material injertado disponible. |
| | | La segunda modificación consistió en el establecimiento de ensayos en los dos sitios de plantación propuestos originalmente en el proyecto. Se establecer 3 densidades de plantación sobre sobre dos portainjertos RST1 y RST2, para las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni. |

8. ACTIVIDADES REALIZADAS EN EL PERÍODO

8.1 Actividades programadas en el plan operativo y realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

Objetivo1 Resultado 1 y 2.

Actividad 1: Establecimiento de micro-estacas y embriones

Fecha de inicio: marzo de 2015

Fecha de término: noviembre de 2016

DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD:

ESTABLECIMIENTO DE MICRO-ESTACAS:

Manejo de plantas madres: con el fin de obtener tejidos con una mayor reactividad in vitro, las plantas madres de campo desde donde se obtuvieron las microestacas, fueron inicialmente sometidas a podas fuertes de rejuvenecimiento y programas de nutrición, riego y manejo fitosanitario. Sin embargo, sobre la base de la experiencia desarrollada, se detectó que las microestaquillas provenientes de campo tenían una alta carga de patógenos propia del material vegetal que está a la intemperie en contacto con una alta cantidad de esporas de hongos y vectores bacterianos que pululan en el ambiente. Estos agentes patógenos, si bien no se desarrollan en condiciones ambientales normales hasta que se presenten condiciones ideales tanto en su hospedero como climáticas; muestran un desarrollo exponencial en condiciones de cultivo in vitro, donde se les proporciona su ambiente ideal: un medio de cultivo estéril con nutrientes y azúcares, sumado a un fotoperiodo y temperatura controladas, donde pueden proliferar de manera exponencial colonizando el medio de cultivo e infectando el material vegetal establecido, teniendo como resultado cuantiosas pérdidas del material ingresado. Por lo tanto se decide trasladar las plantas madres a una cámara de crecimiento hermética, con condiciones de temperatura y fotoperiodo controladas, con la finalidad de bajar la carga de patógenos a la cual estaban expuestas en condiciones ambientales, continuando con el manejo fitosanitario al interior de la cámara, haciendo aplicaciones semanales de fungicidas y bactericidas. A partir esta modificación, disminuyeron significativamente las contaminaciones iniciales propias de la etapa de establecimiento. Adicionalmente se logró obtener material vegetal en distintas épocas del año, ya que debido a las condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura, la planta madre no entra en receso invernal.

Lavado de micro-estacas: A partir de las plantas madres, se obtuvieron brotes (ramillas) que fueron ingresados al laboratorio. Éstos fueron sometidos a un primer paso de lavado, donde previo corte de hojas con tijera desinfectada (etanol) se sumergen en una solución de agua más unas gotas de tenso-activo (jabón) desinfectante. Se procede a cepillar los brotes (con cepillo isopo de pelo suave) para eliminar al máximo la tierra atrapada en las vellosidades y dejar el tejido con menor carga de contaminantes. Luego, las ramillas se dividen en trozos de 3 cm de tamaño las que en adelante se denominarán "micro-estaquillas". Luego éste material se introduce en un vaso precipitado estéril (máximo 15 micro-estaquillas por vaso de 250 ml) y se lavan nuevamente con solución limpia de agua y tenso-activo desinfectante, con agitación magnética por 30 minutos. Posteriormente, se enjuagan bajo chorro fuerte de agua corriente, con lo que el material queda en condiciones para la aplicación de los subsiguientes pasos de desinfección, los cuales se efectúan bajo campana de flujo laminar en condiciones estériles.

Desinfección superficial: A las micro-estaquillas previamente lavadas, se adiciona una solución anti-fúngica sistémica (azoxistrobina 1cc/L) y bacteriostática Timerosal (0,5 g/L), dejándola actuar durante 10 minutos con agitación ocasional (cada 2 minutos aprox.). Luego, las micro-estaquillas son enjuagadas, eliminando el fungicida y se agrega Sulfato de Cobre pentahidratado (Phyton 1 cc/L) por 10 minutos con agitación ocasional. Luego, se repite el enjuague, esta vez con agua destilada y se sumerge en una solución de etanol al 5% por 5 segundos para posteriormente enjuagar con agua destilada estéril. Luego las micro-estaquillas se sumergen en

una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 10 min, revolviendo ocasionalmente para ser enjuagada 3 veces con agua destilada. Finalmente se aplica una solución desinfectante vegetal PPM (preservative for plant tissue culture media) bajo campana de flujo laminar en condiciones estériles, por un periodo de 5 minutos, desechando el líquido para dejar el material vegetal listo para su introducción a los medios de cultivo. **Preparación de medio de cultivo sólido para el establecimiento:** El medio de cultivo elaborado, correspondió a un DKW modificado (Driver & Kuniyuki, 1984) con la adición de la fuente de carbono glucosa (30 g), las hormonas BAP (5 ml), IBA (10 µl): PVP (1 g); el preservante vegetal PPM (2 ml) y el agente gelificante agar (7,5 g); el pH del medio de cultivo se reguló en 5,8. **Anexo 7 Cuadro 1.**

Establecimiento de micro-estaquillas en medio de cultivo sólido: Inmediatamente después de desinfectar el material vegetal, en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar, se realiza un corte transversal delgado en los extremos para dejar expuesto tejido nuevo, que al quedar en contacto directo con el medio de cultivo favorece la absorción de nutrientes.

Evaluación del período de establecimiento: El periodo de establecimiento concluye una vez que el porcentaje de mortalidad se detiene y comienza a aumentar la población de micro-estaquillas (comienza a incrementarse la tasa de proliferación). Para el caso de los materiales provenientes de micro-estacas el promedio que dura la etapa de establecimiento tiene un promedio de duración de 197 días.

ESTABLECIMIENTO DE EMBRIONES:

Manejo de plantas Madres: A partir de plantas madres seleccionadas de las variedades, Tonda di Giffoni, Trebizonda, TGL, entre otras; se obtuvieron embriones de semillas, originados del cruzamiento abierto de las plantas madres señaladas.

Recolección, extracción y desinfección de semillas para porta-injerto: En el mes de Marzo de 2015, fueron recolectadas semillas de las variedades seleccionadas para la extracción de embriones. Estos materiales fueron obtenidos a partir del estado de maduración fisiológico de la fruta de campo colección INIA- Carillanca. Luego los frutos fueron desinfectados en una solución de hipoclorito de sodio a 5%, para posteriormente ser descascarados para obtener la nuez separada del fruto. Posteriormente se procede a separar el embrión de la semilla a través de cortes longitudinal mediante el empleo de bisturí, lo anterior en condiciones asépticas bajo campana de flujo laminar.

Preparación de medio de cultivo sólido para el establecimiento: El medio de establecimiento donde se presentaron los mejores resultados en establecimiento de embriones fue el medio DKW modificado (Driver & Kuniyuki, 1984) con la adición de la fuente de carbono glucosa (30 g), las hormonas BAP (5 ml), IBA (10 µl): PVP (1 g); el preservante vegetal PPM (2 ml) y el agente gelificante agar (7,5 g); el pH del medio de cultivo se reguló en 5,8. **Anexo 7 Cuadro 1**

Establecimiento Embriones en medio de cultivo sólido: Los embriones fueron cultivados 7 a 10 días en oscuridad y luego en cámara con fotoperiodo 16/8 por 25 días en frasco de vidrio de 40 mm de diámetro (30 ml de medio) (1 embrión por tubo).

Evaluación del período de establecimiento: Cada embrión, fue tratado y evaluado individualmente durante la primera etapa de establecimiento. Posteriormente se evaluó la tasa de proliferación individual de cada embrión y fueron elegidos aquellos que fueron más reactivos y expresaron una mayor tasa de proliferación. La etapa de selección de los mejores individuos de

cada material proveniente de embrión tuvo una duración promedio de 221 días.

Actividad 2: Proliferación Medio sólido

Fecha de inicio: diciembre de 2016.

Fecha de término: mayo de 2017.

DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD:

PROLIFERACIÓN DE MICRO-ESTACAS EN MEDIO SÓLIDO:

Preparación de medios de cultivo: Con el objetivo de estimular la formación de nuevas yemas que originaran nuevas micro-estaquillas, los explantes fueron cultivados en un medio DKW modificado, con la adición de la fuente de carbono glucosa (30 g), las hormonas BAP (5 ml), IBA (10 ul); PVP (1 g) y el agente gelificante agar (7,5 g); el pH del medio de cultivo se reguló en 5,8 mediante el uso de NaOH y HCl. El medio de cultivo preparado debe ser auto-clavado a 121C° por 15 minutos, para asegurar las condiciones de asepsia. **Anexo 7 Cuadro 1**

Repique y multiplicación clonal de micro-estacas: En un inicio se programaron repiques de los materiales cada 25 días (corte de los explantes establecidos para la multiplicación de nuevas micro-estaquillas en medios de cultivo frescos, con igual composición al anteriormente mencionado). Sobre la base de la experiencia obtenida, los materiales de avellano europeo están listos para la etapa de repique en un periodo de tiempo comprendido entre los 25 a 45 días.

Evaluación de tasas de proliferación: Se evaluó la tasa mensual de proliferación, medida en N° explantes mes/N° explantes del mes anterior. Las tasas de proliferación mensuales en medio de cultivo sólido, se movieron en un rango de 1,28 a 1,90 explantes obtenidos a partir de cada micro-estaquilla del mes anterior. Anexo 7 Cuadro 1 Las tasas de proliferación mencionadas anteriormente son consideradas bajas para el escalamiento comercial de la producción de plantas de avellano europeo, por lo que se optó por incrementar éstas tasas mediante la adopción de tecnologías asociadas al Sistema de Inmersión Temporal. Para contar con material suficientemente saneado y reactivo, proveniente de micro-estacas, para el ingreso a esta etapa, se necesitaron en promedio un periodo de 107 días para todos los materiales provenientes de micro-estacas. Anexo 7 Cuadro 2

PROLIFERACIÓN DE EMBRIONES PARA PORTA- INJERTO EN MEDIO SÓLIDO:

Preparación de medios de cultivo: Una vez elegidos aquellos individuos de mayor tasa de proliferación, éstos continuaron siendo propagados, en medio DKW modificado, con la adición de la fuente de carbono glucosa (30 g), las hormonas BAP (5 ml), IBA (10 ul); PVP (1 g) y el agente gelificante agar (7,5 g); el pH del medio de cultivo se reguló en 5,8 mediante el uso de NaOH y HCl. El medio de cultivo preparado debe ser auto-clavado a 121C° por 15 minutos, para asegurar las condiciones de asepsia.

Repique y multiplicación clonal de embriones seleccionados: Los materiales de avellano europeo de origen embrionario están listos para la etapa de repique en un periodo de tiempo comprendido entre los 25 a 45 días.

Evaluación de tasas de proliferación: Se evaluó mensualmente la tasa de proliferación de los

explantes medida en N° explantes mes/N° explantes del mes anterior. Las tasas de proliferación mensuales en medio de cultivo sólido, se movieron en un rango de 1,4 a 1,69 explantes obtenidos a partir de cada explante del mes anterior. Anexo 1 Cuadro 1.

Actividad 3.- Proliferación en medio líquido.

Fecha de inicio: enero de 2017.

Fecha de término: septiembre de 2018.

DESCRIPCION DE LA ACTIVIDAD:

Principios de funcionamiento del Sistema de Inmersión temporal (SIT):

El Sistema de Inmersión Temporal funciona con dos contenedores de polipropileno, independientes montados uno sobre otro. Estos contenedores se encuentran conectados entre sí por mangueras de silicona, para el intercambio de medio líquido y la renovación de aire. El contenedor ubicado en la parte inferior contiene el medio de cultivo líquido; mientras que el contenedor ubicado en la parte superior contiene los explantes que desean ser proliferados. Una vez conectadas las mangueras, el sistema funciona mediante pulsaciones de aire de alta calidad seco y filtrado, haciendo circular el medio de cultivo líquido desde el contenedor ubicado en la parte inferior hacia el contenedor ubicado en la parte superior por un tiempo ajustable mediante el software del equipo. El medio líquido posteriormente vuelve al contenedor inferior por efecto de gravedad y diferencia de presión. De la misma manera se pueden programar inyecciones de aire para renovar la micro atmósfera del contenedor superior donde se encuentran los explantes evitando la formación de gases nocivos para el material vegetal.

En el inicio del proceso, el medio de cultivo líquido es colocado en el contenedor que se ubicará en la parte inferior, el cual debe autoclavarse con el medio en su interior (121°C por 15 min), junto con el contenedor donde se ingresarán los explantes, mangueras y filtros.

Una vez obtenido todo este material estéril, se trabaja bajo campana de flujo laminar.

El proceso bajo campana consiste en ingresar al contenedor superior material vegetal proveniente de la etapa de proliferación en medio sólido *in vitro*, que presente total sanidad y una adecuada reactividad, cortándole las hojas e ingresando tallos largos con el menor número de cortes posibles para evitar que entre algún patógeno por las heridas generadas en los cortes.

Para ello, el material obtenido se deposita previamente en un frasco estéril de 200 cc con agua destilada estéril, con la finalidad de contar el número de tallos o explantes ingresados y a la vez tomar nota del peso del material ingresado, pesando el frasco con agua destilada estéril antes y después del ingreso del material vegetal con balanza analítica, para luego determinar el peso por diferencia.

Una vez obtenidos estos registros se depositan los explantes en el contenedor superior montando bajo campana los 2 contenedores con las mangueras de silicona junto con los filtros de aire, para ser definitivamente ubicados en el rack de la unidad central del biorreactor. **Anexo 7 foto 1**

PROLIFERACIÓN DE MICRO-ESTACAS EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL:

Determinación de medios de cultivo líquidos: Fueron formulados distintos medios de cultivo líquidos DKW modificados sin agente gelificante, denominados (D2-3, D2-4, D4-fe) Anexo 7 Cuadro 2.

Introducción de micro-estaquillas al SIT: Con el objetivo de aumentar de manera significativa las tasas de proliferación obtenidas mediante el sistema de propagación *in vitro* tradicional en medio sólido, se procedió a utilizar el material vegetal saneado y reactivo obtenido en la etapa de

proliferación en medio sólido como parte del inicio de la etapa de proliferación en Sistema de Inmersión Temporal, ingresando entre 8 a 15 micro-estaquillas enteras (sin cortes entrenudos) a los contenedores, bajo campana de flujo laminar en condiciones estériles.

Programación de tiempos y frecuencias de Inmersión/Ventilación: La programación de frecuencias y tiempos de inmersión/ventilación, temperatura y fotoperiodo mediante el software del equipo, se determinó después de distintas pruebas que los mejores resultados para la proliferación de avellano europeo son: Tiempo de Inmersión Frecuencia: 720 min Duración 120 seg. Tiempo de Ventilación: Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg. Temperatura: 25 °C. Fotoperiodo: 16/8.

Evaluación de tiempos y tasas de proliferación: Estos materiales, alcanzaron su máximo desarrollo en el Sistema de Inmersión Temporal a los 61 días en promedio desde su ingreso al SIT, obteniéndose tasas mensuales de proliferación, medida en N° explantes mes/N° explantes del mes anterior de un rango entre 4,7 a 6,5 explantes obtenidos a partir de cada micro-estaquilla inicial. Anexo 1, Cuadro 1.

PROLIFERACIÓN DE EMBRIONES PARA PORTA- INJERTO EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL:

Determinación de medio de cultivo líquido: El medio de cultivo formulado, que presentó los mejores resultados en cuanto a proliferación, corresponde a un medio DKW modificado sin agente gelificante, denominado D2-3. Anexo 7 cuadro 3.

Introducción de micro-estaquillas provenientes de embrión al SIT: Fueron ingresados inicialmente entre 9 a 11 micro-estaquillas enteras (sin cortes en entrenudos) a los contenedores.

Programación de tiempos y frecuencias de Inmersión/Ventilación: La programación de frecuencias y tiempos de inmersión/ventilación, temperatura y fotoperiodo mediante el software del equipo, se determinó después de distintas pruebas que los mejores resultados para la proliferación de avellano europeo son: Tiempo de Inmersión Frecuencia: 720 min Duración 120 seg. Tiempo de Ventilación: Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg. Temperatura: 25 °C. Fotoperiodo: 16/8.

Evaluación de tasas de proliferación: Los materiales de avellano europeo de origen embrionario, alcanzan su máximo desarrollo en el SIT a los 60 días en promedio desde su ingreso al sistema, obteniéndose tasas mensuales de proliferación, de entre 5,1 a 5,7. Anexo 1, Cuadro 1.

Actividad 4: Enraizamiento en medio líquido SIT.

Fecha de inicio: julio 2017.

Fecha de término: octubre de 2017.

ENRAIZAMIENTO DE MICRO-ESTACAS EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL:

Determinación de medios de cultivo líquidos para enraizamiento: Los medios líquidos de enraizamiento que presentaron los mejores resultados, corresponden a: D2-4RA, 16R½N y MS½N. Anexo 7 Cuadro 4.

Cambio de medio líquido de enraizamiento: Para realizar el enraizamiento directamente en el Sistema de Inmersión Temporal, se procedió a cambiar el medio de cultivo líquido de proliferación por el medio líquido de enraizamiento una vez que los materiales alcanzaron un tamaño adecuado (25 a 30 mm).

Evaluación de tiempo y porcentajes de enraizamiento: Para determinar el porcentaje de explantes enraizados, se procedió a pesar en balanza analítica cada contenedor. Luego, en condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar, se realiza la separación de los explantes que han formado raíz de los no enraizados para determinar el peso a través de diferencia con respecto al peso inicial. (Anexo 7 Foto 2). Los materiales provenientes de micro-estacas, alcanzaron su máximo desarrollo radicular en el Sistema de Inmersión Temporal a los 37 días en promedio desde el cambio de medio de enraizamiento, obteniéndose porcentajes de enraizamiento promedio de un 77%.

Programación de tiempos y frecuencias de Inmersión/Ventilación: La programación de frecuencias y tiempos de inmersión/ventilación, temperatura y fotoperíodo mediante el software del equipo, se ha determinado después de distintas pruebas que los mejores resultados para el enraizamiento de los materiales RST1 y Barcelona son: Tiempo de Inmersión Frecuencia: 720 min Duración 120 seg. Tiempo de Ventilación: Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg. Temperatura: 25 °C. Fotoperíodo: 16/8.

Para el portainjerto RST2 los mejores resultados se obtuvieron con: Tiempo de Inmersión Frecuencia: 360 min Duración 120 seg. Tiempo de Ventilación: Frecuencia: 400 min Duración: 60 seg. Temperatura: 25 °C. Fotoperíodo: 16/8.

ENRAIZAMIENTO DE EMBRIONES EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL:

Determinación de medios de cultivo líquidos para enraizamiento: El medio líquido de enraizamiento que presentó los mejores resultados en éstos materiales, corresponde a: DT4. Anexo7 Cuadro 5.

Cambio de medio líquido de enraizamiento: Se realizó el enraizamiento directamente en el contenedor del Sistema de Inmersión Temporal. Es decir, cambiando el medio de cultivo líquido de proliferación por un nuevo medio líquido de enraizamiento.

Evaluación de tiempo y porcentajes de enraizamiento: Para determinar el porcentaje de explantes enraizados, se procedió a pesar en balanza analítica cada contenedor. Luego, en condiciones de asepsia, bajo campana de flujo laminar, se realiza la separación de los explantes que han formado raíz de los no enraizados para determinar el peso a través de diferencia con respecto al peso inicial. Estos materiales, alcanzaron su máximo desarrollo radicular en el Sistema de Inmersión Temporal a los 38 días en promedio desde el cambio de medio de enraizamiento, obteniéndose porcentajes de enraizamiento promedio de un 67%.

Programación de tiempos y frecuencias de Inmersión/Ventilación: La programación de frecuencias y tiempos de inmersión/ventilación, temperatura y fotoperíodo mediante el software del equipo, se ha determinado después de distintas pruebas que los mejores resultados para el enraizamiento de los materiales provenientes de embrión: Tiempo de Inmersión Frecuencia: 720 min Duración 120 seg. Tiempo de Ventilación: Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg. Temperatura: 25 °C. Fotoperíodo: 16/8.

Objetivo 1 Resultado esperado 3.

Obtención de 1 protocolo de micro-injerto In vivo en avellano europeo, con un 60% de prendimiento del injerto.

Fecha de inicio: Enero de 2014
Fecha de término: Diciembre de 2015

Actividad 1: Manejo de Plantas madres en Campo (Ensayo 1 y 2). Las plantas madres en el campo fueron manejadas agrónomicamente a través de un programa de nutrición, prevención de plagas y enfermedades, control de malezas y riego.

Actividad 2: Establecimiento de Estacas. (Ensayo 1 y 2): Dosis y fuente de Hormonas: Las estacas obtenidas de las plantas madres, fueron establecidas en camas de propagación en un sustrato de arena, tuba y vermiculita en una relación 1:1:1, con temperatura basal de 20°C. Los materiales correspondieron a patrones RST1, RST2, RST3 Y RST4. Para el ensayo , este material, fue tratado con una dosis de hormona auxina (IBA): 1000 ppm. Para el ensayo 2 el material fue tratado con distintas dosis de hormona: IBA 500 ppm, IBA 1000 ppm, IBA 500 ppm + Putrexina 1000 ppm, IBA 1000 ppm + Putrexina 1000.

Actividad 3: Manejo y evaluación de enraizamiento de estacas en cama de propagación (Ensayo 1 y 2). Se realizó una hidratación de estacas, mediante un sistema de nebulización por pulsos. Se realizó un manejo a través de nutrición foliar y fungicidas para la prevención de enfermedades. Los parámetros que se determinaron para la evaluación de enraizamiento fueron los siguientes: % de formación de callos y % de enraizamiento.

Actividad 4: Evaluación de enraizamiento Final temporada 1 (Ensayo 1 y 2). Al final de la temporada del primer ensayo de enraizamiento se determinó el porcentaje final de plantas enraizadas de los 4 portainjertos seleccionados, para su posterior trasplante a bolsas individuales

Objetivo 2 Resultado esperado 1.

Obtención de plantas maduras de avellano europeo injertadas in vivo sobre portainjertos derivados de acodos INIA RST1 RST2 en un período de 18 meses.

Fecha de inicio: Septiembre de 2014
Fecha de término: Marzo de 2016

Actividad 1: Obtención de acodos de portainjertos RST1, RST2, RST3 Y RST4; provenientes de plantas madres.

Actividad 2: Injertación de variedades sobre los porta injertos obtenidos por acodo: En septiembre de 2014, se realizó una primera etapa de injertación donde la variedad Barcelona fue injertada sobre el portainjertos proveniente de acodo RST1, RST2 y RST3. Mientras que la variedad Giffoni, fue injertada sobre el patrón RST4. En septiembre de 2015, se realizó la segunda etapa de injertación para establecer ensayos de alta densidad en las comunas de Gorbea y Vilcún durante el invierno de 2016, donde ambas variedades fueron injertadas sobre los portainjertos RST1 y RST2.

Actividad 3: Manejo de los Injertos: La mantención de los injertos consistió en riegos periódicos, fertilización basal con fertilizantes de lenta liberación de N,P,K y tratamientos foliares con bioestimulantes. Adicionalmente se realizaron en forma periódica tratamientos preventivos con fungicidas, bactericidas e insecticidas.

Actividad 4: Establecimiento de ensayos durante la temporada 2015-16 de plantas injertadas. Se establecieron ensayos de campo en la localidad de Vilcún para la variedad Barcelona, en 2 densidades de plantación para los portainjertos RST1 y RST2 (500 y 1000 plantas/ha) y 4 densidades de plantación (500, 1000, 1500 y 2000 plantas /ha) para el portainjerto RST3. Para la variedad Giffoni el ensayo incluyó la evaluación de 4 densidades de plantación (500, 1000, 1500 y 2000 plantas/ha) sobre el portainjerto RST4.

Los ensayos fueron manejados agronómicamente con fertilización de mantención y se continuó con el programa fitosanitario para la sanidad de las plantas.

Actividad 5: Establecimiento de ensayos durante la temporada 2015-16 de plantas injertadas. Se implementaron ensayos en las comunas de Gorbea y Vilcún en 3 densidades de plantación (800, 1000 y 2000 plantas/ha) para ambas variedades sobre los portainjertos RST1 Y RST2. Los ensayos fueron manejados agronómicamente con fertilización de mantención y se continuó con el programa fitosanitario para la sanidad de las plantas.

Objetivo 2 Resultado esperado 2 y 3.

Fecha de inicio: Julio 2015.

Fecha de término: Junio 2017.

-Entrada en producción del huerto 2015 a la segunda temporada de evaluación en Vilcún
-Aumento de la producción del huerto 2015 en alta densidad a la segunda temporada de evaluación en Vilcún

Actividad 1: Cosecha de ensayo establecido en Vilcún.

Actividad 2: Evaluación de rendimiento (pesaje) (kg/ha)

Objetivo 2 Resultado esperado 4 y 5.

Fecha de inicio: Julio 2016

Fecha de término: Marzo 2018

-Entrada en producción del huerto 2016 a la primera temporada de evaluación en Vilcún y Gorbea

-Aumento de la producción del huerto 2016 en alta densidad a la primera y segunda temporada de evaluación en Vilcún y Gorbea

Actividad 1: Cosecha de ensayo establecido en Vilcún.

Actividad 2: Evaluación de rendimiento (pesaje) (kg/ha)

8.2 Actividades programadas y no realizadas durante el período de ejecución para la obtención de los objetivos.

-No fue realizada la micro injertación de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni sobre el portainjertos RST2. Lo anterior por falta de material de calidad. Esto se debió a las bajas tasas de aclimatación del porta-injerto RST2.

8.3 Analizar las brechas entre las actividades programadas y realizadas durante el período de ejecución del proyecto.

Etapas de Establecimiento in vitro: Fecha programa: 31-10-2015 Fecha de Logro: 31/10/2016. El atraso de esta actividad ocasionó un fuerte retraso de las actividades posteriores, descritas en el protocolo de proliferación in vitro. A partir de esta demora el equipo se vio en la necesidad de extender el proyecto por una temporada adicional con el fin de completar todas las etapas del protocolo.

Producción de plantas injertadas a partir de estacas: Obtención en un periodo de 18 meses (julio de 2016)

La primera temporada de producción estacas, no fue posible obtener material ideal para injertos

dato que las estacas tuvieron bajas tasas de enraizamiento y bajas tasas de sobrevivencia durante la aclimatación. Esto significó un retraso en la etapa de establecimiento de huertos en alta densidad de una temporada. Por lo que se estableció una parte del ensayo el año 2015 en Vilcún, y posteriormente los dos sitios en Vilcún y Gorbea el 2016. Para lograr este objetivo, fue necesario hacer una modificación del plan operativo e incluir la producción de plantas injertadas a través de acodos en reemplazo de las estacas. Si bien se pudo establecer en el mes de agosto del 2015 los ensayos, estos no tenían la suficiente cantidad de plantas para completar los tratamientos en ambas localidades para las tres densidades. Esto finalmente provocó el retraso de una temporada para contar con al menos dos temporadas post establecimiento de evaluación.

9. POTENCIAL IMPACTO

9.1 Resultados intermedios y finales del proyecto.

Descripción y cuantificación de los resultados obtenidos al final del proyecto, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

Se realizó un estudio de costeo para definir el costo unitario de una planta de Avellano europeo, provenientes tanto la variedad (Giffoni) como el portainjerto (RST1) para una capacidad instalada de 35.000 plantas.

Los costos fijos de producción representan un 95% de los costos totales. A su vez el 80% de los costos fijos totales lo representa los ítems recurso humano. El 20% de los costos fijos de operación lo representa la energía eléctrica requerida para el funcionamiento de todo el proceso de producción in vitro. Los costos variables, corresponden fundamentalmente a insumos de laboratorio, los cuales representan solamente el 5% de los costos variables de operación. Por lo tanto, las eficiencias de costos pasan fundamentalmente por la eficiencia de la productividad de la mano de obra.

El costo unitario de producción de una planta micro injertada alcanza un valor de \$4.002, al cabo de 38 meses de producción. Se esperaba obtener un costo de planta injertada de \$2.500 por y el resultado obtenido fue de \$4.000, por lo que la discrepancia es de \$1.500 por planta. Los altos costos de operación obtenidos tienen que ver con los altos requerimientos de mano obra calificada y especializada. Para disminuir los costos se requiere fundamentalmente la automatización de los procesos en las diferentes etapas.

Al evaluar un proyecto de 100 ha de Tonda di Giffoni, actualmente la variedad más valorada en el mercado, con el uso o no de la tecnología, se observa que la inversión inicial con tecnología se duplica al pasar de 500 pl/ha a 1.333 pl/ha. La inversión en plantas de un huerto en alta densidad es de (\$6.644.738), respecto a la situación sin proyecto con un valor de plantas de (\$964.800).

Fue realizada la estimación de ingresos, en una situación con proyecto, a partir del cual se tomó como ejemplo el mejor resultado productivo de la combinación Giffoni/RST4 obtenido hasta la temporada 3. Los siguientes periodos corresponde a una estimación de producción en alta densidad a partir del cual se espera obtener producciones del orden de 4.000 Kg/ha en pleno régimen productivo, a partir del año 9, acumulando un rendimiento por hectárea de 21.968 Kg. La situación sin proyecto, sobre la base de los rendimientos potenciales de un huerto de Avellano, alcanza los 2.500 kg/ha, acumulando en el periodo de evaluación un total de 12.800 kg. En la medida que se cumpla el supuesto anterior, el uso de la tecnología, podría agregar valor a los proyectos en un menor periodo de tiempo.

De esta forma, a los 10 de años de evaluación, la situación con proyecto produce un VAN/Ha de \$3.222.981, una tasa interna de retorno al 10%, de 14% y un periodo de recuperación de capital de 7 años.

A diferencia de la situación sin proyecto, cuyos indicadores financieros señalan que un proyecto a los 10 años genera un VAN negativo de (-2.278.094) y una tasa interna de retorno de (5%), y en dicho periodo no es posible recuperar completamente el capital invertido.

La brecha tecnológica planteada en el proyecto no es posible ser determinada, debido a que solamente existen 3 temporadas de evaluación con el uso de la tecnología. Por lo tanto, la

brecha tecnológica que actualmente existe es validar en campo, los ensayos de investigación actualmente en desarrollo, y a la espera de financiamiento, para determinar la curva de producción a 10 años cuando el huerto inicie su pleno régimen productivo.

10. CAMBIOS EN EL ENTORNO

Indique si existieron cambios en el entorno que afectaron la ejecución del proyecto en los ámbitos tecnológico, de mercado, normativo y otros, y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

De acuerdo a las señales del mercado es que Chile tiene enorme potencia para el establecimiento de huertos especializados para la industria fundamentalmente. La mejor calidad de avellano, de acuerdo con Ferrero, es producida en Chile, por la variedad Tonda di Giffoni. La superficie ha crecido a tasas exponenciales de aproximadamente 2.000 ha anuales. Se tiene información extraoficial de que existe interés por el desarrollo de proyectos productivos, por parte de grandes inversionistas a nivel local en la región de La Araucanía. Por lo tanto el desarrollo de estas tecnologías a escala comercial son altamente demandadas por la industria.

11. DIFUSIÓN

Describe las actividades de difusión realizadas durante la ejecución del proyecto. Considere como anexos el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares.

| | Fecha | Lugar | Tipo de Actividad | Nº participantes | Documentación Generada |
|----------------------------|---------|------------------------------------|--|-------------------|---|
| 1 | 24-6-16 | Hotel Dreams - Temuco | Encuentro de Innovaciones Tecnológicas para el desarrollo productivo e industrial del avellano europeo en La Araucanía | 130 (47 M, 83 H) | Lanzamiento Libro del Avellano Europeo |
| 2 | 17-8-17 | Samsun, Turkía | IX Congreso internacional del Avellano Europeo | 150 | Presentación: "Advantages of high density of hazelnut orchards in south Chile". |
| 3 | 21-6-18 | INIA Carillanca - Fundo Sta Teresa | Día de campo Avellano Europeo | 60 (10 M, 50 H) | Entrega de avances de Resultados y pendones informativos |
| 4 | 4-10-18 | Hotel Frontera - Temuco | Seminario Avances en investigación: "Tecnologías para el Impulso de la Fruticultura en el sur de Chile" | 216 (72 M, 144 H) | Entrega de avances de Resultados y pendones informativos |
| 5 | | | | | |
| n | | | | | |
| Total participantes | | | | 556 | |

12. PRODUCTORES PARTICIPANTES

Complete los siguientes cuadros con la información de los productores participantes del proyecto.

12.1 Antecedentes globales de participación de productores

Debe indicar el número de productores para cada Región de ejecución del proyecto.

| Región | Tipo productor | N° de mujeres | N° de hombres | Etnia (Si corresponde, indicar el N° de productores por etnia) | Totales |
|----------------------|------------------------------|---------------|---------------|---|---------|
| La Araucanía | Productores pequeños | | 5 | | 5 |
| | Productores medianos-grandes | 5 | 50 | | 55 |
| Los Ríos y Los Lagos | Productores pequeños | | | | |
| | Productores medianos-grandes | | 15 | | 15 |
| Totales | | 5 | 70 | | |

12.2 Antecedentes específicos de participación de productores

| Nombre | Ubicación Predio | | | Superficie Há. | Fecha ingreso al proyecto |
|---------------------|------------------|--------|------------------|----------------|---------------------------|
| | Región | Comuna | Dirección Postal | | |
| Avellaneros del Sur | IX – XV-X | | | 2000 | Enero 2015 |
| | | | | | |
| | | | | | |

13. CONSIDERACIONES GENERALES

13.1 ¿Considera que los resultados obtenidos permitieron alcanzar el objetivo general del proyecto?

Objetivo General: Incrementar el rendimiento potencial del avellano europeo, mediante la densificación del cultivo a partir de porta-injertos enanizantes (Hazel-Rootstock INIA), para mejorar la competitividad en la industria.

El objetivo general fue logrado hasta la segunda temporada post plantación, quedando inconcluso de evaluar 8 temporadas para determinar la curva de producción en alta densidad de distintas combinaciones, densidades y sitios de plantación de 10 periodos sucesivos hasta alcanzar el pleno régimen productivo.

De esta manera, en el periodo de evaluación de los ensayos, fue posible determinar que la combinación Giffonni RST4, logra anticipar en dos años, la entrada en producción desde la segunda temporada post plantación hasta la temporada de establecimiento. Se producen incrementos significativos de la producción acumulada respecto a los tratamientos auto radicados.

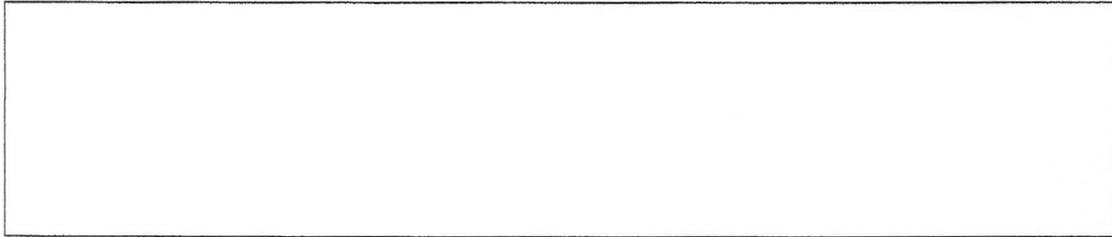
13.2 ¿Cómo fue el funcionamiento del equipo técnico del proyecto y la relación con los asociados, si los hubiere?

Durante los dos primeros años, hubo dos cambios de encargado de laboratorio, por lo que fue complejas las etapas de inducción de personal, más aún con la complejidad de la etapa de establecimiento. Posteriormente con la llegada de profesional Juan Abarzúa, fue posible desarrollar los protocolos in vitro en sus distintas etapas. Las demás parte del equipo cuentan con la experiencia para sacar adelante proyectos de alta complejidad como lo fue este programa.

13.3 A su juicio, ¿Cuál fue la innovación más importante alcanzada por el proyecto?

Fundamentalmente la densificación de los huertos y la validación de la hipótesis, que señala que huertos en alta densidad producen anticipación y aumentos unitarios de los rendimientos. La tecnología de inmersión temporal permite la propagación masiva de material de alta calidad a menor costo.

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

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the user to provide additional relevant information.

14. CONCLUSIONES

Realice un análisis global de las principales conclusiones obtenidas luego de la ejecución del proyecto.

En la industria de Avellano Europeo a nivel mundial, no se han desarrollado tecnologías que permitan reducir el vigor en Avellano. Se han adoptado tecnologías provenientes de Estados Unidos e Italia, donde actualmente se emplean densidades que no superan las 300-500 plantas/ha, cuyos sistemas de formación -ampliamente usados en los '60-'70 en pomáceas y drupáceas- generan árboles de gran altura y de baja eficiencia productiva. Esto implica que la planta no ocupa rápidamente los espacios asignados, generando una lenta entrada en producción y bajos rendimientos (Ellena, *et al* 2012).

El desarrollo de este proyecto permitirá en el corto y mediano plazo modernizar el cultivo del Avellano europeo en Chile y en el mundo. Adelantar la entrada en producción e incrementar el potencial de rendimiento, permite agregar valor a una industria emergente en Chile, donde la demanda por fruta de alta calidad es aún creciente e insatisfecha en el plano global. La escasez de suelo de aptitud frutícola y agua disponible para riego, a nivel país, requieren de tecnologías de intensificación de cultivo, y con ello generar mayores eficiencias en el uso de estos recursos, produciendo una disminución de costos y rentabilidad, lo cual permite en forma sostenible el desarrollo de una nueva industria de Avellano europeo.

La producción masiva de material *in vitro* permitirá contar no solo con la suficiente cantidad de material requerido para los futuros huertos, sino que fundamentalmente permitirá dar un salto importante en cuanto a el uso de portainjertos, actualmente con un desarrollo incipiente en este cultivo. De mismo modo la tecnología desarrollada permite obtener materiales clonados de alta homogeneidad, facilitando de esta forma al cultivo expresar los potenciales de rendimiento y calidad de esta especie.

Finalmente, el financiamiento en investigación innovación y desarrollo realizado por la fundación para innovación agraria, permite posicionar al país entre los países productores de avellano con el mayor nivel de acceso tecnológico para el cultivo a escala global. Por lo tanto, es necesario y fundamental contar con recursos frescos que permitan consolidar la validación y adopción de esta tecnología.

15. RECOMENDACIONES

Señale si tiene sugerencias en relación a lo trabajado durante el proyecto (considere aspectos técnicos, financieros, administrativos u otro).

Fundamentalmente se sugiere mayor flexibilidad, aún, para realizar cambios importantes en el plan operativo del proyecto, de modo poder cambiar tecnologías, y ser proactivo frente a las dificultades y complejidades de este tipo de proyecto. Finalmente se propone desarrollar un formato más corto y simple, sin duplicidades en cuanto a actividades, resultados, metodología e hitos críticos, con el fin de que el informe ayude a establecer claramente el avance del proyecto.

16. ANEXOS

Anexo 1:

Cuadro 1: Tasas de Proliferación In vitro de medios solidos y líquidos y tasa de enraizamiento bajo inmersión temporal.

| Promedio de Indicadores | Establecimiento | Proliferación Sólido | Proliferación Líquido (SIT) | Enraizamiento SIT |
|-----------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------|
| | Sobrevivencia (%) | Tasa proliferación | Tasa proliferación | % |
| Portainjerto | 18% | 1,45 | 5,42 | 70% |
| RST1 | 22% | 1,28 | 5,70 | 72% |
| RST2 | 14% | 1,40 | 4,70 | 80% |
| Embrión Giffoni 1 | | 1,40 | 5,10 | 58% |
| Embrión TGL3 | | 1,69 | 5,90 | 72% |
| Embrión Trebizonda 7 | | 1,50 | 5,70 | 70% |
| Variedad | 18% | 1,63 | 6,20 | 89% |
| Barcelona | 25% | 1,35 | 6,50 | 78% |
| Tonda di Giffoni | 11% | 1,90 | 5,90 | 100% |
| Total general | 18% | 1,50 | 5,64 | 76% |

Gráfico 1: tasas de proliferación en medios líquidos y medios sólidos para portainjertos y variedades propagadas in vitro.

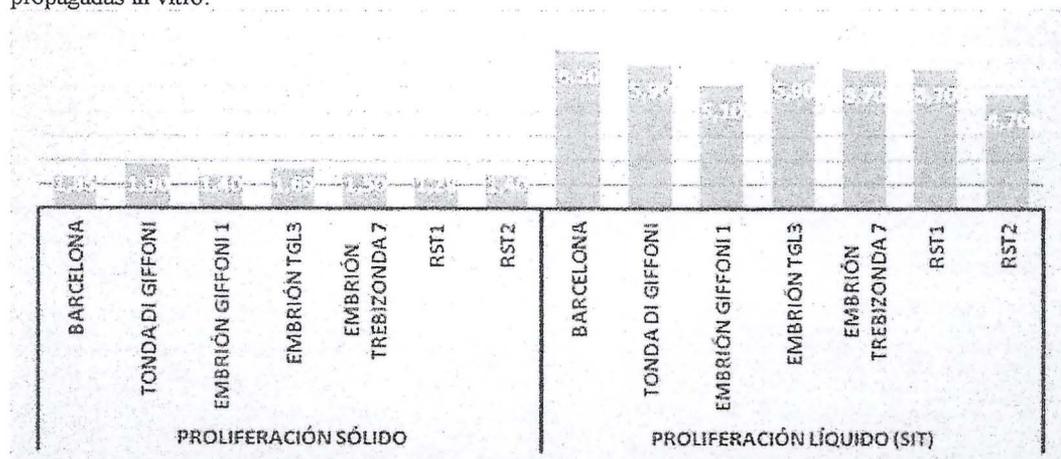
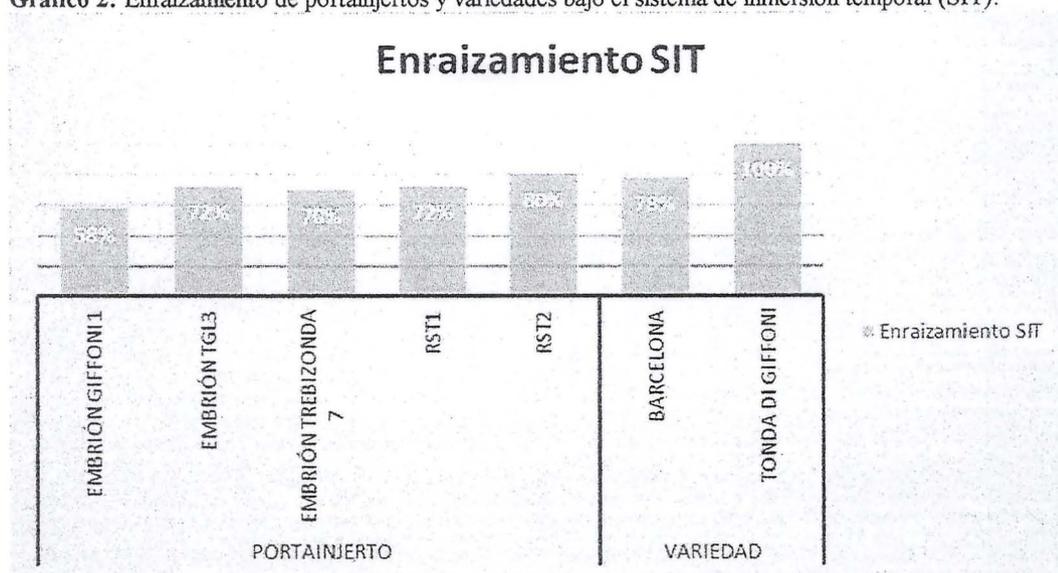


Gráfico 2: Enraizamiento de portainjertos y variedades bajo el sistema de inmersión temporal (SIT).



Cuadro 2: Etapas de micropropagación in vitro para la obtención de plantas enraizadas. Tiempo de duración de cada etapa.

| Suma de Duración (días) | Etiquetas de columna | | | | |
|-------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------|---------------|
| Etiquetas de fila | Establecimiento | Proliferación Sólido | Proliferación Líquido (SIT) | Enraizamiento SIT | Total general |
| Portainjerto | | | | | |
| RST1 | 180 | 120 | 61 | 47 | 408 |
| RST2 | 168 | 125 | 54 | 33 | 380 |
| Embrión Giffoni 1 | 223 | 61 | 53 | 41 | 378 |
| Embrión TGL3 | 223 | 92 | 63 | 43 | 421 |
| Embrión Trebizonda 7 | 218 | 30 | 63 | 30 | 341 |
| Variedad | | | | | |
| Barcelona | 184 | 92 | 63 | 32 | 371 |
| Tonda di Giffoni | 256 | 91 | 66 | 45 | 458 |
| Promedio general | 207 | 87 | 60 | 39 | 394 |

Cuadro 3: Porcentaje de duración de cada una de las etapas del proceso de multiplicación y enraizamiento in vitro para Avellano Europeo.

| | RST1 | RST2 | Embrión Giffoni 1 | Embrión TGL3 | Embrión Trebizonda 7 | Barcelona | Tonda di Giffoni | Promedio |
|-----------------------------|------|------|-------------------|--------------|----------------------|-----------|------------------|----------|
| Establecimiento | 39% | 37% | 50% | 46% | 54% | 42% | 48% | 45% |
| Proliferación Sólido | 26% | 28% | 14% | 19% | 7% | 21% | 17% | 19% |
| Proliferación Líquido (SIT) | 13% | 12% | 12% | 13% | 16% | 14% | 12% | 13% |
| Enraizamiento SIT | 10% | 7% | 9% | 9% | 7% | 7% | 8% | 8% |
| Aclimatación | 11% | 16% | 15% | 14% | 16% | 15% | 14% | 14% |
| Total general | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |

Cuadro 4: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación RST1.

| Material | Etapas | Fechas de evaluación | 20-may-16 | 17-jun-16 | 22-jul-16 | 22-ago-16 | 29-sep-16 | 24-oct-16 | 4-nov-16 | 9-dic-16 | 10/1/2017 | 11/2/2017 | 11/3/2017 | 11/4/2017 |
|----------|-----------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| RST1 | Establecimiento | Días Transcurridos | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 1 | 32 | 60 | 90 | 120 |
| RST1 | Establecimiento | N° Explantes | 99 | 79 | 65 | 45 | 36 | 22 | 22 | 16 | 21 | 28 | 36 | 47 |
| RST1 | Establecimiento | % sobrevivencia | | 80% | 66% | 45% | 36% | 22% | 22% | | | | | |
| RST1 | Proliferación | Tasa Proliferación mensual | | | | | | | | 1,2 | 1,3 | 1,35 | 1,28 | 1,3 |

Cuadro 5: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación RST2.

| Material | Etapas | Fechas de evaluación | 20-may-16 | 17-jun-16 | 22-jul-16 | 8-ago-16 | 22-ago-16 | 29-sep-16 | 24-oct-16 | 4-nov-16 | 9-dic-16 | 10/1/2017 | 11/2/2017 | 13/3/2017 | 13/4/2017 |
|----------|-----------------|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| RST2 | Establecimiento | Días Transcurridos | 0 | 30 | 60 | 76 | 90 | 120 | 150 | 168 | 1 | 32 | 32 | 30 | 125 |
| RST2 | Establecimiento | N° Explantes | 113 | 75 | 41 | 28 | 20 | 18 | 18 | 16 | 13 | 14 | 18 | 27 | 54 |
| RST2 | Establecimiento | % sobrevivencia | | 66% | 36% | 25% | 18% | 16% | 16% | 14% | | | | | |
| RST2 | Proliferación | Tasa Proliferación mensual | | | | | | | | | | 1,1 | 1,25 | 1,5 | 2,02 |

Cuadro 6: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación Trebizonda7.

| Material | Etapas | Fecha evaluación | 13-mar-15 | 14-abr-15 | 15-may-15 | 13-jun-15 | 11-jul-15 | 14-ago-15 | 15-sep-15 | 17-oct-15 | 20-nov-15 | 20-dic-15 | 20-ene-16 | 20-feb-16 | 20-mar-16 | 20-abr-16 | 18-may-16 |
|-------------|-----------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Trebizonda7 | Establecimiento | Días transcurridos | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 218 | 248 | 278 | 308 | 338 | 368 | 398 | 428 |
| Trebizonda7 | Establecimiento | N° explantes | 1 | 2 | 2 | 3 | 5 | 8 | 11 | 17 | 32 | 52 | 114 | 116 | 266 | 315 | 321 |
| Trebizonda7 | Proliferación | Tasa Prolif. Mensual | | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,9 | 1,63 | 2,19 | 1,02 | 2,29 | 1,18 | 1,02 |

Cuadro 7: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación embrión Giffoni 1.

| Material | Etapas | Fecha evaluación | 8-mar | 14-abr-15 | 15-may-15 | 13-jun-15 | 11-jul-15 | 14-ago-15 | 15-sep-15 | 17-oct-15 | 20-nov-15 | 20-dic-15 | 20-ene-16 | 20-feb-16 | 20-mar-16 | 20-abr-16 | 18-may-16 |
|----------|-----------------|----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Giffoni1 | Establecimiento | Días transcurridos | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 223 | 0 | 30 | 61 | 92 | 121 | 152 | 180 |
| Giffoni1 | Establecimiento | N° explantes | 1 | 1 | 2 | 3 | 5 | 7 | 11 | 18 | 34 | 28 | 50 | 71 | 170 | 184 | 230 |
| Giffoni1 | Proliferación | Tasa Prolif. Mensual | | 1,46 | 1,46 | 1,46 | 1,46 | 1,46 | 1,6 | 1,7 | 1,9 | 0,82 | 1,79 | 1,42 | 2,39 | 1,08 | 1,25 |

Cuadro 8: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación TGL3.

| Material | Etapas | Fecha evaluación | 8-mar | 14-abr-15 | 15-may-15 | 13-jun-15 | 11-jul-15 | 14-ago-15 | 15-sep-15 | 17-oct-15 | 20-nov-15 | 20-dic-15 | 20-ene-16 | 20-feb-16 | 20-mar-16 | 20-abr-16 | 18-may-16 |
|----------|-----------------|----------------------|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| TGL3 | Establecimiento | Días transcurridos | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 | 150 | 180 | 223 | 0 | 30 | 61 | 92 | 121 | 152 | 180 |
| TGL3 | Proliferación | N° explantes | 1 | 1,3 | 2 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 14 | 16 | 26 | 67 | 133 | 187 | 264 |
| TGL3 | Proliferación | Tasa Prolif. Mensual | | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 2,2 | 1,14 | 1,63 | 2,58 | 1,99 | 1,41 | 1,41 |

Cuadro 9: Porcentaje de sobrevivencia y proliferación Barcelona.

| Material | Etapas | Fecha evaluación | 20-may-15 | 20-nov-15 | 20-dic-15 | 20-ene-16 | 20-feb-16 | 20-mar-16 | 20-abr-16 | 18-may-16 | 10-jun-16 | 10-jul-16 | 20-ago-16 | 20-sep-16 | 20-oct-16 |
|-----------|-----------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Barcelona | Establecimiento | Días transcurridos | 0 | 184 | 1 | 31 | 31 | 29 | 31 | 28 | 23 | 30 | 41 | 31 | 30 |
| Barcelona | Establecimiento | N° explantes | 52 | 13 | | 32 | 38 | 57 | 85 | 145 | 137 | 234 | 224 | 236 | 273 |
| Barcelona | Establecimiento | Tasa de Sobrevivencia | | 25% | | | | | | | | | | | |
| Barcelona | Proliferación | Tasa Prolif. Mensual | | | 1,77 | 1,39 | 1,19 | 1,5 | 1,49 | 1,71 | 0,9 | 1,7 | 1,0 | 1,1 | 1,2 |

Cuadro 10. Porcentaje de sobrevivencia y proliferación Estaquilla Giffoni.

| Material | Etapas | Fecha evaluación | 20-abr-15 | 18-may-15 | nov-15 | dic-15 | ene-16 | feb-16 | mar-16 | abr-16 | may-16 | jun-16 |
|----------|-----------------|-----------------------|-----------|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Giffoni | Establecimiento | Días transcurridos | | 28 | 167 | 30 | 31 | 1 | 29 | 31 | 30 | 31 |
| Giffoni | Establecimiento | N° explantes | 539 | 40 | 7 | 9 | 11 | 11 | 15 | 16 | 50 | 108 |
| Giffoni | Establecimiento | Tasa de sobrevivencia | | 7% | 1% | 2% | 2% | 2% | | | | |
| Giffoni | Proliferación | Tasa de proliferación | | | | | | | 1,4 | 1,1 | 3,1 | 2,2 |

Cuadro 11: Medios líquidos de enraizamiento y frecuencias de inmersión y ventilación para portainjertos y variedades, bajo sistema de inmersión temporal.

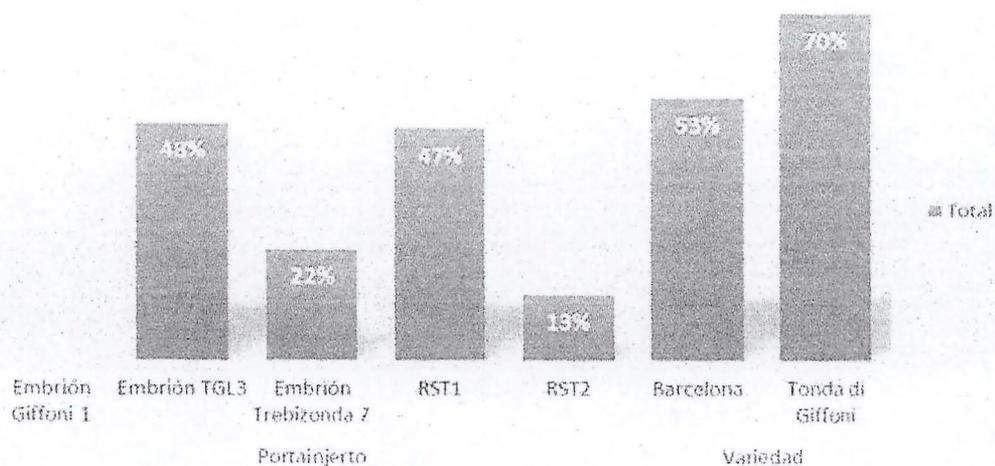
| | RST1 | RST2 | Estaquilla de Barcelona | Embrión Trebizonda7 | Embrión Giffoni 1 | Embrión TGL3 |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| Medio líquido | D2-4RA | 16R½N | MS½N | DT4 | DT4 | DT4 |
| Fecha cambio medio | 17/8/2017 | 7/7/2017 | 12/7/2017 | 28/8/2017 | 24/8/2017 | 24/8/2017 |
| Fecha evaluación | 3/10/2017 | 9/8/2017 | 13/8/2017 | 27/9/2017 | 4/10/2017 | 6/10/2017 |
| Días | 47 | 33 | 32 | 30 | 41 | 43 |
| Peso Inicial total (g) | 83,3 | 99,1 | 127,4 | 82,1 | 104,1 | 102,3 |
| Peso explantes enraizados (g) | 59,8 | 79,5 | 99,2 | 57,8 | 60,8 | 73,8 |
| Porcentaje de enraizamiento | 72% | 80% | 77,86% | 70% | 58% | 72% |
| Tiempo de Inmersión | <i>Frecuencia: 720 min Duración 120 seg</i> | <i>Frecuencia: 360 min Duración 120 seg</i> | <i>Frecuencia: 720 min Duración 120 seg</i> | <i>Frecuencia: 720 min Duración 120 seg</i> | <i>Frecuencia: 720 min Duración 120 seg</i> | <i>Frecuencia: 720 min Duración 120 seg</i> |
| Tiempo de Ventilación | <i>Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg</i> | <i>Frecuencia: 400 min Duración: 60 seg</i> | <i>Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg</i> | <i>Frecuencia: 400 min Duración: 60 seg</i> | <i>Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg</i> | <i>Frecuencia: 800 min Duración: 60 seg</i> |
| Temperatura | 25 °C | 25 °C | 25 °C | 25 °C | 25 °C | 25 °C |
| Fotoperíodo | Luz: 16 - Osc: 8 | Luz: 16 - Osc: 8 | Luz: 16 - Osc: 8 | Luz: 16 - Osc: 8 | Luz: 16 - Osc: 8 | Luz: 16 - Osc: 8 |

Anexo 2.

Cuadro 1. Resultados de aclimatación de tres tecnologías de aclimatación de portainjertos y variedades, provenientes de condiciones in vitro.

| Aclimatación | Tecnologías | | | | | | |
|------------------|---------------|------------------|--------------|------------------|-------------------------|------------------|-----------------------|
| | Speedling | | | | Bolsas en Micro Túneles | | Cámara de Crecimiento |
| | Medio líquido | | Medio Sólido | | Medio líquido | | Medio Líquido |
| Portainjerto | Evaluación 1 | Evaluación Final | Evaluación 1 | Evaluación Final | Evaluación 1 | Evaluación Final | Evaluación Final |
| RST1 | | | | | 30% | 12% | 47% |
| RST2 | | | | | 17% | 17% | 13% |
| Embrión TGL3 | | | | | 100% | 5% | 48% |
| Trebizonda 7 | 13% | 0% | 24% | 0% | 79% | 3% | 22% |
| Giffoni 1 | | | | | 100% | 37% | 0% |
| Variedad | | | | | | | |
| Barcelona | | | | | 23% | 13% | 53% |
| Tonda di Giffoni | | | | | | | 70% |
| Promedio | | 0% | | 0% | 58% | 15% | 36% |

Gráfico 1: Aclimatación de Plantas, bajo cámara de crecimiento con condiciones medioambientales controladas.



Cuadro 1: Lista de Bandejas por cada ingreso de plantas provenientes de vitro en aclimatación en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo.

| Variedad/N° Bandeja | Suma de Días de aclimatación | Promedio de Supervivencia (%) |
|----------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Barcelona | | 53% |
| 1 | 65 | 25% |
| 37 | 65 | 80% |
| 41 | 65 | 50% |
| 43 | 65 | 25% |
| 48 | 65 | 85% |
| Tonda di Giffoni | | 70% |
| 70 | 72 | 40% |
| 71 | 70 | 100% |
| RST 2 | | 13% |
| 63 | 90 | 20% |
| 65 | 73 | 7% |
| Rst1 | | 47% |
| 78 | 50 | 47% |
| TGL3 | | 48% |
| 12 | 65 | 5% |
| 28 | 65 | 80% |
| 29 | 65 | 40% |
| 30 | 65 | 50% |
| 31 | 65 | 55% |
| 32 | 65 | 20% |
| 33 | 65 | 75% |
| 34 | 65 | 60% |
| Trebizonda 7 | | 22% |
| 23 | 65 | 35% |
| 24 | 65 | 20% |
| 26 | 65 | 27% |
| 27 | 65 | 6% |
| Giffoni 1 | | 0% |
| 16 | 65 | 0% |
| 17 | 65 | 0% |
| 18 | 65 | 0% |
| 19 | 65 | 0% |
| 20 | 65 | 0% |
| 21 | 65 | 0% |
| 22 | 65 | 0% |
| 25 | 65 | 0% |
| Total general | | 32% |

Gráfico N°2: Periodo de tiempo de las diferentes etapas de propagación in vitro para la obtención de una planta aclimatada.

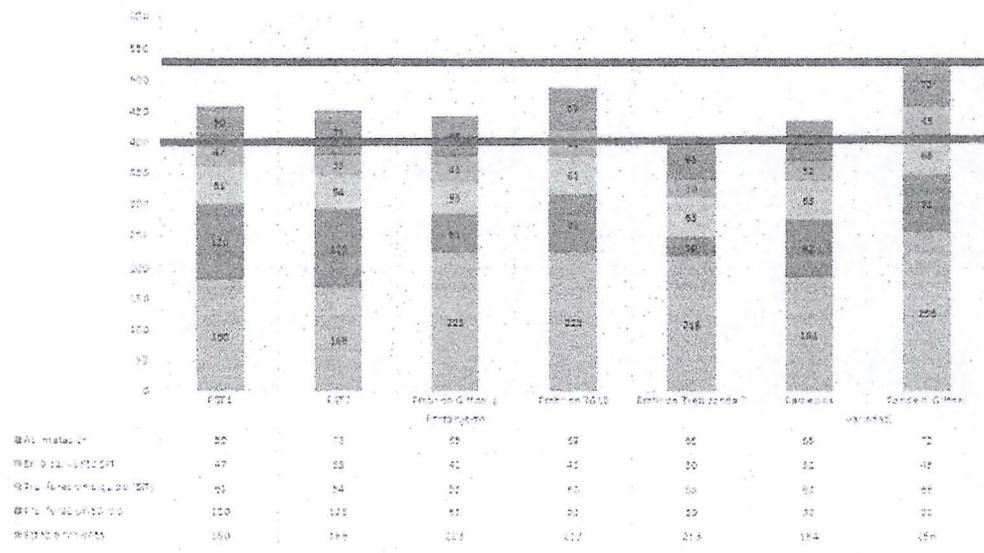
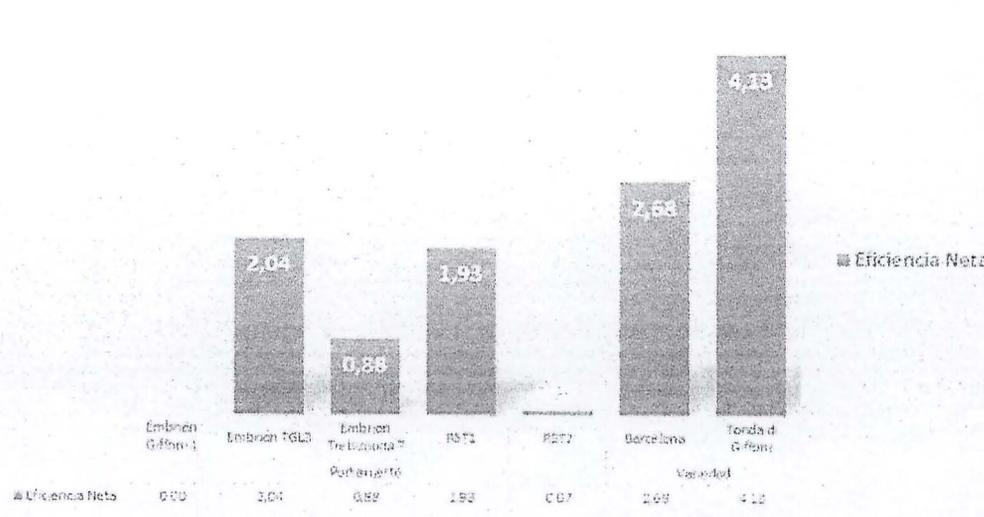
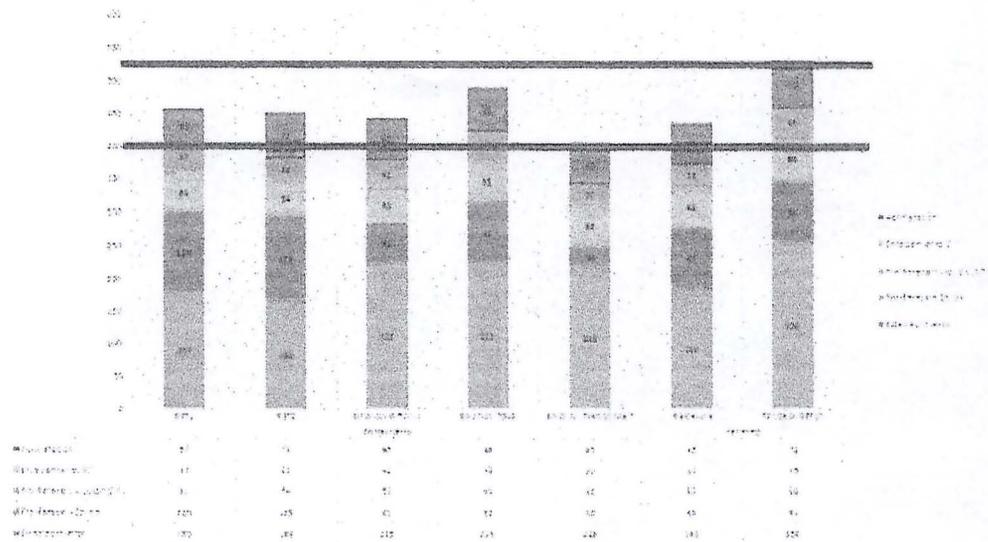


Gráfico N°3: Eficiencia neta de producción de plantas aclimatadas en el proceso de producción de plantas in vitro.

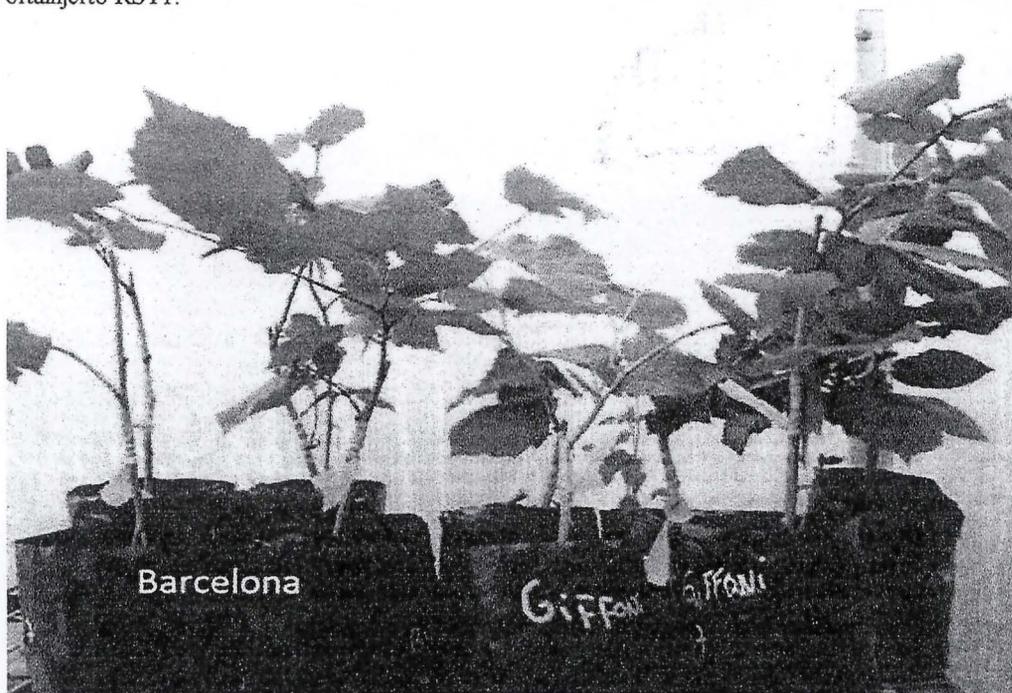




Cuadro 2: Porcentaje de prendimiento y sobrevivencia de micro-injerto in vivo de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni, sobre Portainjerto RST1.

| Portainjerto | Variedad | Plantas injertadas (Nº) | Prendimiento (%) | Plantas Micro injertadas (Nº) | Sobrevivencia Post-Injerto | Plantas Vivas (Nº) |
|--------------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|
| RST1 | Barcelona | 20 | 75% | 15 | 50% | 10 |
| RST1 | Tonda di Giffoni | 20 | 85% | 17 | 70% | 13 |

Foto 1: Registro de plantas micro injertadas de las variedades Barcelona y Tonda di Giffoni, sobre Portainjerto RST1.



Anexo 3:

Cuadro 1: Prendimiento de plantas injertadas (%) sobre portainjertos RST1; RST2; RST3 y RST4, provenientes de acodos.

| Temporada | Porta-injerto | Vigor | Origen | Injertación | Calibre del Eje | Variedad | N° Injertos | Injertos Vivos (N°) | Prendimiento (%) |
|-----------|---------------|----------|--------|-------------|-----------------|------------------|-------------|---------------------|------------------|
| 2014-2015 | RST1 | Bajo | Acodo | Directo | Heterogéneo | Barcelona | 104 | 31 | 30% |
| 2015-2016 | RST1 | Bajo | Acodo | Directo | Heterogéneo | Barcelona | 80 | 38 | 48% |
| 2015-2016 | RST1 | Bajo | Acodo | Directo | Heterogéneo | Tonda di Giffoni | 65 | 11 | 17% |
| 2014-2015 | RST2 | Medio | Acodo | Directo | Heterogéneo | Barcelona | 49 | 30 | 61% |
| 2015-2016 | RST2 | Medio | Acodo | Directo | Heterogéneo | Barcelona | 122 | 43 | 35% |
| 2015-2016 | RST2 | Medio | Acodo | Directo | Heterogéneo | Tonda di Giffoni | 50 | 16 | 32% |
| 2014-2015 | RST3 | Alto | Acodo | 12 meses | Homogéneo | Barcelona | 90 | 70 | 78% |
| 2014-2015 | RST4 | Muy Alto | Acodo | 12 meses | Homogéneo | Giffoni | 80 | 80 | 100% |

ANEXO 4

Cuadro 1: Resultados de productividad de huertos en alta densidad (kg/ha) del cultivar Barcelona sobre los porta-injertos RST1, RST2 y RST3. Establecimiento 2015-2016

| Establecimiento | Portainjerto | Variedad | Marco | Densidad (pl/ha) | Promedio de Producción (kg/ha) | | | Acumulado (kg/ha) |
|-----------------|--------------|-----------|-------|------------------|--------------------------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | | | | 2015-16 | 2016-17 | 2017-18 | |
| | | | | | Establecimiento | 1° Temporada | 2° temporada | |
| 2015-16 | Testigo | Barcelona | 5X4 | 500 | 0 | 0 | 25,6 | 25,6 |
| 2015-16 | RST1 | Barcelona | 5X2 | 1000 | 0 | 0 | 6,9 | 6,9 |
| 2015-16 | RST2 | Barcelona | 5X2 | 1000 | 0 | 0 | 12,2 | 12,2 |
| 2015-16 | RST3 | Barcelona | 5X2 | 1000 | 0 | 0 | 34,7 | 34,7 |
| 2015-16 | RST3 | Barcelona | 5X1,5 | 1333 | 5,7 | 32,7 | 57,1 | 95,5 |
| 2015-16 | RST3 | Barcelona | 5X1 | 2000 | 0 | 0 | 84,4 | 84,4 |

Cuadro 2: Resultados de productividad de huertos en alta densidad (kg/ha) del cultivar Barcelona sobre los porta-injertos RST1, RST2 y RST3. Establecimiento 2016-2017

| Establecimiento | Portainjerto | Variedad | Marco (m) | Densidad (pl/ha) | Promedio de Producción (kg/ha) | | Acumulado (kg/ha) |
|-----------------|--------------|-----------|-----------|------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|
| | | | | | 2016-2017 | 2017-2018 | |
| | | | | | Establecimiento | 1° Temporada | |
| 2016-17 | Testigo | Barcelona | 5x4 | 500 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST1 | Barcelona | 5x2 | 1.000 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST1 | Barcelona | 5x1,5 | 1.333 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST1 | Barcelona | 5x1 | 2.000 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST2 | Barcelona | 5x2 | 1.000 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST2 | Barcelona | 5x1,5 | 1.333 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST2 | Barcelona | 5x1 | 2.000 | 0 | 0 | 0 |

Cuadro 3: Resultados de productividad de huertos en alta densidad (kg/ha) del cultivar Tonda di Giffoni sobre los porta-injertos RST1, RST2 y RST3. Establecimiento 2015-2016

| Establecimiento | Portainjerto | Variedad | Marco (m) | Densidad (pl/ha) | 2015-16 | 2016-17 | 2017-18 | Acumulado (kg/ha) |
|-----------------|--------------|----------|-----------|------------------|-----------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | | | | Establecimiento | 1ª Temporada | 2ª temporada | |
| 2015-16 | Testigo | Giffoni | 5X4 | 500 | | | 25,0 | 25,0 |
| 2015-16 | RST4 | Giffoni | 5X2 | 1.000 | 8 | 23 | 292 | 323,5 |
| 2015-16 | RST4 | Giffoni | 5X1,5 | 1.333 | 15 | 53 | 566 | 634,3 |
| 2015-16 | RST4 | Giffoni | 5X1 | 2.000 | 26 | 30 | 343 | 398,2 |

Cuadro 4: Resultados de productividad de huertos en alta densidad (kg/ha) del cultivar Tonda di Giffoni sobre los porta-injertos RST1, RST2 y RST3. Establecimiento 2016-2017

| Establecimiento | Portainjerto | Variedad | Marco (m) | Densidad (pl/ha) | Promedio de Producción (kg/ha) | | Acumulado (kg/ha) |
|-----------------|--------------|----------|-----------|------------------|--------------------------------|--------------|-------------------|
| | | | | | 2016-2017 | 2017-2018 | |
| | | | | | Establecimiento | 1ª Temporada | |
| 2016-17 | Testigo | Giffoni | 5X4 | 500 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST1 | Giffoni | 5X1,5 | 1.333 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST1 | Giffoni | 5X2 | 1.000 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST2 | Giffoni | 5X1,5 | 1.333 | 0 | 0 | 0 |
| 2016-17 | RST2 | Giffoni | 5X2 | 1.000 | 0 | 0 | 0 |

Anexo 7.

Cuadro 1. Medios de cultivo sólidos, de establecimiento y proliferación para material vegetal proveniente de micro-estacas y embriones.

| Nombre Medio | D2P (Establecimiento) | D2 (proliferación) |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| Medio Original | DKW | DKW |
| Medio Original (g) | 5,32 | 5,32 |
| Glucosa | 30 g | 30 g |
| BAP [1mg/ml] | 5 ml | 5 ml |
| IBA [100 ppm] | 100 ul | 100 ul |
| PVP | 1 g | 1 g |
| PPM | 2 ml | |
| Ph | 5,8 | 5,8 |
| Agar | 7,5g | 7,5g |
| MES | 0,5 g | 0,5 g |

Cuadro 2. Medios de cultivo líquidos, para proliferación de material proveniente de micro-estacas, en Sistema de Inmersión Temporal.

| Nombre Medio | D2 -3 | D2 -4 | D4-Fe |
|--------------------|--------|----------|-----------------|
| Medio Original | DKW | DKW | DKW |
| Medio Original (g) | 5,32 | 5,32 | 5,32 |
| Glucosa | | 30 g | 30 g |
| Fructosa | 30 g | | |
| Mioinositol | | 800 mg | |
| BAP [1 mg/ml] | 5 ml | 2 ml | 4 ml |
| IBA [100 ppm] | 100 ul | 10 ul | 30 ul |
| GA3 [1000 ppm] | | | 100 ul (0,1 ml) |
| PVP | 1 g | | 1 g |
| PPM | 2 ml | | 2 ml |
| Ph | 5,8 | 5,2 | 5,7 |
| MES | 0,5 g | | |
| FE-EDDHA | | 0,0007 g | |
| CuSO4 5H2O | | 0,0051 g | |

Cuadro 3. Medio de cultivo líquido, para proliferación de material proveniente de embriones en Sistema de Inmersión Temporal.

| Nombre Medio | D2 -3 |
|--------------------|--------|
| Medio Original | DKW |
| Medio Original (g) | 5,32 |
| Glucosa | |
| Fructosa | 30 g |
| Mioinositol | |
| BAP [1 mg/ml] | 5 ml |
| IBA [100 ppm] | 100 ul |
| GA3 [1000 ppm] | |
| PVP | 1 g |
| PPM | 2 ml |
| Ph | 5,8 |
| MES | 0,5 g |

Cuadro 4. Medios de cultivo líquidos, para enraizamiento de material proveniente de micro-estacas en Sistema de Inmersión Temporal.

| Nombre Medio | D2-4RA | 16R½N | MS1/2N |
|--------------------------|---------|--------------------|--------------------|
| Medio Original | DKW | MS Modified (M531) | MS Modified (M531) |
| Medio Original (g) | 5,32 | 0,78 | 0,78 |
| Glucosa | 30 g | 30 g | 30 g |
| Mioinositol | 0,8 g | | |
| IBA | 3 mg/l | 5 mg/l | 5 mg/l |
| FeNa-EDDHA | 0,03 | | |
| PPM | 2 ml | | |
| Ph | 5,2 | 5,2 | 5,2 |
| MES | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g |
| Carbón activado | 0,5 g | 0,5 g | 0,5 g |
| CuSO4 5H2O | 0,001 g | | |
| NH4 NO3 [1650 mg/l x 10] | | 10 ml | 10 ml |
| KNO3 [1900 mg/l x10] | | 10 ml | 10 ml |
| Putrescina [2000 ppm] | | | 25 ul |

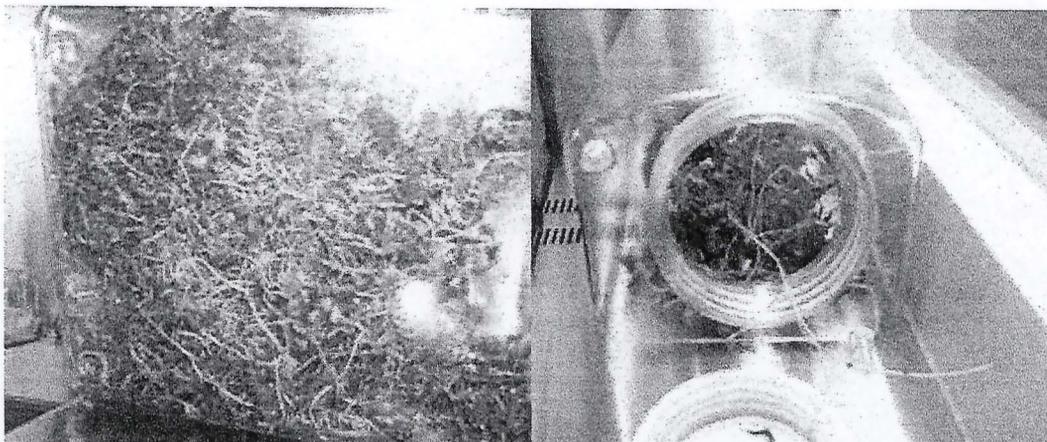
Cuadro 5. Medio de cultivo líquido, para enraizamiento de material proveniente de embriones en Sistema de Inmersión Temporal.

| Nombre Medio | DT4 |
|--------------------|--------|
| Medio Original | DKW |
| Medio Original (g) | 5,32 |
| Glucosa | 30 g |
| IBA | 2 mg/l |
| Ph | 5,2 |
| MES | 0,5 g |
| Carbón activado | 0,5 g |

Foto 1. Imagen general del Sistema de Inmersión Temporal con distintos materiales de avellano europeo



Foto 2. Contenedor de avellano europeo enraizado.



17. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Anderson W.C. 1984. A revised tissue culture médium for shoot multiplication of rhododendron. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109: 343-347.

Caboni, C. 2008. Improving micropropagation of hazelnut italian cultivars. *Acta Horticulturae* 845: VII International Congress on Hazelnut.

Días-Sala, C, Rey, M and Rodriguez, R. 1990. In vitro establishment of a ciclonal chain from nodal segments and apical buds of adult hazel (*Corylus avellana* L). *Plant. Cell Tissue Organ Cult.* 23: 151-157.

Garrison, W; Dale, A; e Saxena, P.K. 2013. Improved shoot multiplication and development in hybrid hazelnut nodal cultures by ethylenediamine di-2 hydroxy-phenylacetic acis (Fe-EDDHA). *Can. J. Plant Sci.* 93: 511-521.

Hand, C; Maki, S and Reed, B.M. 2014. Modeling optimal nutrition for hazelnut micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 119 (2), 411-425.

Hand, C, Reed BM. 2014. Minor nutrient are critical for the improved growth of *Corylus avellana* L shoot cultures. *Plant Cell Tiss. Org.* 119:427-439.

Jyoti, August, 2013. Micropropagation of Hazelnut (*Corylus* Species). A Thesis presented to The University of Guelph. In partial fulfilment of requirements for the degree of Master of Science in Plant Agriculture. Guelph, Ontario, Canada

Latawa, Mukund R. Shukla, and Praveen K. Saxena, 2015. An efficient temporary immersion system for micropropagation of hybrid hazelnut. Department of Plant Agriculture, Gosling Research Institute for Plant Preservation, University of Guelph, Guelph. Canada.

Murashige, T and Skoog, F. 1962. A revised médium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 15 (3): 473-497.

Nas, M.N and Reed P.E. 2001. Micropropagation of hybrid hazelnut: Medium composition, physical state and iron source affect shott morphogenesis multiplication and explant vitality. *Acta Hort.* 556: 251-258.

Yu, X, and Reed, B.M. 1995. A micropropagation system for hazelnut (*Corylus avellana* L). *HortScience* 30(1): 120-123.