

INFORME TECNICO Y DE GESTION FINAL

EJECUTOR: Universidad Austral de Chile - Universidad de Talca

NOMBRE DEL PROYECTO: “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”.

CODIGO: BID-PI-C-2001-1-A-071

Nº INFORME: FINAL

PERIODO: desde: 16 de enero 2006 hasta: 29 de abril 2008

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO:

Peter Seemann F.

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCION	

I. Actividades desarrolladas en la Universidad Austral de Chile

1. Resumen Ejecutivo.

Este informe corresponde a la extensión del proyecto “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”. El proyecto tuvo como objetivo central la multiplicación intensiva de los genotipos de interés, junto con desarrollar un método de crecimiento rápido de bulbos que permitiera la visualización de la flor mejorada. Durante esa primera etapa se advirtieron problemas principalmente derivados a la lenta capacidad de multiplicación *in vitro* lo que dificultaba la obtención de líneas clonales y la propagación de los genotipos de interés. A esto se sumaron otros problemas dados por la dificultad del cultivo en invernadero y el extenso período (3 a 5 años) que estas especies tardan en florecer. Por otro lado existía una falta de conocimiento general de las especies.

En virtud de lo anterior, se decidió proponer una extensión focalizándose a seleccionar y multiplicar genotipos superiores, sin dar tanto énfasis a la obtención de poliploidía. En este período los esfuerzos estuvieron puestos en la obtención de genotipos de mejor capacidad de multiplicación, la realización de estudios moleculares para clarificar las relaciones filogenéticas de especies e híbridos, la optimización de los protocolos de cultivo *in vitro* utilizando en una primera etapa el sistema de inmersión temporal, determinar las condiciones de manejo para engorda de bulbos y postcosecha, y formar un banco genético de las especies de *Rhodophiala* disponible.

La colección de germoplasma de *Rhodophiala* se encuentra *in vivo* tanto en el invernadero de la Universidad de Talca, como en el de la Universidad Austral de Chile, en donde además se cuenta con una colección de genotipos *in vitro*. Este valioso material genético se conservará para futuros proyectos, o trabajos de tesis.

A pesar del largo período que requieren estas especies para florecer, fue posible evaluar la floración de un genotipo poliploide mantenido en el invernadero de la Universidad Austral de Chile. De este genotipo se realizaron evaluaciones morfométricas y del tamaño del polen. En la colección mantenida en la Universidad de Talca se realizó la inducción y evaluación del crecimiento de los bulbos, tanto en plantas diploides como poliploides.

El trabajo realizado, de Cultivo en diferentes condiciones ambientales, sumado al trabajo en terreno y laboratorio, ha permitido obtener resultados positivos, los cuales son un aporte al conocimiento de estas especies y entregan una base para un futuro manejo productivo de estas.

2. Cumplimiento de los objetivos.

1. Seleccionar genotipos superiores diploides y poliploides en cuanto a su capacidad de multiplicación *in vitro*.

Se cumplió en un 50%, ya que solo se seleccionaron genotipos diploides. El cultivo de las plantas poliploides fue difícil de mantener debido a que van perdiendo vigor lo que influye en su sobrevivencia.

2. Aplicar los protocolos de multiplicación desarrollados previamente a genotipos seleccionados del germoplasma disponible.

Se aplicó el protocolo convencional en medio líquido y semisólido a los genotipos seleccionados.

3. Mejorar protocolos de micropropagación con aplicación de diferentes sistemas de cultivo y aclimatación *in vitro* y *ex vitro*.

No se logró aumentar la eficiencia en el cultivo *in vitro* de las diferentes especies, debido a que la respuesta al Cultivo estaba directamente relacionada con el genotipo.

4. Solicitar patente del protocolo de multiplicación de microbulbillos *in vitro* desarrollado.

No se realizó debido a que no se justifica realizar el patentamiento de un protocolo que era específico solo para algunos genotipos.

5. Realizar estudios morfológicos, citológicos y moleculares en torno a clarificar relaciones filogenéticas entre especies e híbridos.

Se realizaron en la gran mayoría de las especies. Se concluyó que existe una reducida variabilidad entre un grupo de especies, el que a su vez difiere fuertemente de especies como *R. rhodolirion* y *R. cipoana*, reafirmandose la necesidad de revisar la taxonomía del género.

6. Formar bancos genético *in vitro* e *in vivo* de especies de *Rhodophiala* disponible.

Se logró formar un Banco de germoplasma tanto *in vitro* como *in vivo*, en la Universidad Austral de Chile e *in vivo* en la Universidad de Talca.

7. Presentar los avances obtenidos en reuniones técnicas especializadas

Se presentaron trabajos a diversos congresos científicos.

Cuadro 1. Actividades y tareas ejecutadas.

Nº de actividad	Actividad a desarrollar	Tarea ejecutada
1	Selección por observación visual de genotipos multiplicados <i>in vitro</i> de acuerdo a aptitudes de propagación.	100%
	Realizado	
1	Multiplicar genotipos seleccionados mediante sistema de cultivo estacionario y sistema de inmersión temporal	80%
Razón discrepancia	El sistema de inmersión temporal no presentó mejoras significativas en los coeficientes de multiplicación, además se produjo pérdida de plantas por problemas relacionados con la hiperhidricidad (vitricación), por lo que no se aplicó en todas las especies.	
2	Ejecución del ensayo 1: efecto del paclobutrazol en la especie o híbrido más difícil de multiplicar de acuerdo a proceso de multiplicación previo.	100%
	Realizado	
3	Ejecución del ensayo 2: evaluar la interacción entre la citoquinina meta-topolina y paclobutrazol sobre la multiplicación de microbulbillos <i>in vitro</i> .	100%
	Realizado	
4	Procesamiento de datos y análisis estadístico	100%
	Realizado	
5	Ejecución del ensayo 3: evaluar el efecto de la cauterización apical de microbulbillos en una especie difícil de multiplicar.	100%
	Realizado	
6	Procesamiento de datos y análisis estadístico	100%
	Realizado	
1	Extracción de ADN de especies en estudio y amplificación de regiones ITS1 e ITS2 mediante PCR	100%
	Realizado	
2	Purificación de fragmentos de ADN y secuenciación	100%
	Realizado	
3	Análisis de secuencias y comparación con secuencias existentes en bases de datos	100%
	Realizado	
4	Digestión de fragmentos PCR por enzimas de restricción y separación de productos en geles de agarosa	
Discrepancia	Debido a los escasos sitios de restricción polimórficos se reemplazó esta actividad por el análisis de polimorfismos a nivel de mutaciones puntuales intra e interespecíficas y el estudio de los	100%

	cromatogramas derivados de las reacciones de secuenciación.	
6	Realizar estudios cariológicos y moleculares de las especies en estudio	100%
	Realizado	
7	Ejecución de ensayo 4: Aplicación de resultados de MTP-PBZ y cauterización apical en SCE en híbridos de <i>Rhodophiala</i> .	100%
	Realizado	
8	Procesamiento de datos y análisis estadístico de ensayo 4	100%
	Realizado	
1	Ejecución ensayo 5: Determinar tiempo y frecuencia de inmersión en sistema de inmersión temporal en <i>R. bagnoldii</i> y <i>R. splendens</i>	0% (No se ha realizado debido a falta de material vegetal)
Discrepancia	No realizado debido a que los ensayos anteriores no permitieron incrementar la cantidad de plántulas para contar con material suficiente para montar el ensayo	
2	Ejecución ensayo 5: Determinar tiempo y frecuencia de inmersión en sistema de inmersión temporal en <i>R. montana</i> y <i>R. aff. laeta</i>	0% (No se ha realizado debido a falta de material vegetal)
Discrepancia	No realizado debido a que los ensayos anteriores no permitieron incrementar la cantidad de plántulas para contar con material suficiente para montar el ensayo	
3	Procesamiento de datos y análisis estadístico.	0%
4	Ejecución ensayo 6: Determinar cantidad de explantes en sistema de inmersión temporal en, <i>R. bagnoldii</i> y <i>R. splendens</i>	50% (se ha realizado para <i>R. splendens</i>)
Discrepancia	Realizado solamente para <i>R. splendens</i> debido a que solo en esa especie se contaba con material suficiente para montar este ensayo	
5	Ejecución ensayo 6: Determinar cantidad de explantes en sistema de inmersión temporal en <i>R. montana</i> y <i>R. aff. laeta</i>	0% (Aun no se ha realizado por no contar con el material vegetal suficiente)
Discrepancia	No realizado debido a que los ensayos anteriores no permitieron incrementar la cantidad de plántulas para contar con material suficiente para montar el ensayo	
6	Procesamiento de datos y análisis estadístico.	0%
7	Aplicar cultivo de inmersión temporal en los 10 híbridos de <i>Rhodophiala</i> de acuerdo a resultados anteriores	0% (Aun no se ha realizado por no contar con el material vegetal suficiente)

	No realizado debido al bajo vigor de los híbridos y a la reducción del material original. Debido a lo escaso del material se determinó mantenerlo en un sistema de Cultivo <i>in vitro</i> conocido y no arriesgarlo en un sistema de inmersión temporal que no proveyó una mayor tasa de multiplicación en el caso de <i>Rhodophiala</i>	
8	Aclimatación <i>in vitro</i> de cuatro especies de <i>Rhodophiala</i>	75% (Se ha realizado para <i>R. montana</i> , <i>R. splendens</i> y <i>R. ananuca</i>).
Discrepancia	Se realizó en forma masiva para las especies <i>R. montana</i> , <i>R. splendens</i> y <i>R. ananuca</i> , especies que se adaptaron a las condiciones de invernadero no calefaccionado de Valdivia. Se mantienen algunos ejemplares de otras especies como <i>R. bagnoldii</i> , <i>R. phycelloides</i> y <i>R. rhodolirion</i> menos adaptadas, junto con algunos híbridos	
9	Procesamiento de datos y análisis estadístico	75%
10	Aclimatación <i>ex vitro</i> de las especies e híbridos de <i>Rhodophiala</i>	75% (Se ha realizado para <i>R. montana</i> , <i>R. splendens</i> y <i>R. ananuca</i>).
Discrepancia	Se realizó en forma masiva para las especies <i>R. montana</i> , <i>R. splendens</i> y <i>R. ananuca</i> , especies que se adaptaron a las condiciones de invernadero no calefaccionado de Valdivia. Se mantienen algunos ejemplares de otras especies como <i>R. bagnoldii</i> , <i>R. phycelloides</i> y <i>R. rhodolirion</i> menos adaptadas, junto con algunos híbridos	
1	Preparación de texto para solicitud de patente	No ejecutado (se solicita eliminar)
	No ejecutado, se solicitó eliminar	
2	Preparación y tramitación de solicitud de patente	No ejecutado (se solicita eliminar)
3	Análisis y contestación de Informes preliminares y periciales	No ejecutado (se solicita eliminar)
	No ejecutado, se solicitó eliminar	
4	Análisis y contestación de Informes preliminares y periciales	No ejecutado (se solicita eliminar)
	No ejecutado, se solicitó eliminar	

3. Análisis de brecha.

Se tenía contemplado realizar ensayos mediante el Cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal con cuatro especies de *Rhodophiala* (*R. montana*, *R. splendens*, *R. bagnoldii* y *R. ananuca* (ex *laeta*) y diez híbridos, sin embargo, la cantidad de material vegetal por genotipo seleccionado y disponible fue insuficiente para establecer un ensayo con las repeticiones necesarias para validarse estadísticamente. Debido a este inconveniente se solicitó realizar una reprogramación de las actividades propuestas en el proyecto, trabajándose solo con el material que se encuentre disponible en mayor cantidad.

El objetivo N° 4, actividades N° 1-4 “Preparación de texto para solicitud de patente” se solicitó a FIA eliminarlo, con la consiguiente devolución de los fondos considerados para ese ítem, debido a que los resultados obtenidos en cultivo *in vitro* sólo son aplicables a genotipos específicos y no se han logrado obtener plantas poliploides que puedan multiplicarse intensivamente.

Debido a que en general *Rhodophiala* ha sido un género que no responde eficientemente al cultivo *in vitro*, no es posible elaborar un protocolo aplicable para un sistema de propagación masiva. Por lo tanto, se decidió no presentar solicitud de patentamiento de los protocolos elaborados.

4. Metodología.

4.1. Descripción de la metodología efectivamente utilizada durante el proyecto.

Durante la ejecución de este proyecto se aplicaron varias metodologías, algunas de las cuales fueron modificadas en base a los ensayos que se realizaron. Entre las metodologías utilizadas se encuentran:

- ✓ Validación de metodología empleada en la observación de cromosoma, para estudio de cariotipos y recuentos cromosómicos durante inducción de poliploidía.
- ✓ Validación de técnica de análisis de polen para determinar nivel de ploidía.
- ✓ Validación de metodología empleada en la inducción de poliploidía, en base a la aplicación de antimicóticos como la colchicina.
- ✓ Validación de metodología empleada en la germinación de semillas tanto *in vivo* como *in vitro*
- ✓ Validación de metodología empleada en la multiplicación de microbulbillos *in vitro*
- ✓ Validación de metodología de crecimiento rápido de bulbos *in vitro* y aclimatación de plantas en invernadero.
- ✓ Validación de metodología para la extracción de ADN, amplificación y purificación de productos PCR de región ITS

4.1.1 Ensayos establecidos en cultivo *in vitro*

4.1.1.1 Cauterización de la zona apical de microbulbillos de diferentes genotipos de *R. bagnoldii*.

Para ello se utilizaron microbulbillos *in vitro* de diferentes genotipos de *Rhodophiala bagnoldii*. A cada microbulbillo se le realizó un corte basal, y una cauterización del ápice con bisturí, los cuales fueron sembrados en 30 ml de medio de cultivo MS 100%, en estado líquido. Este medio de cultivo fue adicionado con 0,5 mg/L de meta-topolina (MTP) y 0,25 mg/L de paclobutrazol (PBZ), además de un medio testigo sin la adición de reguladores de crecimiento.. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento, sembrando en cada frasco microbulbillos con un peso igual o superior a 1.0 g. La incubación se realizó a 23°C, 3000 lux y 16 horas de luz, incubándolas durante un período de tres meses.

Se aplicó ANOVA y comparaciones múltiples de promedio mediante el test LSD (diferencia mínima significativa) al 5% de significancia, con excepción de la variable Tasa de propagación que se evaluó mediante el Test de Kruskal Wallis, aplicando el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples de promedios.

En base a los análisis estadísticos realizados se puede observar que provocar una cauterización apical en la planta no tiene un efecto significativo en la regeneración de nuevos microbulbillos, ni en ninguno de los otros parámetros analizados.

4.1.1.2. Cultivo de microbulbillos de diferentes genotipos de *R. splendens* y del genotipo seleccionado N° 363.

Los microbulbillos se sembraron en medio de cultivo MS adicionado con 2.2, 4.4, 11.1, 22.2 μ M de meta-topolina (MTP) y 1.7, 3.4, 8.5 y 17.0 μ M de Paclobutrazol (PBZ), solos o en combinación, además del tratamiento testigo sin la adición de reguladores de crecimiento. Se utilizaron 10 repeticiones por tratamiento, sembrando en cada frasco microbulbillos con un peso igual o superior a 1.0 g. La incubación se realizó a 23°C, 3000 lux y 16 horas de luz, incubándolas durante un período de tres meses.

Cuadro 2. Tratamientos aplicados a diferentes genotipos de *R. splendens*

Tratamiento	MTP (μ M)	PBZ (μ M)
1 (Testigo)	0	0
2	2,2	0
3	4,4	0
4	11,1	0
5	22,2	0
6	0	1,7
7	0	3,4
8	0	8,5
9	0	17,0
10	2,2	1,7
11	4,4	3,4
12	22,2	17,0
MTP: Metatopolina PBZ: Paclobutrazol		

Se analizaron los datos correspondientes a los parámetros:

Peso de planta

Peso de bulbo

N° de brotes

Largo de brotes

Diámetro de bulbo

Hiperhidricidad

Contaminación

Índice de multiplicación: $(N^{\circ} \text{ bulbos finales} - N^{\circ} \text{ bulbos iniciales}) / N^{\circ} \text{ bulbos iniciales}$

Índice de crecimiento: $(\text{Peso fresco final} - \text{peso fresco inicial}) / \text{Peso fresco inicial}$

Diferencia de peso $(\text{Peso final} - \text{peso inicial})$.

Para cada parámetro se verificó si la distribución de los datos se ajusta a una distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Luego se realizó la prueba de Levene's para corroborar la homocedasticidad o heterocedasticidad de las varianzas de los tratamientos. En caso de no ajustarse a una distribución normal (lo que sucedió en todos los parámetros estudiados) o resultar varianzas heterocedásticas se realizó el test de Kruskal Wallis, para luego realizar la comparación múltiple de promedios de Bonferroni.

4.1.1.3. Regeneración de microbulbillos de *R. bagnoldii* y *R. montana* en medio líquido adicionado con retardantes de crecimiento.

Se realizaron dos ensayos en forma independiente con microbulbillos de diferentes genotipos de *R. bagnoldii* y *R. montana*, cultivado en medio adicionado con 0.85, 1.7, 3.4 y 6.8 μM de Paclobutrazol (PBZ), además de un medio de Cultivo sin reguladores de crecimiento (Testigo 1) y de un medio de cultivo adicionado solo con 4.4 μM de MTP (Testigo 2).

Se aplicó un ANOVA y comparaciones múltiples de promedio mediante el test LSD (diferencia mínima significativa) al 5% de significancia, con excepción de la variable Tasa de propagación que se evaluó mediante el test de Kruskal Wallis, aplicando el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples de promedios.

En el caso del ensayo con *R. bagnoldii* para la evaluación estadística fueron eliminados algunos tratamientos debido a la pérdida de material por contaminación.

4.1.1.4. Efecto de distintos sistemas de cultivo *in vitro*.

Se comparó el efecto de distintos métodos para el Cultivo *in vitro* en *R. splendens*, *R. ananuca* y *R. montana*.

1. Cultivo en medio sólido.
2. Cultivo en medio líquido estacionario con base de algodón hidrófilo
3. Cultivo en medio líquido en agitación orbital.
4. Cultivo en sistema de inmersión temporal (SIT); utilizando 20 mL de medio de cultivo (SIT 20), 40 mL (SIT 40), y 60 mL (SIT 60), con una frecuencia de inmersión de 3 minutos cada 12 horas.

En todos los casos se utilizó medio MS suplementado con vitaminas, reguladores de crecimiento (0,54 μM de ANA y 4,4 μM de BAP), 30 g/L de sacarosa y en el medio solidificado con agar se agregaron 8 g/L.

La unidad experimental consistió en cinco microbulbillos dentro de cada unidad SIT. Para cada especie se instalaron nueve unidades SIT, y cada una constituyó una repetición aplicándose tres repeticiones por tratamiento.

En los tratamientos consistentes en la aplicación de sistemas de Cultivo líquido estacionario con soporte de disco de algodón, líquido en agitación orbital y en medio solidificada con agar, la unidad experimental con cinco microbulbillos fue depositada en contenedor de 1L, con 100 mL de medio de cultivo, existiendo tres repeticiones por tratamiento.

La evaluación de los resultados se realizó a través del recuento del número de brotes, peso fresco, peso fresco de bulbos (separados de hojas y raíces), presencia de pardeamiento (mediante el registro del número de plantas presentando regiones pardeadas) e hiperhidricidad (mediante el registro de plántulas anormales que mostraban tejidos traslúcidos).

Para determinar la cantidad de explantes a cultivar por cada unidad de inmersión temporal, se realizó un ensayo con *R. splendens*, genotipo N° 363. Para ello se colocaron 10, 20 y 30 microbulbillos con corte en la placa basal en frascos de 500 mL de volumen, con 200 mL de medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) adicionado con 2,2 µM de MTP, con una frecuencia de inmersión de 1 minuto/día.

La evaluación de este ensayo se realizó a través de 3 períodos

Debido a los resultados negativos del ensayo anterior, se estableció un nuevo ensayo con *R. montana* genotipo N° 613 y *R. splendens* genotipo N° 571, utilizando 3 repeticiones con 7 explantes por repetición. Estos explantes consisten en trozos de microbulbillos con placa basal en medio de cultivo MS adicionado con 2,2 µM de MTP y 0,85 µM de PBZ. Las condiciones de cultivo fueron con una frecuencia de inmersión de 1 minuto/día.

4.1.1.5. Aclimatación y crecimiento post transplante de material proveniente de condiciones *in vitro*.

Una vez finalizada la etapa de cultivo *in vitro* se realizó la aclimatación de los microbulbillos provenientes de medios de cultivo en diferentes estados (líquido y sólido). Este experimento se realizó para microbulbillos de *R. ananuca*, *R. splendens* y *R. montana* en forma separada.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento. Cada repetición consistió en cuatro microbulbillos plantados en bandejas plásticas con sustrato arena:turba, mantenidas en cámara de aclimatación. Se evaluó inicialmente el peso, diámetro, número, longitud de hojas y raíces y luego de un mes la sobrevivencia, capacidad de enraizamiento, número de hojas y la ganancia en materia fresca. Para determinar la cantidad de biomasa seca, se tomó una muestra aleatoria de cinco plántulas (sólo una muestra reducida para permitir la evaluación de la aclimatación del material vegetal restante). Luego de esta evaluación las bandejas fueron trasladadas a invernadero, donde permanecieron durante 6 y 11 semanas, dependiendo de la especie. Al finalizar esta etapa se realizó una segunda evaluación.

Luego las plantas fueron colocadas en botellas plásticas, con sustrato compuesto de dos partes de suelo y una parte de arena. Al cabo de 7 semanas de transcurrida esta etapa se realizó la última evaluación.

Se comparó lo sucedido en ambos grupos de estudio (provenientes de medio líquido y sólido) mediante una prueba de t-Student. En aquellos parámetros en donde los datos se distribuyeron normalmente y las varianzas de los dos grupos eran homogéneas. En caso contrario se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

Los datos individuales de las plantas fueron utilizados para estudiar la relación entre el peso alcanzado por la planta en función del peso inicial del bulbillito al momento del transplante ex

vitro, con el fin de determinar la importancia del peso inicial del bulbo en la etapa de aclimatación. Adicionalmente se obtuvieron ecuaciones estimadas del peso final alcanzado en función del peso inicial en ambos grupos, además de comparar la posibilidad de ajustar un modelo de predicción de aumento de peso entre los tratamientos para verificar que tan predecible es el crecimiento de los bulbillos provenientes de medios sólidos y líquidos.



Figura 1. Aclimatación en cámara de crecimiento y transferencia de plántulas a macetas de 1,5 L de capacidad.

4.1.1.6. Seguimiento a largo plazo de material originado desde cultivo *in vitro*.

Las plántulas que se han mantenido en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, se han evaluado en cuanto a su crecimiento, aumento de peso, calibre y floración a través del tiempo durante el transcurso del proyecto.

Debido a que las plantas han ido aumentando en tamaño ha sido necesario trasladar los microbulbillos originados de la propagación *in vitro* desde tubetes, a contenedores con mayor capacidad en profundidad (botellas de 1,5 L), realizándose mediciones de su crecimiento a partir de marzo del 2006. En marzo del 2007 se realizaron registros de floración y en abril del 2007, se descalzaron las plantas evaluadas la temporada anterior para realizar mediciones de crecimiento vegetativo, midiendo el diámetro y largo del bulbo, peso total de la planta, número de hojas y raíces.

Utilizando una forma de cultivo que simule las condiciones naturales en cuanto a la profundidad del sustrato, se cultivaron los bulbos en tubos de 50 cm de profundidad con suelo arenoso.

Finalmente, se realizó una división de la población de las plantas de *R. montana* en rangos, según el peso del bulbillo, registrándose el porcentaje de floración de las plantas en cada rango. El manejo de estas plantas ha sido el siguiente: riego: *ad libitum*, manual; fertilización en riego quincenal con fertilizantes solubles (nitrato de potasio y fosfato monoamónico 1g/L).

4.1.1.7. Aclimatación y crecimiento *ex vitro* del genotipo de *Rhodophiala splendens* N° 363.

El genotipo con mejor coeficiente de multiplicación *in vitro* fue el N° 363 de *R. splendens*, (con una tasa de multiplicación de 4), el cual fue evaluado durante el periodo de aclimatación en condiciones de invernadero. Para ello microbulbillos cultivados *in vitro* en medio líquido con base de algodón, sin raíces y brotes fueron medidos en cuanto a su peso y calibre al momento del trasplante. Los microbulbillos se plantaron en bandejas con sustrato turba:arena y fueron mantenidos durante un mes en invernadero con una temperatura promedio de 22°C.

4.1.1.8. Seguimiento y observación de genotipos poliploides inducidos *in vitro*

Las plantas clasificadas como poliploides se mantuvieron en invernadero en condiciones similares a las descritas para los ensayos de aclimatación. Al momento de la floración, estado que en el transcurso del proyecto fue alcanzado solo por una planta en la cual se midió el largo de los tépalos y el tamaño del polen. Ambas variables fueron comparadas con mediciones de plantas diploides que se encontraban en floración en ese momento. Las mediciones de tamaño de polen se realizaron extrayendo granos de polen fresco de flores abiertas, los cuales fueron montados en portaobjeto y fotografiados en microscopio Carl Zeiss Axiolab, con aumento 400X. El tamaño del grano de polen fue determinado a través del análisis de las fotografías con el software Image J, utilizando la fotografía de una reglilla micrométrica como referencia de lectura. Se midió largo, ancho y perímetro del grano de polen.

4.2 Descripción de la metodología utilizada en estudios citológicos y moleculares

Se trabajo con 6 especies chilenas de *Rhodophiala*. Estas especies fueron colectadas desde su ambiente natural por Patricio Peñailillo (Universidad de Talca), siendo un ejemplar de cada especie registrado en el herbario de la Universidad de Talca. *R. montana* (Phil.) Traub fue colectada en Laguna del Maule, VII región cordillera, *R. splendens* (Rengifo) Traub en Vilches Alto VII región cordillera, *R. bagnoldii* (Herb.) Traub en Huasco, III región costa, *R. ananuca* (Phil.) Traub en Aguada de Tongoy, III región costa, *R. rhodolirion* (Baker) Traub en Los Queñes, VII región Cordillera, *R. phycelloides* (Herb.) Hunz en Huasco, III región costa.

Para las especies mencionadas de *Rhodophiala*, a excepción de *R. phycelloides*, se realizaron preparaciones citológicas desde puntas de raíz según protocolo planteado por Grant *et al.*, (1984) y adaptado por Muñoz *et al* (2006) a *Rhodophiala*.

Se tomaron 5 células por especie, desde 2 a 4 plantas, para cada célula se contabilizó el n° cromosómico somático y cada cromosoma de estas células se midió el largo de brazo largo (BL) y largo de brazo corto (BC). Los cromosomas se agruparon en pares de acuerdo a similitud morfológica y se ordenaron de mayor a menor tamaño. Con estas mediciones se calculó el largo total del complemento, haploide, el índice centromérico: BL/BC, fórmula cariotípica básica (Levan *et al.*, 1964) y el índice de asimetría cariotípica (A) según la fórmula propuesta por Romero Zarco (1986): $A = 1 - [S_1^n (\text{brazo corto} / \text{brazo largo}/n)]$

Para las especies mencionadas, se realizó la amplificación del fragmento correspondiente a la región ITS1/5.8S/ITS2 en tres plantas por especie a través del siguiente protocolo:

La extracción de ADN se realizó a partir de 0.1 g de hojas jóvenes que fueron maceradas en 500 µL Buffer de extracción CTAB 2% (Tris 100 mM pH 8, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M, CTAB 2%) y 2 µL de Mercaptoetanol, incubándose por 30 minutos a 60°C; luego se adicionó 500 µL de Cloroformo:fenol:alcohol isoamílico (25:24:1) seguido de centrifugado (5 min a 10.000 rpm). Luego de la adición de 200 µL de isopropanol frío (-18°C) al sobrenadante se centrifugó nuevamente (10 min a 11.000 rpm) lavándose el pellet con etanol frío 70% y resuspendiéndose en ddH₂O.

La región ITS fue amplificada utilizando los cebadores ITS1-Plant -F, 5'-CGCGAGAAGTCCACTG-3' e ITS C26A-R 5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-3' (Varghese *et al.*, 2003). La reacción PCR para la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 µL, consistente de 35.2 µL de ddH₂O, 5 ddH₂O de 10X Taq polymerase Buffer (Fermentas), 1.25 µL de dNTPs (2 mM), 3 µL de MgCl₂ (25 Mm), 1 µL de cada cebador (10 pmol/µL), 0.8 µL de

Taq polymerase (5U/ μ L) (Fermentas). Las amplificaciones se realizaron aplicando los siguientes pasos: Denaturación inicial a 94°C por 3 minutos, para luego realizar 39 ciclos de 94°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto. Se finalizó con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los productos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5% mediante tinción con bromuro de etidio.

Los productos amplificados fueron secuenciados por un servidor externo, MacroGen Inc., Corea. Las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando el programa ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, con el cual se realizó la construcción de un filograma comparando las secuencias obtenidas con algunas reportadas por Meerow *et al.* (2000).

Principales problemas metodológicos enfrentados

En los experimentos de cultivo de tejidos el mayor problema consistió en la baja capacidad de regeneración de las especies, la lentitud de la respuesta de brotación y la susceptibilidad de los explantes a presentar problemas típicos del cultivo *in vitro* como el pardeamiento. En medios líquidos se apreciaron fuertes problemas relacionados con la hiperhidratación (vitricación), lo cual incidió fuertemente en la mortalidad de las plantas y en la escasa sobrevivencia de genotipos poliploides. También hizo poco eficiente la inducción de poliploidía y no permitió producir numerosos clones de los individuos seleccionados.

En los experimentos relacionados con los estudios moleculares, los problemas consistieron en la amplificación de productos inespecíficos por parte de los partidores inicialmente utilizados. Otro problema importante consistió en los escasos sitios polimórficos encontrados en las secuencias ITS de las especies, a excepción de *R. rhodolirion*. Esto no hizo posible la identificación de híbridos inter-específicos pero sí permitió la confirmación, a nivel molecular que *R. rhodolirion* es una especie distante del resto de las especies del género y probablemente corresponde a otro género.

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

La eficiencia de los protocolos de cultivo *in vitro* hasta ahora desarrollados (incluyendo el sistema de inmersión temporal), no permitió generar la cantidad de material vegetal que se esperaba obtener producto de micropropagación. Este serviría para realizar nuevos ensayos, y, dado que no se contó con la cantidad de tejido u órganos para ejecutar estos ensayos, se modificaron las actividades. Se determinó la eficiencia de protocolos de cultivo de tejidos en inmersión temporal, agitación y estacionarios en algunas especies de *Rhodophiala*, dependiendo de la disponibilidad de plántulas o microbulbillos que existía de cada especie.

La preparación y tramitación de solicitud de patente no se realizó debido a que los resultados obtenidos en cultivo *in vitro* sólo son aplicables a genotipos específicos. Pocos genotipos alcanzaron la floración por lo que no fueron evaluados con respecto a sus características florales, por el largo tiempo que transcurrió desde la aclimatación hasta la floración, además del desconocimiento que existe acerca de las condiciones ambientales que inducen la floración en estas especies. Tampoco se podía asegurar que habría un interés comercial por dichos genotipos como potenciales variedades ornamentales. Por ello, el patentamiento de un protocolo específico de propagación sería apresurado y arriesgado al no poder extrapolarse a un sistema

de propagación masivo, dada las naturales diferencias genotípicas que existen en la capacidad de regeneración dentro y entre las especies y que han hecho que la habilidad de micropropagación de ellas continúe siendo muy variable. Por tanto, se solicitó a FIA descontar en el aporte correspondiente los fondos destinados para este ítem (\$3.000.000.-).

5. RESULTADOS

5.1. Cauterización de la zona apical de microbulbillos de diferentes genotipos de *R. bagnoldii*.

En base a los análisis estadísticos realizados se puede observar que provocar una cauterización apical en la planta no tiene un efecto significativo en la regeneración de nuevos microbulbillos, ni en ninguno de los otros parámetros analizados.

Cuadro 1. Cauterización apical de *R. bagnoldii*

Tratamiento	Tasa de propagación*	Peso de planta	Peso de bulbo	IC bulbo	Diámetro	Largo de brotes
Medio Testigo-Sin cauterización	1.10	2.53	1.25	0.70	0.77	5.06
Medio testigo- Con cauterización	1.08	4.01	2.16	0.72	1.17	5.31
Medio 1-Sin cauterización	1.00	4.38	1.43	0.68	1.02	8.97
Medio 1-Con cauterización	1.00	3.92	1.51	0.61	1.25	13.79
Signif. 5%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

*N° bulbos finales/explante

5.2. Capacidad de regeneración de genotipos de *Rhodophiala splendens* en medio líquido adicionado con inductores de brotación y retardantes de crecimiento.

En este ensayo, donde se analizaron diferentes genotipos, para todos los parámetros analizados, ninguno de los tratamientos arrojó diferencias significativas. Se entrega la tabla para cada parámetro con el promedio general del ensayo. Los doce tratamientos se aplicaron en 6 repeticiones, por lo que promedio indicado se refiere a las 72 unidades experimentales medidas. La unidad experimental estuvo constituida por un bulbo dentro de un contenedor con medio MS.

Cuadro 3. Resultado en peso de planta, peso de bulbo y número de brotes por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens*

Tratamiento	Peso de planta	Peso de bulbo	N° brotes
0 – 0	2.88 +/- 1.84	1.48 +/- 0.56	2.50 +/- 3.67
2.2 µM MTP – 0	1.93 +/- 1.05	0.73 +/- 0.31	2.00 +/- 2.45
4.4 µM MTP - 0	1.87 +/- 1.19	0.60 +/- 0.19	1.00 +/- 0.00
11.1 µM MTP – 0	2.38 +/- 1.58	0.83 +/- 0.55	1.00 +/- 0.00
22.2 µM MTP – 0	1.82 +/- 0.59	0.97 +/- 0.77	1.00 +/- 0.00
1.7 µM PBZ – 0	3.02 +/- 1.06	0.82 +/- 0.41	1.00 +/- 0.00
3.4 µM PBZ – 0	2.62 +/- 1.90	1.22 +/- 0.72	1.33 +/- 0.82
8.5 µM PBZ – 0	2.60 +/- 1.40	1.37 +/- 0.60	1.33 +/- 0.52
17 µM PBZ – 0	3.20 +/-1.70	1.05 +/- 0.53	1.00 +/- 0.00
2.2 µM MTP-1.7 µM PBZ	2.02 +/- 1.45	1.13 +/- 1.28	1.67 +/- 1.21
4.4 µM MTP-3.4 µM PBZ	2.05 +/- 1.39	0.90 +/- 0.37	1.17 +/- 0.41
22.2 µM MTP-17 µM PBZ	1.57 +/- 0.92	1.08 +/- 0.51	1.00 +/- 0.00
Promedio general	2.33 +/- 1.38	1.02 +/- 0.63	1.33 +/- 1.33
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.	N.S.

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

Cuadro 4. Resultado en largo de brotes, diámetro de bulbo, hiperhidricidad y contaminación por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens*

Tratamiento	Largo de brotes	Diámetro de bulbo	Hiperhidricidad	Contaminación
0 – 0	5.67 +/- 5.82	0.90 +/- 0.62	33.33%	33.33%
2.2 µM MTP – 0	9.50 +/- 6.44	0.55 +/- 0.23	16.67%	0.00%
4.4 µM MTP - 0	10.00 +/- 7.46	0.50 +/- 0.14	16.67%	33.33%
11.1 µM MTP – 0	13.83 +/- 7.88	0.57 +/- 0.16	16.67%	66.67%
22.2 µM MTP – 0	12.50 +/- 6.89	3.42 +/- 7.14	16.67%	0.00%
1.7 µM PBZ – 0	11.25 +/- 9.05	0.83 +/- 0.39	33.33%	0.00%
3.4 µM PBZ – 0	5.33 +/- 7.53	0.57 +/- 0.32	50.00%	33.33%
8.5 µM PBZ – 0	2.33 +/- 2.07	0.88 +/- 0.32	33.33%	0.00%
17 µM PBZ – 0	4.08 +/- 3.69	1.15 +/- 0.78	0.00%	50.00%
2.2 µM MTP-1.7 µM PBZ	6.83 +/- 8.52	0.50 +/- 0.22	50.00%	100.00%
4.4 µM MTP-3.4 µM PBZ	5.17 +/- 6.34	0.57 +/- 0.46	0.00%	66.67%
22.2 µM MTP-17 µM PBZ	3.50 +/- 4.81	0.52 +/- 0.19	83.33%	66.67%
Promedio general	7.50 +/- 7.13	0.91 +/- 2.08	29.17%	37.50%
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.		

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

Cuadro 5. Resultado en índice de crecimiento, diferencia de peso e índice de multiplicación por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens*

Tratamiento	Índice de crecimiento	Diferencia de peso	Índice de multiplicación
0 – 0	11.50 +/- 15.77	2.55 +/- 1.90	0.67 +/- 1.63
2.2 µM MTP – 0	2.34 +/- 1.10	1.27 +/- 0.65	1.00 +/- 2.45
4.4 µM MTP - 0	2.92 +/- 3.52	1.18 +/- 1.30	0.00 +/- 0.00
11.1 µM MTP – 0	3.22 +/- 2.21	1.77 +/- 1.29	0.00 +/- 0.00
22.2 µM MTP – 0	3.96 +/- 2.75	1.25 +/- 0.68	-0.08 +/- 0.20
1.7 µM PBZ – 0	8.90 +/- 10.48	2.37 +/- 1.20	0.00 +/- 0.00
3.4 µM PBZ – 0	6.00 +/- 7.84	2.04 +/- 2.08	0.33 +/- 0.82
8.5 µM PBZ – 0	6.31 +/- 5.46	2.14 +/- 1.29	0.00 +/- 0.00
17 µM PBZ – 0	3.05 +/- 1.64	2.35 +/- 1.26	0.00 +/- 0.00
2.2 µM MTP- 1.7 µM PBZ	1.48 +/- 1.58	1.10 +/- 0.93	0.67 +/- 1.21
4.4 µM MTP-3.4 µM PBZ	4.48 +/- 6.92	1.50 +/- 1.32	0.17 +/- 0.41
22.2 µM MTP-17 µM PBZ	3.60 +/- 2.64	1.22 +/- 0.91	0.00 +/- 0.00
Promedio general	4.81 +/- 6.76	1.73 +/- 1.30	0.23 +/- 0.95
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.	N.S.

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

Para los parámetros: Índice de multiplicación, índice de crecimiento, peso de bulbo y largo de brotes no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a 72 clones del genotipo 363. Se presentan los resultados promedio de todas las unidades del ensayo, para estos parámetros. La unidad experimental estuvo constituida por 1 g de inóculo de bulbillos de *R. splendens*

Cuadro 6. Resultado en peso de planta, peso de bulbo y número de brotes por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens* genotipo 363

Tratamiento	Peso de planta	Peso de bulbo	N° de brotes
0 – 0	3.71 +/- 1.37	2.78 +/- 1.49	1.67 +/- 0.82 b
2.2 µM MTP – 0	4.75 +/- 2.28	1.73 +/- 0.88	9.17 +/- 4.07 a
4.4 µM MTP - 0	3.35 +/- 1.31	1.62 +/- 0.94	2.67 +/- 1.86 b
11.1 µM MTP – 0	4.08 +/- 1.37	1.57 +/- 0.54	5.50 +/- 4.93 ab
22.2 µM MTP – 0	3.42 +/- 0.81	1.62 +/- 1.35	3.50 +/- 2.07 b
1.7 µM PBZ – 0	3.67 +/- 1.33	1.03 +/- 0.55	3.50 +/- 1.76 b
3.4 µM PBZ – 0	3.40 +/- 1.20	2.07 +/- 1.14	2.50 +/- 3.21 b
8.5 µM PBZ – 0	2.11 +/- 1.02	1.58 +/- 0.44	2.17 +/- 1.60 b
17 µM PBZ – 0	2.48 +/- 0.77	1.03 +/- 0.63	3.17 +/- 2.64 b
2.2 µM MTP + µM 1.7 PBZ	2.60 +/- 1.11	0.96 +/- 0.93	3.00 +/- 1.79 b
4.4 µM MTP + 3.4 µM PBZ	4.30 +/- 0.95	2.22 +/- 1.60	2.50 +/- 1.87 b
22.2 µM MTP + 17 µM PBZ	3.42 +/- 1.30	0.97 +/- 0.87	3.67 +/- 3.08 b
Promedio general	3.44 +/- 1.40	1.60 +/- 1.08	3.58 +/- 3.16 b
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.	*

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

Se detectaron diferencias significativas en cuanto al N° de brotes obtenidos desde 1g de microbulbillos de inóculo

Cuadro 7. Resultado en largo de brotes, diámetro de bulbo, hiperhidricidad y contaminación por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens* genotipo 363.

Tratamiento	Largo de brotes	Diámetro de bulbo	Hiperhidricidad	Contaminación
0 – 0	2.33 +/- 2.73	0.45 +/- 0.37	33.33%	16.67%
2.2 µM MTP – 0	10.67 +/- 1.63	0.28 +/- 0.10	0.00%	0.00%
4.4 µM MTP - 0	8.33 +/- 8.02	0.80 +/- 0.47	16.67%	50.00%
11.1 µM MTP – 0	10.00 +/- 7.46	0.47 +/- 0.24	16.67%	16.67%
22.2 µM MTP – 0	7.67 +/- 8.04	0.57 +/- 0.71	33.33%	33.33%
1.7 µM PBZ – 0	4.17 +/- 5.46	0.42 +/- 0.31	66.67%	66.67%
3.4 µM PBZ – 0	1.50 +/- 3.21	0.87 +/- 0.61	83.33%	50.00%
8.5 µM PBZ – 0	0.83 +/- 2.04	0.47 +/- 0.27	100.00%	83.33%
17 µM PBZ – 0	2.83 +/- 2.40	0.43 +/- 0.38	16.67%	83.33%
2.2 µM MTP + µM 1.7 PBZ	4.50 +/- 3.89	0.43 +/- 0.23	66.67%	83.33%
4.4 µM MTP + 3.4 µM PBZ	3.67 +/- 4.32	0.53 +/- 0.28	50.00%	100.00%
22.2 µM MTP + 17 µM PBZ	3.50 +/- 1.97	0.22 +/- 0.10	83.33%	50.00%
Promedio general	5.00 +/- 5.49	0.49 +/- 0.39	47.22%	52.78%
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.		

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

Cuadro 8. Resultado en índice de crecimiento, diferencia de peso e índice de multiplicación por tratamiento y promedio del ensayo, separado según parámetro estudiado, en microbulbillos de *R. splendens* genotipo 363.

Tratamiento	Índice de crecimiento	Diferencia de peso	Índice de multiplicación
0 – 0	2.33 +/- 1.47	2.57 +/-1.44	0.17 +/- 0.52
2.2 µM MTP – 0	3.56 +/- 2.26	3.70 +/-2.29	3.83 +/- 3.49
4.4 µM MTP - 0	1.96 +/- 1.39	2.17 +/-1.40	0.94 +/- 1.56
11.1 µM MTP – 0	2.62 +/- 1.11	2.95 +/-1.28	2.25 +/- 2.32
22.2 µM MTP – 0	1.82 +/- 0.89	2.14 +/-0.84	1.67 +/- 2.25
1.7 µM PBZ – 0	2.35 +/- 1.50	2.51 +/-1.51	1.50 +/- 1.48
3.4 µM PBZ – 0	1.99 +/- 1.30	2.21 +/-1.32	0.75 +/- 1.41
8.5 µM PBZ – 0	0.83 +/- 0.96	0.94 +/-1.05	-0.13 +/- 0.32
17 µM PBZ – 0	1.01 +/- 0.65	1.22 +/-0.71	1.67 +/- 2.25
2.2 µM MTP + µM 1.7 PBZ	1.15 +/- 0.85	1.37 +/-1.08	1.58 +/- 2.01
4.4 µM MTP + 3.4 µM PBZ	2.59 +/- 1.18	3.04 +/-1.13	0.67 +/- 1.03
22.2 µM MTP + 17 µM PBZ	1.69 +/- 0.87	2.16 +/-1.21	1.03 +/- 1.78
Promedio general	1.99 +/- 1.39	2.25 +/-1.44	1.33 +/- 2.01
Bonferroni 5%	N.S.	N.S.	N.S.

Datos se refieren a promedio +/- desviación estándar

El tratamiento que consistió en agregar 2.2 µM de Metatopolina produjo la mayor cantidad de brotes desde 1g de inóculo de microbulbillos. Llama la atención la alta hiperhidricidad producida por los tratamientos en donde se agregó Paclobutrazol.

Comparando lo sucedido entre la muestra estudiada en el ensayo 1 (mezcla de diversos genotipos) y el genotipo 363 del segundo ensayo, se constató que existen diferencias significativas entre ambos grupos, en cuanto a su capacidad de multiplicación.

Cuadro 9. Resumen comparativo entre la mezcla de genotipos y el genotipo 363.

Genotipos	Indice de multiplicación	Indice de crecimiento	Hiperhidricidad (%)
S 363	1.32 +/- 2.00 a	1.99 +/- 1.38 b	47.22
Mezcla diversa	0.22 +/- 0.94 b	4.81 +/- 6.75 a	29.17

Letras distintas indican diferencias significativas (Mann-Whitney, 5%).

Este resultado corresponde a uno de los más significativos del proyecto, encontrándose un genotipo de mayor capacidad de multiplicación que la población promedio, lo que constituye mejoramiento. Como se verá en resultados de experimentos presentados más adelante, este genotipo posee una buena capacidad de sobrevivencia a condiciones *ex vitro*.



Figura 2. Genotipo 363, medio de cultivo con 2.2 μ M MTP



Figura 3. Mezcla de genotipos, medio de cultivo sin reguladores de crecimiento

Por otra parte, el genotipo 363 posee un índice de crecimiento inferior al grupo constituido por genotipos diferentes.

5.3. Regeneración de microbulbillos de *R. bagnoldii* y *R. montana* en medio líquido adicionado con retardantes de crecimiento.

Se realizaron dos ensayos en forma independiente con microbulbillos de diferentes genotipos de *R. bagnoldii* y *R. montana*, cultivado en medio adicionado con 0.85, 1.7, 3.4 y 6.8 μ M de Paclobutrazol (PBZ), además de un medio de Cultivo sin reguladores de crecimiento (Testigo 1) y de un medio de Cultivo adicionado solo con 4.4 μ M de MTP (Testigo 2).

Se aplicó un ANOVA y comparaciones múltiples de promedio mediante el test LSD (diferencia mínima significativa) al 5% de significancia, con excepción de la variable Tasa de propagación que se evaluó mediante el test de Kruskal Wallis, aplicando el Test de Bonferroni para comparaciones múltiples de promedios.

En el caso del ensayo con *R. bagnoldii* para la evaluación estadística fueron eliminados algunos tratamientos debido a la pérdida de material por contaminación.

Cuadro 10. Comportamiento de *R. bagnoldii* y *R. montana* en medio de Cultivo adicionado con retardantes de crecimiento.

Tratamientos	Tasa Propagación *	Peso planta (g)	Peso bulbo (g)	IC bulbo	Diámetro bulbo (cm)	Longitud brote (cm)
<i>R. bagnoldii</i>						
Testigo 1	2.28	4.62	2.71 a	1.35 a	0.37 cb	6.57 ab
Testigo 2	0.57	3.38	0.85 b	-0.27 b	0.31 c	4.00 b
0.85 µM PBZ	2.14	6.20	2.30 a	0.79 ab	0.65 ba	10.16 a
6.8 µM PBZ	1.00	6.02	3.01 a	1.69 a	1.05 a	5.71 b
Signif. 5%	N.S.	N.S.	*	*	*	*
<i>R. montana</i>						
Testigo 1	1.00	2.83	1.43	2.06	0.71	9.83
Testigo 2	1.16	2.84	1.63	2.33	0.88	10.66
0.85 µM PBZ	1.33	2.06	0.84	1.58	0.53	10.33
1.7 µM PBZ	1.50	2.50	0.81	1.90	0.73	9.66
3.4 µM PBZ	1.50	2.49	0.85	2.05	0.55	8.00
6.8 µM PBZ	1.00	4.11	2.54	3.25	1.43	3.83
Signif. 5%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

*Nº bulbos finales/explante

De acuerdo con los resultados presentados anteriormente se puede observar que el retardante de crecimiento paclobutrazol afecta la longitud del brote en forma significativa en el caso de *R. bagnoldii* y en el caso de *R. montana* se obtuvieron brotes de menor tamaño pero sin diferencias significativas entre los tratamientos. La disminución del crecimiento del brote mas que favorecer la formación de nuevos microbulbillos favorece el peso y tamaño de los microbulbillos, con lo cual puede plantearse como una buena forma para engordar microbulbillos *in vitro*.

En general, se puede concluir que la capacidad de renegeración de *Rhodophiala sp.* se encuentra influenciada por el genotipo mas que por las condiciones nutricionales a la que son sometidas. Sin embargo, los ensayos realizados han permitido concluir que las mejores condiciones para promover la multiplicación de los microbulbillos son en un medio sin reguladores de crecimiento o adicionados con 2,2 µM de Meta-topolina, pero con tasas de multiplicación aún poco eficientes para este tipo de cultivo.

5.4 Resultados cultivo en Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Objetivo: Determinar cantidad de explantes. Este ensayo se realizó con *R. splendens* genotipo N° 363. La evaluación de este ensayo se realizó a través de 3 períodos, obteniéndose los resultados que se indican en la tabla.

Cuadro 11. N° total de microbulbillos cosechados por unidad SIT desde distintas densidades de inóculo (N° de bulbos iniciales) a través del tiempo (días en cultivo SIT)

N° Bulbos Iniciales			
Días en Cultivo SIT	10	20	30
50	10	20	31
124	12	25	30
184	11	20	17

Cuadro 12. N° de bulbos recuperados por cada bulbo sembrado por unidad SIT a distintas densidades de inóculo (N° de bulbos iniciales) a través del tiempo (días en cultivo SIT)

N° de bulbos iniciales			
Días en Cultivo SIT	10	20	30
50	1.0	1.0	1.0
124	1.2	1.3	1.0
184	1.1	1.0	0.6

Se aprecia que utilizando este sistema de inmersión temporal no se logró incrementar el número de bulbillos por cada de bulbillo sembrado, cosechándose prácticamente la misma cantidad de bulbillos sembrados inicialmente al final de 184 días de evaluación. Incluso, a una densidad de inóculo alta (30 bulbillos por frasco) se perdió material, recuperándose al final del período del experimento un 60% del material sembrado original, por lo que este sistema no fue efectivo en producir micropropagación. Utilizar más allá de 20 bulbillos por unidad frasco es aún más perjudicial, probablemente por un exceso de humedad relativa y problemas de contaminación.

Debido a que los resultados del ensayo anterior hicieron vislumbrar una situación poco favorable para el cultivo de *Rhodophiala* bajo el sistema de inmersión temporal, se estableció un ensayo en donde se comparan los diferentes sistemas de cultivo utilizados hasta el momento en tres especies de *Rhodophiala* de acuerdo a la disponibilidad del material vegetal.

5.5 Efecto de distintos sistemas de cultivo *in vitro*. Se comparó el efecto de distintos métodos para el cultivo *in vitro* en *R. splendens*, *R. ananuca* y *R. montana*.

Cuadro 13. Comparación de diferentes sistemas de cultivo en tres especies de *Rhodophiala*

Sistema	Número de brotes	Índice de crecimiento	Índice de crecimiento de bulbo	% Hiperhidricidad
<i>R. splendens</i>				
SIT 20	6.3 ± 1.5	1.1 ± 0.4	0.6 ± 0.2	4.2 ± 7.2 a
SIT 40	5.3 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	24.4 ± 21.4 ab
SIT 60	6.0 ± 1.0	1.1 ± 0.8	0.8 ± 0.6	37.9 ± 20.3 ab
Líquido algodón	5.0 ± 0.6	1.4 ± 0.8	0.9 ± 0.5	63.3 ± 15.3 b
Líquido agitación	5.3 ± 0.6	1.7 ± 2.2	1.4 ± 2.5	62.2 ± 3.9 b
Gelificado	5.0 ± 0.0	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.04	6.7 ± 11.5 a
Signif. 5%	N.S.	N.S.	N.S.	*
<i>R. montana</i>				
SIT 20	5.3 ± 0.6	0.3 ± 0.4	0.2 ± 0.3	17.8 ± 16.8
SIT 40	5.3 ± 0.6	0.8 ± 0.4	0.6 ± 0.3	16.7 ± 28.9
SIT 60	6.3 ± 1.5	0.7 ± 0.6	0.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0
Líquido algodón	5.0 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	13.3 ± 11.5
Gelificado	6.0 ± 1.0	0.1 ± 0.3	-0.1 ± 0.2	18.1 ± 20.3
Signif. 5%	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>R. ananuca</i>				
SIT 20	9.3 ± 2.1 a	1.9 ± 1.4	1.1 ± 1.0	12.1 ± 21.0 a
SIT 40	5.7 ± 1.2 a b	1.0 ± 0.9	0.8 ± 0.8	24.8 ± 13.5 a
SIT 60	6.7 ± 0.6 a b	1.5 ± 0.5	1.0 ± 0.7	19.0 ± 21.8 a
Líquido algodón	8.0 ± 2.0 a b	2.6 ± 2.4	0.9 ± 0.9	7.5 ± 6.6 a
Líquido agitación	5.0 ± 0.0 b	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.5	93.3 ± 11.5 b
Gelificado	8.0 ± 1.7 a b	0.6 ± 0.3	0.2 ± 0.1	3.7 ± 6.4 a
Signif. 5%	*	N.S.	N.S.	*

SIT = Sistema de inmersión temporal

El único parámetro que entregó resultados significativos fue el porcentaje de hiperhidricidad, que es un problema fisiológico que provoca la acumulación interna de agua en los bulbos, el cual dependiendo de su magnitud provoca que este material no regenere brotes y no sea apto para subcultivos posteriores.

De acuerdo a los resultados observados en el Cuadro 1, el uso del sistema de inmersión temporal permitió reducir los niveles de hiperhidricidad frente a los otros sistemas en medio líquido, especialmente en el tratamiento con menor cantidad de medio de cultivo por explante (20 mL/explante). En *R. ananuca*, el cultivo en medio líquido en agitación incrementó el porcentaje de explantes hiperhidratados y produjo menor número de brotes que el tratamiento con 20 mL/explante.

En cuanto a la regeneración, no existieron diferencias significativas en el número de brotes e índice de crecimiento en ninguno de los tratamientos utilizados. Para *R. montana* no se detectaron diferencias entre los distintos sistemas de cultivo. En esta especie no se aplicó el tratamiento en agitación orbital.

Se puede concluir que en general la respuesta de las tres especies fue muy variable, pero es uniforme en cuanto al sistema de cultivo utilizado, ya que se obtuvieron resultados similares de regeneración, sin poder determinarse que el Sistema de Inmersión Temporal sea más eficiente. Debido a la poca habilidad de regeneración de *Rhodophiala* en los sistemas tradicionales de cultivo (en medios sólidos), es poco probable que mejore su multiplicación en el cultivo con inmersión temporal, encontrándose esta respuesta influenciada mas por el genotipo que por las condiciones nutritivas y de cultivo utilizadas

5.6 Aclimatación y crecimiento post transplante de material proveniente de condiciones *in vitro*.

Cuadro 14. Porcentaje de sobrevivencia, peso e índice de crecimiento después de tres etapas de aclimatación.

Medio de origen y especies	% de Sobrevivencia	Peso de sobrevivientes (g)	Índice de crecimiento
<i>R. montana</i>			
Sólido	87.2	1.38 ± 1.03	1.86 ± 1.53
Líquido	68.8	1.95 ± 1.24	1.24 ± 1.43
5% signif.		N.S.	N.S.
<i>R. splendens</i>			
Sólido	93.8	1.51 ± 1.13	2.43 ± 2.09
Líquido	37.5	2.35 ± 1.61	1.18 ± 1.05
5% signif.		N.S.	N.S.
<i>R. ananuca</i>			
Sólido	93.8	1.97 ± 0.64	2.25 ± 1.19 a
Líquido	37.5	1.69 ± 0.70	0.67 ± 0.54 b
5% signif.		N.S.	*

El cuadro 2 muestra que el mayor porcentaje de sobrevivencia se obtiene en plantas que fueron cultivadas en medio sólido.

Cuadro15. Parámetros evaluados en *Rhodophiala* sp. después de tres etapas de aclimatación.

Medio de origen y especies	Diámetro (mm)	Nº de hojas	Longitud de la hoja mayor (cm)	Nº de raíces	Longitud de la raíz más larga (cm)
<i>R. montana</i>					
Sólido	6.35 ± 2.94	1.85 ± 0.86	12.8 ± 5.65	3.35 ± 2.84	19.7 ± 11.7
Líquido	7.90 ± 2.51	2.18 ± 1.99	12.1 ± 7.51	7.45 ± 6.99	23.6 ± 14.9
5% signif.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>R. splendens</i>					
Sólido	6.34 ± 2.0 a	1.53 ± 0.74	17.8 ± 5.21	7.93 ± 9.45	18.5 ± 7.94
Líquido	8.38 ± 1.6 b	1.83 ± 0.75	13.9 ± 8.05	9.16 ± 11.3	19.8 ± 10.6
5% signif.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
<i>R. ananuca</i>					
Sólido	8.23 ± 1.11	1.73 ± 0.79	20.7 ± 4.18	1.66 ± 0.81	25.3 ± 7.43
Líquido	7.90 ± 0.82	1.83 ± 0.75	19.2 ± 4.09	1.93 ± 0.88	21.4 ± 7.42
5% signif.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Después de tres estados de aclimatación, la sobrevivencia de las plantas provenientes de medio sólido fue mayor que la proveniente de medio líquido, sin embargo, al cabo de algunos meses de aclimatación, el crecimiento de las plantas provenientes de ambos medios de cultivo (sólido y líquido) en *R. montana* y *R. splendens* se compensó. En *R. ananuca*, las plantas provenientes de medio sólido tuvieron un índice de crecimiento mayor.

5.7 Seguimiento a largo plazo de material cultivado *in vitro*: las plántulas que se han mantenido en el invernadero del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, se han evaluado en cuanto a su crecimiento, aumento de peso, calibre y floración a través del tiempo durante el transcurso del proyecto.

Para la población de *R. montana* mantenida en invernadero se han obtenido los siguientes resultados:

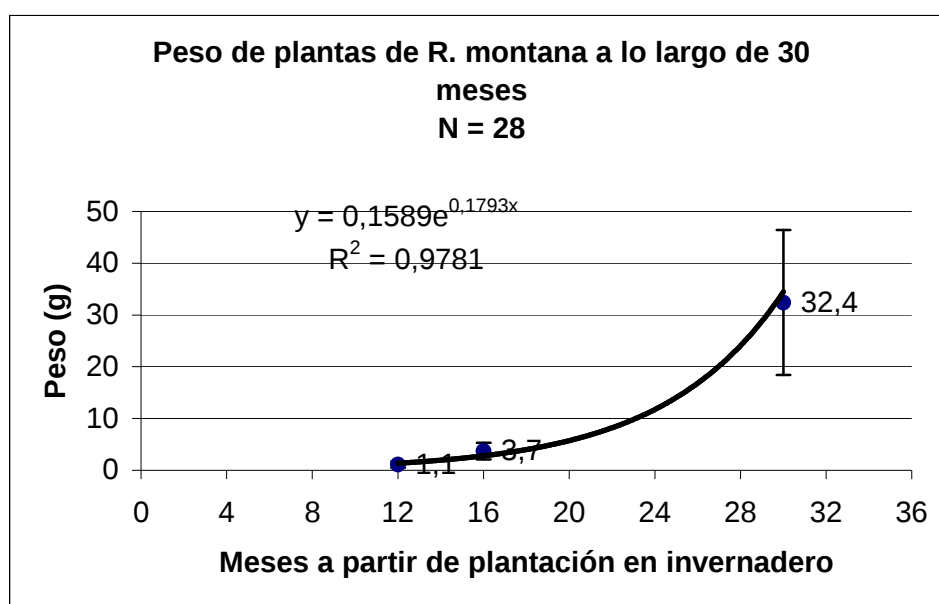
Cuadro 16. Evaluación de población de *R. montana* y porcentaje de floración a marzo de 2007 en cada cuartil.

Cuartil*	Peso cuartil (g)	Diam. Cuartil (mm)	Calibre (cm)	IC	% Floración
1	17.3	19.0	6.0	4.5	0
2	24.8	22.3	7.0	7.4	0
3	38.5	24.0	7.6	12.1	0
4	50.7	29.4	9.2	10.5	42.8
Cuartil	Largo hoja (cm)	Ancho hoja (mm)	N° hojas	N° raíces	Largo raíces (cm)
1	39.5	5.4	3.3	5.9	39.2
2	41.9	5.9	4.4	8.1	34.8
3	51.3	6.9	5.9	11.3	39.1
4	50.3	7.9	7.7	12.4	39.7

• población de 28 plantas

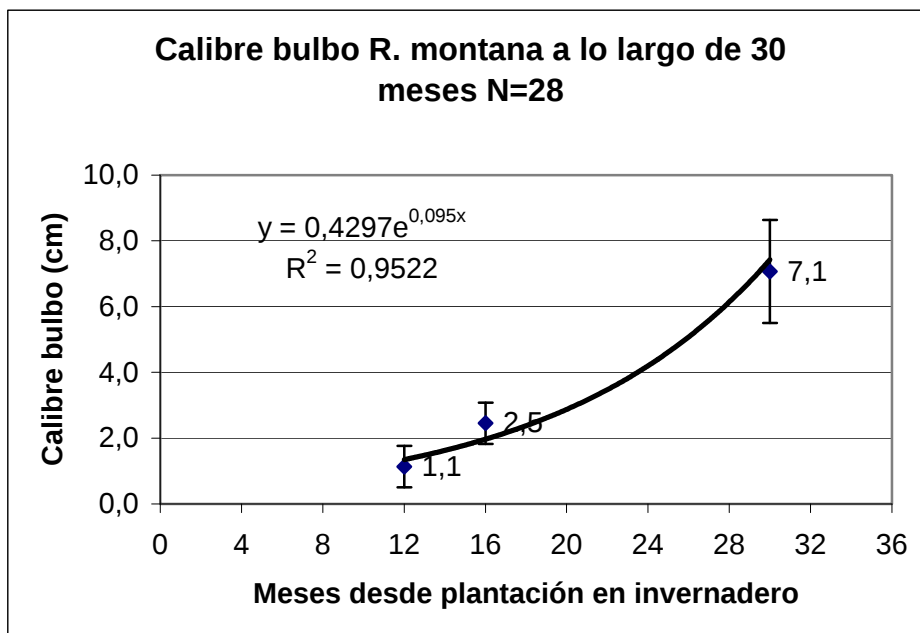
Se aprecia que las plantas que lograron florecer corresponden al cuartil N° 4, o sea al grupo constituido por el 25% de las plantas de mayor peso. Existe una clara relación entre la biomasa alcanzada y la capacidad de florecer. En las plantas pertenecientes a cuartiles inferiores no ocurrió floración.

Las gráficas que se muestran a continuación corresponden a la evolución del peso durante los 30 meses post trasplante a invernadero. Las mediciones realizadas en las plantas individuales fueron promediadas representando cada punto en la curva una fecha distinta en que se realizó la medición, midiéndose el mismo grupo de plantas en diferentes fechas a los largo de 30 meses. Se ajustó una curva de aumento de peso en el tiempo a través de una regresión.



Se incluye ecuación de regresión. Líneas verticales indican desviación estándar

Figura 4. Incremento en peso de los bulbos en *R. montana*, durante 30 meses de cultivo en invernadero.



Se incluye ecuación de regresión. Líneas verticales indican desviación estándar

Figura 5. Aumento de calibre de los bulbos en *R. montana* en invernadero.

A continuación se muestra un gráfico que señala la diferencia en el peso alcanzado a través del tiempo entre las plantas que lograron la floración y las que no alcanzaron dicho estado.

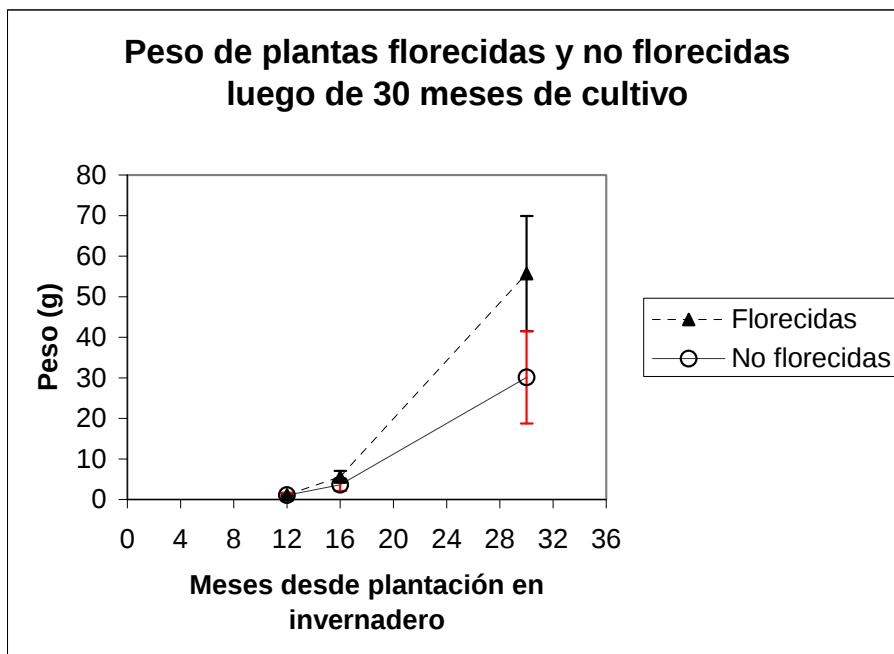


Figura 6. Aumento de peso de las plantas de *R. montana* en invernadero.

Con respecto a las características de las flores observadas, estas fueron las siguientes:

Característica	Promedio $\pm$ D.E
Floración	7.5
Días en flor	14.0 $\pm$ 1.7
N° de varas florales	1.0 $\pm$ 0.0
N° de flores x vara	2.7 $\pm$ 0.6
Largo vara floral	45.0 $\pm$ 2.6
Diámetro de la flor	3.8 $\pm$ 0.6
Largo tépalos	3.5 $\pm$ 0.5
Ancho tépalos	0.8 $\pm$ 0.1
Color tépalos	Amarillo
N° de tépalos	6.0 $\pm$ 0.0
N° estambres	6.0 $\pm$ 0.0
N° hojas presentes	4.5 $\pm$ 0.7
Largo hojas	36.0 $\pm$ 7.1
Ancho hojas	0.6 $\pm$ 0.1
Formación de frutos	0.0 $\pm$ 0.0

n=3



Figura 7. Plántulas mantenidas en contenedores de mayor capacidad.

Como lo señalan estudios previos realizados por el grupo de la Universidad de Talca, las plantas de *Rhodophiala* no presentan receso, sino que solamente disminuyen su desarrollo en cuanto al número de hojas y probablemente restringiendo el crecimiento durante los meses de abril a septiembre (observación visual).

Otra población observada fueron 100 plantas mantenidas en macetas de 1,5 L (macetas consistentes en botellas plásticas modificadas). Estas plantas, provenientes del cultivo *in vitro*, fueron ingresadas al invernadero en noviembre de 2004, colocadas en tubotes y luego trasladadas a botellas plásticas de 1,5 L. La floración de estas plantas se registró desde noviembre 2006 a Marzo de 2007.

La siguiente tabla muestra las características de la floración de las distintas plantas:

Característica	Promedio $\pm$ D.E
Edad cronológica	2.0 años
Fecha floración	
Días en flor	11.3 $\pm$ 2.1
N° de varas florales	1.0 $\pm$ 0.0
N° de flores x vara	2.8 $\pm$ 0.6
Largo vara floral	38.9 $\pm$ 5.7
Diámetro de la flor	4.0 $\pm$ 0.3
Largo tépalos	3.7 $\pm$ 0.4
Ancho tépalos	0.9 $\pm$ 0.1
Largo estambres	1.5 $\pm$ 0.0
Largo pistilo	2.5 $\pm$ 0.0
Color tépalos	Amarillo
N° de tépalos	6.0 $\pm$ 0.0
N° estambres	6.0 $\pm$ 0.0
N° hojas presentes	3.9 $\pm$ 1.7
Largo hojas presentes	27.2 $\pm$ 3.8
Ancho hojas presentes	0.5 $\pm$ 0.1
Formación de fruto	0.0 $\pm$ 0.0

n=9



Figura 8. *Rhodophiala montana* en floración en invernadero del Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales (UACH).

Cómo observación cabe señalar que un genotipo floreció dos veces en la temporada, en los meses de enero y marzo 2007.

5.8 Aclimatación y crecimiento *ex vitro* del genotipo de *Rhodophiala splendens* N° 363.

El genotipo con mejor coeficiente de multiplicación *in vitro* fue el N° 363 de *R. splendens*, (con una tasa de multiplicación de 4), el cual fue evaluado durante el periodo de aclimatación en condiciones de invernadero. Para ello microbulbillos cultivado *in vitro* en medio líquido con base de algodón, sin raíces y brotes fueron medidos en cuanto a su peso y calibre al momento del

trasplante. Los microbulbillos se plantaron en bandejas con sustrato turba:arena y fueron mantenidos durante un mes en invernadero con una temperatura promedio de 22°C.

Cuadro 17. Parámetros evaluados durante la aclimatación del genotipo de *R. splendens* N° 363

Parámetros evaluados	Promedio ± D.E.
Sobrevivencia	0.77
Peso (g)	0.06 ± 0.04
Diámetro (cm)	2.54 ±0.73
Largo hoja (cm)	2.13 ±1.89
Largo raíz (cm)	1.17 ±1.20
Índice de crecimiento /mes	-0.32 ± 0.53
Aumento largo hojas (cm)	1.40 ±1.86

Este genotipo presentó un 77% de sobrevivencia bajo estas condiciones, con desarrollo de nuevas hojas y raíces y un índice de crecimiento (peso final –peso inicial)/peso inicial) negativo, lo que refleja una deshidratación de los microbulbillos y/o un balance negativo en cuanto a fotosíntesis/respiración. Esta situación es normal en etapas iniciales de la aclimatación y debiera revertirse con el transcurso del tiempo.

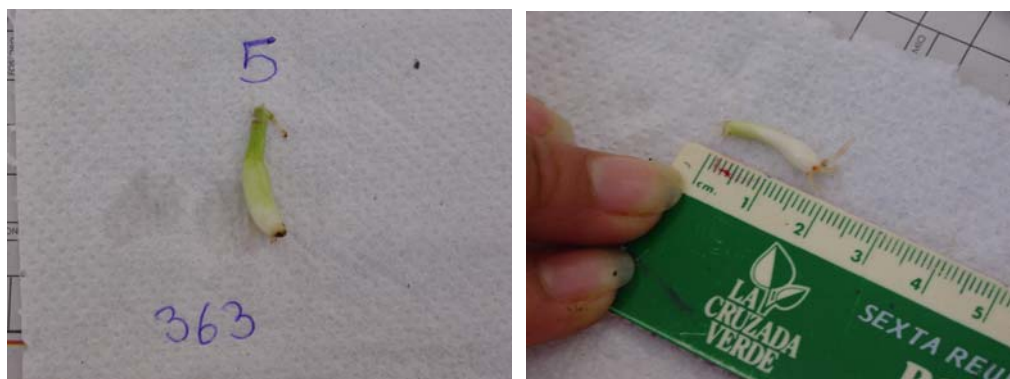


Figura 9. Microbulbillos de *R. splendens* para aclimatación.

Estos resultados demuestran no solo la buena capacidad de adaptación al cultivo *in vitro* del genotipo de *R. splendens* N° 363, sino que también su buena adaptación al Cultivo *ex vitro*.

Este resultado se constituye en uno de los más importantes del proyecto debido a que permite verificar que el genotipo de mejor aptitud multiplicativa, y que pudiera tener alguna posibilidad en el desarrollo de variedades comerciales, posee una buena capacidad de adaptación al Cultivo *ex vitro* y puede ser cultivado en invernadero. Lamentablemente en el período del

proyecto no se produjo floración de este genotipo. (La especie *R. splendens* no floreció en las condiciones de invernadero no calefaccionado en Valdivia).

Durante el mes de diciembre del 2007 en el invernadero de la Universidad Austral de Chile floreció una planta de *Rhodophiala montana* (genotipo N° 125), identificada como posible poliploide, ya que había sido tratado con una solución de colchicina al 0,2%.

Para comprobar su estado cromosómico se realizaron evaluaciones del tamaño de polen y del tamaño de los tépalos. De acuerdo a las mediciones realizadas, el tamaño de polen del posible poliploide es significativamente mayor que el producido por los diploides. Esto fue corroborado por una prueba de t-Student ($P < 0.05$). Lo que constituye evidencia de condición de poliploidía. El aumento del tamaño de polen es típico de aumentos en el nivel de ploidía. Al observar la floración de este genotipo se aprecia una muy leve diferencia con respecto al diploide. A pesar de que se indujo poliploidía en varios cientos de plantas, a cabo de los años, solo se pudo apreciar el resultado de la inducción en la flor de una planta. En cuanto al resto de las plantas, muchas murieron al momento del tratamiento, otras no mostraron cambios en su número de genomas o ningún atributo ligado a la poliploidía (mayor tamaño de estomas o mayor tamaño de polen), otras si mostraron evidencia de poliploidía pero con el paso de los años no lograron sobrevivir.

Cuadro 18. Resultados medidas de tamaño de granos de polen de planta posible poliploide* comparado con granos de polen de planta diploide

Medidas tamaño polen (mm)							
<i>Tecas maduras de 4 plantas diploides mezcladas</i>				<i>Tecas maduras 1 planta poliploide</i>			
Muestra	Ancho	Diploides largo	perímetro	Ancho	Poliploide largo	perímetro	
1	0,062	0,082	0,227	0,073	0,096	0,264	
2	0,069	0,066	0,212	0,085	0,102	0,297	
3	0,061	0,069	0,208	0,092	0,122	0,337	
4	0,066	0,085	0,243	0,082	0,098	0,296	
5	0,06	0,073	0,217	0,083	0,107	0,293	
6	0,065	0,075	0,223	0,086	0,105	0,301	
7	0,066	0,08	0,23	0,083	0,097	0,291	
8	0,067	0,077	0,23	0,095	0,125	0,345	
9	0,065	0,079	0,228	0,085	0,091	0,275	
10	0,074	0,095	0,268	0,084	0,093	0,286	
11	0,06	0,073	0,223	0,097	0,123	0,353	
12	0,065	0,078	0,223	0,113	0,135	0,391	
13	0,07	0,076	0,229	0,084	0,095	0,278	
14				0,107	0,124	0,358	
15				0,08	0,097	0,281	
16				0,067	0,117	0,295	
17				0,07	0,095	0,264	
18				0,088	0,104	0,304	
Promedio	0,065	0,078	0,228	0,086	0,107	0,306	
Sd	0,004	0,007	0,015	0,012	0,014	0,037	

* Esta planta fue clasificada como posible poliploide según su tamaño de estomas significativamente mayor a los diploides (este rasgo está altamente correlacionado con el nivel de ploidía)



Figura 10. Grano de polen de una posible planta poliploide

A continuación se muestra el resultado de la medición de los tépalos de la planta posible poliploide comparado con una muestra de plantas diploides.

Cuadro 19. Características de la flor de distintos genotipos de *R. montana*, incluyendo un posible poliploide y diploides

Genotipo	Largo vara cm	N° flores por vara	Largo tépalos mm	Ancho tépalos mm
m 125 poliploide	33	3	43	9
montana s/n	37	3	40	0,8
m 608	29,5	3		
m 126	27,5	8	29	7
m 149	38	5	35	9
m 112	27	3	30	8
m 114	20	3	25	7
m 170	33	3	37	7
m 142	26	4	30	7
m 133	32	3	35	8
m 789	38,5	3	35	8
Promedio diploide	30,9	3,8	32,9	6,9
sd	5,68	1,54	4,41	2,24

El único rasgo en el que el posible poliploide muestra una leve ventaja es en el largo de los tépalos. A continuación se muestra una gráfica de los datos correspondientes a largo de tépalos.

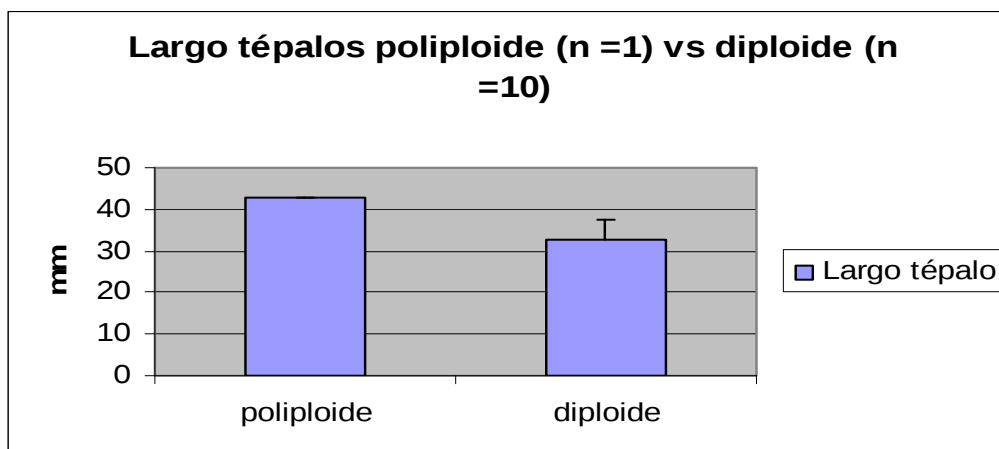


Figura 11. Largo de tépatos de un posible poliploide con respecto a un diploide



Figura 12. Fotografía de planta de *R. montana* genotipo N° 125 diploide (izquierda) y poliploide (derecha).

En resumen, los resultados de todo el proceso de inducción de poliploidía son bastante modestos. Sin embargo, ese era uno de los riesgos del proyecto, consignados en la propuesta original. La poliploidía es una condición genética que significa la duplicación total de genoma, de todos los genes y elementos reguladores de esos genes (tanto activadores como silenciadores). Esta situación involucra un cambio enorme en las actividades metabólicas de la planta, lo que repercute en el fenotipo, tanto positiva como negativamente. Si bien, se han logrado avances en el desarrollo de cultivares florícolas utilizando la inducción de

autopoliploidía, no necesariamente cada vez que se induzca poliploidía se producirá un mejoramiento. El resultado es bastante incierto. No obstante, esta era una alternativa válida para intentar aumentar el tamaño de la inflorescencia con miras a la utilización comercial de *Rhodophiala*.

5.9 Resultados de estudios citológicos y moleculares en torno a clarificar relaciones filogenéticas entre especies e híbridos

La Tabla 1 muestra los números cromosómicos, niveles de ploidía, fórmula cariotípica e índices de asimetría de los cariotipos de las distintas especies de *Rhodophiala* estudiadas. Las especies muestran números cromosómicos somáticos mayoritariamente $2n=18$, existiendo casos de $2n=16$. Los índices de asimetría tienden a acercarse a 0.6 en la mayoría de las especies, a excepción de *R. rhodolirion* que es 0.46. En cuatro especies, los 2 pares de cromosomas más pequeños son metacéntricos, los de mayor tamaño son submetacéntricos y subtelocéntricos, en *R. rhodolirion* los 2 pares más pequeños son subtelocéntrico y submetacéntrico, los de mayor tamaño son metacéntricos, submetacéntrico y subtelocéntrico.

Análisis de las secuencias de regiones ITS1/5.8S/ITS2 entre partidores ITS Plant y C26A (738 pb) de cada especie estudiada revelaron la existencia de escasa variabilidad interespecífica. Entre *R. montana* y *R. splendens* no se detectaron polimorfismos interespecíficos. Entre *R. montana* y *R. bagnoldii*, las secuencias de ambas especies difirieron por 2 mutaciones puntuales, *R. montana* y *R. phycelloides* por 2 mutaciones puntuales al igual que *R. montana* y *R. ananuca*. Al comparar entre sí las demás especies, no se detectaron polimorfismos interespecíficos. En *R. montana* se detectó polimorfismo intraespecífico en un sitio de mutación puntual, en *R. splendens* 2 sitios y en *R. bagnoldii* 3 sitios. Los diferentes sitios de mutación puntual intra e interespecíficos, como los sitios de restricción para diferentes enzimas se indican en la Tabla 2. La especie *R. rhodolirion* constituye un caso especial, difiriendo en más de 90 sitios puntuales de mutación con respecto a las demás especies.

La Figura 1 presenta un filograma resultado de la comparación de las secuencias ITS de las especies estudiadas junto a secuencias reportadas por Meerow *et al.*, (2000) de *R. cipoana*, *Phycella ignea* e *Hippeastrum brasileum*. La especie de *R. ananuca*, *R. montana*, *R. phycelloides*, *R. splendens* y *R. bagnoldii* constituyen un grupo cercanamente relacionado, alejándose de *R. rhodolirion* que es más cercana a *P. ignea* y separándose de *R. cipoana* que es más cercana a *H. brasileum*.

Cuadro 20. Número cromosómico somático, nivel de ploidía e índices asimetría para distintas especies de *Rhodophiala*

Especie	Nº ind.	2n	Ploidia	Fórmula cariotípica*	Índice de asimetría
<i>R. montana</i>	4	18	2X	<10%: 2m >10%: 3sm + 4st	0.59
<i>R. splendens</i>	4	18	2X	< 10%: 2m >10%: 4sm +3 st	0.62
<i>R. bagnoldii</i>	2	18	2X	<10%: 2m >10%: 4sm + 3 st	0.60
<i>R. ananuca</i>	2	18	2X	<10%: 2m >10%: 3sm + 4st	0.61
<i>R. rhodolirion</i>	2	16	2X	<10%: 1st + 1 sm >10%: 3m + 2sm + 1 st	0.46

*Se dividió en dos grupos de cromosomas: pequeños, que individualmente representan menos del 10% del complemento haploide; grandes que representan más del 10%.



Figura 13. Cromosomas metafásicos *R.splendens*



Figura 14. Cromosomas metafásicos *R.rhodolirion*

Cuadro 21. Polimorfismos región ITS (738 pb) intra e interespecíficos entre distintas combinaciones de especies.

Especie	<i>R. montana</i>	<i>R. splendens</i>	<i>R. bagnoldii</i> *	<i>R. phycelloides</i> *	<i>R. ananuca</i> *
<i>R. montana</i>	Base nº 92 GGTAG GGNAG	No	Base Nº 105 GCAACTGCC G GCAACCGCC G Acil CCGC Base Nº136 CCCTAGCCG CCCCAGCCG Bfal CTAG BseYI CCCAGC	Base Nº 106 GCAACTGCCG GCAACCGCCG Acil CCGC : 9 Base Nº 136 CCCTAGCCG CCCCAGCCG Bfal CTAG : BseYI CCCAGC	Base N' 106 GCAACTGCCG GCAACCGCCG Acil CCGC : 6 Base Nº 136 CCCTAGCCG CCCCAGCCG Bfal CTAG : BseYI CCCAGC
<i>R. splendens</i>	No	Base nº 105 ACNGC ACCGC ACTGC Base Nº 136 CCCAG CCTAG	No	No	No
<i>R. bagnoldii</i>			Base Nº 92, GGAGG GGTGG Base Nº 239 GCAAG GCTAG Base Nº 276 CGACAA CGGCAA	No	No
<i>R. phycelloides</i>				No	No
<i>R. ananuca</i>					No
<i>R. rhodolirion</i>	+ 90 mutaciones puntuales	+ 90 mutaciones puntuales	+ 90 mutaciones puntuales	+ 90 mutaciones puntuales	+ 90 mutaciones puntuales

*Las secuencias descritas en la tabla corresponden a *R. montana* en la fila superior y a *R. bagnoldii*, *R. phycelloides* o *R. ananuca* en la fila inferior

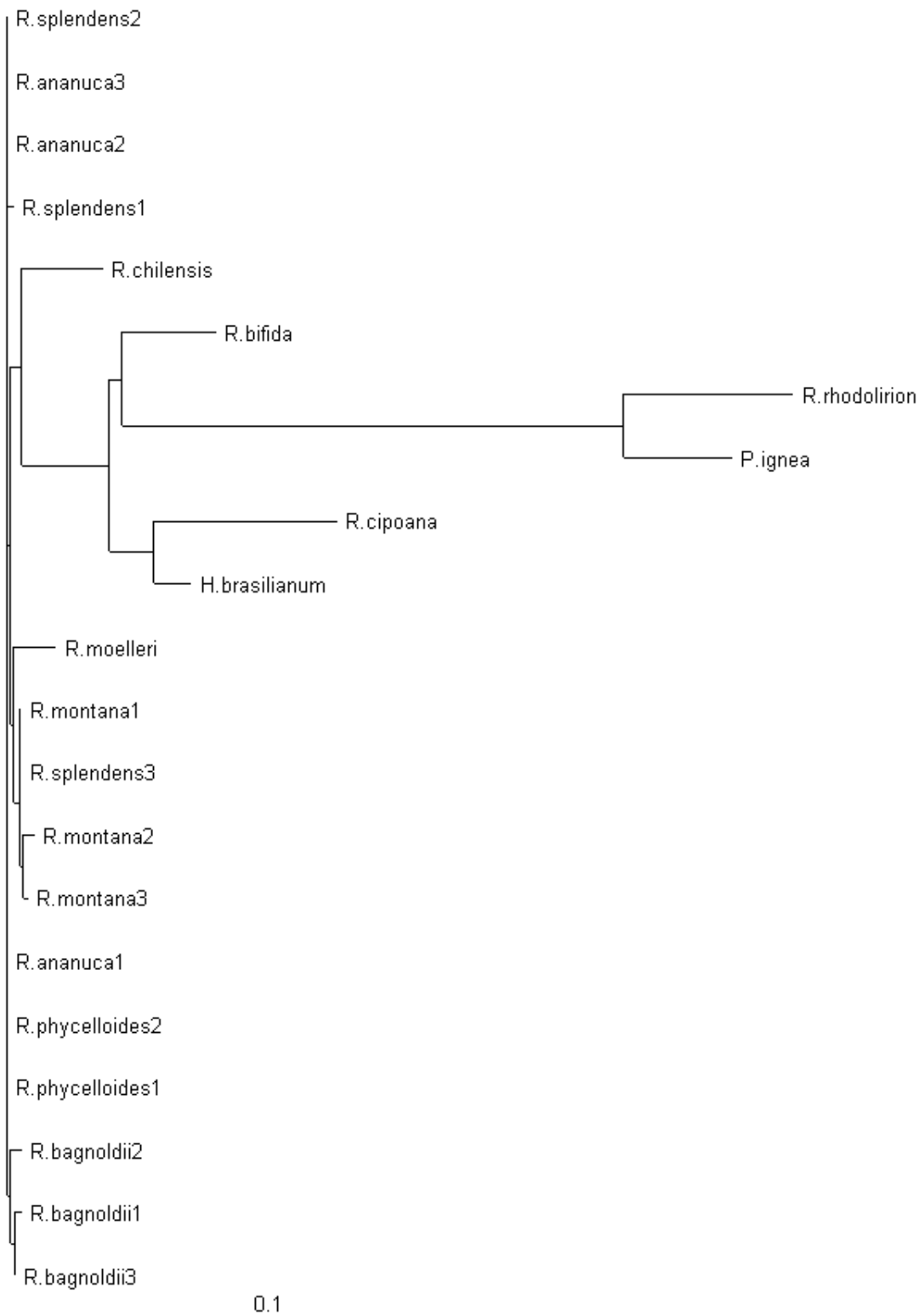


Figura 15. Filograma de relaciones filogenéticas entre distintas especies de *Rhodophiala* con referencia a especies de otros géneros cercanos (*Hippeastrum* y *Phycella*)

Los resultados en cuanto a número y morfología cromosómica (Tabla 1) se corresponden con lo reportado por Naranjo y Poggio (2000) para las especies *R. bifida* ($2n = 18$ y 16), *R. elwessi* ($2n = 18, 36, 72$), *R. araucana* ($2n = 54$), *R. rhodolirion* ($2n = 16$) y *R. andicola* ($2n = 16$) y lo informado por Palma-Rojas (1999) en *R. phycelloides* $2n=18$ y *R. advena* ($2n = 18$). El cariotipo es bimodal y bastante constante entre las especies, estando constituido por 2 pares pequeños metacéntricos y 7 pares de mayor tamaño, submetacéntricos y subtelocéntricos. La especie *R. rhodolirion* posee un número y morfología cariotípica diferente. Los resultados confirman los números básicos propuestos para el género de $x = 9$ y $x = 8$ (Naranjo y Andrada, 1975), lo que tiene consistencia con los citotipos reportados por Naranjo y Poggio (2000), que corresponden a múltiplos de 9. Estos autores reportan casos de poliploidía para algunas accesiones. Otros casos de poliploidía han sido reportados por Muñoz *et al.* 2006, quien obtuvo plantas tetraploides a través del uso de colchicina.

El índice de asimetría es una buena forma de expresar la morfología cariotípica general en plantas (Romero Zarco, 1986). Naranjo y Poggio (2000), describen índices de asimetría de 0.55 a 0.61 para *R. bifida*, de 0.61 a 0.66 para *R. elweesi*, 0.59 para *R. araucana*; *R. rhodolirion* y *R. andicola* presentaron índices de asimetría diferentes, 0.36 y 0.23 respectivamente. En el presente estudio los índices de asimetría se aproximaron a 0.6, de manera similar a lo encontrado por los autores citados, coincidiendo también con la diferenciación de *R. rhodolirion* (0.46), cuyo índice de asimetría refleja una distinta morfología cromosómica con respecto a las demás especies.

Desde el punto de vista práctico, la región ITS resultó fácil de amplificar debido a la presencia de secuencias altamente conservadas flanqueantes que permitieron obtener secuencias ITS de alta calidad en todas las especies estudiadas utilizando los cebadores ITS Plant y C26A diseñados por Varghese *et al.* (2003)., lo cual reafirma la descrito por Baldwin *et al.*, (1995) para angiospermas, en cuanto a la amplia y sencilla aplicabilidad de esta región en estudios genéticos y construcción de filogenias.

Sin embargo, a excepción de *R. rhodolirion*, la variabilidad encontrada entre las especies estudiadas fue escasa (Figura 1), incluso la variabilidad encontrada entre distintos individuos de *R. splendens* es mayor a la presente entre *R. bagnoldii*, *R. phycelloides* y *R. ananuca*, haciendo difícil la identificación de posibles híbridos interespecíficos a través de sitios de restricción polimórficos que permitan habilitar la técnica ITS-RFLP. Teóricamente, sería factible detectar híbridos entre *R. montana* y las especies: *R. ananuca*, *R. phycelloides* y *R. bagnoldii* (Tabla 2). Los híbridos entre las otras combinaciones no podrían reconocerse a partir del estudio de este fragmento. Esto se suma a la constancia del cariotipo entre estas especies, que también dificulta la búsqueda de evidencia cariológica de hibridación. Estas dos estrategias, molecular (ITS-RFLP) y cariológica, han sido usadas por Pellegrino *et al.*, 2005 en la confirmación de hibridación entre *Orchis mascula* y *O. provincialis*. Obviamente *R. rhodolirion* constituye una excepción, aunque sería difícil esperar descendencia viable de la cruce de esta especie con algún representante del resto de las especies del género.

La reducida variabilidad encontrada entre un grupo de especies, el que a su vez difiere fuertemente de especies como *R. rhodolirion* y *R. cipoana*, reafirma la necesidad de revisar la taxonomía del género. Al comparar la secuencia ITS obtenida de *R. rhodolirion* con las secuencias existentes en la base de datos “nucleotide collection” de NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov la mayor homología se presenta con *Phycella ignea*. Sin embargo, no existen autores que sugieran la reclasificación de *R. rhodolirion* en el género *Phycella*.

Los resultados de los estudios moleculares realizados en esta oportunidad concuerdan con lo sugerido por Naranjo y Poggio (2000) y con lo propuesto por Ravenna (2003), acerca de rehabilitar el género *Rhodolirion*.

BIBLIOGRAFIA

Baldwin, B., Sanderson, M., Porter, M., Wojciechowski, M., Campbell, C. y Donoghue, M. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. 1995. Annals of the Missouri botanical garden. 82: 247 – 277.

Grant, J., Brown, A. y Grace, J. 1984. Cytological and isozyme diversity in *Glycine tomentella* Hayata (leguminosae). Australian Journal of Botany 32: 665 – 667.

King, R., Gornall, R., Preston, C. y Croft, J.M. 2001. Molecular confirmation of *Potamogeton x bottnicus* (*P. pectinatus* x *P. vaginatus*, *Potamogetonaceae*) in Britain. Botanical Journal of the Linnean Society, 135: 67 – 70.

Levan, A., Fredga, K., y Sandberg, A. 1964. Nomenclatura for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201-220.

Meerow, A., Guy, C., Qin-Bao, L., Yang, S. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. Systematic Botany 25: 708 – 726

Muñoz, M., Riegel, R And Seemann, P. 2006. Use of image citometry for the early screening of induced autopolyploids. Plant Breeding 125: 414-416.

Naranjo, C.A. y Andrade, B. 1975. El cariotipo fundamental del género *Hippeastrum* Herb. (Amaryllidaceae) Darwiniana 19:556-582.

Naranjo, C. y Poggio, L. 2000. Karyotypes of five *Rhodophiala* species (Amaryllidaceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 35 (3-4): 335-343.

Olate, E. Y Bridgen, M. 2005. Techniques for the *in vitro* propagation of *Rhodophiala* and *Leucocoryne* spp. Acta Horticulturae 673: 335 – 339

Palma-Rojas, C. 1999. Caracterización citogenética de los géneros *Rhodophiala* Presl. y *Phycella* Lindl. (Amaryllidaceae). In: Los neófitos nativos y su importancia en la floricultura. Schiappacasse, F.y Peñailillo, P. Eds. Universidad de Talca. Chile. Pp. 73 – 79.

Pellegrino, G., Emerico, S., Musacchio, A., Scrugli, A y Cozzolino, S. 2005. Confirmation of hybridization among sympatric insular populations of *Orchis mascula* and *O. provincialis* Plant Systematics and Evolution. 251: 131 – 142.

Ravenna, P. 2003. Elucidation and systematics of the Chilean genera of Amaryllidaceae. Botánica Australis 2: 1 – 20.

Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526 – 530.

Schiappacasse, F.; Peñailillo, P. Y Yáñez, P. 2002. Propagación de bulbosas chilenas ornamentales. Editorial Universidad de Talca. Talca. Chile. 65 p.

Seemann, P., Muñoz, M., Jara, G., Riegel, R., Schiappacasse, F., Peñailillo, P., Vico, V. 2004. Propagación *in vitro* de dos especies de *Rhodophiala* sp. a partir de microbulbillos. Resúmenes 55º Congreso Agronómico de Chile. Valdivia 19-22. 10.2004. Nº. 62.

Traub, H. 1956. The genera *Rhodophiala* Presl and *Phycella* Lindl.: key to the species and synonymy. Plant life (Herbertia) 12: 67 – 76.

Varguese, R., Chauhan, V. y Misra, A. 2003. Hypervariable spacer regions are good sites for developing specific PCR-RFLP markers and PCR primers for screening actinorhizal symbionts. Journal of Bioscience 28:437-442.

6. PROBLEMAS ENFRENTADOS

6.1. Legales: no se presentaron

6.2. Técnicos: se decidió no continuar con el cultivo en medio líquido mediante el sistema de inmersión temporal, debido a que no se contó con una cantidad apropiada de material vegetal para la realización de los ensayos.

6.3. Administrativos: se solicitó realizar la devolución de los fondos considerados para la Preparación y tramitación de solicitud de patente, los cuales ascendían a \$3.000.000.

6.4. De gestión: no se presentaron.

7. ACTIVIDADES DE DIFUSION

Durante el periodo 2006-2008 se presentaron los siguientes trabajos:

- ✓ 57° Congreso Agronómico de Chile. 7° Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura. 3er Congreso de la Sociedad Chilena de Horticultura. 17 al 20 de octubre de 2006. Santiago.

Capacidad de regeneración de genotipos de *Rhodophiala splendens* (Rengifo) Traub. en medio líquido adicionado con retardantes de crecimiento.

Jara, G., Muñoz, M. y Seemann, P.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
E-mail: gjara@uach.cl

A partir del Banco de Germoplasma Chileno de *Rhodophiala* se realizó una selección de 65 genotipos de *R. splendens*, los cuales fueron divididos en un grupo de 64 genotipos y en un grupo con clones del genotipo 363, para realizar dos ensayos independientes. En ambos ensayos los microbulbillos fueron sembrados en el medio de Murashige y Skoog (1962), líquido, adicionado con diferentes combinaciones de Meta-topolina (0-22.2 μ M) y Paclobutrazol (0-17 μ M), incubándolos durante 2 meses bajo condiciones controladas. Se realizaron evaluaciones pre y post incubación sobre los parámetros; peso de planta y bulbo (g), número y diámetro de bulbo (cm), altura de brotes (cm), para obtener el Índice de multiplicación e Índice de crecimiento. Además se determinaron visualmente la presencia de hiperhidricidad y contaminación. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el Test de Kruskal Wallis, para luego realizar la comparación múltiple de promedios con el Test de Bonferroni. No se observaron diferencias significativas para el ensayo con genotipos múltiples en ninguno de los tratamientos utilizados y parámetros evaluados, en cambio, en el ensayo con un solo genotipo se determinaron diferencias significativas para el parámetro número de brotes. Al contrastar los resultados de ambos ensayos (mezcla de genotipos) y el genotipo 363, se determinó que existe una mayor capacidad de multiplicación de este último genotipo, con un coeficiente de 3,8 en el medio con 2,2 μ M de Meta-topolina.

Cultivo *in vitro* en medio semisólido y líquido en *Rhodophiala*: Influencia en el crecimiento y aclimatización de bulbillos

MUÑOZ M.¹, SEEMANN P.¹, RIEGEL R.¹ y JARA G.¹

Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Instituto de Producción y Sanidad Vegetal. Casilla 567, Valdivia. Email: mamunoz@uach.cl

Rhodophiala Presl. (Amaryllidaceae) es un género nativo de Chile, con notorio potencial ornamental, que se distribuye desde la II a la X región encontrándose también en Argentina y Bolivia. Debido a la baja tasa de propagación natural, el cultivo de tejidos *in vitro* puede constituir una valiosa herramienta que permita la propagación rápida y masiva de material genéticamente homogéneo para futuro uso ornamental. En este trabajo se realizaron diversos experimentos empleándose el medio Murashige Skoog (1962) semisólido o líquido en contacto permanente e intermitente, a través del cultivo en inmersión temporal de *R. splendens*, *R. montana* y *R. ananuca*. En un primer ensayo, se evaluó la tasa de propagación e incremento en biomasa de estas especies en medio semisólido (agar 8 gL⁻¹) versus medio líquido con un soporte de algodón en la base del frasco. Existió mayor crecimiento de bulbos *in vitro* en *R. montana* utilizando medio líquido, aunque la aclimatización fue menos exitosa y el crecimiento *ex vitro* fue errático, mostrando un comportamiento poco homogéneo entre los bulbos sobrevivientes. En cambio, en bulbos provenientes de cultivo en medio sólido la aclimatización fue más uniforme y controlable para las tres especies en estudio. En un segundo ensayo, se aplicó inmersión temporal frente a formas de cultivo en medio estacionario sólido y líquido. La aplicación intermitente del medio MS permitió reducir la hiperhidratación de los explantes, no detectándose diferencias significativas en biomasa y número de microbulbillos producidos.

- ✓ 2º Simposio de Horticultura Ornamental. Talca, VII Región – Chile. 6 y 7 de Diciembre de 2007.

Cultivo *in vitro* y aclimatación de plántulas de *Rhodophiala montana*

Jara, G., Seemann, P., y Muñoz, M.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias,
Universidad Austral de Chile. E.mail: gjara@uach.cl

INTRODUCCIÓN

Rhodophiala montana es una planta geófito, de la familia *Amaryllidaceae*, que se distribuye principalmente en la VII región, en suelo arenoso. Su floración ocurre en primavera y verano, formando flores amarillas, amarilla/anaranjadas, lo cual les otorga características apropiadas como planta ornamental. Debido a este potencial y a su propagación natural poco eficiente la aplicación de herramientas biotecnológicas, como el Cultivo de tejidos, ha sido analizada considerando diferentes tipos de material vegetal y condiciones de Cultivo para su propagación.

La desventaja del cultivo *in vitro* a partir de escamas gemelas provenientes de bulbos, ha sido su bajo porcentaje de regeneración de brotes, el que no supera el 20% y en el caso de la utilización de semillas su poca uniformidad en la germinación, con valores que no superan el 60% en un periodo de tiempo muy amplio (Jara, et. al. 2004). La multiplicación posterior de los microbulbillos *in vitro* tampoco ha dado buenos resultados, con un coeficiente de multiplicación de 2.0 con un corte basal en el microbulbillo. Muñoz (2006), determinó que la aptitud al trasplante de bulbos de *R. montana* cultivado en medio sólido y líquido no es significativa, determinándose que la sobrevivencia es mejor en material proveniente de medio sólido que de medio líquido.

Por lo anterior, se planteó como objetivo del presente trabajo determinar el efecto del calibre de los microbulbillos y de diferentes condiciones de aclimatación sobre el desarrollo vegetativo posterior.

MATERIALES Y METODOS

Para el ensayo de aclimatación se utilizaron microbulbillos de diferentes genotipos de *Rhodophiala montana*, cultivadas *in vitro* en el medio nutritivo de Murashige y Skoog (1962) adicionado con 1,0 mg/L de 6-Benzil Amino Purina (BAP) y 0,1 mg/L Acido Naftalen Acético (ANA), y gelificado con 8 g/L de agar, de acuerdo a protocolos previamente desarrollados (Jara et al. 2004, Seemann et al. 2006) Las plántulas fueron lavadas y desinfectadas con una solución de cloro al 1%, para luego evaluar las variables; número, peso y diámetro de los microbulbillos, número y longitud de raíces.

Los microbulbillos de *R. montana* se clasificaron en 3 rangos de calibre de los microbulbillos:

Rango 1: entre 0,2- 0.4 cm de diámetro

Rango 2: 0,5 – 0.6 cm de diámetro

Rango 3: 0,7- 1,2 cm de diámetro

Estos fueron trasladados a dos condiciones ambientales diferentes. Se comparó el efecto de dos cámaras de incubación cuyas condiciones exactas fueron:

1.- Cámara de aclimatación 1: una temperatura de 22°C, 16 horas luz y un promedio de 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica.

2.- Cámara de aclimatación 2: con una temperatura promedio de 20°C, 16 horas luz y un promedio de 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$.

Cada microbulbillo con sus raíces, fue transplantado a bandejas plásticas con una mezcla de sustrato compuesto por turba y arena en partes iguales. Se realizó una fertilización cada 15 días con solución Hoagland completa. Por cada bandeja se colocaron 6 microbulbillos con 4 o 5 repeticiones por tratamiento. Las bandejas fueron cubiertas con tapa transparente, para evitar la deshidratación, abriéndose parcialmente a los 10 días.

A los 30 días se realizó una segunda evaluación de las variables; emergencia foliar, número y longitud de hojas. Paralelamente las plántulas fueron descalzadas y transplantadas a macetas de 30 cm de alto con tierra, manteniéndose en invernadero, donde permanecieron durante 3 meses, para evaluar las variables; peso de planta completa, número y longitud de raíces, número y diámetro de bulbos y número de hojas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La respuesta de la emergencia de nuevas hojas en los microbulbillos en ambos ambientes de aclimatación presentó diferencias significativas, observándose los mayores Valores en la cámara de aclimatación 2, donde las condiciones ambientales son más fluctuantes. Transcurridos 3 meses luego de la formación de las hojas se obtuvieron resultados significativos, tanto para las variables peso de planta y diámetro de los bulbos, aportadas por los bulbillos de mayor calibre (rango 2 y 3) y por los bulbillos provenientes de la aclimatación realizada en la cámara N° 2.

Cuadro 1. Comportamiento de bulbillos de *R. montana* en fase de aclimatación

	Emergencia foliar (%)	Peso planta (g)	Diámetro de bulbos (cm)
Tratamiento			
Tipo de aclimatación			
<i>Cámara 1</i>	72,0 b	0,6 b	0,46 a
<i>Cámara 2</i>	89,0 a	1,1 a	0,56 a
<i>Significancia</i>	*	*	n.s
Calibre de microbulbillos (cm)			
<i>Rango 1: 0,2-0,4</i>	69,0 b	0,5 c	0,37 b
<i>Rango 2: 0,5-0,6</i>	84,0 a	0,8 b	0,52 a
<i>Rango 3: 0,7-1,2</i>	88,0 a	1,2 a	0,64 a
<i>Significancia</i>	*	*	*

Los resultados permiten concluir que:

Las condiciones ambientales fluctuantes permiten una mejor emergencia foliar y mayores pesos de planta debidos al aumento en los diámetros de bulbos.

Los rangos de calibre de los microbulbillos tienen un efecto significativo sobre los parámetros vegetativos determinados.

REFERENCIAS

Jara, G., Seemann, P., Muñoz, M., Riegel, R., Schiapacasse, F., Peñailillo, P. y Vico, V. 2004. Investigaciones preliminares realizadas en torno al establecimiento *in vitro* de especies chilenas de *Rhodophiala*. In XIV Congreso Científico. Instituto Nacional de Ciencias Agrarias. San José de Las Lajas, Cuba. 217 p.

Muñoz, M. 2006. Estudio de sistemas de Cultivo *in vitro*, aclimatación de plántulas y crecimiento de bulbos en *Rhodophiala* Presl. (Amaryllidaceae). Tesis presentada como parte de los requisitos para la obtención del grado de Magíster en Ciencias Vegetales. 107 pp.

Seemann, P., Schiapacasse, F., Riegel, R., Peñailillo, P., Muñoz, M., Jara, G., Vico, V. Y Basoalto, A., 2006. Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas. 11º Informe de Avance Técnico y de Gestión Proyecto BID-PI-C-2001-1-A-071 (ex BIOT-01-A-071). Valdivia. Universidad Austral de Chile y Universidad de Talca. 55 p.

*Con financiamiento del proyecto FIA-BID-PI-C-2001-1-A-071.

Análisis de polimorfismos intra e interespecíficos a nivel de región ITS, estudios de cariotipo y aproximaciones filogenéticas entre especies de *Rhodophiala* Presl.

Muñoz, M¹., Riegel, R²., Seemann, P²., Schiappacasse, F³., Peñailillo, P³., Jara, G²., Basoalto, A³.

¹ Escuela de Graduados, Universidad Austral de Chile

² Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile

³ Departamento de Horticultura, Universidad de Talca

Introducción

Rhodophiala Presl. es un género nativo del Cono Sur Americano. Sus especies han sido descritas en Chile, Argentina y Bolivia (Traub, 1956). Se trata de geófitas bulbosas pertenecientes a Amaryllidaceae J. St.-Hill, de vistosas flores que han llamado la atención de investigadores en floricultura en el mundo, realizándose iniciativas para su domesticación con miras a su utilización como Cultivo ornamental (Morgan, comunicación personal., Muñoz *et al*, 2006, Olate y Bridgen, 2005, Seemann *et al*. 2004, Schiappacasse, 2002).

En el pasado, ha sido tratado como parte del género *Hippeastrum*, siendo la taxonomía y los límites del género controversiales. Meerow *et al.*, (2000), utilizando datos provenientes del análisis del espaciador transcrito interno de genes ribosomales (ITS) distingue a *Rhodophiala* de *Hippeastrum* teniendo un origen aparentemente polifilético, aunque sostiene que un muestreo más amplio del género es necesario.

Por otra parte, se ha obtenido descendencia viable desde cruzamientos controlados entre distintas especies de *Rhodophiala*, habiéndose reportado también la existencia de fenotipos intermedios en la naturaleza (Flavia Schiappacasse, Universidad de Talca, comunicación personal).

Una de las formas de obtener evidencia molecular de hibridización interespecífica es a través del estudio de la secuenciación del espaciador transcrito interno de genes ribosomales (nrITS). Dado su carácter conservado intra especie, en los híbridos se espera que la secuencia de la región ITS muestre heterocigocidad en las bases en las posiciones en las cuales los dos especies parentales poseen secuencias diferentes (King *et al.*, 2001 y Pellegrino *et al.*, 2005).

Por otra parte, para taxa relacionados, ITS ha mostrado gran utilidad para generar filogenias genéticas a nivel de familia y menores (Meerow *et al.*, 2000).

El siguiente trabajo pretende aportar información cariológica y molecular de estas especies que pueda ser usada para el estudio de las relaciones filogenéticas entre ellas.

Además, se plantea el diseño de un sistema basado en sitios de restricción polimórficos a nivel de región ITS para identificar posibles híbridos existentes en la naturaleza, como producidos a través de cruzamientos controlados.

Metodología

Se trabajó con 6 especies chilenas de *Rhodophiala*. Estas especies fueron colectadas desde su ambiente natural por Patricio Peñailillo (Universidad de Talca), siendo un ejemplar de cada especie registrado en el herbario de la Universidad de Talca. *R. montana* (Phil.) Traub fue colectada en Laguna del Maule, VII región cordillera, *R. splendens* (Rengifo) Traub en Vilches Alto VII región cordillera, *R. bagnoldii* (Herb.) Traub en Huasco, III región costa, *R. ananuca* (Phil.) Traub en Aguada de Tongoy, III región costa, *R. rhodolirion* (Baker) Traub en Los Queñes, VII región Cordillera, *R. phycelloides* (Herb.) Hunz en Huasco, III región costa.

Para las especies mencionadas de *Rhodophiala*, a excepción de *R. phycelloides*, se realizaron preparaciones citológicas desde puntas de raíz según protocolo planteado por Grant *et al.*,

(1984) y adaptado por Muñoz *et al.*, (2006) a *Rhodophiala*. Para los estudios moleculares se realizó la amplificación, previa extracción de ADN, del fragmento correspondiente a la región ITS1/5.8S/ITS2 en tres plantas por especie utilizando los cebadores ITS1-Plant-F, 5'-CGCGAGAAGTCCACTG-3' e ITS C26A-R 5'-GTTTCTTTTCCTCCGCT-3'. Los productos fueron visualizados mediante electroforesis en geles de Agarosa 1,5% mediante tinción con bromuro de etidio.

Los productos amplificados fueron secuenciados por un servidor externo, MacroGen Inc., Corea. Las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando el programa ClustalW, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, con el cual se realizó la construcción de un filograma comparando las secuencias obtenidas con algunas reportadas por Merrow *et al.* (2000).

Resultados y Discusión

Las especies muestran números cromosómicos somáticos mayoritariamente $2n=18$, existiendo casos de $2n=16$. Los índices de asimetría tienden a acercarse a 0.6 en la mayoría de las especies, a excepción de *R. rhodolirion* que es 0.46. En cuatro especies, los 2 pares de cromosomas más pequeños son metacéntricos, los de mayor tamaño son submetacéntricos y subtelocéntricos, en *R. rhodolirion* los 2 pares más pequeños son subtelocéntrico y submetacéntrico, los de mayor tamaño son metacéntricos, submetacéntrico y subtelocéntrico.

Un filograma Resultado de la comparación de las secuencias ITS de las especies estudiadas junto a secuencias reportadas por Meerow *et al.*, (2000) de *R. cipoana*, *Phycella ignea* e *Hippeastrum brasileum* entre otras, nos indica que las especies *R. ananuca*, *R. montana*, *R. phycelloides*, *R. splendens* y *R. bagnoldii* constituyen un grupo cercanamente relacionado, alejándose de *R. rhodolirion* que es más cercana a *P. ignea* y separándose de *R. cipoana* que es más cercana a *H. brasileum*.

Sin embargo, a excepción de *R. rhodolirion*, la variabilidad encontrada entre las especies estudiadas fue escasa, incluso la variabilidad encontrada entre distintos individuos de *R. splendens* es mayor a la presente entre *R. bagnoldii*, *R. phycelloides* y *R. ananuca*, haciendo difícil la identificación de posibles híbridos interespecíficos a través de sitios de restricción polimórficos que permitan habilitar la técnica ITS-RFLP. Teóricamente, sería factible detectar híbridos entre *R. montana* y las especies: *R. ananuca*, *R. phycelloides* y *R. bagnoldii*. *R. rhodolirion* constituye una excepción, aunque sería difícil esperar descendencia viable de la cruce de esta especie con algún representante del resto de las especies del género.

Conclusiones

La reducida variabilidad encontrada entre un grupo de especies, el que a su vez difiere fuertemente de especies como *R. rhodolirion* y *R. cipoana*, reafirma la necesidad de revisar la taxonomía del género. Los resultados de los estudios moleculares realizados en esta oportunidad concuerdan con lo sugerido por Naranjo y Poggio (2000) y con lo propuesto por Ravenna (2003), acerca de rehabilitar el género *Rhodolirion*, sugiriendo que sería más apropiado clasificar como *Rhodolirion andinum* Phil., propuesto inicialmente (ver sinonimias en Traub, 1956), a la actual *R. rhodolirion* (Baker) Traub., basándose en el hecho de que, además de diferir en número y morfología cromosómica del resto de las especies de *Rhodophiala*, se diferencia claramente a nivel de región ITS.

Meerow, A., Guy, C., Qin-Bao, L., Yang, S. 2000. Phylogeny of the American Amaryllidaceae based on nrDNA ITS sequences. Systematic Botany 25: 708 – 726

Muñoz, M., Riegel, R And Seemann, P. 2006. Use of image cytometry for the early screening of induced autopolyploids. Plant Breeding 125: 414-416.

Traub, H. 1956. The genera *Rhodophiala* Presl and *Phycella* Lindl.: key to the species and synonymy. Plant life (Herbertia) 12: 67 – 76.

- ✓ **58° Congreso Agronómico de Chile, 8° Congreso de la Sociedad Chilena de Fruticultura y el 4° Congreso de la Sociedad Chilena de Horticultura. Arica, Chile. 11-14 de septiembre del 2007.**

Aclimatación y desarrollo ex vitro de plántulas de *Rhodophiala* spp. provenientes de diferentes sistemas de cultivo in vitro.

Seemann, P., Muñoz, M. y Jara, G.
Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
E-mail: pseemann@uach.cl

La respuesta de las plantas micropropagadas luego de su transferencia a condiciones *ex vitro*, en la gran mayoría de los casos incide negativamente en su tasa de sobrevivencia, de tal forma que es necesario determinar las mejores condiciones de cultivo para que la transferencia sea exitosa. Se postula que esta respuesta podría ser dependiente del sistema de cultivo *in vitro* empleado en la fase de micropropagación. Para este efecto, se utilizaron plántulas de tres especies geófitas ornamentales: *Rhodophiala ananuca*, *R. splendens* y *R. montana*, previamente cultivadas en medio MS líquido y sólido, que fueron repicadas a bandejas con sustrato arena:turba (1:1), y mantenidas en cámara de incubación con una temperatura promedio de 22°C y 3000 lux de luminancia. Cada 15 días se fertilizó con solución MS diluida al 50%. Luego de un mes de cultivo en estas condiciones se evaluaron las variables peso, diámetro, número de bulbillos, largo de hojas y raíces, sobrevivencia al trasplante, y la ganancia en materia fresca. Posteriormente, las bandejas fueron transferidas a invernadero, y mantenidas bajo condiciones ambientales naturales durante 6 u 11 semanas, dependiendo de la especie, realizando una segunda evaluación, previa al trasplante definitivo de las plantas a contenedores plásticos, con sustrato compuesto de suelo y arena (2:1), con fertilización completa NPKMgS (12:15:15:4:3, 0,93 g/L). Los resultados indican que en la primera etapa del trasplante se determinó una aparente homologación en el crecimiento de las plantas, mientras que en la etapa de invernadero las plantas provenientes del medio sólido ya comienzan a manifestar una mayor sobrevivencia y crecimiento. La sobrevivencia post trasplante *ex vitro* de las plantas provenientes de medio sólido alcanzó entre 87 y 94%, mientras que en las provenientes de medio líquido sobrevivieron entre 38 y 69%, según la especie, reflejando la influencia del estado del medio de Cultivo en la posterior aclimatación de plántulas de *Rhodophiala*. De la misma forma, las plantas provenientes de medio sólido, se ven favorecidas en la mayoría de los parámetros de desarrollo.

Financiado mediante proyecto FIA -BIOT-01-A-71

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✓ No se logró optimizar la multiplicación acelerada de especies e híbridos de *Rhodophiala*, mediante el Sistema de Inmersión Temporal propuesto.
- ✓ Se aplicaron diferentes protocolos para la multiplicación *in vitro* en genotipos seleccionados en base a su capacidad de multiplicación.
- ✓ Uno de los genotipos seleccionados de *R. splendens* (Nº 363), con un coeficiente de multiplicación alto (x 4), ha demostrado además una buena adaptación a condiciones *ex vitro*, constituyéndose en un genotipo con características superiores al resto en cuanto a su facilidad de clonación través de micropropagación y cultivar posteriormente en invernadero.
- ✓ Alrededor del 10% de los individuos de una población genéticamente heterogénea de plantas originadas desde cultivo *in vitro* puede alcanzar la floración a los 30 meses de cultivo en invernadero sin calefacción.
- ✓ Las plantas que alcanzan la floración a los 30 meses han desarrollado mayor biomasa que el promedio y todas corresponden a plantas con bulbos de peso superior, mostrando la importancia del alcance de biomasa para llegar a la etapa reproductiva.
- ✓ Las plantas que florecieron destacaron del resto en cuanto al aumento de biomasa. Esta es una característica que depende de factores ambientales y genéticos, por lo que sería recomendable intentar clonar estas plantas para separar los efectos genéticos de los ambientales.
- ✓ Existen secuencias disponibles de la región del espaciador transcrito interno de *Rhodophiala* entre los genes ribosomales que codifican las unidades de RNA ribosomal 18S, 5,8S y 26S. Se espera que a través del análisis de estas secuencias se obtengan patrones genéticos que permitan distinguir especies e híbridos de *Rhodophiala*. A través del estudio de las secuencias de la región ITS, y de la identificación de la presencia o ausencia de mutaciones especie-específicas, es posible distinguir especies e híbridos, sin embargo, al desarrollar partidores especie específicos o la detección de perfiles de restricción enzimático típicos de las especies, se podría implementar un sistema de identificación de especies e híbridos sin necesidad de secuenciar (proceso más caro) cada individuo estudiado e incluso se podrían identificar posibles híbridos existentes en la naturaleza.

II. Actividades desarrolladas en la Universidad de Talca

1. Resumen ejecutivo

El siguiente informe corresponde al periodo comprendido entre noviembre de 2006 y marzo de 2008, periodo de extensión del proyecto “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”.

Los objetivos principales de la extensión fueron continuar con los estudios desarrollados en la primera parte del proyecto, tomando como base los resultados preliminares obtenidos y enfocándose en determinar las mejores condiciones para el manejo y cultivo de los bulbos. Uno de los objetivos principales de la extensión fue evaluar la floración y las características florales de los bulbos poliploides de *R. montana* y *R. splendens*, lamentablemente, este evento no ocurrió.

2. Cumplimiento de los objetivos

2.1. Identificar y caracterizar 8 especies de *Rhodophiala*

2.2. Determinar la temperatura óptima para lograr la engorda rápida de los bulbos, incluyendo protocolo de fertilización.

Se cumplió parcialmente ya que se realizó un estudio que incluyó 4 especies utilizando plántulas provenientes de semilla, en este caso el experimento no se pudo evaluar bien, ya que hubo mucha muerte de plantas.

2.3. Realizar estudios preliminares sobre control de floración y poscosecha de las especies.

Se cumplió parcialmente, ya que sólo se pudo realizar un estudio sobre la especie *Rhodophiala* sp. (Alto Pangué), en este caso como en todos la limitante fue el número de bulbos. En el caso de la poscosecha se realizó un ensayo con flores de *R. montana*.

2.4. Cultivo de semillas híbridas

Se realizó el cultivo de semillas provenientes de cruzamientos, actualmente se cuenta con un total de 327 bulbos de los diferentes cruzamientos.

2.5. Formar una colección de especies de *Rhodophiala* a partir de bulbos

Al finalizar el proyecto se cuenta con una colección de bulbos de diferentes especies de *Rhodophiala* plantados al aire libre en la Estación Experimental Panguilemo.

2.6. Evaluación de plantas diploides y poliploides

Este objetivo se cumplió parcialmente. Al final del proyecto es posible contar con gráficos que muestran la evolución del número de hojas de las plantas poliploides cultivadas en varios años. Sin embargo, no fue posible evaluar la floración de los poliploides porque no ocurrió.

3. Aspectos metodológicos.

3.1 Descripción de la metodología efectivamente utilizada según objetivo.

3.1.1 Material Vegetal.

Para la realización de los estudios y experimentos se utilizaron bulbos de *R. montana*, *R. bagnoldii*, *R. splendens*, *R. phycelloides* y *R. ananuca*, obtenidos a partir de almácigos. También se utilizaron bulbos de *Rhodophiala spp.* recolectados en terreno (Alto Pangué y Putú).

3.1.2 Determinar la temperatura óptima para lograr la engorda rápida de los bulbos, incluyendo protocolo de fertilización.

3.1.2.1 Estudios de crecimiento bajo temperatura controlada de sustrato y ambiente.

El 18 de junio de 2007 se comenzó un experimento para estudiar el crecimiento de bulbillos de 4 especies, bajo condiciones de calefacción basal del sustrato a nivel de las raíces y a nivel de las hojas, para medir su efecto principalmente sobre el crecimiento de los bulbos, medido como aumento de calibre al final de la temporada.

Materiales.

Para lograr las condiciones de calefacción del sustrato, se utilizó una cama caliente, ubicada en el invernadero de la E/E Panguilemo, cuyo sustrato a nivel de raíces se ajustó a 20°C. La temperatura del aire se reguló usando un turboventilador de 1800W con termostato y cubriendo la cama caliente con polietileno transparente de 0,1 mm de grosor sin aditivos, el cual se instaló el mismo día del inicio del experimento. Se instalaron dos registradores de temperatura (Data logger).

Para este ensayo, se utilizaron bulbillos provenientes de almácigos realizados desde el 21 de marzo de 2007, los cuales se transplantaron a vasos plásticos transparentes (de 12 cm de alto por 7 de ancho en la parte superior) cuando tenían una hoja. Como sustrato se utilizó 1 parte de tierra ½ parte de turba y ¼ de perlas de poliestireno. Después del trasplante se realizaron 2 riegos semanales con agua sola.

Metodología.

Para obtener las 4 condiciones de crecimiento de los bulbillos se instalaron los cables calefactores en la mitad a lo largo de la superficie de la cama caliente, en forma transversal se instaló la estructura para formar un túnel. De esta forma se originaron 4 sectores, uno con calefacción del aire y del sustrato, uno sin calefacción, uno con calefacción sólo del aire y otro con calefacción sólo del sustrato. Los bulbillos se distribuyeron al azar dentro de cada sector, quedando en cada uno 20 bulbillos de cada especie (4 repeticiones de 5 bulbillos).

El experimento fue conducido con un diseño completamente al azar en arreglo factorial 2 x 2 dado por 2 temperaturas en la parte aérea y 2 temperaturas en el sustrato.

Los tratamientos fueron los siguientes:

- T1 con calefacción en sustrato y con calefacción en parte aérea
- T2 con calefacción en sustrato y sin calefacción en parte aérea
- T3 sin calefacción en sustrato y con calefacción en parte aérea
- T0 sin calefacción en sustrato y sin calefacción en parte aérea

3.1.3 Realizar estudios preliminares sobre control de floración y poscosecha de las especies..

3.1.3.1 Estudios de crecimiento y floración.

Se realizó un experimento para determinar el efecto de 3 fechas de plantación y 3 temperaturas de desarrollo del Cultivo sobre la fecha de emergencia, floración y aumento del diámetro del bulbo en las especies *Rhodophiala aff. chilensis*, *R. montana* y *R. splendens*.

Materiales.

Para obtener las tres temperaturas se confeccionó dentro del invernadero de la E/E Panguilemo un *Túnel de Gradiente Térmico* de 12 m de largo, 1 m de ancho y 0,6 m de alto (Figura 3.1), el cual consta de una estructura rígida semicircular formada por arcos de acero fijados al suelo cada 80 cm y cubierto de polietileno transparente de 0.1 mm sin aditivos. En uno de los extremos se colocó una fuente de calor, que corresponde a una estufa eléctrica (turboventilador) de 1800W con termostato, el otro extremo se dejó abierto. El suelo se cubrió con una capa de planchas de poliestireno expandido de 15 mm de espesor. Dentro del túnel se instalaron 3 registradores de temperatura (Data logger) a 1, 4 y 8 m desde el inicio (estufa), con el fin de registrar las temperaturas diarias, para posteriormente graficar el comportamiento de las mismas.

Para este ensayo, se utilizaron bulbos florales de la especie *Rhodophiala aff. chilensis* recolectados en abril de 2006 en la localidad de Putú, bulbillos de *R. splendens* (clones del genotipo S363), provenientes de cultivo *in vitro* de la U. Austral y bulbos de *R. montana* con calibre floral cultivado en el invernadero de la E/E Panguilemo de la Universidad de Talca.

Los bulbos fueron colocados en bolsas plásticas negras de 15x20 cm con un sustrato compuesto por turba y perlas de poliestireno expandido en proporción 2:1 el cual fue previamente humedecido. Previo a la plantación, después de eliminar las hojas, los bulbos fueron sumergidos durante 10 min en una solución de Captan al 0,1% p/v.



Figura 3.1 Túnel de gradiente térmico, en el invernadero de la E/E Panguilemo

Metodología.

Los bulbos recolectados fueron calibrados, pesados y se registró el número de hojas, la presencia de raíces y de tallos florales en cada uno. Posteriormente se les eliminaron las hojas a todos y se repartieron en 3 grupos (para realizar plantaciones en tres fechas distintas) teniendo la precaución de dejar bulbos de todos los calibres en cada uno. Posteriormente, cada grupo se subdividió aleatoriamente en 3 subgrupos (1 para cada nivel de temperatura dentro del túnel). Estos bulbos fueron mantenidos en bolsas de polietileno con aserrín húmedo a temperatura ambiente, hasta el momento de iniciado el experimento.

El ensayo se estableció el día 25 de mayo de 2006 con la plantación del primer grupo de bulbos. Un tercio de ellos se colocó en la zona cercana al inicio del túnel (subgrupo1), otro tercio en el medio (subgrupo 2) y el tercio restante (subgrupo 3) al final. Los bulbos de los otros dos grupos se mantuvieron refrigerados hasta el momento de la plantación.

La segunda plantación se realizó el día 24 de julio y la tercera se realizó el día 25 de agosto. El experimento fue conducido con un diseño completamente al azar con el factor fecha de plantación y bajo 3 temperaturas distintas. Además contó con 4 repeticiones por tratamientos de 5 bulbos cada repetición. Los tratamientos fueron los siguientes:

- | | |
|----|--------------------------------------|
| T1 | Primera plantación, inicio del túnel |
| T2 | Primera plantación, medio del túnel |
| T3 | Primera plantación, final del túnel |
| T4 | Segunda plantación, inicio del túnel |
| T5 | Segunda plantación, medio del túnel |
| T6 | Segunda plantación, final del túnel |
| T7 | Tercera plantación, inicio del túnel |
| T8 | Tercera plantación, medio del túnel |
| T9 | Tercera plantación, final del túnel |

Los bulbos florales de *R. montana* que se encontraban en contenedores plásticos en el invernadero de la E/E, también fueron separados en tres grupos y se estableció un grupo al comienzo del túnel, un grupo en medio del túnel y otro grupo al final, esto se realizó en una sola fecha, ya que el número de bulbos florales es bajo.

Los bulbillos de *R. splendens* de cultivo in vitro también se separaron en tres, estableciéndose cada uno en un sector del túnel, en una sola fecha, la misma que para *R. montana*, el 18 de mayo de 2006.

3.1.3.2 Estudios de fenología.

Se comenzó un experimento de almacenaje a diferentes temperaturas de una especie de amarilidácea, la cual fue recolectada en un predio particular del sector Alto Pangue, en la ribera norte del Río Claro, en receso vegetativo. Después de su floración se determinó que era una especie de *Rhodophiala*.

Para el experimento se utilizaron bulbos con calibre floral, considerándose 6/7 como el mínimo, ya que a partir de la disección realizada a un bulbo calibre 5/6 no se encontraron estructuras florales visibles y al disectar uno de calibre 6/7 se observaron 3 órganos diferenciados en el centro del bulbo. Por su pequeño tamaño no se distinguieron estructuras florales dentro de cada uno, pero como eran 3 se asumió que uno era el meristema vegetativo y los otros 2 eran primordios florales.

Además de recolectar bulbos se recogió tierra del mismo sector para ser utilizada en la posterior plantación. Se envió una muestra para análisis de suelo.

La plantación se realizó en botellas plásticas desechables de 600 cc, las cuales se utilizaron en forma invertida, eliminándose la base de las mismas y realizando perforaciones en la zona más angosta y en la tapa para facilitar el escurrimiento del agua de riego y permitir una adecuada aireación del sustrato.



Figura 3.1 Bulbos recolectados

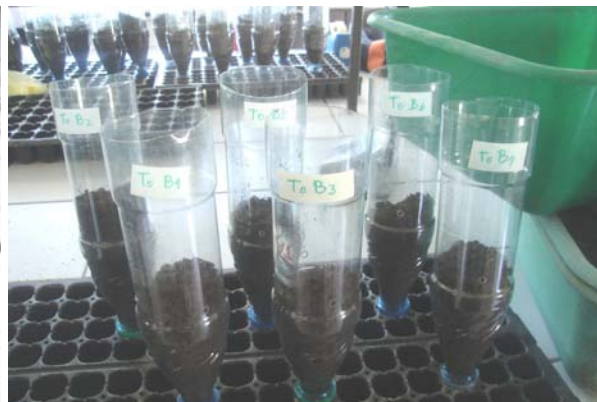


Figura 3.2 Botellas desechables en proceso de llenarse con sustrato para proceder a la plantación

El día 9 de enero de 2007 se estableció un experimento para estudiar la respuesta de los bulbos a 6 condiciones de almacenaje. Los tratamientos fueron los siguientes:

T0 Control o Testigo, plantación el día de establecimiento del experimento

T1 1 mes de almacenaje a 5°C

- T2 2 meses de almacenaje a 5°C
- T3 3 meses de almacenaje a 5°C
- T4 1 mes de almacenaje a 18-20°C
- T5 2 meses de almacenaje a 18-20°C
- T6 3 meses de almacenaje a 18-20°C

Se utilizaron 6 bulbos por tratamiento

El almacenaje a 5°C se realizó en el refrigerador del Laboratorio de Hortalizas. Los bulbos almacenados a 18-20°C se mantuvieron en la bodega del mismo laboratorio.

Se evaluó fecha de emergencia, número de hojas mensualmente y número total de hojas, fecha de floración, porcentaje de floración, características florales.

3.1.3.3 Estudios de poscosecha.

Se realizaron dos experimentos de poscosecha en la especie *R. montana*. Uno de pulsado en soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa y uno de mantención en soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa.

Experimento de pulsado.

Las flores recién cosechadas, se colocaron en tubos, los cuales contenían soluciones con diferentes concentraciones de sacarosa y se mantuvieron en la nevera hasta su llegada al laboratorio. Una vez en éste, se sacaron los tubos con flores de la nevera y se dejaron a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente las flores se sacaron de la solución de pulsado y se colocaron en una caja dentro del refrigerador durante un día. Transcurrido este tiempo se sacaron del refrigerador y se colocaron en tubos de ensayo con agua destilada. Las soluciones se prepararon utilizando agua destilada y sacarosa, el pH se ajustó con ac. cítrico. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- T0 agua destilada, pH 3,5-4
- T1 6% sacarosa, pH 3,5-4
- T2 12% sacarosa, pH 3,5-4
- T3 18% sacarosa, pH 3,5-4
- T4 24% sacarosa, pH 3,5-4

Se utilizaron 4 flores por tratamiento.

Experimento de soluciones de mantención.

Las flores recién cosechadas fueron colocadas en tubos con agua destilada pura y colocadas en la nevera. Al llegar al laboratorio se sacaron de los tubos con agua y se colocaron en una caja de cartón en la parte baja del refrigerador. Se mantuvieron 2 días en estas condiciones. Transcurrido este tiempo se sacaron del refrigerador y se colocaron en tubos con soluciones de mantención, las cuales tenían diferentes concentraciones de azúcar. Las soluciones se prepararon utilizando agua destilada y sacarosa, el pH se ajustó con ac. cítrico. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- T0 Agua destilada
- T1 Agua destilada, pH 3,5-4,0
- T2 5% azúcar, pH 3,5-4,0
- T3 10% azúcar pH 3,5-4,0
- T4 15% azúcar pH 3,5-4,0

Se utilizaron 5 flores por tratamiento

Para ambos experimentos las flores se mantuvieron en una nevera durante todo el transporte (desde cosecha hasta llegada al laboratorio), registrándose la temperatura interna. Ambos experimentos se realizaron en una sala con iluminación acondicionada especialmente para esto. En ambos casos se evaluaron:

- Días a apertura de la primera flor
- Vida útil (50% de florecillas senescentes)
- Absorción de solución
- Florecillas abortadas por vara.

3.1.4 Cultivo de híbridos.

Todos los bulbos provenientes de cruzamientos se mantuvieron dentro del invernadero, se regaron con la misma frecuencia que los demás, al final del proyecto se separaron a contenedores de diferentes tamaños separados por el cruzamiento del híbrido. Los que estaban en mayor cantidad se colocaron en contenedores más grandes y viceversa, y cada contenedor se identificó con una placa que indica los padres, el año de siembra y el número de bulbos. Se espera que algunos de los que tienen 3 años florezcan durante la temporada 2008-2009.

3.1.5 Formar una colección de especies de *Rhodophiala* a partir de bulbos.

Se trasladaron a la Estación Experimental Panguilemo todos los bulbos y se colocaron en el suelo en un lugar cedido por el gerente del campo. Se utilizaron 2 cajones de 9 m de largo por 1 de ancho y 6 cajones de 2,7 m de largo por 1 de ancho. Se preparó el suelo en su interior y se aplicó glifosato para el control de malezas, posteriormente comenzaron a trasladarse los bulbos. Se instaló un sistema de riego automático por microaspersores, para facilitar el cuidado de las plantas y todos los cajones se cercaron con malla hexagonal de 80 cm de alLura, para prevenir que los conejos dañen las plantas. Los híbridos serán mantenidos dentro del invernadero en macetas, al igual que las plantas tetraploides. A todas las macetas se les instaló una placa acrílica con el nombre de la especie, su procedencia y año de plantación, los bulbos que quedaron al exterior también llevan placas acrílicas con los datos mencionados anteriormente.

3.1.6 Evaluación de plantas diploides y poliploides.

Se registró el número de hojas, no fue posible evaluar la floración en las plantas poliploides, consistentes en una planta de *R. splendens* y tres de *R. montana*.

3.1.7 Otras actividades.

3.1.7.1 Estudios de la presencia de micorrizas.

Se analizaron las raíces de dos especies, para esto se recolectaron bulbos desde su hábitat natural y se trasladaron al laboratorio para su estudio.

Los bulbos se extrajeron cuidadosamente para no dañar las raíces finas y se colocaron en toallas de papel humedecido o en suelo del mismo lugar donde se realizó la extracción del bulbo.

R. bagnoldii se recolectó en un sector ubicado aproximadamente 50 km al sur de La Serena, donde se encontraban en gran cantidad, se recolectaron 5 bulbos. *R. splendens*, se recolectó en la VI Región camino a Termas del Flaco, en un predio particular denominado “La Polcura”. También se recolectaron 5 bulbos. Una vez tomadas las muestras se colocaron en bolsas plásticas dentro de neveras para evitar la deshidratación de los bulbos y la pérdida de calidad de las muestras.

Una vez que las muestras de raíces obtenidas en terreno fueron lavadas cuidadosamente, quitando todas las partículas de suelo u otros elementos indeseables, se procedió a la selección de raíces factibles de ser analizadas bajo el microscopio. Éstas correspondieron a raíces más finas o fibrosas (raicillas), evitando las más oscuras, viejas y gruesas, pues no presentan micorrizas y si las tienen son difíciles de visualizar.

Como no se sabía de antemano si se encontrarían micorrizas en *Rhodophiala* y mucho menos el tipo de micorrizas si es que eventualmente existían; se utilizaron para su estudio técnicas de observación e identificación que se usan en general para todas las especies. Esto es posible ya que aunque los tipos de micorrizas son distintos, las raíces micorrizadas tienen en común algunos caracteres macroscópicos y microscópicos, como por ejemplo, la presencia de arbuscúlos y vesículas en VAM; vaina, red de Hartig, color, ramificación, etc.

Para favorecer la visualización de las hifas, vesículas y arbuscúlos del hongo micorrízico, se sometieron las raíces a un proceso de aclarado con una solución de KOH caliente al 10% durante 10 minutos (más tiempo si éstas son gruesas o tienen muchos taninos, ya que necesitarán un mayor aclarado). Una vez enfriadas se eliminó la solución y se lavaron las raíces con agua destilada.

Luego, se cubrieron con una solución de HCl (0,1 N) por 5 minutos para neutralizar el KOH residual que hubiera quedado en las raíces y luego se eliminó el sobrenadante. Si las raíces no quedaban blancas (por ejemplo, mantenían colores amarillentos) se repetía el proceso de aclarado, dejando actuar más tiempo al KOH. Posterior a esto las muestras se tiñeron con colorante Azul Tripán 0,05% en lactoglicerol. De esta forma quedaron preparadas para su observación microscópica.

3.1.7.2 Salidas a terreno

El 25 de abril de 2006 se realizó una recolección de material vegetal en la localidad de Putú, con el fin de realizar un estudio sobre el desarrollo, crecimiento y floración de esta especie a diferentes temperaturas. Se eligió esta especie, ya que es la que muestra mejor adaptación al trasplante, es decir su floración se ve afectada en menor proporción que otras especies de *Rhodophiala*, además el sitio de recolección es de uso agrícola, por lo tanto, esta especie está siendo eliminada por las prácticas de manejo utilizadas en el cultivo.

Se recogió una gran cantidad de material vegetal para que el experimento contara con una buena cantidad de repeticiones por cada tratamiento. Los bulbos fueron levantados del terreno con picota o pala, y se colocaron en bolsas de plástico. Se trasladaron al Laboratorio de Hortalizas de la Facultad de Ciencias Agrarias donde fueron mantenidos a temperatura ambiente en bolsas de polietileno con aserrín húmedo. Posteriormente fueron separados según calibre, eligiéndose para el ensayo todos aquellos de calibre superior a 6/7, considerando que el mínimo floral de la especie es 4/5.

Al recorrer el sector de Alto Pangue en diciembre de 2006 se observó que algunas plantas presentaban frutos similares a las del género *Rhodophiala* y *Phycella*, los cuales contenían semillas también similares. Al sacar los bulbos del terreno, observamos que éstos eran muy parecidos a los de las especies antes mencionadas. Otra particularidad fue que los bulbos extraídos eran florales (tenían restos de tallo floral) y sus calibres no eran muy grandes, y finalmente la razón que nos motivó a sacar bulbos para estudio fue que éstos se encontraban en pleno receso vegetativo, con ausencia total de follaje y sin crecimiento de raíces, lo que se notó al extraer los bulbos del terreno ya que éstos no ofrecían mayor resistencia, por el contrario, era muy fácil sacarlos. Al verlos nos dimos cuenta de que no tenían raíces en esta época.

El 9 de enero se realizó la recolección del material vegetal en Alto Pangue, para estudiar su comportamiento en almacenaje. Utilizando pala y picota, se extrajeron bulbos de diferentes sectores, teniendo la precaución de no sacar la totalidad de los bulbos que se encontraban en cada sector y dejando el suelo lo más parecido posible a como estaba antes de extraer los bulbos. Los bulbos se colocaron en bolsas de papel y fueron trasladados hasta el Laboratorio de Hortalizas.

El 15 de enero de 2007 se realizó una excursión a Laguna del Maule, para recolectar flores de *R. montana*, las cuales se utilizarían posteriormente en experimentos de poscosecha, se definió como estado de madurez de cosecha el estado en que la vaina comienza a abrirse y se empieza a ver la flor. Las flores cosechadas fueron colocadas en tubos de ensayo con agua destilada o con las soluciones indicadas según el tratamiento correspondiente y se conservaron en una nevera hasta la llegada al Laboratorio. Durante todo el traslado se registró la temperatura dentro de la nevera.

El 30 de agosto de 2007 se realizó una excursión al predio La Polcura ubicado en la VI región, camino a Termas del Flaco, con el fin de recolectar bulbos de *R. splendens* para los estudios de presencia de micorrizas, se recorrió el lugar y se en la parte baja del predio cercana al Río Tinguiririca encontró una pequeña población de la especie. Se recolectaron 5 bulbos, teniendo mucha precaución para no dañar las raicillas que posteriormente serían examinadas.

El 9 de septiembre de 2007 se realizó una nueva excursión, esta vez hacia el norte, con el fin de recolectar otras especies de *Rhodophiala* también para los estudios sobre presencia de micorrizas. Durante dos días se recorrieron varios lugares y se recolectaron bulbos de *R. bagnoldii* al norte de la Serena (aprox. 50 km) y de *R. phycelloides* en Caleta Horno.

El 15 de enero de 2008 se realizó una excursión a La Polcura, esta vez para recolectar flores para realizar un experimento de poscosecha, lamentablemente, la floración fue muy baja y ya estaba terminando, por lo cual no se pudo recolectar. En vista de esto ese mismo día subimos hasta Radal 7 tazas con el mismo fin pero en este sector la floración también estaba terminando. Lamentablemente no se pudo realizar el experimento de poscosecha que estaba previsto.

El 22 de Enero viajamos a Santiago para visitar el Laboratorio de Resonancia Magnética de la P. Universidad Católica de Chile, con el fin de someter algunos bulbos a este procedimiento para observar si existían yemas florales en su interior sin destruirlos. Se llevaron varios bulbos entre ellos 2 tetraploides, uno de *R. montana* y uno de *R. splendens*, pero no fue posible obtener imágenes claras de ellos.

3.1.7.3 Acondicionamiento salta de ensayos

Durante los meses de octubre y noviembre de 2007 se realizaron los trabajos para acondicionar una salta con el equipamiento necesario para realizar los estudios de poscosecha, se instalaron tubos fluorescentes y un equipo de aire acondicionado.

3.1.7.4 Recuento de número de hojas

Se continuó con el recuento de número de hojas sobre los bulbos de tres especies.

3.2 Principales problemas metodológicos enfrentados

3.2.1 Identificar y caracterizar 8 especies de *Rhodophiala*

No hubo problemas al respecto.

3.2.2 Determinar la temperatura óptima para lograr la engorda rápida de los bulbos, incluyendo protocolo de fertilización.

Como en ocasiones anteriores el principal problema metodológico fue la falta de bulbos de calibre homogéneo y número adecuado para realizar los experimentos, por lo que debieron usarse plántulas para realizar este estudio.

Otro problema que incidió en el desarrollo del experimento de Cultivo con calefacción fue que las altas temperaturas primaverales asociada tal vez a algún patógeno provocaron la muerte de muchas plántulas, con lo cual los resultados de ese experimento fueron afectados.

En el caso de Cultivo en túnel de gradiente tuvieron que modificarse los tratamientos porque se detectó un problema con el número de repeticiones de uno de los factores.

3.2.3 Realizar estudios preliminares sobre control de floración y poscosecha de las especies.

La principal limitante fue el número de bulbos en el caso del experimento de control de floración. En el caso de la poscosecha sólo se realizó un ensayo en *R. montana*, como se mencionó anteriormente, al salir a terreno para recolectar flores de *R. splendens* la floración estaba concluyendo y no se encontraron suficientes varas florales.

3.2.4 Cultivo de híbridos.

No se detectaron problemas.

3.2.5 Formar una colección de especies de *Rhodophiala* a partir de bulbos.

No se detectaron problemas.

3.2.6 Evaluación de plantas diploides y poliploides.

No fue posible evaluar la floración de los poliploides.

3.2.7 Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto y explicación de estas modificaciones.

En el experimento de cultivo en túnel de gradiente térmico se modificaron los tratamientos originales, quedando el experimento conducido en un diseño completamente al azar con un factor, la fecha de plantación, en tres niveles. Finalmente se evaluó el efecto de la fecha de plantación sobre características de floración y desarrollo de las plantas.

4. Descripción de las actividades y tareas ejecutadas

2006

Obj espe	Actividad N°	Descripción	Programada	Ejecutada	
1	1				
2	1	Cultivar los bulbos en condiciones de temperatura controlada (sustrato y ambiental).	si	Si	
2	2	Experimentos de fertilización	si	no	En exp. previo no se encontraron diferencias
3	1	Experimentos de exposición al frío	si	Si	
3	2	Experimentos de aplicación de ácido giberélico	sí	no	Por baja cantidad de bulbos florales
3	3	Experimentos de poscosecha	sí	sí	
4	1	Cultivo de semillas provenientes de cruzamientos	sí	sí	
5	1	Recolección de bulbos flores e información	sí	sí	
5	2	Establecimiento de los bulbos en el lugar definido	sí	no	No estaba definido el lugar
6	1	Evaluación de poliploides	sí	sí	
6	2	Registro de número de hojas	sí	sí	

2007

Obj esp	Actividad N°	Descripción	Programada	Ejecutada	
1	1				
2	1	Cultivar los bulbos en condiciones de temperatura controlada (sustrato y ambiental), aplicando protocolo de fertilización	sí	no	
3	1	Experimentos de exposición al frío	sí	sí	
3	2	Experimento de aplicación de ácido giberélico	si	no	Por baja cantidad de bulbos florales
3	3	Experimentos de poscosecha	si	no	Se adelantó la floración

					no hubo flores
4	1	Cultivo de híbridos	Si	Si	
5	1	Recolección de bulbos y flores	Si	Si	
5	2	Establecimiento de los bulbos en lugar definido	Si	Si	
6	1	Evaluación de poliploides	Si	Si	
6	2	Registro de número de hojas	Si	Si	

5. Resultados del proyecto

5.1 Determinar la temperatura óptima para lograr la engorda rápida de los bulbos, incluyendo protocolo de fertilización.

5.1.1 Estudios de crecimiento bajo temperatura controlada de sustrato y ambiente.

En la figura 4.1 se observa la evolución en el número de hojas durante los meses de duración del experimento para la especie *R. ananuca*. En los cuatro tratamientos se registró un comportamiento similar, las plantas alcanzaron un máximo número de hojas durante los meses de junio y julio, luego este valor decreció en forma constante, las plantas sin calefacción retuvieron por mayor tiempo el follaje.

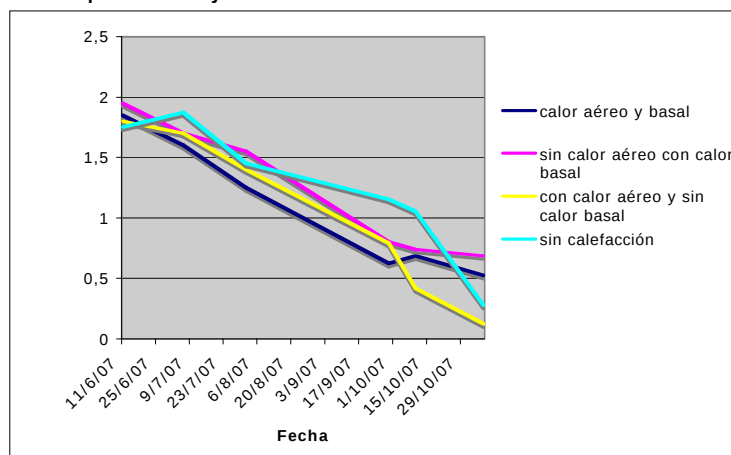


Figura 5.1. Evolución en el número de hojas en plantas de *R. ananuca* cultivadas bajo diferentes condiciones térmicas

En el caso de *R. splendens* en número de hojas se mantuvo constante durante la temporada evaluada para todos los tratamientos con calefacción. En el caso de las plantas que no contaron con calor basal ni aéreo, el número de hojas se redujo llegando a un mínimo entre julio y agosto cercano a 0,2 hojas por planta (Figura 4.2). Hacia el final de la temporada todos los tratamientos mostraron un comportamiento similar, pero siempre el número de hojas fue menor en las plantas sin calefacción.

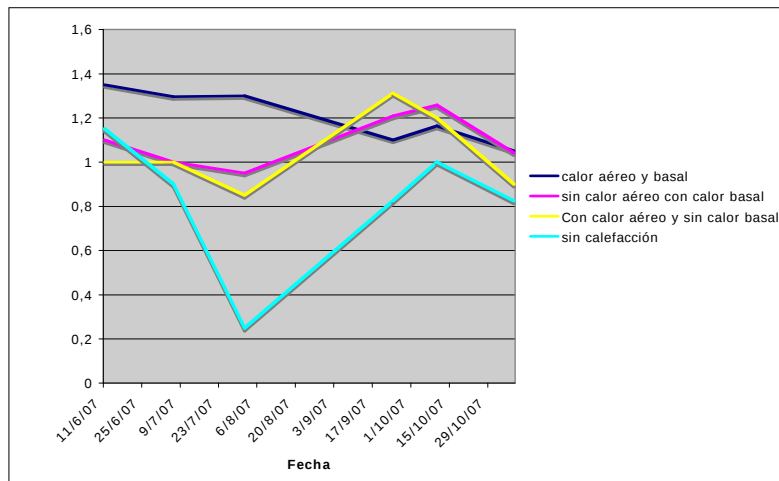


Figura 5.2. Evolución en el número de hojas en plantas de *R. splendens* cultivadas bajo diferentes condiciones térmicas

La especie *R. bagnoldii* mostró un comportamiento similar a *R. ananuca*, con un máximo de producción de hojas al principio de la temporada de medición y un posterior descenso. Al igual que *R. ananuca*, las plantas sin calefacción mantuvieron su área foliar por un periodo de tiempo mayor que el resto de los tratamientos

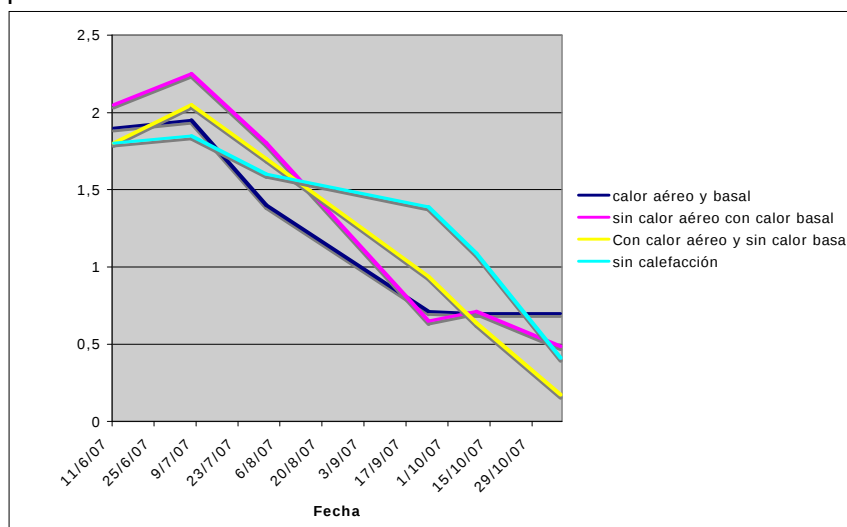


Figura 5.3. Evolución en el número de hojas en plantas de *R. bagnoldii* cultivadas bajo diferentes condiciones térmicas

Al analizar estadísticamente los pesos y diámetros finales de los cuatro tratamientos, se encontraron diferencias significativas entre ellos sólo para diámetro en la especie *R. splendens*, el cual fue mayor para los tratamientos con calefacción basal o aérea, en los otros parámetros no hubo diferencias esto se puede atribuir a la época en que se realizó el experimento

Cuadro 4.1 Efecto de los tratamientos sobre el peso y diámetro a cosecha de tres especies de *Rhodophiala*

Tratamiento	Especie					
	<i>R. ananuca</i>		<i>R. splendens</i>		<i>R. bagnoldii</i>	
	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)	Peso (g)	Diámetro (mm)
Con calefacción aérea y basal	0,45	4,6	1,67	4,89	0,53	4,88
Sólo calefacción basal	0,45	4,98	1,07	5,18	0,46	4,95
Sólo calefacción aérea	0,51	4,86	0,83	5,28	0,56	5,09
Sin calefacción	0,57	4,64	0,68	4,89	0,71	4,85
Significancia	n. s.	n. s.	n. s.	*	n. s.	n. s.

Valores seguidos por la misma letra en las columnas, no difieren estadísticamente entre si (LSD, $p < 0,05$)

5.2. Realizar estudios preliminares sobre control de floración y poscosecha de las especies.

5.2.1 Estudios de crecimiento y floración.

En el cuadro 4.2 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de cultivo en túnel de gradiente para las variables días a emergencia y días a floración. Se encontraron diferencias significativas en los días a emergencia en los sectores más cerca y más lejos de la estufa siendo menores los días a emergencia para las fechas de plantación más tempranas en el sector al inicio del túnel, el caso del sector final, un menor número de días a emergencia se registró con la segunda fecha de plantación.

Para la variable días a primera flor se obtuvieron diferencias significativas en el sector inicial, siendo menores los días a primera flor para la plantación más tardía. En los sectores medio y final también los días a primera flor fueron menores para las plantaciones más tardías, en estos casos las diferencias fueron altamente significativas.



Figura 4.4a Floración de *Rhodophiala* sp. (Putú)

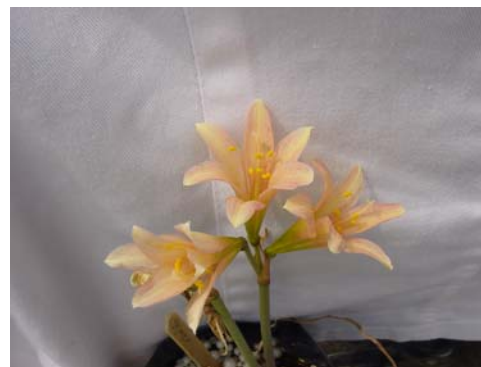


Figura 4.4b Floración de *Rhodophiala* sp. (Putú)

Cuadro 4.2 Días a emergencia y días a floración

Fecha de plantación	Días a emergencia			Días a primera flor		
	SI	SM	SF	SI	SM	SF
25/05/06	22,9 a	21,5	36,7 b	183,7 b	200 b	194,2 b
24/06/06	23 a	33,9	16,7 a	166,4 ab	170,7 a	166 a
21/07/06	42,3 b	36,6	37,2 b	150,5 a	152,5 a	166,9 a
Significancia	*	n.s.	**	*	**	**

Valores seguidos por la misma letra en las columnas, no difieren estadísticamente entre sí (LSD, $p < 0,05$)

SI=sector más cerca de la estufa, SM=sector del medio, SF=sector más lejos de la estufa

Al analizar características florales como el largo de vara, se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas entre las tres fechas de plantación siendo más largas las de la primera y segunda fecha en el sector inicial del túnel, en los otros sectores no hubo diferencias significativas.

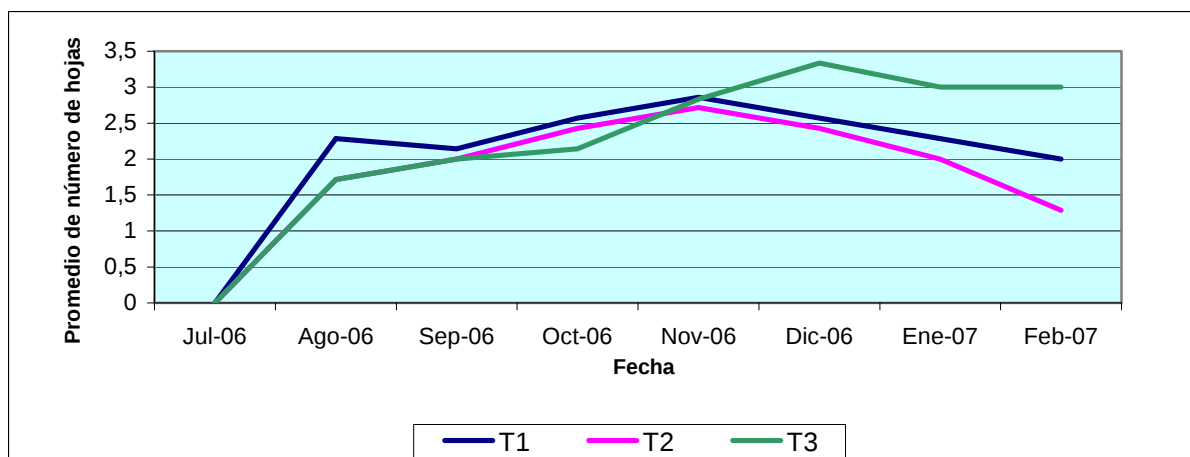
Para las otras características florales medidas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Otra característica interesante que muestra esta especie es que el color de las flores puede variar desde el rojo al naranja claro, como se observa en las figuras 4.4a y 4.4b.

Cuadro 4.3 Características florales.

Fecha de plantación	Largo de la vara (cm)			Longitud de tépalos (cm)			Cantidad de varas florales			Cantidad de florecillas por vara		
	SI	SM	SF	SI	SM	SF	SI	SM	SF	SI	SM	SF
25/05/06	20,1 a	18,1	19,5	4,5	4,3	4,4	1,0	0,9	0,85	1,6	1,4	1,39
24/06/06	21,3 a	13,5	18,1	5,1	3,5	4,1	1,0	0,7	0,9	1,56	1,2	1,54
21/07/06	16,7 b	15,6	21,4	4,3	4,1	4,3	0,6 5	0,9	0,7	1,1	1,0	1,16
Significancia	**	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

En la figura 4.5 se muestra la evolución en el número de hojas en la especie *R. montana* en cada uno de los sectores del túnel, siendo T1 la zona más cercana a la estufa, al comienzo del ensayo, en los meses invernales el desarrollo de hojas fue levemente superior en la zona más cercana a la estufa, al transcurrir la temporada las plantas ubicadas en el sector contiguo a la estufa siempre mostraron un valor superior al igual que aquellas ubicadas en la zona intermedia. A partir de noviembre, se observa que el número de hojas comienza a decrecer en aquellas plantas que están más cercanas a la fuente de calor. Por el contrario, las plantas del sector más alejado (T3) continuaron aumentando su área foliar hasta llegar a 3 hojas por planta como promedio.

Figura 4.5 Evolución del número de hojas por planta de *R. montana*, mantenidas en túnel de gradiente térmico desde mayo de 2006.



Al analizar la floración de las plantas en los diferentes sectores no se obtuvieron diferencias significativas estadísticamente, aunque el porcentaje de plantas que florecieron fue mayor en el sector más alejado de la fuente de calor. Con relación a los días a floración tampoco se registraron diferencias estadísticamente significativas, esto probablemente debido a que eran pocas plantas en evaluación.

Cuadro 4.4 Días y porcentaje de floración en plantas de *R. montana* mantenidas en túnel de gradiente térmico desde mayo de 2006.

Tratamiento	Días a floración	Floración (%)
Sector 1	215	14
Sector 2	153	14
Sector 3	177	57
Significancia	n. s.	n. s.

n. s. : No significativo

5.2.2 Estudios de fenología.

En la figura 4.6 se observa la evolución del área foliar para los diferentes tratamientos. Las plantas que se mantuvieron almacenadas a 5°C desarrollaron en general una menor área foliar que el testigo (color verde) y que los tratamientos de almacenaje a 20°C. Las plantas almacenadas por 3 meses a 5°C y a 20°C emergieron en fechas similares, sin embargo, las plantas mantenidas a 20°C alcanzaron más de 3 hojas por planta, y las almacenadas a 5°C alcanzaron 2.

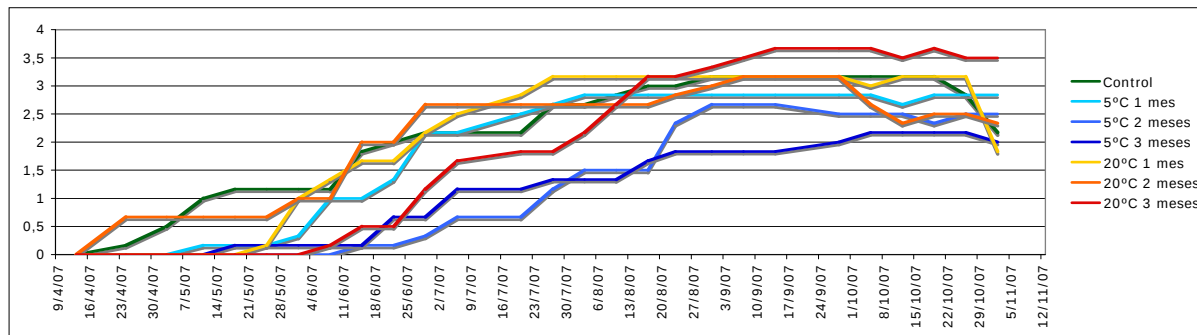


Figura 4.6 Evolución del número de hojas por planta para los diferentes tratamientos en *Rhodophiala* sp. recolectada en sector Alto Pangue.

El almacenaje en frío también podría afectar la floración, como se observa en el cuadro 4.5. Ninguno de los bulbos almacenados a 5°C por 3 meses floreció, y al analizar la fecha de floración se observa que los bulbos almacenados a 20°C florecieron casi un mes antes que los bulbos almacenados en frío y que el testigo plantado el mismo día del inicio del experimento.

Cuadro 4.5 Registro de floración en bulbos de *Rhodophiala* sp. Alto Pangue con diferentes tratamientos de almacenaje.

Tratamiento	Fecha de floración y (Nº de bulbos)	Nº de bulbos con flor totales
Control	5/10/07 (1)	1 de 6
5°C 1 mes	5/10/07(1)	1 de 6
5°C 2 meses	5/10/07 (1); 12/10/07 (1)	2 de 6
5°C 3 meses		0 de 6
20°C 1 mes	14/9/07 (1); 28/09/07 (3)	4 de 6
20°C 2 meses	14/9/07 (1)	1 de 6
20°C 3 meses	14/9/07 (1); 5/10/07 (1)	2 de 6

Al analizar estadísticamente los diámetros finales y al aumento en el diámetro durante la temporada de crecimiento, no se obtuvieron diferencias significativas, por lo tanto no es posible determinar si alguno de los tratamientos afectó o favoreció el desarrollo del bulbo.

Cuadro 4.6 Diámetro de los bulbos a cosecha e incremento en el diámetro en *Rhodophiala* sp. Alto Pangue.

Tratamiento	Diámetro final (mm)	Aumento en el diámetro (mm)
1 mes almacenaje a 5°C	27,77	2,67
2 meses almacenaje a 5°C	27,78	2,68
3 meses almacenaje a 5°C	27	1,86
1 mes almacenaje a 20°C	29,52	3,41
2 meses almacenaje a 20°C	26,97	2,2
3 meses almacenaje a 20°C	31,23	3,8
significancia	n. s.	n. s.

n. s. : No significativo

La figura 4.7 muestra el desarrollo que experimentaron las raíces durante el almacenaje. Tanto a 5°C como a 20°C se observó un abundante desarrollo de raíces, no así la emergencia de hojas, las que sólo aparecieron después de plantar; 1 y 2 meses después de la emergencia del testigo en bulbos a 5°C y 0 y 1 meses después de la emergencia del testigo en bulbos a 20°C.



Figura 4.7 Desarrollo de raíces durante el almacenaje en *Rhodophiala* sp. (Alto Pangué)



Figura 4.8 Floración en *Rhodophiala* sp. (Alto Pangué)

Como esta especie se recolectó en estado de receso no teníamos claro como serían las flores, pensábamos que serían más grandes que las demás *Rhodophiala* basados en el tamaño de los frutos que vimos cuando visitamos Alto Pangué en diciembre de 2006, en la Figura 4.8 se observa la vistosa floración de esta especie, el diámetro aproximado del perigonio es de 10 cm. Revisando las claves disponibles con el botánico P. Peñailillo, Esta especie podría ser *Rhodophiala colona*.

5.2.3 Estudios de poscosecha.

Experimento con solución de mantención.

Las varas florales se mantuvieron durante dos días almacenadas en seco en una caja de cartón dentro del refrigerador, al sacarlas luego de este tiempo, se observó que habían perdido turgor, sin embargo, al colocarlas en tubos con las respectivas soluciones las varas recuperaron la firmeza. En el Cuadro 4.7 se resumen los resultados de la mantención de flores de *R. montana* en varios tipos de soluciones. En la variable número de días a apertura de la primera flor no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, y este tiempo fluctuó entre 1 y 1,2 días. Para la variable vida útil los resultados mostraron que utilizando soluciones con azúcar, independientemente de la concentración se logra mayor vida útil de las varas, alcanzando 5,8 a 6,4 días. Al parecer, el uso de soluciones con pH entre 3,5 y 4 también contribuye a lograr una mayor vida de florero. En la variable, absorción de solución, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas y esta varió entre 3,62 y 5,2 mL. En el caso de la variable aborto de flores no se obtuvieron diferencias estadísticamente, pero en todos los tratamientos se registraron flores abortadas.

Cuadro 4.7 Resultados del experimento de mantención.

<i>Tratamiento</i>	Días a apertura de primera flor	Vida útil (días)	Absorción de solución (mL)	Aborto de flores (%)
Agua destilada pura	1	4.8 c	3.62	13
Agua destilada pH 3.5 a 4	1	5 bc	3.52	20
5% azúcar pH 3.5 a 4	1.2	5.8 ab	5.2	10
10% azúcar pH 3.5 a 4	1	6.4 a	4.92	6
15% azúcar pH 3.5 a 4	1	5.8 ab	3.72	9
significancia	n. s.	**	n. s.	n. s.

n. s. : No significativo; * : significativo $p \leq 0,05$; **: altamente significativo $p \leq 0,01$ Valores en una misma columna seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas según Test de Duncan

Experimento de pulsado.

Se había planificado que después del pulsado las varas se almacenarían en frío durante 2 días y posteriormente de colocarían en florero, sin embargo, esto no fue posible ya que después de 24 hrs de pulsado la mayoría de las varas presentaban flores abiertas, esto explica los Valores que aparecen en la columna días a apertura de primera flor del Cuadro 4.8. Para la variable vida útil, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, las flores que recibieron pulsado comenzaron a abrir muy rápidamente y duraron (en tubos con agua destilada) entre 4,25 y 5,5 días, la absorción de pulsado también fue similar entre los diferentes tratamientos. En el caso de la variable aborto de flores no hubieron diferencias estadísticamente significativas, y en general el aborto de flores fue nulo en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento con 12% de azúcar en que 2 botones florales abortaron.

Cuadro 4.8 Resultados del experimento de pulsado.

<i>Tratamiento</i>	Días a apertura de primera flor	Vida útil (días)	Absorción de solución (mL)	Aborto de flores (%)
Agua destilada pura pH 3,5 a 4	0.5	4.25	0.55	0
6% azúcar pH 3,5 a 4	0.25	5.25	0.625	0
12% azúcar pH 3,5 a 4	0.5	4	0.6	20
18% azúcar pH 3,5 a 4	0.25	5.5	0.65	0
24% azúcar pH 3,5 a 4	0.5	4.75	0.6	0
significancia	n. s.	n.s		

n. s. : No significativo; * : significativo $p \leq 0,05$; **: altamente significativo $p \leq 0,01$ Valores en una misma columna seguidos de letras distintas indican diferencias estadísticas según Test de Duncan

5.3 Cultivo de híbridos.

El cuadro 4.9 muestra el número de bulbos híbridos que se encuentran actualmente en Cultivo en el invernadero de la Estación Experimental.

Cuadro 4.9 Híbridos en cultivo.

Cruzamiento	Edad (años)	Nº de bulbos
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	2	22
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	2	29
<i>R. Las trancas</i> x <i>R. montana</i>	2	27
<i>R. Caleu</i> x <i>R. splendens</i>	2	34
<i>R. Las trancas</i> x <i>R. montana</i>	2	21
<i>R. Las trancas</i> x <i>R. montana</i>	2	30
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	2	17
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	2	12
<i>R. splendens</i> x <i>R. montana</i>	2	11
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. splendens</i>	2	10
<i>splendens</i> x <i>R. Montana</i>	2	16
<i>R. splendens</i> x <i>R. ananuca</i>	2	3
<i>R. montana</i> x <i>R. ananuca</i>	2	7
<i>R. montana</i> x <i>R. ananuca</i>	2	3
<i>R. splendens</i> x <i>R. ananuca</i>	2	5
<i>R. montana</i> x <i>R. ananuca</i>	2	10
<i>R. splendens</i> x <i>R. advena</i>	2	11
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. ananuca</i>	2	3
<i>R. montana</i> x <i>R. Las trancas</i>	2	10
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	2	1
<i>R. splendens</i> x <i>R. Putú</i>	3	20
<i>R. splendens</i> x <i>R. Putú</i>	3	5
<i>R. montana</i> x <i>R. splendens</i>	3	13
<i>R phycelloides</i> x <i>R bagnoldii</i>	3	2
<i>R. montana</i> x <i>R. bagnoldii</i>	3	3
<i>R. phycelloides</i> x <i>R. bagnoldii</i>	3	2

5.4 Formación de una colección de especies de *Rhodophiala* a partir de bulbos.

Se trasladaron a un sector al aire libre dentro de la Estación Experimental Panguilemo todos los bulbos existentes recolectados durante la ejecución del proyecto, las especies que quedarán en esta colección son *R. montana*, *R. splendens*, *R. bagnoldii*, *R. ananuca*, *R. phycelloides*, *R. aff. chilensis* (Putú), *Rhodophiala* sp. (Alto Pangué) y *Rhodophiala* sp. (Cobquecura).

5.5 Evaluación de plantas diploides y poliploides.

5.5.1 Registro del número de hojas en bulbos poliploides y mixoploides.

En el caso de *R. splendens* poliploide se observa que el número máximo de hojas se registró durante los meses de octubre y noviembre, similar a temporadas anteriores, llegando a un máximo de 4 hojas por planta. Durante este último periodo, se ha observado un mínimo de 0 hojas, a partir de las evaluaciones de marzo, lo que podría indicar que esta especie ha entrado de receso, lo cual también se asocia con bulbos más grandes de calibre floral. Sin embargo, no se registró floración de esta planta tampoco durante la última temporada (2006-2007). En el caso de *R. splendens* mixoploide también se ha observado un aumento en el máximo número de hojas con respecto a temporadas anteriores, además, estas plantas han mostrado un periodo de receso que comienza aproximadamente en marzo desde hace 2 temporadas. *R. montana*, mixoploide, en cambio, ha mostrado un máximo 3 hojas, muy similar a los periodos anteriores, y también ha mostrado periodos de receso invernal desde hace 3 temporadas, tampoco se ha registrado floración en el caso de las plantas mixoploides. Al observar el comportamiento de los tres tipos de planta, se podría decir que la poliploide ha presentado un periodo juvenil más largo y está entrando en una fase adulta. Sin embargo, no es posible predecir un comportamiento en cuanto a la floración de esta planta, ya que las mixoploides que han presentado desde hace varias temporadas, una periodicidad parecida a la que presentan en forma natural, aun así, no han logrado florecer.

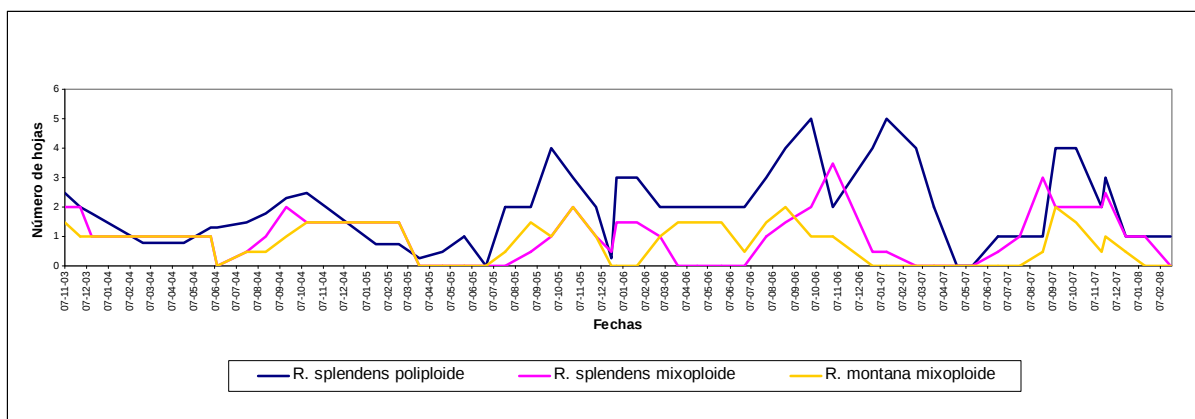


Figura 4.9 Número de hojas por bulbo en *Rhodophiala splendens* poliploide, mixoploide y *Rhodophiala montana* mixoploide trasladadas al invernadero Panguilemo desde Valdivia en julio de 2003

5.6 Otras actividades.

5.6.1 Estudios de la presencia de micorrizas.

El análisis microscópico mostró la existencia de raíces micorrizadas casi en el 100% de las muestras y para todas las especies estudiadas (Cuadro 4.11). Esto podría explicar en parte que cuando los bulbos son sacados de su hábitat y cultivado en mezclas de suelo corrientes, que se usan para cualquier tipo de cultivo, podrían afectarse algunas de sus características fisiológicas, incluso su floración.

Cuadro 4.11 Análisis de raíces.

Especie/ Lugar de recolección	Nº de bulbos muestreados	Nº total de raíces	Nº de raíces seleccionadas	Raíces micorrizadas (%)
<i>R. phycelliodes</i> Valle Hurtado	4	62	34	95
<i>R. Bagnoldii</i> Ruta Norte de Ovalle Km 440	6	69	32	100
<i>R. Bagnoldii</i> Tongoy	7	100	45	98.6
<i>R. phycelliodes</i> Caleta Horno	4	56	25	100

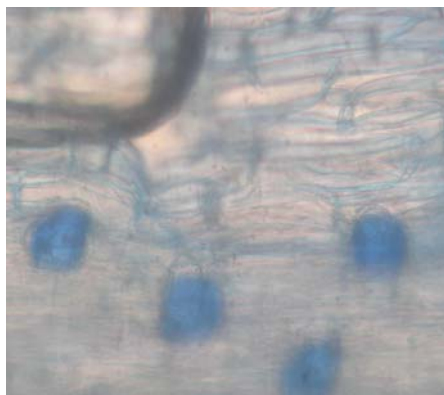
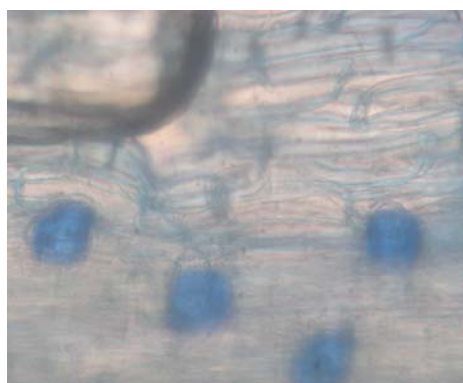
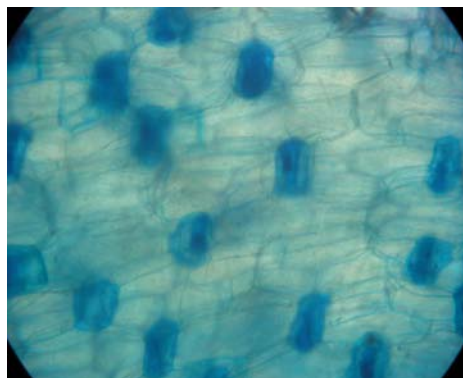
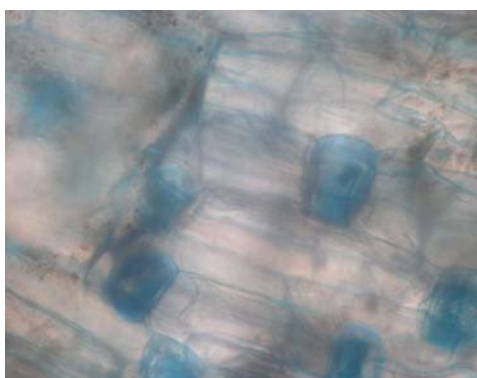


Figura 4.10 a,b,c y d. Fotografías de raíces micorrizadas (vesículas) observadas a microscopio óptico (40X)

5.6.2 Registro de número de hojas.

Rhodophiala splendens

Durante este periodo el comportamiento ha sido similar que en los anteriores, las plantas han mostrado una disminución en la producción de hojas durante los meses de verano y de invierno, pero sin llegar a 0 hojas. El máximo número de hojas se ha registrado en el mes de octubre, siendo este valor menor en bulbos de calibres más pequeños (Figura 4.11).

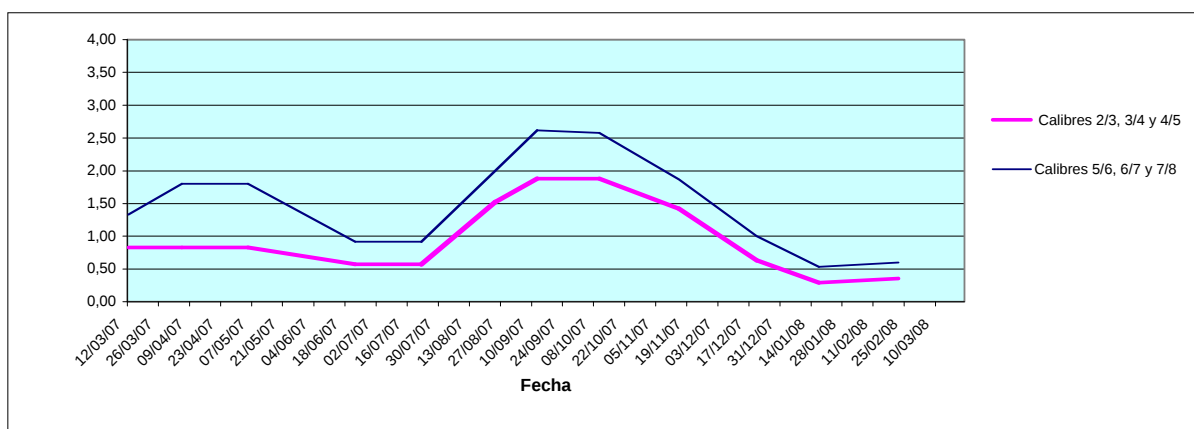


Figura 4.11. Promedio de número de hojas en bulbos de *R. splendens*

Rhodophiala montana

Las plantas de esta especie también continúan mostrando la periodicidad de temporadas anteriores, en el caso de los bulbos de tamaños más pequeños, el máximo número de hojas se registró en noviembre y alcanzó en promedio 2,3 hojas, lo que es mejor a los máximos registrados en temporadas anteriores los bulbos más grandes produjeron en promedio un máximo de 3.5 hojas. La mínima producción de hojas se registró en febrero y julio, al igual que en *R. splendens* los bulbos de calibres pequeños y grandes siguen el mismo patrón de comportamiento, sólo con diferencias en el número de hojas producidas (Figura 4.12).

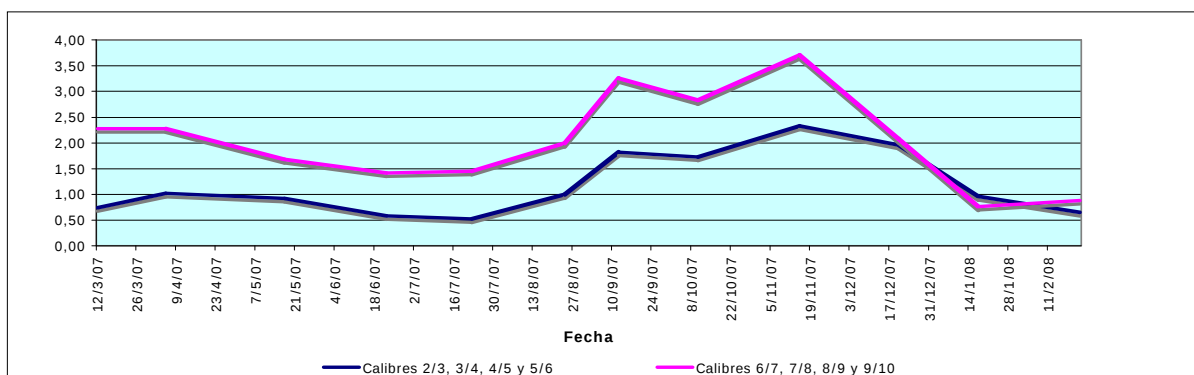


Figura 4.12. Promedio de número de hojas en bulbos de *R. montana*

Rhodophiala bagnoldii

Los bulbos de esta especie han ido disminuyendo en número desde que se recolectaron a inicios del proyecto, en la mediciones de esta temporada ya se contaba con muy pocos bulbos y como puede apreciarse en la figura 4.13 los de calibre 3/4 y 4/5 no mostraron hojas durante este periodo. En el caso de los bulbos más grandes 5/6 y 6/7 estos sólo alcanzaron un máximo de 0,6 hojas por plantas en julio disminuyendo bruscamente en la medición de agosto. No se siguió midiendo a partir de esta fecha ya que quedaban muy pocos bulbos.

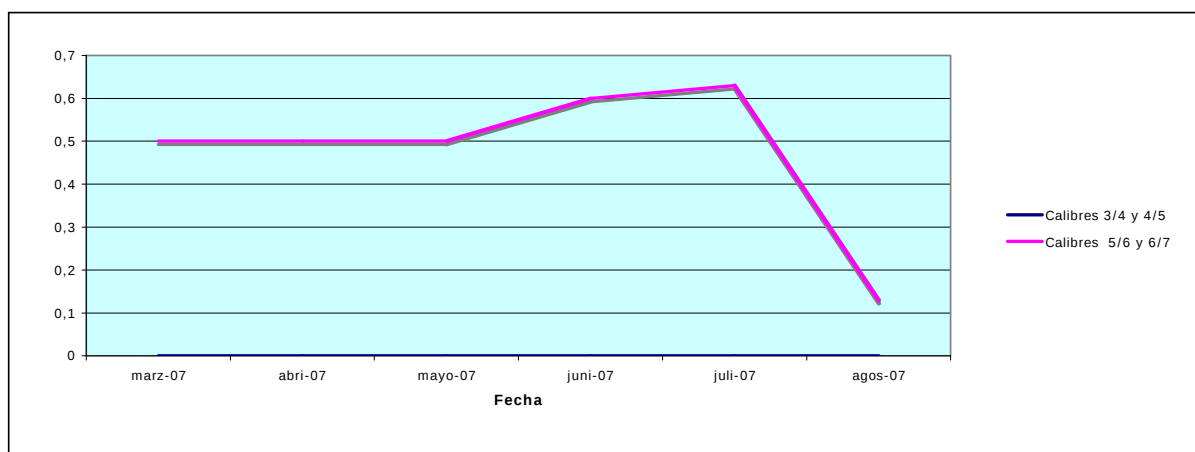


Figura 4.13. Promedio de número de hojas en bulbos de *R. bagnoldii*

5.6.5 Cruzamientos

Durante la temporada de floración 2006-2007 se repitió el programa de cruzamiento entre las especies del proyecto, sin embargo, debido a la baja floración se pudo utilizar flores sólo de *R. montana*, *R. bagnoldii*, *R. splendens*, *R. phycelloides* y *R. aff. chilensis*.

Cuadro 4.3. Cruzamientos realizados en la temporada 2006-2007 y número de semillas híbridas resultantes

Macho	Hembra	Nº de cruzamientos realizados	Nº de cruzamientos exitosos	Nº total de semillas
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. montana</i>	29	4	26
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. splendens</i>	2	2	63
<i>R. montana</i>	<i>R. splendens</i>	9	5	97
<i>R. bagnoldii</i>	<i>R. phycelloides</i>	1	1	64
<i>R. aff. chilensis</i>	<i>R. montana</i>	25	9	131
<i>R. aff. chilensis</i>	<i>R. bagnoldii</i>	2	2	52
<i>R. splendens</i>	<i>R. montana</i>	27	5	74
<i>R. montana</i>	<i>R. phycelloides</i>	1	1	17

En general, los cruzamientos con la especie *R. montana* como hembra, fueron menos exitosos, a pesar de esto, se obtuvo una gran cantidad de semillas híbridas. En las demás especies, de todos los cruzamientos realizados se obtuvieron semillas.

6. Problemas enfrentados durante la ejecución del proyecto

El hecho de que las plantas nunca presentaran un comportamiento “absoluto”, es decir, nunca estuvieron 100% en receso, o presentaran 100% de floración, fue un problema en todos los experimentos. En este caso, la unidad experimental debería ser un número mucho mayor que el utilizado normalmente en otras especies y mucho mayor que el utilizado en este proyecto. El material disponible siempre fue escaso y de alta variabilidad genética.

El problema presentado en el experimento bajo túnel, las plantas de *R. montana*, a diferencia de las otras especies murieron aparentemente por exceso de calor generado bajo el túnel un día de sol en octubre, esto también podría estar relacionado a una condición genética (plantas de cordillera) o a la presencia de algún patógeno.

La imposibilidad de florecer de los tetraploides fue el principal problema enfrentado, y éste no tuvo solución.

Lamentablemente, no se pudo analizar los bulbos con resonancia magnética. El Laboratorio de la Universidad Católica, altamente especializado, donde se veían muestras de diferentes especies animales y vegetales, no obtuvo “señal” de bulbo, probando durante varias horas en 2 oportunidades, una de ellas con el equipo del proyecto presente.

El análisis interno del bulbo mediante Resonancia Magnética, era el único medio que nos habría servido para ver si se formaban yemas florales dentro de los individuos tetraploides. La otra forma es abriendo los bulbos, pero obviamente se dañan.

No se logró realizar el último experimento de poscosecha con flores de *R. splendens*, porque la fecha de floración se adelantó con respecto a años anteriores, se estimó que si hubiéramos ido una semana antes habríamos encontrado suficiente material. Fue una lástima; se recorrió un predio un predio particular de la VI Región y la cercanías de Radal 7 tazas, en ambos lugares la floración se adelantó.

7. Difusión de los resultados obtenidos

Como una actividad de difusión del proyecto se recibió la visita de grupos de estudiantes de diferentes colegios, de enseñanza básica y media.

En el mes de octubre de 2006 se recibió la visita de alumnos por medio del programa Explora, pertenecientes a los colegios Liceo de Yervas Buenas y ODESSA de Camarico.

Durante estas visitas (Figura 4.14) se explicó a los alumnos los objetivos y actividades del proyecto, además se les entregó un impreso a color con un resumen, el cual se adjunta en el Anexo 1.



Figura 4.14 Alumnos durante visita al Invernadero de la estación experimental

A fines de octubre de 2006 el equipo técnico del proyecto participó en el curso “Bases fisiológicas para el Cultivo de flores bulbosas”, realizado en Trailanqui y organizado por INIA Carillanca con apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria. Se presentaron los avances en el estudio de la fisiología de las especies de *Rhodophiala* en estudio, junto con las presentaciones de colegas de otras universidades de nuestro país.

Fue una experiencia muy positiva para el equipo del proyecto. Tuvimos la oportunidad de interactuar e intercambiar opiniones y experiencias con otros investigadores y sobre todo tener la oportunidad de recibir ideas de parte de investigadores tan destacados como August De Hertogh, Marcel Le Nard y Rina Kamenetski, lo cual es un gran aporte para el desarrollo de

nuestra investigación. Cabe destacar la opinión de Rina Kanemetski, en orden a que ella considera que el género *Rhodophiala* tiene un gran potencial, y que nuestro proyecto, en general, va muy bien encaminado. Señaló que en esta etapa deberíamos contactar a una empresa de otro país (Holanda, Estados Unidos u otro) que pueda generar demanda de bulbos para forzado y eso haría que productores chilenos se encarguen de cultivarlos.

En el Anexo 2 se presenta la presentación del proyecto que fue presentado durante este curso.

En diciembre de 2007 se realizó en Talca el 2º Simposio de Horticultura Ornamental, en esta oportunidad la coordinación estuvo a cargo del equipo técnico del proyecto encabezado por la Prof. Flavia Schiappacasse, se recibieron trabajos de destacados investigadores nacionales y se contó con las conferencias de la Prof. Nina Bassuk especialista en Agricultura Urbana de la Universidad de Cornell, del Prof. Mark Bridgen, especialista en mejoramiento genético de *Alstroemeria* de la Universidad de Cornell y Paola Yañez, especialista en floricultura de la Universidad de Shizuoka. En la oportunidad se presentaron 2 posters cuyos resúmenes se adjuntan en el Anexo 3.

APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE ESPECIES DE RHODOPHIALA CHILENAS

Schiappacasse, F.¹, Peñailillo, P.², Basoalto, A.¹, Seemann, P.³, Riegel, R.³, Muñoz, M.,³ Jara, G.³ y Durán, C.³

1 Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. 2 Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología.

3 Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Universidad Austral de Chile.

Introducción

Las especies pertenecientes al género *Rhodophiala* son plantas bulbosas nativas de Chile, Bolivia, Argentina y Uruguay. En nuestro país se distribuyen desde la III Región a la X Región. Son plantas que producen hermosas flores, de colores que van desde el blanco puro al rojo intenso, y poseen un órgano de almacenamiento subterráneo (bulbo), que les permite permanecer en estado de dormancia o reposo cuando las condiciones de humedad o temperatura no son adecuadas.

El gran valor ornamental que poseen estas especies ha llevado a investigadores de dos centros de estudios a desarrollar en conjunto y con apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria un proyecto para estudiarlas.

Durante 6 años se han realizado diversos estudios con el fin de conocer las características genéticas de estas especies para iniciar estudios de mejoramiento. También se han evaluado métodos para el crecimiento rápido de bulbos y estudios de morfología y fisiología de las especies.

Entre los objetivos del proyecto están: determinación de cariotipos; elaboración de un protocolo para inducción de poliploidía; evaluación del grado de poliploidía logrado; multiplicación de material *in vitro*; evaluación de métodos de crecimiento rápido de bulbos; evaluación de poliploides; fisiología de las plantas, receso y morfogénesis floral.

Materiales y Métodos

Bulbos de las diferentes especies, provenientes de un proyecto FIA anterior, recolectados en terreno, provenientes de almácigos y provenientes de cultivo *in vitro*, y de diferentes calibres, se usaron para probar el efecto de distintas condiciones ambientales sobre el crecimiento y

desarrollo de las plantas. Durante varias temporadas se evaluó el efecto de la luz, del calor basal y la temperatura del aire, además de la fenología presentada en cultivo. Anualmente estos bulbos fueron cosechados y calibrados para posteriormente ser utilizados en los experimentos.

Para determinar el **efecto de la luz** se cultivaron plantas bajo diferentes regímenes de iluminación, usando primero (año 2002) ampollitas incandescentes en tratamientos con luz natural, luz natural + artificial, interrupción nocturna y luz suplementaria y posteriormente (año 2003) luces fluorescentes en tratamientos con y sin luz, registrándose el diámetro y peso de los bulbos al final del periodo.

Para determinar el **efecto de la temperatura estival** se establecieron bulbos de 4 especies y diferentes tamaños en los invernaderos del Campus Lircay (ventilación natural) y de la E.E. Panguilemo (enfriamiento del aire en verano), registrándose periódicamente el número de hojas.

Para determinar el **efecto del calor** basal, bulbos de las diferentes especies fueron cultivados en cama caliente durante 6 meses en sustrato a 22°C constante y a temperatura ambiente. Al final del periodo se registraron diámetro y peso de bulbos, y número de hojas de cada planta.

Para realizar los **estudios fenológicos**, bulbos de 4 especies de diferentes calibres fueron establecidos en los invernaderos del Campus Lircay y E.E Panguilemo y se registraron fechas de aparición de hojas, floración e inicio del receso.

Se realizaron **cruzamientos** entre las especies pertenecientes al proyecto e incorporando otras especies de *Rhodophiala* y la especie *Phycella australis* (de la misma familia). Las flores maduras a punto de abrir fueron emasculadas, siendo polinizadas al momento de encontrarse receptivo el estigma.

El polen recolectado fue almacenado a 5°C en cápsulas de vidrio, siendo previamente deshidratado con gel de sílice, debiendo ser rehidratado para su utilización.

Los **estudios de morfogénesis floral** se realizaron a través de la disección periódica de bulbos tomados del ambiente natural.

Resultados

Con el uso de luces fluorescentes el año 2003 se logró aumentar el diámetro y el número de hojas en *R. bagnoldii* y el peso de los bulbos en *R. splendens*.

Con el uso de calor basal, el peso del bulbo aumentó significativamente en *R. splendens*, *R. bagnoldii* y *R. montana*, también se registró un aumento significativo del diámetro en *R. bagnoldii* y *R. montana*. El número de hojas no se afectó significativamente.

Los registros de fenología en el ambiente natural, muestran que las especies de cordillera (*R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*) presentan floración estival entre diciembre y enero, y un receso estival posterior a ésta, reactivándose con las primeras lluvias.

Por otra parte las especies del desierto (*R. bagnoldii* y *R. ananuca*) presentan floración primaveral y receso estival.

Bajo cultivo, las épocas de floración son similares a las del ambiente natural, sin embargo, *R. bagnoldii* y *R. montana* han florecido en distintas épocas del año.

Los estudios morfológicos mostraron que los tallos florales se disponen en línea en el plano medio del bulbo y emergen alternadamente. Todas las escamas son bases de hojas y cada 3 escamas hay un resto de tallo floral protegido por una escama semienvainadora. Se forman dos inflorescencias por año, las cuales emergen en la temporada siguiente. Los bulbos hijos se forman entre un resto de tallo floral y una escama semienvainadora.

En la Universidad Austral de Chile se han logrado establecer los cariotipos de las especies en estudio, además, se han obtenido plantas tetraploides de *R. splendens* y *R. montana*, que se están cultivando en el invernadero de la E/E Panguilemo.

Conclusiones

Las plantas presentan mejor comportamiento con temperaturas no extremas y un crecimiento más rápido con calor basal.

La fecha de floración no cambia al cultivar las plantas en invernadero, además *R. montana* y *R. bagnoldii* han mostrado distintas fechas de floración.

Los bulbos florales forman dos yemas florales por año

Existe una alta compatibilidad intraespecífica y con el género *Phycella*.

AVANCES EN ESTUDIOS DE CRECIMIENTO Y FLORACIÓN DE ESPECIES DE *Rhodophiala*

Proyecto “Aplicaciones biotecnológicas en el mejoramiento genético de especies de *Rhodophiala* chilenas”



Equipo técnico:
Peter Seemann, Ricardo Riegel, Ximena Henzi, Manuel Muñoz, Gloria Jara (U. Austral de Chile)
Flavia Schiappacasse, Patricio Peñailillo, Alejandra Basalto (U. De Talca)

Resumen

Las especies pertenecientes al género *Rhodophiala* son plantas bulbosas nativas de Chile, Bolivia, Argentina y Uruguay. En nuestro país se distribuyen desde la III Región a la X Región. Son plantas que producen hermosas flores, de colores que van desde el blanco puro al rojo intenso, y poseen un órgano de almacenamiento subterráneo (bulbo), que les permite permanecer en estado de dormancia o reposo cuando las condiciones de humedad o temperatura no son adecuadas. El gran valor ornamental que poseen estas especies ha llevado a investigadores de dos centros de estudios a desarrollar en conjunto y con apoyo de la Fundación para la Innovación Agraria un proyecto para estudiarlas. Durante 4 años se han realizado diversos estudios con el fin de conocer las características genéticas de estas especies para iniciar estudios de mejoramiento. También se han evaluado métodos para el crecimiento rápido de bulbos y estudios de morfología y fisiología de las especies.

Objetivos

UNIVERSIDAD AUSTRAL

Determinación de cariotipos

Protocolo para inducción de poliploidía

Evaluación de grado de poliploidía logrado

Multiplicación de material in vitro

UNIVERSIDAD DE TALCA

Evaluación de métodos de crecimiento rápido de bulbos

Evaluación de poliploidies

Fisiología de las plantas, receso y morfogénesis floral

Materiales y métodos

Bulbos de las diferentes especies, provenientes de un proyecto FIA anterior, recolectados en terreno, provenientes de almácgos y provenientes de cultivo in vitro, y de diferentes calibres, se usaron para probar el efecto de distintas condiciones ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Durante varias temporadas se evaluó el efecto de la luz, del calor basal y la temperatura del aire, además de la fenología presentada en cultivo. Anualmente estos bulbos fueron cosechados y calibrados para posteriormente ser utilizados en los experimentos.

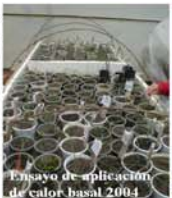


Para determinar el efecto de la temperatura estival se establecieron bulbos de 4 especies y diferentes tamaños en los invernaderos del Campus Lircay (ventilación natural) y de la E.E. Panguilemo (enfriamiento del aire en verano), registrándose periódicamente el número de hojas.

Para determinar el efecto de la luz se cultivaron plantas bajo diferentes regímenes de iluminación, usando primero (año 2002) ampolletas incandescentes en tratamientos con luz natural, luz natural + artificial, interrupción nocturna y luz suplementaria y posteriormente (año 2003) luces fluorescentes en tratamientos con y sin luz, registrándose el diámetro y peso de los bulbos al final del periodo.



Para determinar el efecto del calor basal bulbos de las diferentes especies fueron cultivados en cama caliente durante 6 meses en sustrato a 22°C constante y a temperatura ambiente. Al final del periodo se registraron diámetro, peso y número de hojas.



Para realizar los estudios fenológicos, bulbos de 4 especies de diferentes calibres fueron establecidos en los invernaderos del Campus Lircay y E.E. Panguilemo y se registraron fechas de aparición de hojas, floración e inicio del receso.



Se realizaron cruzamientos entre las especies pertenecientes al proyecto e incorporando otras especies de *Rhodophiala* y la especie *Phycella australis* (de la misma familia). Las flores maduras a punto de abrir fueron emasculadas, siendo polinizadas al momento de encontrarse receptivo el estigma.

El polen recolectado fue almacenado a 5°C en cápsulas de vidrio, siendo previamente deshidratado con gel de sílice, debiendo ser rehidratado para su utilización.

Los estudios de morfogénesis floral se realizaron a través de la disección periódica de bulbos tomados del ambiente natural.

Conclusiones

*Las plantas presentan mejor comportamiento con temperaturas no extremas y un crecimiento más rápido con calor basal.

*Los bulbos florales forman dos yemas florales por año

*Existe una alta compatibilidad entre las especies del género.

Especies estudiadas



Resultados principales

*Efecto de la luz

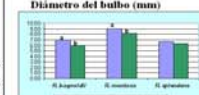
Solo en 2003 hubo resultados significativamente distintos

Con luz artificial fue mayor:

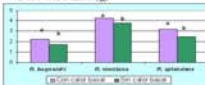
*diámetro de bulbos en *R. bagnoldii*,
*peso de bulbos en *R. splendens*,
*número de hojas en *R. bagnoldii*

*Efecto del calor basal (22°C)

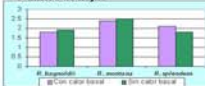
Diámetro del bulbo (mm)



Peso del bulbo (g)



Número de hojas



Procedencia es una columna con distintos tipos de calor basal: 1) Con calor basal, 2) Sin calor basal

Fenología en el ambiente natural

Especies de cordillera

(*R. montana*, *R. splendens* y *R. rhodolirion*)

*Floración en enero

*Receso estival después de floración

*Se reactivan con primeras lluvias

Especies del desierto

(*R. bagnoldii* y *R. ananuca*)

*Floración en primavera

*Receso estival

Fenología bajo cultivo

Epocas de Floración similares a las del ambiente natural. Excepción: *R. bagnoldii* y *R. montana*, que florecen en distintas épocas

*Los bulbos hijos se forman entre un resto de tallo floral y una escama semivainadora

Estudios Morfológicos

*Restos de tallos florales se disponen en línea y alternadamente

*Escamas son bases de hojas

*Cada 3 escamas hay un resto de tallo floral protegido por una escama semivainadora

*Se forman dos inflorescencias por año.

En este momento emergieron las de 2005/2006 y están

formadas las de 2006/2007



Resultados obtenidos en Universidad Austral de Chile

*Se han logrado establecer los cariotipos de las especies en estudio.

*Se han obtenido plantas tetraploides de *R. splendens* y *R. montana*, que se están cultivando en el invernadero de la E.E. Panguilemo.

8. Conclusiones

- ✓ El conteo de número de hojas fue un buen indicador de la actividad de las plantas. Al evaluar durante varios años se vio que la actividad es cíclica, pero en una población relativamente abundante no llega a 0, es decir, este género no presenta receso absoluto, sólo baja la actividad en ciertas épocas.
- ✓ El bulbo tetraploide de *R. splendens* que se encuentra en la Estación Experimental continuó desarrollando hojas en forma cíclica al igual que los otros bulbos de *R. splendens*, pero no floreció a pesar de tener calibre floral. Lo mismo sucedió con los tetraploides de *R. montana*. Se sabe que en algunos casos los bulbos tetraploides tardan más tiempo en alcanzar la madurez para florecer. En este caso ya llevan dos años de retraso con respecto a plantas diploides, aproximadamente. Cabe destacar que algunas especies son de cordillera, en las cuales incluso la floración de plantas diploides no se logra plenamente en Cultivo.
- ✓ El uso de calefacción del sustrato mostró tener un efecto sobre el crecimiento de los bulbos, en experimentos desarrollados en la primera parte del proyecto, sin embargo, en el experimento realizado durante la extensión, el uso de diferentes tratamientos de calefacción durante el Cultivo de bulbillos provenientes de semilla, mostró no tener una influencia significativa sobre el crecimiento de los bulbos, medido como aumento en calibre y en peso, excepto en *R. splendens*, en la cual, se obtuvo mayores diámetros al utilizar calefacción sólo de la parte aérea o sólo del sustrato.
- ✓ En *Rhodophiala* sp. (Putú) con plantaciones más tardías se logró que las plantas florecieran en menos días, indicando que hay un factor ambiental no estudiado que gatilla la floración, posiblemente largo del día o temperatura o bien la combinación de ambos. Las características florales no se vieron afectadas, a excepción del largo promedio de vara, que en bulbos cultivado cerca de la fuente de calor fue mayor para las fechas de plantación más tempranas.
- ✓ Las plantas provenientes de cultivo *in vitro* de *R. splendens* colocadas en túnel de gradiente térmico no sobrevivieron. En general, hubo problemas de sobrevivencia de los bulbos provenientes de Cultivo *in vitro*, aunque hubieran sido aclimatados, en todas las especies. Los de mejor comportamiento fueron los de *R. montana*, que sobrevivieron en alto porcentaje e incluso algunos de ellos florecieron.
- ✓ En el experimento realizado con bulbos de Alto Pangue se vio que el único tratamiento que no floreció fue aquel en que los bulbos fueron almacenados a 5°C por 3 meses; al parecer, esta especie no requirió frío, florece más con temperatura altas; el tratamiento que más floreció fue el de los bulbos tratados a 20°C por 1 mes.
- ✓ El uso de soluciones azucaradas para la mantención permite alargar la vida útil de las varas florales de *R. montana*, en casi dos días con respecto a conservar las varas sólo en agua, el uso de un acidificante en la solución, también ayuda a la conservación de las varas.
- ✓ Los tratamientos de pulsado utilizados no tuvieron un efecto claro sobre la vida de florero de las varas, provocando una rápida apertura de las mismas y llegando ésta a un veltor máximo de 5,5 días.

- ✓ Con respecto a la floración, el comportamiento de las plantas nunca fue absoluto,, es decir nunca se logró el 100% de la floración
- ✓ Los bulbos provenientes de cruzamientos realizados durante el proyecto han mostrado una buena sobrevivencia en cultivo, se espera que durante la próxima temporada primavera-verano puedan florecen algunos de los que ya tienen 3 años.
- ✓ En la mayoría de las plantas muestreadas de *R. bagnoldii*, *R. phycelloides* y *R. splendens* se observaron micorrizas, lo cual podría explicar en cierto grado su crecimiento en suelos pobres como los suelos fijadores de fósforo de la Cordillera de Los Andes o los suelos arenosos del Norte.