

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA

CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE UNA RAZA DE
***Eucalyptus globulus* Labill TOLERANTE AL FRÍO**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

BRAULIO GUTIÉRREZ CARO

Profesor Guía: Ing. Forestal, Sr. Manuel Ibarra Martínez

SANTIAGO - CHILE
2006

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
ESCUELA DE CIENCIAS FORESTALES
DEPARTAMENTO DE SILVICULTURA**

**CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE UNA RAZA DE *Eucalyptus globulus*
Labill TOLERANTE AL FRÍO**

Memoria para optar al Título
Profesional de Ingeniero Forestal

Braulio Gutiérrez Caro

Calificaciones:	Nota	Firma
Prof. Guía Sr. Manuel Ibarra M.	7,0
Prof. Consejero Sr. Sergio Donoso C.	7,0
Prof. Consejero Sr. Julio Torres C.	7,0

SANTIAGO-CHILE

2006

INDICE DE MATERIAS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.	Las plantas y el frío	3
2.2.	<i>E. globulus</i> y el frío	7
2.3.	Alternativas para sobrellevar las limitaciones impuestas por el frío al cultivo de <i>E. globulus</i>	12
2.3.1.	Cambio de especie	13
2.3.2.	Endurecimiento	13
2.3.3.	Hibridación	14
2.3.4.	Clonación	15
2.3.5.	Transformación genética	16
3.	MATERIAL Y METODO	19
3.1.	El proyecto FONDEF D00I1036	20
3.1.1.	Selección y Sanción	21
3.1.2.	Habilitación para propagación	21
3.1.3.	Evaluación de enraizamiento	22
3.1.4.	Ensayos clonales	22
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1.	Síntesis y Discusión de Resultados del Proyecto FONDEF D00I1036	24
4.1.1.	Selección de Árboles Plus	24
4.1.2.	Evaluación de capacidad rizogénica	27
4.1.3.	Ensayos clonales	35
4.2.	Propuesta para la Utilización de los Resultados del Proyecto FONDEF D00I1036	42
4.2.1.	Distribución del Material genético	42
4.2.2.	Propuestas para el uso del material genético del proyecto	43
4.3.	Análisis de Alternativas para Sobrellevar las Limitaciones Impuestas por el Frío al Cultivo de <i>E. globulus</i>	44
4.3.1.	Cambio de Especie	46

4.3.2.	Endurecimiento de Plantas (Aclimatación)	47
4.3.3.	Hibridación de <i>E. globulus</i> con Especies Tolerantes al Frío	47
4.3.4.	Selección y Clonación de Individuos Tolerantes al Frío	49
4.3.5.	Transformación Genética	50
5.	CONCLUSIONES	54
6.	BIBLIOGRAFÍA	57
	ANEXO 1: Detalles Operativos de la Metodología del Proyecto FONDEF D00I1036.	68

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°

1	Número de Árboles Plus Seleccionados, Sancionados y Habilitados para Propagación por Temporada y Empresa.	25
2	Características Medias de los Árboles Seleccionados y Distribución por Comuna y Región.	26
3	Número de Árboles Representados en Pruebas de Enraizamiento a partir de Retoños de Tocón.	27
4	Enraizamiento de Clones a partir de Estacas de Retoños de Tocón, según Clase de Enraizamiento y Temporada.	29
5	Número de Clones Re-evaluados a partir de Estacas Obtenidas desde Plantas Madres.	31
6	Porcentajes de Enraizamiento Obtenidos con Estacas Provenientes de Retoños de Tocón y de Plantas Madres.	32
7	Resultados de Re-evaluación de Enraizamiento a partir de Estacas Provenientes de Setos.	34
8	Ensayos Clonales con Material Genético Tolerante al Frío.	36
9	Clones Considerados en cada Ensayo.	37
10	Prueba de Duncan para Variable Altura (m) de Ensayo Trongol.	39
11	Prueba de Duncan para Variable Altura (m) de Ensayo Peralillo.	40
12	Prueba de Duncan para Variable Supervivencia (%) de Ensayo Peralillo.	40
13	Análisis Comparativo de las Tecnologías Identificadas para Sobrellevar las Limitaciones Impuestas por el Frío al Cultivo de <i>E. globulus</i> .	46

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

1	Variación en el porcentaje de enraizamiento de 153 clones de <i>E. globulus</i> al evaluarlos con estacas provenientes de retoños de tocón y desde plantas madres	33
---	---	----

RESUMEN

La baja resistencia al frío de *Eucalyptus globulus* es uno de los factores que restringe su desarrollo y limita su crecimiento y área de cultivo.

Existen opciones tecnológicas para sobrellevar este problema. Entre ellas el mejoramiento genético tradicional, basado en la selección, evaluación y posterior masificación de individuos con mayor tolerancia, se perfila como una opción de gran interés. Esta ha sido implementada mediante la formulación y ejecución del proyecto FONDEF D0011036 “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *E. globulus* Tolerante al Frío”, cuyos resultados se presentan y analizan en esta memoria.

Se proponen alternativas de uso para el material genético seleccionado en el proyecto mencionado, sugiriendo que los clones tolerantes al frío podrán ser usados para establecer plantaciones comerciales clonales en sitios afectados por bajas temperaturas; conformarán un material idóneo para labores de investigación; y podrán constituir una población de infusión que aporte tolerancia al frío a los programas de mejoramiento genético de *E. globulus* de las principales empresas forestales del país.

Se identifican otras alternativas para sobrellevar las limitaciones impuestas por el frío al cultivo de *E. globulus*, se analiza su aplicabilidad y se concluye que: Es posible utilizar especies alternativas a *E. globulus* para establecer plantaciones en sitios afectadas por heladas; se puede mejorar la frío-tolerancia inicial de las plantas mediante técnicas de endurecimiento; se pueden desarrollar programas de hibridación de *E. globulus* con otras especies de *Eucalyptus* que aporten tolerancia al frío a las progenies híbridas; existe un gran potencial para mejorar esta característica mediante tecnologías de transformación genética, pero su aplicación operacional no es inmediata.

Se recopilan antecedentes respecto a los efectos de las bajas temperaturas, como factor de estrés sobre las células vegetales, y respecto a los mecanismos involucrados en la respuesta de las plantas ante esta condición. Se presentan antecedentes que

describen el comportamiento de *E. globulus* ante el frío, concluyendo la existencia de suficiente variabilidad intraespecífica como para respaldar programas de selección individual y clonación de individuos frío tolerantes.

Palabras clave: *Eucalyptus globulus*, mejoramiento genético, resistencia al frío.

SUMMARY

The low cold resistance of *Eucalyptus globulus* is the main factor that limits its growth and restricts the cultivation areas.

There are several technological options to face this problem. One of the most interesting is the traditional breeding and genetic improvement, based on selection, evaluation and finally mass production of the most resistant trees. This option has been implemented through the formulation and accomplishment of the FONDEF project D00I1036 "Genotype collection to develop a *Eucalyptus globulus* cold-resistant line", whose results are shown and analyzed in this memory.

Alternative uses of the genetic material selected in this project are proposed, suggesting that cold tolerant clones could be used to establish clonal commercial plantations in sites affected by low temperatures; they will conform a suitable material for future research; and they will be able to constitute a infusion population that supply cold tolerance to genetic improvement programs of *E. globulus* leaded by the main forest companies of the country.

Other options to deal with the limitations imposed by the cold to the culture of *E. globulus* are identified, its applicability is analyzed and the conclusions are: It is possible to use alternative species to *E. globulus* to establish plantations in sites affected by frosts; the initial cold-tolerance of the plants can be improved through hardening techniques; hybridization programs of *E. globulus*, with other species of *Eucalyptus* that supply cold tolerance to the F1 hybrid progenies, can be developed; there is a great potential to improve this characteristic through genetic transformation, but its operational application is not immediate.

Backgrounds related to the effects of the low temperatures, like factor of stress on the vegetal cells and with respect to the mechanisms involved in the response of the plants against this condition are compiled. Information about the behavior of *E. globulus* in

cold conditions is shown, concluding the existence of enough intraspecific variability as a support for the programs of selection and cloning of individual cold tolerant trees.

Key words: *Eucalyptus globulus*, genetic improvement, cold resistance.

1. INTRODUCCIÓN

En Chile, *Eucalyptus globulus* Labill es una de las especies forestales de mayor importancia económica, situación que obedece principalmente a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera, especialmente para la fabricación de pulpa. En la actualidad representa la segunda especie más plantada en el país, totalizando en conjunto con otros eucaliptos, una superficie superior a las 377.000 ha.

Sumado al rápido crecimiento y buena forma que exhibe *E. globulus* en Chile, la especie tiene la capacidad de adaptarse a un rango relativamente amplio de sitios. No obstante, existen extensas superficies que exhiben restricciones que limitan su desarrollo. Particularmente las zonas con incidencia de heladas, sumado a la baja tolerancia al frío de la especie, han limitado la expansión de sus plantaciones hacia el Sur y Precordillera Andina. Incluso en el Valle Central se han producido desastrosas pérdidas de plantaciones, en zonas afectadas por heladas, como consecuencia de la gran susceptibilidad de esta especie al frío.

Reconociendo la vulnerabilidad de *E. globulus* a las bajas temperaturas, y atendiendo a las demandas de las empresas de pulpa, por disponer de material genético adaptado a condiciones de frío y capaz de exhibir rendimientos productivos rentables bajo tal restricción de sitio, se han buscado alternativas de producción que permitan superar esta limitante. Al respecto existen diferentes opciones de solución, las que van desde el cambio de especie hasta la transformación genética, pasando por procesos de aclimatación gradual de las plantas al frío y soluciones derivadas de la aplicación de tecnologías tradicionales de mejoramiento genético, entre ellas la selección y clonación de genotipos tolerantes y la hibridación de *E. globulus* con otras especies mejor adaptadas al frío.

Una de tales alternativas se ha materializado a través de la implementación del proyecto FONDEF D0011036 “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío”. Este proyecto, formulado y ejecutado en forma

conjunta por el Instituto Forestal, la Cooperativa de Mejoramiento Genético, Bioforest S.A. y un conjunto de empresas e instituciones asociadas a esa cooperativa, bajo la dirección del autor de esta memoria, corresponde al enfoque adoptado por el sector productivo para desarrollar en Chile una línea de *E. globulus* tolerante al frío.

El referido proyecto, que se extendió desde abril del año 2001 hasta fines de julio del 2005, hizo uso de herramientas tradicionales de mejoramiento genético, particularmente aplicaciones operacionales de procesos de selección y clonación, para conformar una base genética de *E. globulus* tolerante al frío.

Los antecedentes derivados de tal investigación dieron origen a la presente memoria de título, la cual tiene como objetivo general: Contribuir al desarrollo de una línea de *E. globulus* tolerante al frío mediante la selección, clonación y evaluación de árboles plus que crecen en zonas con incidencia de heladas.

Sus objetivos específicos son:

- Presentar y analizar los resultados del proyecto FONDEF D0011036 “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío”.
- Proponer un enfoque operativo para la utilización de los resultados del proyecto anterior por parte de las empresas forestales.
- Recopilar información respecto al comportamiento de *E. globulus* ante las bajas temperaturas.
- Identificar y describir alternativas para sobrellevar las limitaciones impuestas por el frío al cultivo de *E. globulus*.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Las plantas y el frío

Las plantas enfrentan diferentes condiciones desfavorables, entendidas como aquellas que se apartan de las condiciones óptimas requeridas para su crecimiento y multiplicación, y a las cuales sobreviven en la medida que se lo permita la flexibilidad adaptativa de su genoma (Barceló *et al.*, 1995). Tales condiciones se derivan de la acción de factores de estrés, los cuales Larcher (1995) considera como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida de un determinado organismo.

El crecimiento de las plantas, su productividad y distribución están condicionados por distintos factores de estrés ambiental. Entre ellos, la sequía, la salinidad y las bajas temperaturas se caracterizan por alterar el balance hídrico de las células (Keller *et al.*, 2004). Ante estos y los restantes factores de estrés, las plantas han desarrollado diferentes estrategias adaptativas para sobrellevar sus efectos adversos (Palva *et al.*, 2001). De acuerdo con González (S/F) tales estrategias pueden clasificarse en tres categorías:

a.- Tolerancia ("Stress tolerance"): una especie convive con el estrés, por ejemplo plantas de montaña que soportan heladas cada noche.

b.- Evitación ("Stress avoidance"): la especie evita de alguna manera al factor estresante, por ejemplo produciendo una elevada concentración de solutos para evitar la formación de hielo.

c.- Escape ("Stress escape"): el organismo ajusta su ciclo biológico de tal manera que cumple con su ciclo en poco tiempo coincidiendo con las condiciones menos desfavorables, por ejemplo plantas efímeras, anuales, o plantas del Ártico que florecen por muy poco tiempo en primavera.

De acuerdo con Somerville (2002, *cit. por* Figueroa, 2003) los efectos de la sequía y del congelamiento son biológicamente muy similares, pues ambos producen desecación en las células de los vegetales. Según el autor (*op cit*), las plantas sometidas a heladas forman cristales de hielo alrededor de las células, estos cristales de hielo excluyen el sodio provocando que el agua salga de la célula para tratar de balancear el potencial osmótico. Consecuentemente, la membrana comienza a colapsar y cuando esto ocurre, pequeñas vesículas del plasma exterior penetran en las células. Cuando el proceso se revierte estas pequeñas vesículas pueden retroceder a la membrana y ésta se rompe. En la sequía se produce el mismo proceso. En ambos casos la mayor parte del daño está asociado a la desecación, señalándose que las bases fisiológicas de este proceso aún no se conocen completamente. Coincidentemente, Kuminsky y Scarascia-Mugnozza (1994) y Singh y Laroche (1988) señalan que a pesar de la abundante literatura existente en relación al proceso de adaptación o aclimatación al frío de las plantas, el mecanismo involucrado aún no es bien conocido.

Al disminuir la temperatura también se reduce la velocidad de las reacciones bioquímicas, lo que genera una menor disponibilidad de energía metabólica, que a su vez se traduce en la disminución de la capacidad para absorber agua y nutrientes, reducción de las tasas de asimilación y biosíntesis y detención del crecimiento. Así, mientras más frecuentes, más largos y más fríos son los periodos de baja temperatura, mayor es la intensidad de estos fenómenos y más serias las consecuencias para las plantas (Larcher, 1995).

Barceló *et al.* (1995) diferencian el mecanismo de acción del frío dependiendo de si la temperatura alcanza o no el punto de congelación del agua dentro de la planta, umbral que determina la formación de cristales de hielo; y de si estos se forman dentro de las células o sólo en los espacios intercelulares.

Si el enfriamiento es lento, se congelará el agua extracelular antes que la del interior de las células, determinando un aumento de la concentración de solutos extracelulares y la pérdida de agua y turgencia de las células, las cuales pueden morir por desecación (Lambers *et al.*, 2000). Si el enfriamiento es más drástico se formarán cristales de

hielo incluso dentro de las células, los cuales rompen la subestructura celular, las membranas y la ordenación estructural de muchas proteínas. En este caso, la muerte de las células se produce por la pérdida de sus componentes a través de las membranas rotas, a la vez que por la pérdida de funcionamiento de muchas de sus proteínas (Barceló *et al.*, 1995; Lambers *et al.*, 2000).

Los daños provocados por temperaturas bajas, pero que no provocan congelación, son los típicos de plantas sensibles al frío. Ellos se atribuyen al comportamiento de las membranas celulares. Estas son una estructura semifluida compuesta por dos capas lipídicas, cuyo grado de fluidez depende de su composición y temperatura. A su vez, el grado de fluidez de las capas lipídicas de la membrana determina el funcionamiento de los sistemas enzimáticos, de transporte y su acción como barrera física que impida diferencialmente el paso de componentes celulares (Barceló *et al.*, 1995). Así, ante un descenso significativo de la temperatura se produce una transición de los lípidos de la membrana desde una forma fluida y cristalina hacia un estado de gel, más cristalino, más rígido y menos fluido. En este estado la permeabilidad de la membrana experimenta una pérdida de selectividad, produciéndose un intercambio no controlado de iones y metabolitos, con pérdida del contenido celular hacia el exterior de la célula y acumulación de productos tóxicos intermediarios y finales en su interior, situaciones que en su conjunto colapsan el funcionamiento de la célula y provocan su muerte (Larcher, 1995; Xie, 2004).

El efecto del frío sobre las capas lipídicas de las membranas celulares permite hacer estimaciones de la frío-tolerancia de plantas de eucalipto mediante la determinación de un índice de contenido de ácidos grasos insaturados. Mientras mayor es el contenido de estos ácidos grasos, menor es el grado de solidificación de las membranas, aspecto que se correlaciona con una mayor tolerancia al frío (Xie, 2004).

Diversos investigadores han establecido que la frío-resistencia constituye una de las respuestas fisiológicas de la planta controlada por el fotoperíodo (Landis *et al.*, 1992; Arévalo, 1994). Según Sánchez-Olate *et al.* (2003), el desarrollo de la frío-resistencia depende de varios procesos y la suma de ellos determina el grado en que esta se

expresa. Algunos de tales factores son dependientes de niveles hormonales e inducidos por fotoperíodos cortos; otros, dependen de la actividad de distintos sistemas enzimáticos relacionados a bajas temperaturas (Christersson, 1978).

La tolerancia al frío se correlaciona con la concentración de carbohidratos solubles intracelulares, los que juegan un rol crioprotector (Lambers *et al.*, 2000). En el mismo sentido, Sánchez-Olate *et al.* (2003) postulan que existe correlación entre el incremento en los niveles de ciertos carbohidratos con el endurecimiento de las plantas a bajas temperaturas, a su vez el incremento en el contenido de carbohidratos es causado por fotoperíodos reducidos (Alden y Hermann, 1971; Aronsson *et al.*, 1976).

Kuminsky y Scarascia-Mugnozza (1994) explican que el aumento en las concentraciones de carbohidratos, aminoácidos y alcoholes que se observa en plantas endurecidas al frío constituye un mecanismo de protección de las membranas celulares y componentes citoplasmáticos, ante los efectos tóxicos derivados del aumento de la concentración de electrolitos causada por las bajas temperaturas. Señalan que en especies leñosas el rol protector de los carbohidratos y de la prolina ha sido claramente demostrado.

De acuerdo con Gamboa *et al.* (2003) la capacidad de adaptación de las plantas frente a las bajas temperaturas es un carácter poligénico que está íntimamente ligada a la expresión de ciertos genes denominados CBF (c-repeat binding factor). Los genes CBF son un subgrupo de los denominados factores de transcripción (FT) o genes “switch”, los cuales son los encargados de la activación en cascada de una serie de otros genes primarios, secundarios y terciarios (Somerville, 2002; *cit. por* Figueroa, 2003). Particularmente, los CBF actúan regulando la expresión de otros genes, denominados COR (cold-regulated genes), que confieren a la planta tolerancia al frío y al estrés producido por la falta de agua o por alta salinidad.

Hasta el momento se han descrito cuatro genes CBF (CBF1, 2, 3 y 4) en *Arabidopsis thaliana* cv *Landsberg* y su sobreexpresión da como resultado una mayor tolerancia al frío y al estrés producido por falta de agua (Gamboa *et al.*, 2003). Se cree que cada

uno de los grupos juega roles diferentes en sequía o tolerancia al frío. Hay muchos genes involucrados en las respuestas "switches" y en adición a la expresión genética se observan respuestas fisiológicas asociadas a la tolerancia al frío o la sequía: las plantas transgénicas incrementan la prolina y los azúcares solubles modificando los potenciales osmóticos de sus células (Figuroa, 2003).

Se reconoce que los cambios fisiológicos y bioquímicos experimentados por las plantas durante el endurecimiento para tolerar bajas temperaturas están controlados por modificaciones en la expresión génica, y aunque se ha realizado un gran esfuerzo en la identificación y caracterización de las rutas de señalización y de los intermediarios que regulan este proceso, mediante intensivos estudios conducidos principalmente sobre la planta modelo *A. thaliana*, todavía persisten muchas incógnitas para explicar el proceso desde la percepción del estímulo, hasta la regulación de la expresión génica asociado al mismo (Catalá, 2003).

2.2 *E. globulus* y el frío

El área de distribución natural de *E. globulus*, en Australia, presenta dos tipos de clima, un clima marítimo en Tasmania y otro subtropical en el sur de Victoria. Ambos se caracterizan por una distribución relativamente uniforme de precipitaciones a lo largo del año, lo que junto a temperaturas moderadas determina una mínima incidencia de déficit hídrico y heladas (Toval, 2004). En Tasmania por ejemplo, si bien se producen algunas nevazones, la temperatura del suelo no baja de 0°C (Skolmen y Ledig, S/F). Por el contrario, como especie exótica *E. globulus* se ha difundido extensamente por el mundo, enfrentando distintas condiciones ambientales, siendo su sensibilidad al frío uno de los principales factores que limita su expansión (Keller *et al.*, 2004).

Efectivamente, aunque *E. globulus* ha demostrado una gran adaptabilidad climática, la mayoría de las introducciones exitosas se han producido en zonas de clima templado, sin abundancia de meses secos, precipitaciones anuales cercanas a los 900 mm y temperaturas mínimas no inferiores a -7°C (Skolmen y Ledig, S/F). Particularmente,

por tratarse de una especie que presenta yemas desnudas y que no exhibe un período de receso vegetativo en invierno, resulta especialmente sensible a las bajas temperaturas (Kuminsky y Scarascia-Mugnozza, 1994).

En Chile, la mayoría de las plantaciones de *E. globulus* sufren algún grado de daño por heladas, los que varían desde efectos leves, que no comprometen el crecimiento ni la forma de los árboles, hasta daños severos que provocan la muerte de los mismos (Droppelmann *et al.*, 2001).

Las plantas de esta especie son sensibles al frío y las heladas, pudiendo morir al enfrentar temperaturas inferiores a -5°C (Skolmen y Ledig, S/F). Santos (1997) señala que los daños se producen cuando la temperatura desciende de -3°C . Marien (1979, *cit. por* Prado *et al.*, 1994) menciona que existen procedencias de Tasmania que pueden soportar temperaturas de hasta -8°C y mantener un buen crecimiento.

El valor absoluto de temperatura al cual se produce el daño es variable y depende de varios factores. Prado *et al.* (1994) mencionan que además del valor de la temperatura se debe considerar la velocidad de descenso de la misma, la duración del periodo frío bajo un determinado umbral, la amplitud térmica diaria, la temperatura del suelo, la humedad relativa del aire, la velocidad del viento, la presencia o ausencia de nieve y el estado vegetativo de las plantas al momento de ocurrir el episodio de frío. Por su parte, Santos (1997) agrega otros factores, entre los cuales menciona el contenido de humedad del suelo, el tamaño y la condición del árbol, el clima local y la época del año en que se produce la helada.

La capacidad de tolerar bajas temperaturas aumenta con la edad de los árboles, siendo el follaje juvenil más sensible que el adulto (Skolmen y Ledig, S/F); también varía entre órganos y tejidos y en función del estado fisiológico de las plantas, siendo los tejidos suculentos, con mayor contenido de agua, más susceptibles que los tejidos lignificados (Parra y Canala-Echeverría, 1994).

Adicionalmente, a lo largo del año las plantas experimentan una variación estacional en su capacidad de tolerar frío, “endureciéndose” en forma gradual durante el otoño para alcanzar la máxima resistencia en invierno y revertir este proceso en primavera, para llegar a una tolerancia mínima durante el verano. Así se pueden observar diferencias de hasta 8°C entre las temperaturas mínimas que pueden tolerar en invierno y verano (Prado *et al.*, 1994).

El comportamiento de *E. globulus* ante las bajas temperaturas ha sido estudiado por diversos investigadores, tanto en condiciones de campo como en condiciones controladas de laboratorio.

Droppelmann *et al.* (2001) evalúan la tolerancia al frío en un ensayo de progenies de *E. globulus* de un año de edad, formado por 77 familias de polinización abierta, durante un año en que se produjeron más de 20 heladas invernales y en el que se registraron temperaturas mínimas de hasta -9,5°C. Concluyen que el 92% de los árboles presentan daño por frío, pero observan también una gran variabilidad en la capacidad de la especie para tolerar esta condición, detectando familias particularmente frío-tolerantes. Concluyen además que el carácter tolerancia al frío es altamente heredable, estimando un valor de heredabilidad de 0,56.

Nixon (1983) también evaluó la tolerancia al frío en ensayos de campo de 15 especies de eucaliptos, establecidos en tres sitios de Sudáfrica. El análisis se efectuó a los 11 meses de edad, utilizando una escala de daño subjetiva, que varió desde cero (árboles sin daño) hasta cuatro (árboles muertos o severamente dañados). En los tres sitios observó que *E. globulus* y sus subespecies fueron de los más afectados, detectando mortalidad total en algunos ensayos y sobrevivencia del orden de 0,2% en otros. Por el contrario, en las mismas condiciones, especies como *E. dalrympleana*, *E. macarthurii* y *E. viminalis* mostraron ser muy resistentes al frío. Coincidentemente, Darrow (1983) también señala la pérdida total de ensayos de *E. globulus* como consecuencia del frío, en otra área de Sudáfrica distinta a las consideradas por Nixon (*op. cit.*).

Existen numerosas referencias bibliográficas respecto a evaluaciones de daño por frío, provocado por heladas naturales, en ensayos de terreno de distintas especies de eucaliptos (Eldrige *et al.*, 1983). No obstante estas condiciones distan de las ideales para fines de investigación, por cuanto son altamente dependientes de las características meteorológicas específicas de los años involucrados en el estudio, así como de las condiciones específicas del sitio (Nixon, 1983). En consecuencia, se han efectuado estudios de evaluación de resistencia al frío bajo condiciones controladas en cámaras o cuartos climatizados.

En el caso de *E. globulus*, Prado *et al.* (1994) evaluaron la resistencia al frío de plantas de vivero de 36 procedencias y 121 familias representativas de gran parte del área de distribución natural de la especie en Australia, utilizando una cámara de frío de temperatura controlable. Tras simular las heladas y evaluar el daño provocado en el follaje, concluyen que entre -1 y -4 °C se producen daños que comprometen alrededor del 30% del follaje de las plantas, aspecto que retrasa su crecimiento pero no amenaza su sobrevivencia; a -6°C el daño resulta severo y afecta en distinto grado, a todas las procedencias y familias ensayadas; existen procedencias muy sensibles al frío, particularmente aquellas de las islas King y Cape Barren en el Estrecho de Bass, y otras más resistentes (Jeerelang y Flinders), no obstante no existe un patrón bien definido de resistencia al frío a nivel de procedencias, como tampoco una correlación adecuada entre esta y la altitud.

Para evitar someter plantas completas a bajas temperaturas, Eldrige *et al.* (1983) desarrollaron un método no destructivo para analizar la resistencia al frío de los eucaliptos, basado en la conductividad eléctrica de discos foliares de 6mm de diámetro, sometidos a temperaturas de congelamiento generadas por un baño de glicoletileno, utilizado para aplicar los tratamientos de frío y controlar la temperatura.

Bara *et al.* (1994) utilizan un método equivalente al anterior para evaluar la resistencia al frío de 240 familias de *E. globulus* en plantas de una temporada de crecimiento en vivero. Para tales efectos simulan heladas de -2, -3, -4, -5, -6 y -7°C en discos foliares de 9 mm de diámetro, mediante un baño térmico automatizado de glicoletileno que

ejecuta un descenso programado y controlado de la temperatura. Posteriormente miden la conductividad eléctrica y la expresan como un porcentaje de la conductividad máxima, correspondiente a aquella medida en el mismo disco después de someterlo a una temperatura de destrucción celular (-18°C). Mientras mayor es el porcentaje de conductividad mayor es el nivel de daño experimentado por las células del disco expuesto a la helada simulada. Tal procedimiento permite demostrar que existe variación estadísticamente significativa en la capacidad de tolerar frío entre las distintas familias de *E. globulus*. Los resultados también coinciden con los de Prado *et al.* (1983) en términos de que no se detecta una relación clara entre origen geográfico del material vegetal ensayado y frío-tolerancia.

Técnicas bioeléctricas, relacionadas con evaluaciones de potencial osmótico, contenido relativo de agua e impedancia eléctrica también han sido utilizadas para estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta de los eucaliptos ante las bajas temperaturas (Glerum, 1980; Serrano y Pardos, 1994)

En *E. globulus*, las técnicas anteriores se han utilizado para evaluar el efecto de distintos esquemas de endurecimiento de plantas de vivero, sometidas artificialmente a heladas de hasta -10°C en una cámara refrigerada (Serrano y Pardos, 1994). De tales estudios se desprende que plantas jóvenes de *E. globulus* son capaces de expresar algún grado de endurecimiento después de ser sometida a tratamientos de aclimatación consistentes en exposición a temperaturas relativamente bajas (6 a -2°C) durante 7 noches consecutivas, resultando mayor el grado de endurecimiento mientras más baja es la temperatura de aclimatación dentro del rango ensayado. También se observa una diferencia entre los testigos y las plantas endurecidas de hasta 3,1°C en la temperatura a que se manifiestan los daños. Junto con aumentar el endurecimiento se produce también un incremento de la impedancia eléctrica y una disminución del potencial osmótico y del contenido relativo de agua, aún así, atendiendo a la gran variabilidad en los estados fisiológicos de las plantas individuales, estos parámetros no constituyen predictores seguros para efectuar selección precoz por resistencia al frío.

Enfoques similares para desarrollar procedimientos de selección precoz para tolerancia al frío también han sido documentados por Marien (1979) y Pardos y Pita (1989), no obstante Higa¹ señala que no existe correlación adecuada entre los resultados de estas selecciones y la posterior tolerancia exhibida por las plantas cuando son establecidas en terreno.

A pesar de la literatura existente en relación al proceso de adaptación o aclimatación al frío de las plantas, aún no se conocen a cabalidad los mecanismos involucrados en tal proceso, sugiriéndose por lo mismo la adopción de distintas estrategias prácticas para sobrellevar esta limitación en el desarrollo de *E. globulus* (Gutiérrez *et al.*, 2001; 2002).

2.3 Alternativas para sobrellevar las limitaciones impuestas por el frío al cultivo de *E. globulus*

Reconociendo la vulnerabilidad de *E. globulus* a las bajas temperaturas, y atendiendo a las demandas de las empresas de pulpa por contar con material genético adaptado a condiciones de frío y capaz de exhibir rendimientos productivos rentables bajo esta restricción de sitio, se han buscado alternativas de producción que permitan superar esta limitante. Al respecto, existen diferentes opciones para desarrollar soluciones a esta limitación. Estas abarcan desde el cambio de especie hasta el uso de organismos transgénicos, pasando por procesos de aclimatación gradual de las plantas al frío y soluciones derivadas de la aplicación de tecnologías tradicionales de mejoramiento genético. Entre estas últimas se destacan la selección y clonación de genotipos tolerantes y la hibridación de *E. globulus* con otras especies tolerantes al frío (Gutiérrez *et al.*, 2001).

¹ Antonio Higa. 2002. Investigador Universidad Federal de Paraná y EMBRAPA. Comunicación personal

2.3.1 Cambio de especie

El enfoque más simple para evitar el daño causado por el frío en las plantaciones de *E. globulus* sugiere evitar su plantación en zonas afectadas por heladas y utilizar en su reemplazo otras especies mejor adaptadas a esas condiciones. En este sentido, una de las especies reconocidas por presentar una de las mejores combinaciones de resistencia al frío y velocidad de crecimiento es *E. nitens* (Lembke, 1977; Marquestaut *et al.*, 1977; McKimm y Flinn, 1979; FAO, 1981; Schönau y Purnell, 1987; Johnson y Wilcox, 1989).

En Chile, de las múltiples especies de *Eucalyptus* ensayadas desde los años '60 en los programas de introducción de especies ejecutados por INFOR, *Eucalyptus nitens* surgió como una de las más promisorias en cuanto a resistencia al frío y tasa de crecimiento. Lo anterior incidió importantemente en que se promoviera como una especie alternativa para ser plantada en aquellas zonas en que las bajas temperaturas restringían el desarrollo de *E. globulus* (INFOR, 1986).

2.3.2 Endurecimiento

El acondicionamiento gradual de las plantas a condiciones de baja temperatura es otro enfoque para reducir el daño por heladas. Estudios conducidos sobre la mayoría de las especies más comunes de *Eucalyptus* coinciden en señalar que la capacidad de estas plantas para resistir el frío está relacionada con la exposición gradual a temperaturas moderadamente bajas (Harwood, 1980; Kuminsky y Scarascia-Mugnozza, 1994). En el caso de *E. globulus*, Serrano y Pardos (1994) señalan que plantas endurecidas mediante exposición a temperaturas bajas (-2 a 6°C) durante una semana, pueden tolerar temperaturas 3°C más frías que plantas equivalentes sin endurecer. Análogamente, Paton (1983) menciona que plantas de *E. viminalis* sometidas durante dos días a una temperatura de 2°C, alcanzan un grado de endurecimiento que les permite soportar temperaturas de hasta -6,5°C, la cual resulta mortal en plantas sin este acondicionamiento.

2.3.3 Hibridación

Los cruzamientos híbridos de *E. globulus* con especies resistentes al frío (e.o. *E. gunnii* y *E. nitens*), teóricamente pueden generar una progenie que combine las características de *E. globulus* con la resistencia al frío de la especie complementaria (INFOR, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2001).

Abundantes estudios se han efectuado en el área de la hibridación de especies de *Eucalyptus* (Cauvin *et al.*, 1986; Martin, 1989; Tibbits *et al.*, 1991; Dungey *et al.*, 1993; Espejo *et al.*, 1994; Volker, 1995). De acuerdo con Shelbourne (2000) la factibilidad de desarrollar un programa operativo de hibridación está determinada por las características biológicas de las especies involucradas, la viabilidad de la descendencia híbrida y la capacidad de esta última para ser propagada vegetativamente.

En efecto, como consecuencia de la variabilidad de las progenies híbridas, se hace necesario efectuar rigurosas selecciones antes de identificar algún individuo que combine apropiadamente las características favorables de cada progenitor. Por otra parte, este genotipo excepcional sólo podrá masificarse en la medida que se propague vegetativamente, vale decir en la medida que se pueda materializar la clonación operacional del individuo híbrido identificado. Por lo mismo, el desarrollo de la tecnología de hibridación debe ser complementado con el desarrollo de protocolos operacionales de clonación (Gutiérrez *et al.*, 2001).

En el caso de *E. globulus*, reconociendo su importancia para la industria de celulosa y las limitaciones que el frío le impone, Tilyard *et al.* (2000) señalan que existe un especial interés por usar híbridos F1 de *E. nitens* X *E. globulus*, pero que el desarrollo de estos se ve limitado, tanto por la dificultad para producir semilla híbrida a gran escala, como por la escasa capacidad de propagarlos clonalmente.

En la práctica se observa que el desempeño de las progenies híbridas es muy variable, presentando una tendencia a expresar características intermedias entre las de las

especies progenitoras puras, situación que conlleva un sacrificio de las características deseables de cada padre. Tal situación ha sido confirmada para la resistencia al frío de híbridos F1 de *E. globulus* y *E. gunnii* (Manson y Potts, 1995), así como para la capacidad de enraizamiento de híbridos de *E. camaldulensis* X *E. globulus* (Awad y Gutiérrez, 1997).

Las situaciones extremas en el comportamiento de los individuos híbridos, correspondientes en el mejor caso a heterosis (vigor híbrido), o en el peor de ellos a características anómalas o aberraciones, son mucho menos frecuentes (Espejo *et al.*, 1994). Aún así, en cruzamientos híbridos entre *E. nitens* y *E. globulus* Tilyard *et al.* (2000) mencionan que la F1 exhibe en terreno un desempeño deficiente, con altas tasas de mortalidad, alta incidencia de anomalías y bajo crecimiento, señalando que no fue posible identificar ninguna familia de estos cruces que tuviera un desempeño adecuado. En forma similar, Volker (1995) compara el crecimiento de progenies híbridas y puras de *E. nitens* y *E. globulus* de cuatro años de edad, concluyendo que en el caso de los híbridos la distribución de frecuencias del diámetro presenta una mayor concentración en las clases inferiores, que las de las especies puras.

2.3.4. Clonación

La masificación, a través de mecanismos de clonación, de genotipos seleccionados por combinar tolerancia al frío con otras características productivas de interés, parece una forma más directa que la hibridación (y también complementaria a esta) para sobrellevar las limitaciones que le imponen las bajas temperaturas a *E. globulus*. (INFOR, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2001)

Esta alternativa se sustenta en la variabilidad intraespecífica exhibida por *E. globulus*, la que permite la existencia de individuos de características sobresalientes, en plantaciones que crecen en zonas con alta incidencia de heladas (INFOR, 2000). La variabilidad intraespecífica de *E. globulus* en relación a la tolerancia al frío ha sido

demostrada en diversos estudios, entre los que se encuentran los de Bara *et al.* (1994); Prado *et al.* (1994) y Droppelmann *et al.* (2001).

Todos los métodos de clonación son aplicables en alguna medida a los eucaliptos, pero el que concentra la mayor atención es el enraizamiento de estacas, debido fundamentalmente al gran número de copias que se puede obtener a partir de un ortet o árbol seleccionado, a su menor costo con relación a otras técnicas (micropropagación) y por requerir menos laboriosidad y evitar los problemas de incompatibilidad de los injertos (Ipinza y Gutiérrez, 1992; Gutiérrez *et al.*, 1994; Gutiérrez, 1995; Ipinza y Gutiérrez, 1998).

El uso de las técnicas de enraizamiento ha generado resultados impresionantes y muy conocidos en eucaliptos tropicales. También se han establecido programas operativos de producción de plantas con eucaliptos de zonas templadas, entre los cuales se destacan los desarrollados en España y Portugal con *E. globulus*. En estos programas el éxito obtenido obedece a una estrategia sencilla, en que se identifican individuos que junto con presentar características deseables, exhiben una capacidad rizogénica compatible con la clonación operacional. Ellos se evalúan en ensayos clonales y posteriormente se propagan masivamente para establecerlos en plantaciones comerciales operacionales (Gutiérrez *et al.*, 2001).

2.3.5. Transformación genética

Un enfoque moderno para enfrentar el problema de la susceptibilidad al frío de *E. globulus* sugiere el uso de la tecnología de transformación genética. Todos los seres vivos están constituidos por genes que determinan las características propias de cada organismo. La posibilidad de incorporarle genes adicionales a los de su composición original permite modificar sus características, permitiéndoles expresar peculiaridades específicas. El procedimiento para efectuar esta adición de genes se denomina transgenie y da origen a un organismo genéticamente modificado (OGM) o transgénico (INFOR, 2003).

Griffith *et al.* (1992) y Edwards *et al.* (1995) señalan que a las especies sensibles al frío, se les puede conferir resistencia adicional, mediante la incorporación de aquellos genes que codifican para la síntesis de proteínas anticongelantes en las especies adaptadas a bajas temperaturas. Keller *et al.* (2004) plantean que la identificación de los genes involucrados en las respuestas bioquímicas y fisiológicas de las plantas ante las bajas temperaturas, así como la determinación de los patrones de expresión de estos genes y un mayor conocimiento de sus funciones, entregarán las bases para una estrategia efectiva de mejoramiento de la resistencia a factores de estrés.

En el mismo sentido, estudios efectuados por Zúñiga (2000) en *Deschampsia antarctica* indican que esta planta es capaz de producir una gran cantidad de hidratos de carbono, principalmente sacarosa y polímeros de fructosa, que ayudan a disminuir su temperatura de congelamiento, de modo que aunque la temperatura sea muy baja, el tejido no se congela. Al respecto, el autor (*op. cit.*) indica que si se identifican los genes involucrados en este proceso, se pueden transferir mediante tecnologías de transformación genética, a especies de interés económico para mejorar su frio-tolerancia.

Coincidiendo con lo anterior, Griffin (1995) señala que la tolerancia al frío en eucaliptos es un carácter particularmente apropiado para mejorarlo mediante procedimientos de ingeniería genética. De igual forma, Edwards *et al.* (1995) mencionan a este rasgo junto con la tolerancia a herbicidas y la reducción de lignina como los tres principales caracteres que satisfacen criterios científicos y económicos que sugieren introducirlos o modificarlos mediante transgenie.

Algunos de los resultados más significativos de la transformación genética para mejorar la tolerancia al frío se han obtenido en plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas y silvestres creciendo en un recipiente, congeladas a -10° C y luego devueltas a temperatura normal. Las transgénicas se hacen resistentes al frío, en tanto las silvestres quedan completamente aniquiladas. Una respuesta semejante se obtiene cuando los genes CBF de *Arabidopsis* son incorporados en una especie relacionada como la canola (*Brassica spp*) (Somerville, 2002, *cit por* Figueroa, 2003). También se

ha logrado la transformación estable de tejido embrionario de *Pinus radiata* mediante cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizado como vector del gen CBF3 de *A. thaliana* (Gamboa *et al.*, 2003).

A pesar del claro potencial de la ingeniería genética para contribuir al mejoramiento genético de los árboles forestales, aún presenta algunos aspectos que deben ser depurados, de modo que su aplicación no es inmediata y el costo de su desarrollo es alto (Gutiérrez *et al.*, 2001). Además de las complejidades biológicas, propias de esta moderna tecnología, existen otros aspectos que han influido negativamente en su adopción. Entre ellos Chandler (1995) y Griffin (1995) mencionan a la negociación de patentes y licencias; las regulaciones, o falta de ellas, para la evaluación y liberación de transgénicos; y la negativa percepción pública de los eventuales efectos ambientales de esta tecnología.

Al respecto, Balocchi y Valenzuela (2004) estiman que es sólo cuestión de tiempo la superación de las limitaciones de carácter técnico y económico que restringen la adopción masiva de la transgenie. Reconocen como limitación principal a la incertidumbre respecto de su aceptación pública y postulan que será este último factor el que definirá el futuro de la tecnología de transformación genética en árboles forestales.

Análogamente, Strauss *et al.* (2004) analizan los resultados de 15 años de investigación en transformación genética de álamos, concluyendo que la transgenia es una herramienta extremadamente útil para la investigación en biotecnología y genómica funcional. Destacan que la transformación de álamos es una tecnología confiable, donde la estabilidad de los rasgos transformados es muy alta; la variación somaclonal es marginal y manejable; y donde existen diversos métodos para desarrollar sistemas de esterilidad para evitar el escape de genes y mejorar la bioseguridad. Aún así, coinciden en que será materia de largo plazo la masificación de estos árboles, lo que además requerirá de una favorable disposición de entidades públicas y privadas para cooperar en el progreso y difusión de esta tecnología.

3. MATERIAL Y METODO

Para cumplir con los objetivos enunciados se utilizó la información generada durante la ejecución del proyecto FONDEF D0011036 “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío”. A partir de ella se efectuó una síntesis y descripción de sus resultados, en función de los cuales se elaboró una propuesta, para que las instituciones participantes de esta investigación puedan hacer uso del material genético identificado por el proyecto.

El desarrollo de tal propuesta consideró los resultados del proyecto, el interés de las instituciones asociadas por su utilización, la naturaleza y objetivos de estas instituciones, y la forma en que estas se relacionan entre sí. Se considera como objetivo central un esquema de utilización que favorezca el mayor impacto de los resultados del proyecto sobre la productividad del sector forestal en su totalidad, resguardando los intereses particulares de los actores que invirtieron esfuerzos y recursos durante su desarrollo.

Paralelamente, se recurrió a fuentes bibliográficas y documentación consultada en Internet para recopilar antecedentes relacionados con el efecto del frío sobre las plantas y compendiar información dispersa en distintas fuentes respecto a los efectos del frío y los mecanismos que controlan la respuesta de las plantas ante este factor de estrés.

El mismo procedimiento se utilizó para identificar estrategias alternativas que puedan contribuir a sobrellevar las limitaciones impuestas por el frío al cultivo de *E. globulus*. Posteriormente el análisis de esta información permitió valorar objetivamente la contribución potencial que cada una de ellas puede aportar y en que medida resultan complementarias al enfoque desarrollado en el proyecto analizado.

3.1 El proyecto FONDEF D00I1036.

En los párrafos siguientes se entrega una síntesis de los principales aspectos metodológicos considerados en el proyecto “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío”, los cuales resultan de interés para comprender en forma cabal los resultados que posteriormente se presentan en esta memoria. Detalles operativos de la metodología del proyecto se presentan en el anexo 1.

El referido proyecto fue formulado en forma conjunta por el Instituto Forestal (INFOR), Bioforest S.A. y la Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal (CMGF). En su ejecución participó, en calidad de asociados, un conjunto de empresas forestales vinculadas a la CMGF². El proyecto fue dirigido por el autor de esta memoria, se extendió desde mayo del año 2001 hasta julio del año 2005 y contó con financiamiento del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDEF, organismo dependiente de la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología CONICYT.

Como población base se consideró a las plantaciones de *E. globulus* pertenecientes al patrimonio de las empresas asociadas al proyecto. Sobre este recurso se implementaron campañas de selección y sanción de árboles plus. Posteriormente, los árboles efectivamente seleccionados se habilitaron para propagación y se les evaluó su capacidad rizogénica mediante pruebas de enraizamiento de estacas conducidas en invernadero, bajo condiciones de ambiente controlado. En el último paso, los clones que exhibieron una capacidad rizogénica compatible con la clonación operacional se multiplicaron hasta generar material suficiente para establecer ensayos clonales, que permitan evaluar su desempeño en terreno.

² En orden alfabético las instituciones asociadas a la ejecución de este proyecto corresponden a: Bosques Arauco S.A., Bosques Cautín S.A., CONAF, Forestal Celco S.A., Forestal Los Lagos S.A., Forestal Tornagaleones S.A. y Forestal Valdivia S.A.

3.1.1 Selección y Sanción de árboles plus

Se implementó un programa de selección indirecta para tolerancia al frío, destinado a identificar a aquellos individuos de *E. globulus* que exhiben una marcada superioridad en caracteres de propósito general (volumen y forma), en áreas donde el daño por heladas ha afectado a la mayor parte de la población. Se prospectaron rodales de edad superior a cinco años y superficie mínima de cinco hectáreas, ubicados entre la VII y X regiones del país, en sectores previamente definidos como áreas de frío.

Corresponde a una selección de baja intensidad (un árbol cada cinco hectáreas) efectuada mediante una aplicación operacional del "sistema de selección por árboles de comparación".

Una vez efectuada la selección de los árboles candidatos a plus, se sometieron a un proceso de sanción por personal ajeno al que efectuó la selección. Este proceso tuvo por objetivo determinar en forma definitiva la calidad del candidato y la pertinencia de clasificarlo como plus e incorporarlo a las actividades consideradas en el proyecto, fue también la oportunidad en que se asignó un código definitivo para la identificación del clon.

La selección y sanción se realizó durante tres años consecutivos.

3.1.2. Habilitación para propagación

Después de cada temporada de selección y sanción, a fines de invierno de cada año, se voltearon los árboles positivamente sancionados, con el objeto de obtener desde ellos brotes rejuvenecidos y compatibles con la obtención de sus primeras réplicas vegetativas.

Cada campaña de habilitación culminó con la cosecha de los rebrotes de tocón y su despacho a invernadero, donde manteniendo un estricto control sobre la identificación

de los clones, se realizó la evaluación de su capacidad rizogénica. La cosecha se efectuó anualmente, durante el verano siguiente al volteo de los árboles, cuando los retoños alcanzan un estado de desarrollo compatible con la obtención de estacas enraizables.

3.1.3 Evaluación de enraizamiento

La evaluación de la capacidad rizogénica de cada clon se realizó mediante ensayos de enraizamiento de estacas conducidos en invernadero, utilizando 66 estacas por clon. Se utilizaron protocolos tradicionales de enraizamiento, los que contemplan el uso de propágulos con un par de hojas recortadas a la mitad, dispuestos en contenedores individuales de 140 cc de capacidad volumétrica, utilizando como sustrato una mezcla de turba y perlita (1:1 en volumen) enriquecida con fertilizantes de entrega lenta, aplicando un programa periódico de fumigaciones preventivas y un riguroso control de las condiciones ambientales.

El enraizamiento se evaluó a los 90 días, considerándose como clon enraizable a aquellos que lograron formar raíces adventicias en al menos el 50% de sus estacas. Aquellos clones que enraízan entre un 30 y 50% fueron sometidos a una segunda prueba, similar a la anterior, pero donde las estacas se obtienen desde setos conformados a partir de las estacas que enraizaron en la fase anterior. En esta segunda prueba también se consideraron enraizables a aquellos clones que enraízan en una proporción superior al 50%.

3.1.4 Ensayos clonales

Las réplicas vegetativas de aquellos clones clasificados como enraizables durante la evaluación de su capacidad rizogénica, se dispusieron en contenedores de mayor volumen en un jardín clonal y se manejaron como setos o plantas madres para obtener nuevos propágulos, destinados a generar las copias vegetativas requeridas para

establecer los ensayos clonales que permitirán evaluar el desempeño en terreno de los clones seleccionados.

Estos ensayos corresponden a plantaciones experimentales, establecidas con réplicas vegetativas de los árboles seleccionados por el proyecto, y que durante sus pruebas de enraizamiento mostraron una capacidad rizogénica superior al 30%. El objetivo de estas unidades es verificar en terreno el comportamiento de los clones y comparar entre ellos su desempeño relativo.

El establecimiento de estos ensayos contempló la definición de un diseño experimental, la preparación del sitio de acuerdo a estándares de silvicultura intensiva y la plantación propiamente tal.

Los clones de las dos primeras temporadas de selección que exhibieron porcentajes de enraizamiento superiores al 30% fueron representados en dos ensayos clonales, establecidos en los predios Trongol y Peralillo, de las empresas Bosques Arauco y Forestal Celco, respectivamente.

Estas pruebas fueron plantadas en septiembre del año 2004 y sometidas a una evaluación de sobrevivencia y crecimiento inicial en febrero y marzo del año 2005. Las evaluaciones posteriores, así como el establecimiento de nuevos ensayos, considerando a los clones restantes y diferentes sitios de plantación, necesariamente deberán desarrollarse fuera del horizonte de planificación del proyecto.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis y Discusión de Resultados del Proyecto FONDEF D00I1036

4.1.1 Selección de Árboles Plus

Como consecuencia de implementar las tres campañas anuales de selección de árboles plus, se prospectaron del orden de 7.600 ha de plantaciones de *E. globulus* mayores de 5 años de edad, en predios pertenecientes al patrimonio de las empresas asociadas al proyecto.

Esta actividad permitió identificar 1.519 árboles plus, efectivamente aprobados por la CMGF en un riguroso e imparcial proceso de sanción. Estos árboles fueron evaluados en términos dasométricos y de calidad, y su información registrada en bases de datos y fichas individuales de selección. En este proceso también recibieron un código único de identificación que los individualiza como clon durante todas las siguientes fases del proyecto.

En el cuadro 1 se resumen los resultados de las 3 temporadas de selección. En el cuadro 2 se presenta un detalle de la distribución de árboles seleccionados por región y comuna. En él se agregan a manera de descriptores los valores medios obtenidos por los árboles plus en volumen y rectitud de fuste, detallándose también el porcentaje de superioridad en volumen que exhiben en relación al promedio de los árboles de comparación utilizados durante el proceso de selección.

CUADRO 1
NÚMERO DE ÁRBOLES PLUS SELECCIONADOS, SANCIONADOS Y HABILITADOS
PARA PROPAGACIÓN POR TEMPORADA Y EMPRESA

PATRIMONIO	1ra temporada	2da temporada	3ra temporada	TOTAL
Bosques Cautín S.A.	51	147	83	281
Forestal Tornagaleones S.A.	37	110	30	177
Forestal Los Lagos S.A.	120	117	147	384
Forestal Celco S.A.	77	32	50	159
Forestal Valdivia S.A.	31	75	119	225
Bosques Arauco S.A.	29	86	178	293
TOTAL	345	567	607	1.519

CUADRO 2
CARACTERÍSTICAS MEDIAS DE LOS ÁRBOLES SELECCIONADOS Y DISTRIBUCIÓN
POR COMUNAS Y REGIONES

Región	Comuna	N° de árboles	Volumen (m ³)	Rectitud de fuste ^(*) (1 a 4)	Superioridad en volumen ^(*) (%)
VII	Romeral	13	0,440	3,13	96,70
VII	San Clemente	7	0,487	3,71	52,10
	sub total	20	0,456	3,33	81,09
VIII	Bulnes	28	1,226	3,54	80,80
VIII	Mulchén	30	1,333	2,57	35,20
VIII	Ninhue	22	0,346	2,72	58,10
VIII	Quilaco	33	1,149	2,83	64,10
VIII	San Carlos	52	1,127	3,42	50,50
VIII	San Fabián	35	1,529	2,90	81,00
	sub total	200	1,160	3,04	60,86
IX	Collipulli	23	0,734	2,78	47,50
IX	Ercilla	89	0,822	2,90	46,50
IX	Loncoche	23	0,931	3,71	35,20
IX	Los Sauces	50	0,321	2,72	44,00
IX	Pitrufquen	33	1,088	2,85	36,10
IX	Traiguén	171	0,434	2,65	46,40
IX	Villarrica	11	0,826	2,91	40,04
	sub total	400	0,617	2,81	44,52
X	Fresia	361	0,628	2,98	46,90
X	La Unión	106	0,912	3,19	47,00
X	Lanco	54	0,826	2,88	39,80
X	Los lagos	28	0,387	2,96	51,30
X	Los Muermos	19	0,559	2,97	54,40
X	Mafil	32	0,730	3,16	45,30
X	Mariquina	31	0,740	2,87	37,60
X	Mauñín	3	0,719	3,67	63,50
X	Paillaco	75	0,975	3,31	40,00
X	Purranque	179	0,555	3,04	44,60
X	Rio negro	11	0,562	3,00	36,00
	sub total	899	0,686	3,04	45,29
	TOTAL	1519	0,727	2,98	47,61

(*) Ver Anexo 1.

El cuadro anterior (cuadro 2) evidencia una alta concentración de clones seleccionados en la distribución sur de las plantaciones de *E. globulus*, precisamente donde las condiciones ambientales, particularmente la baja temperatura, definen situaciones marginales para la plantación de esta especie. Por su parte, los clones restantes corresponden a selecciones efectuadas en sitios de precordillera, o bajo condiciones microambientales de frío en la costa o el valle central.

4.1.2. Evaluación de capacidad rizogénica

Todos los árboles seleccionados fueron habilitados para propagación. Desde una gran proporción de ellos (84%) fue posible obtener retoños de tocón para confeccionar las estacas con que se evaluó la capacidad de enraizamiento de cada clon. El porcentaje restante corresponde a árboles que no rebrotan, que emiten rebrote de mala calidad o cuyo rebrote no fue aprovechable por distintas razones (dañados por animales, herbicida, fuego, vandalismo, etc.).

En total 1.278 árboles fueron representados en pruebas de enraizamiento, a partir de retoños de tocón, obteniéndose un porcentaje promedio de estacas enraizadas del 7% (cuadro 3).

CUADRO 3
NÚMERO DE ÁRBOLES REPRESENTADOS EN PRUEBAS DE ENRAIZAMIENTO A PARTIR DE RETOÑOS DE TOCÓN Y PORCENTAJE MEDIO DE ENRAIZAMIENTO OBTENIDO EN CADA TEMPORADA

	1ra temporada	2da temporada	3ra temporada	TOTAL
Árboles Plus Seleccionados	345	567	607	1.519
Árboles en Pruebas de Enraizamiento	269 (78%)	516 (91%)	493 (81%)	1.278 (84%)
Enraizamiento promedio (desde retoños de tocón)	8,1%	6,8%	6,5%	7,0%

La situación anterior es coincidente con la señalada por diversos autores citados por Awad (1997), que mencionan a *E. globulus* como una especie de reconocida dificultad para enraizar. Al respecto, England y Borralho (1995), reconociendo las ventajas asociadas al uso de estacas enraizadas, señalan que su utilización se ve limitada precisamente por la dificultad que exhibe *E. globulus* para enraizar, sugiriendo por lo mismo, que se efectúe una intensa selección en función de la capacidad rizogénica.

Chaperon (1987) destaca que si bien se pueden encontrar clones de *E. globulus* capaces de enraizar en un 100%, la especie tiene una baja capacidad rizogénica, siendo el porcentaje medio de enraizamiento no mayor del 15%.

Efectivamente, en los estudios efectuados por el proyecto FONDEF se observó la gran variabilidad en capacidad rizogénica mencionada por Chaperon (1987), existiendo clones con una alta capacidad de enraizamiento (hasta 86%), pero que representan una muy baja proporción del material ensayado, de modo que el enraizamiento medio observado en cada temporada se mantuvo en el rango señalado (bajo el 15%).

En el cuadro 4 se detalla la distribución de clones por clase de enraizamiento, obtenido durante las tres temporadas consideradas en el proyecto FONDEF. En él, el porcentaje de enraizamiento corresponde a la expresión en términos porcentuales del número de estacas enraizadas respecto al total de estacas instaladas de cada clon.

CUADRO 4
ENRAIZAMIENTO DE CLONES A PARTIR DE ESTACAS DE RETOÑOS DE TOCÓN, SEGÚN
CLASE DE ENRAIZAMIENTO Y TEMPORADA

CLASE DE ENRAIZAMIENTO (%)	PORCENTAJE DE CLONES POR CLASE (N° DE CLONES POR CLASE)			
	1ra temporada	2da temporada	3ra temporada	TOTAL
% = 0	43,1% (116)	43,2% (223)	43,6% (215)	43,3% (554)
0 < % < 10	32,3% (87)	35,9% (185)	34,5% (170)	34,6% (442)
10 = % < 30	17,1% (46)	14,7% (76)	16,8% (83)	16,0% (205)
30 = % < 50	3,7% (10)	3,5% (18)	4,9% (24)	4,1% (52)
50 = %	3,7% (10)	2,7% (14)	0,2% (1)	2,0% (25)
TOTAL	100,0% (269)	100,0% (516)	100,0% (493)	100,0% (1.278)

Los clones de las tres temporadas exhiben el mismo comportamiento en cuanto a su enraizamiento medio (cuadro 3) y su distribución en las distintas clases de enraizamiento (cuadro 4). Totalizando las tres temporadas, se observa que el 56,7% de los individuos logra formar raíces en algunas de sus estacas, concentrándose principalmente en las clases de enraizamiento inferiores al 30%; una pequeña proporción de la población, el 6% de los clones, forma raíces en más del 30% de sus estacas, mientras que solo el 2% de ellos enraíza en valores superiores al 50% (cuadro 4).

La bibliografía normalmente señala los resultado de estaquillado de *E. globulus* en términos de enraizamiento promedio por tratamiento, no siendo frecuente los datos respecto a la distribución de los clones en cada clase de enraizamiento. Al respecto, sólo en UACH (1997) se señala una distribución de este tipo, aunque no indica los valores comprendidos en cada clase. Efectivamente, en tal estudio (*op. cit*) se evalúa el enraizamiento de 112 clones de *E. globulus*, clasificando su respuesta rizogénica en cuatro categorías de enraizamiento (nula, baja, media y alta), señalando que el 61,6%

de los clones no enraíza; el 31,2% tiene un enraizamiento bajo; el 4,4% exhibe un enraizamiento medio; y sólo el 2,7% presenta un enraizamiento alto. Esta tendencia es equivalente a la que se presenta en la columna "Total" del cuadro 4 y contribuye a confirmar que esta sería característica de la especie. Otro antecedente que apunta hacia la misma conclusión lo constituye el hecho de que en cada temporada se evaluaron clones distintos, y aún así se obtuvieron tendencias de distribución muy similares en las clases de enraizamiento.

Por otra parte, los resultados de enraizamiento obtenidos en el proyecto FONDEF son muy similares a los conseguidos en los programas operativos de producción de plantas de *E. globulus* por enraizamiento de estacas, conducidos en España por la empresa ENCE. Según lo señalado por Cañas (1990), el programa español identificó del orden de 1.744 individuos de *E. globulus* tolerantes a condiciones de sequía, de los cuales después de las pruebas de enraizamiento se identificaron sólo 16 individuos (menos del 1%) que exhibían porcentajes de enraizamiento mayores al 50%. En este estudio tal proporción alcanzó el 2%, valor que está en el mismo orden de magnitud que el reportado por el programa español. Valores de la misma envergadura fueron comunicados al autor durante una visita a los programas de propagación de clonal de *E. globulus* de las empresas CELBI y SOPORCEL en Portugal en el año 1995. En ambos casos se seleccionaron más de 1.000 clones para posteriormente propagar operativamente 18 en SOPORCEL y menos del 5% en CELBI.

Al evaluar la aptitud de los clones para formar raíces adventicias, a partir de estacas confeccionadas con retoños de tocón, se logra individualizar un total de 25 clones con una aptitud compatible con la clonación operacional (enraizamiento mayor al 50%). Sin embargo, atendiendo a que la respuesta rizogénica, además de su intenso grado de control genético, también está condicionada por las características del material a propagar, fundamentalmente su condición fisiológica y estado nutritivo, se efectuó una segunda evaluación de los clones.

En esta segunda evaluación, los ensayos de enraizamiento se montaron con estacas obtenidas desde setos o plantas madres confeccionados con las estacas enraizadas

en la primera evaluación, con el objeto de descartar que la baja respuesta observada inicialmente en la mayoría de los clones, estuviese determinada por el eventual deterioro de los retoños durante su cosecha y transporte.

Se re-evaluó la respuesta rizogénica, con estacas obtenidas desde setos, a 457 clones (cuadro 5). La prueba con los clones de la primera temporada consideró re-evaluar desde setos a todos los clones que obtuvieron algún grado de enraizamiento desde retoños; las pruebas con el material de la 2da y 3ra temporadas consideraron a aquellos clones con enraizamiento desde retoños inferior a 30% y superior a 4,5%.

CUADRO 5
NÚMERO DE CLONES RE-EVALUADOS A PARTIR DE ESTACAS OBTENIDAS DESDE PLANTAS MADRES Y PORCENTAJE MEDIO DE ENRAIZAMIENTO OBTENIDO

N° de clones	1ra temporada	2da temporada	3ra temporada	TOTAL
Evaluados desde Retoños de Tocón	269	516	493	1.278
Re-evaluados desde Plantas Madres	153 (56,9%)	151 (29,3%)	153 (31,0%)	457 (35,7%)
Enraizamiento promedio (desde plantas madres)	17,5%	11,4%	17,0%	15,3%

De acuerdo con Chaperon (1983) y Heth *et al.* (1986), el porcentaje de enraizamiento aumenta al usar estacas provenientes de plantas madres, respecto a aquellas obtenidas desde retoños de tocón.

Efectivamente, en los ensayos conducidos en el proyecto FONDEF se observa esta misma tendencia. Sin embargo, no es válido comparar directamente los resultados de enraizamiento desde retoños del cuadro 3 con los de plantas madres del cuadro 5, por cuanto en el primero de ellos se consideran todos los clones evaluados, incluyendo a aquellos que no enraizaron, mientras que el cuadro 5 sólo considera la reevaluación de clones que expresaron algún grado de enraizamiento cuando se ensayaron con estacas provenientes de retoños de tocón. Una comparación válida al respecto se

presenta en el cuadro 6, donde se contrastan exactamente los mismos clones, evaluados con estacas provenientes de retoños y de plantas madres.

CUADRO 6
PORCENTAJES DE ENRAIZAMIENTO OBTENIDOS CON ESTACAS PROVENIENTES DE
RETOÑOS DE TOCÓN Y DE PLANTAS MADRES

Origen de las estacas	1ra temporada (153 clones)	2da temporada (151 clones)	3ra temporada (153 clones)	TOTAL (457 clones)
Retoños de tocón	14,2%	11,3%	12,5%	12,7%
Plantas madres	17,5%	11,4%	17,0%	15,3%

Los resultados del cuadro 6 evidencian una leve mejoría de la respuesta rizogénica de las estacas provenientes de plantas madres, la cual de acuerdo con lo enunciado por Chaperon (1983), puede mejorar aún más, en la medida que se seleccione en cada generación a las plantas madres de mejor calidad. Por otra parte, según observaciones empíricas mencionadas por el personal de la unidad de propagación de Bioforest S.A., la primera cosecha de estacas desde una planta madre exhibe enraizamientos inferiores a los que registran las cosechas posteriores, siendo posible esperar porcentajes de enraizamiento superiores en las sucesivas estacas que se obtengan desde este material.

A pesar de lo anterior, atendiendo a que el objetivo del proyecto FONDEF no fue evaluar este comportamiento, sino que sólo identificar clones con adecuada respuesta rizogénica, no se establecieron ensayos que permitan confirmar y cuantificar la evolución de la capacidad rizogénica en función de las distintas cosechas y generaciones de plantas madres.

Un segundo elemento a considerar en la reevaluación de clones, es que si bien el porcentaje medio de enraizamiento experimenta un ligero aumento respecto al obtenido con estacas de retoños de tocón, esta conducta no es homogénea en todos los clones. Existen individuos que tras haber presentado elevados porcentajes de enraizamiento al ser ensayados con estacas de retoños, no enraízan al evaluarlos con

estacas de plantas madres. También se presenta la situación recíproca, donde clones con un bajo porcentaje de enraizamiento en la primera evaluación experimentan una considerable mejoría al ser enraizados desde setos (figura 1).

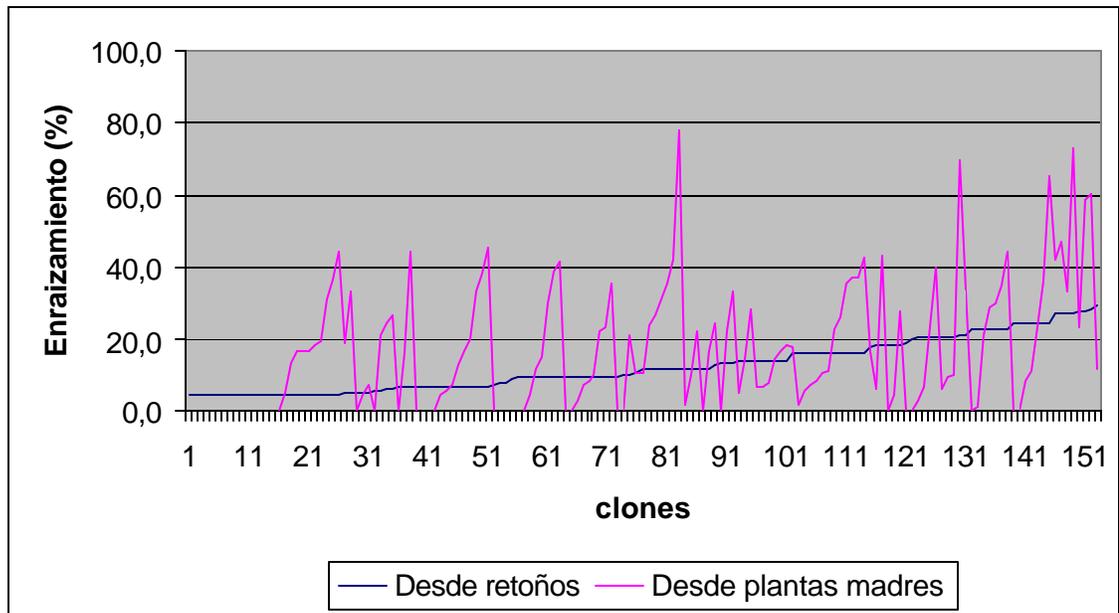


FIGURA 1
Variación en el porcentaje de enraizamiento de 153 clones de *E. globulus* al evaluarlos con estacas provenientes de retoños de tocón y desde plantas madres

La variación observada en la figura 1 indica que eventualmente existirían clones que aún siendo capaces de enraizar a partir de estacas de retoños de tocón no lo hacen cuando se evalúan con estacas provenientes de plantas madres. Esta situación es contraria a la tendencia reportada por la bibliografía (Chaperon, 1983; Heth *et al.*, 1986), y podría obedecer a que las plantas madres utilizadas para la reevaluación no serían representativas de la condición ni tamaño de una planta madre ideal, correspondiendo en la mayoría de los casos a estacas enraizadas en la temporada inmediatamente anterior.

No obstante lo anterior, tales irregularidades de comportamiento están documentadas en la bibliografía, mencionándose como uno de los fenómenos que limita el uso del

enraizamiento de estacas en la producción de plantas de *E. globulus*. Efectivamente, evaluaciones efectuadas en distintas cosechas de estacas sobre plantas madres de los mismos clones exhiben grandes variaciones tanto en el porcentaje de enraizamiento como en el número de raíces por estacas. Estas variaciones son impredecibles y se manifiestan aún cuando la metodología de propagación se mantenga constante (Sasse, 1995).

La distribución por clase de enraizamiento de todos los clones sometidos a reevaluación de su capacidad rizogénica mediante estacas provenientes de plantas madres se presenta en el cuadro 7.

CUADRO 7
RESULTADOS DE RE-EVALUACIÓN DE ENRAIZAMIENTO A PARTIR DE ESTACAS
PROVENIENTES DE SETOS.

Temporada	Enraizamiento desde Retoños (%)	N° de Clones	Enraizamiento desde setos (%)			
			% = 0	0 < % < 30	30 = % < 50	50 = %
1ra. temporada	0 < % < 30	133	42	72	11	8
	30 = % < 50	10	1	7	1	1
	50 = %	10	0	4	5	1
	total	153	43	83	17	10
2da temporada	4,5 = % < 30	151	51	77	17	6
	total	151	51	77	17	6
3ra temporada	4,5 = % < 30	153	41	76	30	6
	total	153	41	76	30	6
TOTAL		455	135	236	64	22

Como resultado de la re-evaluación (cuadro 7), se identificaron 22 clones con una capacidad rizogénica superior al 50%, 21 de ellos corresponden a individuos que en la primera evaluación con estacas de retoños habían enraizado menos del 30%.

Considerando ambas evaluaciones, se totalizan 46 clones distintos con una capacidad rizogénica superior al 50% (25 identificados desde retoños y 21 adicionales desde setos). En consecuencia el porcentaje de clones con enraizamiento superior al 50% se aumenta desde el 2% identificado en las pruebas con retoños hasta 3,6%.

El mismo análisis, efectuado ahora para los clones que enraízan en una proporción superior al 30%, indica que existen 69 clones adicionales a los 77 identificados en la primera evaluación. En consecuencia, considerando ambas evaluaciones el porcentaje de clones con respuesta rizogénica superior al 30% se eleva de 6,1 a 11,4%.

4.1.3 Ensayos clonales

Los antecedentes generales de los ensayos establecidos, así como los clones individuales representados en cada uno de ellos se resumen en los cuadros 8 y 9.

CUADRO 8
ENSAYOS CLONALES CON MATERIAL GENÉTICO TOLERANTE AL FRIO

Descripción	Ensayos clonales	
	Ensayo 1 Área patrimonial	Ensayo 2 Sitio de frío
Empresa	Bosques Arauco	Forestal Celco S.A.
Predio	Trongol H8	Peralillo
Comuna	Curanilahue	Quilleco
Condición	Costa VIII Reg	Precordillera VIII Reg
Diseño	Bloques al azar (1 árbol por parcela)	Bloques al azar (3 árboles por parcela)
Repeticiones	10 bloques	6 bloques
N° de clones	24	16
Testigos	Clones operacionales Forestal Arauco	Clones operacionales Forestal Arauco
Fecha plantación	29.09.04	25.09.04
Fecha evaluación	17.02.05	11.03.05
Sobrevivencia (%)	100%	93,8%
Altura (m)	0,46	0,56 m

**CUADRO 9
CLONES CONSIDERADOS EN CADA ENSAYO**

Codigo	Predio	Comuna	Ensayo	
			Trongol	Peralillo
CAF42	Cahual	Quilaco	X	X
CAF44	Cahual	Quilaco	X	X
CAF46	Cahual	Quilaco	X	X
FAF22	San Miguel	Ercilla	X	X
LCF16	Los Monos	San Fabián	X	
LCF44	Sn Jorge Zemita Oriente	San Carlos	X	
LCF65	Sn Jorge Zemita Oriente	San Carlos	X	
LCF72	Sn Jorge Zemita Oriente	San Carlos		X
LCF75	Sn Jorge Zemita Oriente	San Carlos	X	X
LLF7	Parcela 11	Fresia	X	
LLF13	Repil, Lote A	Fresia	X	
LLF21	Repil, Lote A	Fresia	X	
LLF24	Repil, Lote A	Fresia	X	
LLF30	Las Ortigas y Napeco	Fresia	X	
LLF34	Las Ortigas y Napeco	Fresia	X	X
LLF38	Las Ortigas y Napeco	Fresia		X
LLF54	Ortigas, Hijueta 2	Fresia	X	X
LLF63	Parcela 4	Fresia	X	
TGF5	Los Tallos	Paillaco	X	X
TGF16	Hijueta 54	Paillaco	X	X
TGF22	El Monte	Los Lagos	X	X
TGF25	El Monte	Los Lagos	X	X
TGF34	Monteverde	Máfil	X	X
TGF35	El Trebol	Los Lagos	X	X
TGF76	Lanco 3	Lanco	X	
TGF84	Lanco 3	Lanco	X	X

El diseño de los ensayos clonales depende de consideraciones prácticas y estadísticas, debiendo generar el máximo de información al mínimo costo (Molina, 2005). Al respecto, Gezan (2005) establece que la silvicultura clonal es una práctica relativamente nueva, y que por lo mismo, aún hay varios aspectos que deben ser estudiados y resueltos. Particularmente, la evaluación genética de clones es una de las áreas en que este autor (*op. cit*) reconoce falta de información para una adecuada definición de los ensayos clonales en terreno, sugiriendo diseños experimentales

óptimos o próximos al óptimo para evaluar clones y estimar parámetros genéticos que permitan maximizar la información obtenida de estos ensayos.

Los diseños utilizados en los ensayos del proyecto FONDEF, bloques completos al azar, con 10 bloques y un árbol por parcela (STP, single tree plot) en Trongol y 6 bloques, con parcelas lineales de tres árboles en Peralillo, permiten representar 10 y 18 rametos de cada clon, en cada sitio ensayado. Estos valores son superiores a los óptimos reportados por Gezan (2005) quien señala que con 6 rametos por clon y por sitio se obtienen adecuadas estimaciones de las medias clonales, pero reconociendo que mientras más rametos por clon se consideren, más precisas serán las estimaciones de los componentes de varianza y por ende de la heredabilidad.

La primera evaluación de los ensayos instalados por el proyecto FONDEF, efectuada entre los 5 y 6 meses de edad, ya mostraba diferencias estadísticamente significativas entre las alturas medias de los clones (cuadros 10 y 11). En el caso del ensayo Peralillo, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre clones para la variable sobrevivencia (cuadro 12).

La variable sobrevivencia es de fundamental importancia para determinar la idoneidad de los clones que se propagarán masivamente en el futuro. Tal como señalan Chambers *et al.* (1995) esta variable no se incluye como objetivo en los programas de mejoramiento genético, sin embargo tiene un gran impacto sobre la productividad de las plantaciones. El error de no considerar la sobrevivencia en la evaluación de otros caracteres, puede sesgar las estimaciones de los valores de mejora, particularmente si existe una correlación genética significativa entre ese carácter y la sobrevivencia.

En el caso de estos ensayos, los valores de sobrevivencia observados en la primera evaluación (93,8 y 100%) son altos y superan a los mencionados por Sánchez *et al.* (2004) para otros ensayos clonales de eucalipto, evaluados a los 10 meses de edad, donde obtuvieron valores de sobrevivencia que fluctuaron entre 68,5 y 98,8%. También superan el 86,1% obtenido por Barbour y Butcher (1995) al evaluar la sobrevivencia de estacas de *E. globulus* después de un año de plantación.

Los antecedentes anteriores indican que las plantas toleraron el estrés de la plantación y superaron sin inconvenientes el primer periodo estival, que es cuando generalmente se produce la mayor mortalidad post plantación.

CUADRO 10
PRUEBA DE DUNCAN PARA VARIABLE ALTURA (m) DE ENSAYO TRONGOL

CLON	Medias				
LCF65	0,37	A			
LLF63	0,37	A			
LLF24	0,38	A			
CAF42	0,42	A	B		
TGF22	0,43	A	B	C	
TGF5	0,43	A	B	C	
LLF7	0,43	A	B	C	
TGF34	0,44	A	B	C	
LLF54	0,44	A	B	C	D
TESTIGOS	0,45	A	B	C	D
CAF44	0,45	A	B	C	D
TGF35	0,45	A	B	C	D
LCF16	0,45	A	B	C	D
TGF76	0,46	A	B	C	D
LLF34	0,46	A	B	C	D
FAF22	0,47	A	B	C	D
LCF75	0,48	A	B	C	D
CAF46	0,50	A	B	C	D
TGF25	0,50	A	B	C	D
TGF16	0,50	A	B	C	D
LLF13	0,52		B	C	D
TGF84	0,53		B	C	D
LLF21	0,56			C	D
LLF30	0,56			C	D
LCF44	0,58				D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

CUADRO 11
PRUEBA DE DUNCAN PARA VARIABLE ALTURA (m) DE ENSAYO PERALILLO

CLON	Medias					
CAF44	0,43	A				
TESTIGOS	0,49	A	B			
LLF54	0,52		B	C		
CAF42	0,53		B	C	D	
FAF22	0,54		B	C	D	E
TGF22	0,54		B	C	D	E
LCF72	0,54		B	C	D	E
LLF38	0,56		B	C	D	E
TGF34	0,58		B	C	D	E
TGF5	0,60			C	D	E
LCF75	0,61			C	D	E
TGF16	0,62			C	D	E
CAF46	0,62			C	D	E
TGF35	0,62			C	D	E
TGF84	0,63				D	E
TGF25	0,63					E
LLF34	0,64					E

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

CUADRO 12
PRUEBA DE DUNCAN PARA VARIABLE SOBREVIVENCIA (%) DE ENSAYO PERALILLO

CLON	Medias		
LCF72	80,70	A	
TGF5	93,01	A	B
TGF22	95,17	A	B
TESTIGOS	95,49	A	B
CAF46	95,84	A	B
CAF42	97,88		B
TGF34	98,95		B
TGF16	98,95		B
CAF44	98,95		B
FAF22	98,95		B
TGF35	100,00		B
TGF84	100,00		B
TGF25	100,00		B
LCF75	100,00		B
LLF34	100,00		B
LLF38	100,00		B
LLF54	100,00		B

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Respecto a la variable altura, en ambos ensayos una proporción importante de los clones seleccionados por el proyecto exhibe un comportamiento mejor que el de los clones operacionales utilizados como testigos.

La diferencia de altura media entre ensayos no puede ser atribuida directamente a un efecto de sitio, por cuanto las mediciones no fueron simultáneas y la diferencia de tiempo entre ellas (aproximadamente un mes) es considerable en relación a la edad de los ensayos al momento de la evaluación.

En cualquier caso, por tratarse de una evaluación temprana las tendencias definitivas aún no se reflejan en los datos analizados, de modo que no se pueden adelantar conclusiones respecto a la idoneidad de cada clon ensayado.

Existen antecedentes de análisis efectuados en forma temprana en ensayos clonales de eucalipto, señalándose que las evaluaciones genéticas generalmente se pueden hacer a los tres años, e incluso a una edad menor en especies de rápido crecimiento (Lambeth *et al.*, 1994; Wei y Borralho, 1998, citados por Sánchez *et al.*, 2004). Evaluaciones efectuadas entre los 10 y 12 meses de edad se han efectuado en ensayos clonales de *E. urophylla*, pero su objetivo ha sido determinar interacción genotipo ambiente y no seleccionar clones en función de su desempeño, el cual se reconoce que puede cambiar en el tiempo (Sánchez *et al.*, 2004).

Para efectos de discriminar entre clones, e identificara los más adecuados para su representación masiva en plantaciones operacionales, es recomendable efectuar la evaluación en una edad cercana a la mitad de la rotación comercial, momento en que se puede obtener una adecuada estimación del comportamiento a la edad de cosecha. Evaluaciones efectuadas con anterioridad constituyen un antecedente para establecer correlaciones edad-edad, que orienten respecto a que tanto se puede adelantar la evaluación y obtener una buena estimación del comportamiento final de los árboles³.

³ Roberto Ipinza C. Dr. Ingeniero de Montes. Asesor genética cuantitativa. Comunicación personal

En relación a la evaluación inicial de los ensayos, efectuada en el marco del proyecto FONDEF, esta no resulta adecuada para discriminar el comportamiento entre clones para variables de crecimiento. Evaluaciones posteriores permitirán dilucidar esta situación. Sin embargo, debe reconocerse como mérito de esta iniciativa el haber establecido pruebas de terreno que en el futuro generarán valiosa información para orientar las decisiones relacionadas con el aprovechamiento clonal del material tolerante al frío.

4.2 Propuesta Para la Utilización de los Resultados del Proyecto FONDEF D00I1036

El proyecto FONDEF D00I1036 “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío” fue formulado para obtener tres resultados; (a) Identificación de árboles plus de *E. globulus* en zonas de frío; (b) Evaluación de la capacidad rizogénica de los árboles plus seleccionados; (c) Representación de los árboles con mayor capacidad rizogénica en ensayos clonales.

Los tres resultados anteriores y la información técnica asociada a ellos conforma un paquete tecnológico denominado “clones de *E. globulus* tolerantes al frío”, el que constituye la forma en que los usuarios adquirirán el desarrollo tecnológico obtenido por el proyecto. Los clones en sí representan el producto tecnológico posible de transferir o comercializar.

4.2.1 Distribución del material genético

Todas las instituciones vinculadas al desarrollo del proyecto, ya sea en calidad de ejecutores o asociados, adquieren el derecho a utilizar para los fines propios de su gestión todos los clones seleccionados durante el desarrollo del proyecto.

Paralelamente, con el objeto de retribuir diferencialmente los esfuerzos y recursos que cada institución destinó a la ejecución del proyecto, así como para discriminarlas

positivamente de aquellas que no participaron de este programa, se establecen limitaciones para transferir a terceros el producto de esta investigación. En lo esencial se acuerda que cada empresa, si bien podrá usar todos los clones, sólo podrá ejercer el derecho de propiedad sobre aquellos individuos que hayan sido seleccionados en áreas de su patrimonio. Sólo esos clones podrá transferirlos a terceros al título que ella estime conveniente.

Considerando que los fondos destinados a la ejecución de este proyecto son de naturaleza pública, los impactos del proyecto deben ser de nivel nacional. Para estos efectos y privilegiando la posición de los emprendedores que participaron en su formulación y ejecución, se definen alternativas para que terceros puedan acceder a las ventajas que involucra el uso del material genético seleccionado. Al respecto, se establece que tanto CONAF como INFOR, entidades del sector público dependientes del Ministerio de Agricultura y vinculadas a la ejecución del proyecto, podrán disponer del material genético para los fines propios de su quehacer institucional. En este sentido CONAF instaló un huerto semillero clonal con los clones identificados por el proyecto, con el objeto de producir semilla genéticamente mejorada que utilizará en sus programas de fomento y apoyo a pequeños propietarios. Por su parte, INFOR también podrá instalar una unidad equivalente y hacer uso de los clones seleccionados para labores de investigación, así como para otros estudios y evaluaciones que considere de interés.

4.2.2 Propuestas para el uso del material genético del proyecto

El negocio derivado del proyecto corresponde a la explotación comercial, por parte de las empresas forestales, del producto “clones de *E. globulus* tolerantes al frío”.

Como tal, este negocio es una iniciativa de largo plazo, cuya gestación se inicia con la ejecución del proyecto, para consolidarse con el establecimiento de plantaciones comerciales de estos clones y la obtención de los ingresos netos asociados a la cosecha de estas al alcanzar su rotación comercial.

Además del uso evidente de los clones para el establecimiento de plantaciones comerciales, estos conjugan también otras opciones de uso igualmente interesantes.

Los clones selectos pueden complementar y fortalecer los programas de mejoramiento genético de *E. globulus*, ofreciendo una mayor diversidad y amplitud a la base genética que los sustenta. Particularmente, pueden ser utilizados como una población de infusión o una sublínea que aporte tolerancia al frío a los actuales programas de mejoramiento genético, aspecto que puede materializarse mediante el diseño e implementación de adecuados esquemas de polinización controlada y evaluación de las progenies obtenidas.

Otra finalidad apropiada para los clones selectos es su utilización como material experimental y de investigación para mejorar la tolerancia al frío de la especie. En este contexto, pueden ser utilizados como un material patrón o testigo para comparar el desempeño de otros clones o progenies en cuanto a su tolerancia al frío, o en forma equivalente para valorar objetivamente los resultados de diferentes tratamientos de preacondicionamiento de plantas para tolerar bajas temperaturas, o para validar herramientas predictivas de la resistencia al frío desarrolladas en laboratorio.

4.3 Análisis de Alternativas para Sobrellevar las Limitaciones Impuestas por el Frío al Cultivo de *E. globulus*

Tal como lo señalan los antecedentes expuestos en la revisión bibliográfica, existen distintas alternativas cuya aplicación puede contribuir en alguna medida a mitigar los efectos del frío en el cultivo de *E. globulus*. Aún así, el potencial de contribución y el estado actual de desarrollo de ellas, determinan diferentes grados de aplicabilidad operacional.

Las particularidades propias de cada opción, en términos de su disponibilidad actual y expectativas futuras; su efecto sobre el aprovechamiento industrial de la especie; el

tiempo requerido para obtener resultados operacionales; los costos asociados a su implementación y la oportunidad en que ellas pueden ser utilizadas, constituyen los atributos fundamentales para comparar y analizar los distintos enfoques sugeridos para sobrellevar las limitaciones que el frío impone al cultivo de *E. globulus*. Una comparación en términos relativos de estas características, para las opciones tecnológicas: reemplazo de especie, endurecimiento, hibridación, clonación y transgenia se resume en el cuadro 13.

El análisis de las características reflejadas en el cuadro mencionado sugiere que la combinación de más de una de las opciones constituye un enfoque apropiado para complementar sus ventajas y obtener los mejores resultados, en término de minimizar el efecto del frío sobre las plantas a cultivar. También sugiere que las opciones identificadas pueden ser clasificadas en términos de su oportunidad de utilización en alternativas actuales y potenciales

CUADRO 13
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS TECNOLOGÍAS IDENTIFICADAS PARA
SOBRELLEVAR LAS LIMITACIONES IMPUESTAS POR EL FRÍO AL CULTIVO DE *E.*
***globulus*.**

Atributos relevantes	Opciones tecnológicas				
	1	2	3	4	5
Disponibilidad de la tecnología	Disponible	Disponible	Disponible	Disponible	En desarrollo
Efecto sobre aprovechamiento industrial	Reduce rendimiento pulpable	No afecta	Reduce rendimiento pulpable	No afecta	No afecta
Tiempo requerido para obtener resultados operacionales	Corto plazo	Corto plazo	Mediano plazo	Mediano plazo	Largo plazo
Costos involucrados	Bajos	Bajos	Medios	Medios	Altos
Expectativas futuras	Variables	Bajas	Medias	Medias	Altas

Opción tecnológica 1: Cambio de especie.

Opción tecnológica 2: Endurecimiento de plantas.

Opción tecnológica 3: Hibridación de *E. globulus* con especies tolerantes al frío.

Opción tecnológica 4: Selección y clonación de individuos tolerantes al frío.

Opción tecnológica 5: Transformación genética.

4.3.1 Cambio de especie

Utilizar especies de eucalipto distintas a *E. globulus* en aquellas zonas donde esta se ve afectada por las bajas temperaturas es una opción práctica para evitar los daños en las plantaciones. Es también una opción disponible en la actualidad, y que durante la década de los '90 constituyó uno de los principales argumentos para promover en forma significativa la forestación con *E. nitens*. No obstante, siendo una opción válida, en la práctica no contribuye a mejorar el desempeño de *E. globulus*.

Por otra parte, en términos del aprovechamiento industrial del recurso, las especies alternativas, entre ellas *E. nitens*, han manifestado un rendimiento pulpable menos atractivo que el de *E. globulus*. Esta situación, sumada al hecho que el principal destino de estas plantaciones lo representan las plantas de celulosa, hace que el

interés de las empresas por esta opción sea inferior al que despierta *E. globulus*. Por lo mismo, en la actualidad se destinan grandes esfuerzos a desarrollar esquemas de manejo de *E. nitens*, orientados a obtener productos alternativos, de mayor valor que la celulosa.

4.3.2 Endurecimiento de plantas (aclimatación)

El endurecimiento o aclimatación de las plantas a las bajas temperaturas también es una tecnología disponible. Su aplicación se verifica como una medida adicional de manejo de las plantas en vivero, las que mediante exposición a temperaturas relativamente bajas, sobre 0°, obtienen la capacidad de tolerar efecto de las heladas en mejor forma que las plantas no endurecidas.

El efecto de esta práctica es de poca duración, pero tiene el mérito de manifestarse precisamente durante la primera temporada de crecimiento de las plantas en terreno, de modo que la tolerancia adicional a las bajas temperaturas se expresa en el estadio de desarrollo en que son más sensibles al frío.

La naturaleza de esta alternativa la constituye en un adecuado complemento adicional para mejorar la tolerancia al frío de plantas generadas por cualquiera de las alternativas que se describen en los puntos siguientes.

4.3.3 Hibridación de *E. globulus* con especies tolerantes al frío

El estado actual de la tecnología de polinización controlada permite generar híbridos entre distintas especies de eucaliptos, existiendo de acuerdo a los antecedentes reflejados en la revisión bibliográfica, abundantes ejemplos de su aplicación. Es por lo mismo, una opción actualmente disponible para contribuir a otorgar tolerancia al frío a *E. globulus*, mediante su cruzamiento con otras especies que manifiesten una mayor tolerancia a este factor. El aprovechamiento de esta opción tecnológica pasa por usar

especies sexualmente compatibles, evaluar el desempeño de los individuos híbridos resultantes e identificar a los escasos individuos de interés, para posteriormente tener la capacidad de propagarlos vegetativamente.

Aún cuando la teoría indica que se pueden combinar por este mecanismo características deseables de dos especies distintas, y obtener en la mayoría de los casos una descendencia híbrida con un comportamiento intermedio entre el de las especies puras, en la práctica la bibliografía consultada señala que particularmente los híbridos de *E. nitens* X *E. globulus* no han exhibido un desempeño apropiado.

Atendiendo a la gran variabilidad de las progenies híbridas, su aprovechamiento práctico necesariamente demanda la capacidad de poder propagar vegetativamente a los individuos de interés. En este sentido, la tecnología de hibridación debe complementarse con la de clonación.

Por otra parte, el comportamiento intermedio exhibido por los híbridos en relación a sus padres, conlleva un sacrificio de las características de interés de las especies puras. Así por ejemplo, un eventual híbrido *E. nitens* x *E. globulus* no será tan resistente al frío como *E. nitens*, ni exhibirá rendimientos pulpables tan deseables como los de *E. globulus*. Al respecto, una acuciosa selección de los progenitores, asegurándose que ellos expresen ventajosamente los rasgos que se pretende transferir, contribuirá a mejorar el desempeño del híbrido obtenido.

En tal sentido, la selección y clonación de individuos de *E. globulus* tolerantes al frío es una tecnología complementaria con la de hibridación, por cuanto al mejorar las características de interés de las especies puras se obtiene un impacto directo en el resultado del híbrido, permitiendo por ejemplo aumentar la participación genética de *E. globulus*, al hacer retrocruces entre la F1 y el padre más deseable (*E. globulus*). Por lo mismo, clones de *E. globulus* seleccionados específicamente por combinar una manifiesta tolerancia al frío, con caracteres productivos deseables, constituyen los individuos ideales para ser considerados en la planificación de un programa de

cruzamientos híbridos con una especie complementaria que contribuya con tolerancia adicional a las bajas temperaturas.

4.3.4 Selección y clonación de individuos tolerantes al frío

La selección y clonación de individuos de *E. globulus* tolerantes al frío es un enfoque práctico y directo para mejorar el desempeño de plantaciones de esta especie en sitios afectados por bajas temperaturas. Esta estrategia se basa en la variabilidad intraespecífica que muestra *E. globulus* en relación a la tolerancia al frío, la que ha sido demostrada en observaciones empíricas y estudios documentados en la bibliografía consultada (Bara *et al.*, 1994; Prado *et al.*, 1994; Droppelmann *et al.*, 2001).

Entre sus ventajas se reconoce que es un método más directo que la hibridación, y a la vez complementario a ella, para mejorar la tolerancia al frío. Exhibe además la ventaja adicional de no sacrificar las características deseables de *E. globulus* al hibridarlo con otra especie que aporte frío-resistencia.

Tecnológicamente corresponde a una estrategia simple que hace uso de herramientas tradicionales y disponibles de mejoramiento genético y propagación, aspecto que lo hace mucho más accesible y aplicable que otras tecnologías de vanguardia, aún en desarrollo y con limitaciones para su masificación, como es el caso de la transformación genética.

Permite complementarlo con tratamientos de endurecimiento de plantas, para mejorar aún más el desempeño de las plantaciones en terreno durante el primer año de su establecimiento.

Como inconveniente se identifica el hecho de que la especie no es fácil de propagar vegetativamente y que sólo una pequeña proporción de los individuos selectos exhibe una capacidad rizogénica compatible con la clonación operacional mediante enraizamiento de estacas. Aún así, constituye el método adoptado por las principales

empresas forestales del país para mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus* y se ha materializado operacionalmente mediante la implementación del proyecto FONDEF que se presenta en esta memoria.

Por otra parte, el enfoque propuesto ha demostrado ser exitoso en otros programas operacionales de clonación. Al respecto, la referencia más directa corresponde a los trabajos efectuados en España, donde mediante la selección del orden de 1.744 individuos de *E. globulus* tolerantes a condiciones de sequía, permitió identificar 16 clones enraizables con los cuales se configuró un programa operacional de clonación para generar material vegetativo para el establecimiento de plantaciones comerciales (Cañas, 1990). El mismo procedimiento fue adoptado también en Portugal por empresas forestales como Celbi y Soporcel.

4.3.5 Transformación genética

Como se señala en la revisión bibliográfica, la tecnología de modificación genética ofrece la posibilidad de intervenir en la constitución genética de los individuos a través de la incorporación de genes exógenos, identificados y aislados en otros organismos.

De acuerdo con los antecedentes presentados en el cuadro 12, este enfoque constituye una opción potencial para contribuir a mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus*, pero su aplicación operacional no resulta inmediata.

Efectivamente, la tecnología de transformación genética en árboles forestales es una herramienta relativamente nueva. De acuerdo con Balocchi y Valenzuela (2004), los primeros ensayos de campo se efectuaron recién en 1988, ocasión en que se plantaron en Bélgica los primeros álamos transformados para resistir el efecto de herbicidas. En la actualidad existen un poco más de 200 ensayos y la única plantación conocida a escala comercial fue efectuada el año 2003 en China.

Por otra parte, el desarrollo de esta tecnología se concentra en relativamente pocos países. Según los autores (*op. cit.*), el 64% de los ensayos se encuentra en Estados Unidos, y un 41% se concentra en 7 países europeos. Más aún, 11 instituciones son responsables de más del 75% de los ensayos existentes. Estos antecedentes son especialmente relevantes si se considera que uno de los obstáculos para el desarrollo de transgenia es el considerable costo que involucra el pago de licencias, y royalties a los titulares de las patentes asociadas a estos desarrollos.

La diversidad de géneros considerados en las pruebas de campo también es escasa. Un 55% de ellas corresponden a *Populus* y un 15% a *Pinus*. El porcentaje restante está representado, en orden de participación, fundamentalmente por *Picea*, *Liquidambar*, *Juglans*, *Eucalyptus* y *Castanea*.

En la actualidad el número de caracteres modificados aún es restringido, siendo la tolerancia a herbicidas el rasgo más representado (31% de las pruebas de terreno). Este carácter más la resistencia a enfermedades e insectos, elementos de desarrollo reproductivo y modificación de la lignina concentran el 90% de las liberaciones experimentales de árboles transgénicos. Como hecho relevante debe destacarse que aún cuando se reconoce que esta tecnología puede ser de utilidad para mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus*, no existe ningún ensayo reportado para evaluar esta característica.

Los antecedentes anteriores confirman que la modificación genética es una tecnología nueva y poco difundida. Aún así, es conocida por un amplio sector de la comunidad, donde crea posiciones muy divergentes. A nivel de opinión general, existe un conocimiento vago sobre el tema, normalmente sesgado por visiones sensacionalistas que la asocian a manipulaciones genéticas nocivas para la salud humana y el medioambiente. Por el contrario, una visión más objetiva permite reconocer en esta tecnología una herramienta de gran potencial, cuya aplicación en el sector forestal permitirá materializar importantes ventajas productivas, pero que aún requiere de investigación adicional para dilucidar dudas respecto a eventuales impactos no deseados.

Efectivamente, si bien la transgenie ofrece un gran potencial, aún presenta aspectos tanto científico biológicos como político, sociales y económicos, que deben ser depurados. Una de las consideraciones técnicas más relevantes dice relación con la estabilidad del rasgo transformado, es decir que el gen exógeno sea heredado a la descendencia y que se exprese en ella de forma estable. Al respecto, si bien el ADN incorporado se integra a un locus simple del genoma nuclear y se hereda en forma mendeliana, existen evidencias de la pérdida del fenotipo transformado durante la meiosis, así como irregularidades en la expresión del carácter en la línea de individuos transformados (INFOR, 2003).

En términos económicos, existen limitaciones para calcular el retorno de las inversiones en transformación genética de árboles forestales, derivadas de los costos de los royalties asociados con los genes y procesos protegidos por patentes. Como la mayoría de estas innovaciones pertenecen a compañías biotecnológicas como Monsanto o ArborGen, y el material genético y los clones son propiedad de empresas forestales, existe la necesidad de crear consorcios entre ambas entidades para aplicar esta tecnología al mejor material genético de las empresas.

A su vez, los aspectos de política y regulación de la investigación y liberación de árboles transgénicos es un aspecto que aún debe ser resuelto para cada país y para cada esquema de certificación forestal. Así, de acuerdo con los estándares de certificación de FSC (Forest Stewardship Council) no se acepta la utilización de árboles genéticamente modificados por considerarlos incompatibles con el manejo forestal sustentable.

En Chile, la situación de los árboles transgénicos está en un estado aún más incipiente, siendo remota la posibilidad práctica de usar esta tecnología en el corto plazo para mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus*. Existen, sin embargo, algunas iniciativas realizadas con *Pinus radiata* y *Eucalyptus* transgénicos, entre las que se destacan los trabajos de GENFOR orientados a la obtención de pinos resistentes a la polilla del brote (*Rhyacionia buoliana*), y las investigaciones de Royal Dutch/Shell en Chile y Uruguay para producir eucaliptos con un tipo diferente de lignina, con la

finalidad de facilitar su remoción durante la fabricación de pulpa y papel. Por su parte, Forestal y Agrícola Monte Águila S.A., miembro de este grupo, efectuó pruebas de campo con 60 plantas de eucalipto tolerantes al herbicida glifosato en 1999, bajo la supervisión del SAG. Posteriormente, abandonó las pruebas señalando que no pretende continuar con los experimentos ni reemplazar sus plantaciones por eucaliptos transgénicos (INFOR, 2003).

En resumen, la situación de la tecnología de transformación genética para mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus* corresponde a la de una herramienta con un gran potencial futuro, cuya aplicación no se verificaría en el corto plazo. Este enunciado coincide con las conclusiones que se desprenden del artículo de Bitrán (2003), quien reconoce la necesidad de invertir en transgenia en Chile: En primera instancia a nivel experimental y exploratorio, mientras se liberan las barreras internacionales que limitan su uso, reconociendo que cualquier postergación involucraría un retraso en el desarrollo tecnológico del país. Y quien también destaca la necesidad de desarrollar un marco regulatorio que inspire confianza en todos los estamentos de la sociedad.

5. CONCLUSIONES

La selección y clonación de individuos de *E. globulus* tolerantes al frío corresponde a la alternativa implementada por el proyecto FONDEF D0011036 "Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío", para mejorar el desempeño de las plantaciones de esta especie en sitios expuestos a bajas temperaturas y heladas. La propuesta reconoce que *E. globulus* es una especie sensible al frío, pero aprovecha su variabilidad intraespecífica para seleccionar individuos considerablemente más tolerantes que el promedio de sus poblaciones y constituir con ellos una línea clonal tolerante al frío.

La implementación del proyecto FONDEF D0011036 permitió identificar una base compuesta por más de 1500 árboles plus de *E. globulus* seleccionados en áreas de frío. La evaluación de la capacidad rizogénica de estos árboles individualizó 46 clones con una capacidad rizogénica superior al 50%. De ellos 26 fueron representados en dos ensayos clonales establecidos en terreno.

El porcentaje de clones identificados por el proyecto, con una aptitud rizogénica compatible con la clonación operacional es del orden del 3,6%.

Se confirma la baja capacidad rizogénica indicada por la bibliografía para *E. globulus*, así como la gran variabilidad que esta exhibe entre clones y en distintas evaluaciones dentro de un mismo clon.

La evaluación inicial de los ensayos clonales establecidos por el proyecto arroja altos valores de sobrevivencia, pero no permite adelantar conclusiones respecto al comportamiento de los clones para variables de crecimiento. Por lo mismo, se recomienda efectuar nuevas mediciones a edades más avanzadas, de modo que la masificación de los clones selectos, para su uso en plantaciones comerciales, sólo se produzca una vez que se obtengan conclusiones definitivas de su desempeño en terreno, a una edad más cercana a la de la rotación comercial de la especie.

Los avances obtenidos por el proyecto en el desarrollo de una línea de *E. globulus* tolerante al frío son considerables. Los clones y la información generada fortalecerán y complementarán los programas de mejoramiento genético de *E. globulus*, y en función de los resultados definitivos de sus ensayos, se identificará material genético que mejorará la productividad de la especie en zonas donde se ve limitada por las bajas temperaturas.

Se identifican diferentes estrategias para evitar o reducir el efecto del frío sobre las plantaciones de *E. globulus*. Sus efectos y aplicabilidad son variados, reconociéndose que la complementación de ellas representaría el enfoque más adecuado para mitigar el efecto del frío sobre la especie.

La hibridación de *E. globulus* con especies tolerantes al frío es una tecnología disponible para generar material genético tolerante al frío. Es menos directa que la selección y clonación de individuos frío-tolerantes de *E. globulus*, e involucra un sacrificio de las características deseables de cada progenitor. Aún así, es complementaria con el enfoque de clonación.

El endurecimiento de plantas mediante exposición gradual a bajas temperaturas, mejora su tolerancia al frío, resultando una medida complementaria de gran valor para mejorar el desempeño de las plantas durante su primera temporada en terreno.

Utilizar especies distintas a *E. globulus* en aquellos sitios donde el frío limita su desarrollo y sobrevivencia es una estrategia viable para reducir las pérdidas de productividad. No obstante, las especies alternativas sugeridas para esta condición, particularmente *E. nitens*, exhiben rendimientos pulpables menos atractivos que los de *E. globulus*.

La transformación genética es una moderna herramienta biotecnológica, que exhibe un gran potencial para contribuir a mejorar la tolerancia al frío de *E. globulus*. Sin

embargo, su estado de desarrollo y las restricciones para su uso sugieren que su aplicación a nivel operacional no se verificará en el corto plazo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALDEN, J. and HERMANN, R. 1971. Aspects of the coldhardiness mechanism in plants. *The Botanical Review*. 37 (1): 37-116.
- AREVALO, J. 1994. Efecto del manejo de raíces y tallo en plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. en vivero, en la resistencia a bajas temperaturas. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. 56 p.
- ARONSSON, A.; INGESTAD, T. and LÖÖF, L. 1976. "Carbohydrate metabolism and frost hardiness in pine and spruce seedlings grown at different photoperiods and thermoperiods", *Physiologia Plantarum*. 36: 127-132.
- AWAD, G. 1997. Índice de selección de clones de plantas de semilla de árboles plus. Universidad Austral de Chile. Proyecto de Propagación Clonal de Eucalipto. Ficha Técnica 3-97. Valdivia, Chile. Marzo de 1997. 4 p.
- AWAD, G. Y GUTIÉRREZ, B. 1997. Evaluación de la capacidad rizogénica de progenies híbridas F1 de *Eucalyptus camaldulensis* X *E. globulus*. Chile Forestal N° 247.
- BALOCCHI, C. y VALENZUELA, S. 2004. Introduction to GMO's and Biosafety in Forestry. In: Kellison, R.; Mc. Cord, S. and Gartland, K. (editors). Forest Biotechnology in Latin America. Proceedings from the Workshop Biotecnología Forestal. Global Biotechnology Forum. Concepción, Chile. 2-5, March 2004. Pp: 85-96.
- BARA, S.; ESPAÑOL, E.; VEGA, G. y RODRÍGUEZ, E. 1994. Test of Frost Resistance of Eucalyptus. En: Pereira, J. y Pereira, H. (Editores). Eucalyptus for Biomass Production. Lisboa, Portugal. Pp: 155-167.

- BARBOUR, E. y BUTCHER, T. 1995. Field testing vegetative propagation techniques of *Eucalyptus globulus*. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 313-314.
- BARCELÓ, J.; NICOLÁS, G.; SABATER, B. y SÁNCHEZ, R. 1995. Fisiología Vegetal. Ciencia y Técnica. Ediciones Pirámide S.A. Madrid. España. 566 p.
- BITRAN, E. 2003. Transgénicos en Chile: ¿Ser o no ser?. El Mercurio, 31 de marzo de 2003.
- CAÑAS, I. 1990. Selección Individual y Multiplicación Clonal de *Eucalyptus globulus* Labill. Jornadas Técnicas Forestales "Materiales Forestales de Reproducción en España". Huelva, España. 8 y 9 de febrero, 1990.
- CATALÁ, R. 2003. Identificación de nuevas rutas de señalización en la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis thaliana*. Resumen Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid. http://www.cibernetia.com/tesis_es/ciencias_de_la_vida/genetica/geneticamolecular/1. Consulta 7.12.2005
- CAUVIN, B.; POTTS, B. Y POTTS, W. 1986. Eucalyptus: Hybridation Artificielle- Barriers et Heredite des Caracteres. Annales de la Recherche Silvicoles, 1986. AFOCEL, Paris. Pp: 255-303.
- CHAMBERS, P. ; BORRALHO, N. y POTTS, B. 1995. The genetic control of survival in *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 233-234.
- CHANDLER, S. 1995. Commercialisation of genetically engineered trees. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield and quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 381-385.

- CHAPERON, H. 1983. Clonal propagation of eucalypt by cutting in France. En: Proceedings of a workshop on Eucalyptus in California. Sacramento, California. June 14-16, 1983. Pp: 108-114.
- CHAPERON, H. 1987. Vegetative propagation of *Eucalyptus*. En: Actas del Simposio sobre Silvicultura y Mejoramiento Genético de Especies Forestales. Centro de Investigación y Experiencias Forestales. Buenos Aires, Argentina. Pp: 215-232.
- CHRISTERSSON, L. 1978. The influence of photoperiod and temperature on the development of frost hardiness in seedlings of *Pinus sylvestris* and *Picea abies*. Physiologia Plantarum N° 44. Pp: 228-294.
- DARROW, K. 1983. Provenance studies of frost-resistant eucalypts in South Africa. In: Proceedings of Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 448-468.
- DROPPELMANN, F.; BALOCCHI, C.; MORALES, E.; ARRIAGADA, M. y CATALÁN, G. 2001. Evaluación genética de la tolerancia al frío de familias de medios hermanos de *Eucalyptus globulus*. En: Actas del Simposio Internacional IUFRO: Desarrollando el Eucalipto del Futuro. Valdivia, Chile. 10-15 de septiembre de 2001. CD.
- DUNGEY, H.; VOLKER, P; POTTS, B. Y OWEN, J. 1993. Interspecific Hibridisation between *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*: Preliminary Analysis of Early Growth and Frost Resistance. En: Proceedings of the 12° Meeting of Research Working Group 1 (Forest Genetic) of the Australian Forestry Council. Canberra, 15-18 february, 1993. Pp:104-106.

- EDWARDS, G.; FISH, N.; FUELL, M.; KEIL, J.; PURSE, J. Y WIGNALL, T. 1995. Genetic Modifications of Eucalypts. Objectives Strategies and Progress. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 389-391.
- ELDRIGE, K.; OWEN, J.; GRIFFIN, R. Y HARWOOD, C. 1983. Development of a Method for Assessing Frost Resistance of Eucalypts. In: Proceedings of Colloque International Sur les *Eucalyptus* Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 145-152.
- ENGLAND, N. y BORRALHO, N. 1995. Heritability of rooting success in *Eucalyptus globulus* stem cuttings. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 237-238.
- ESPEJO, J.; ENGLAND, N.; ROJAS, P. Y GRIFFIN, R. 1994. Resultados de Primeras Temporadas de Hibridación en *Eucalyptus* spp. En: Barros, S.; Prado, J. y Alvear, C. (Editores). Actas del Simposio Los Eucaliptos en el Desarrollo Forestal de Chile. Pucón, Chile, 24 al 26 de noviembre de 1993. Santiago, Chile. Abril de 1994. Pp: 51-60.
- FAO. 1981. Eucalypts for Planting. FAO Forestry Series N° 11. Rome, Italy. 677 p.
- FIGUEROA, J. 2003. El "switch" molecular que permitirá a los cultivos tolerar heladas y sequías. Revista Chile Riego N° 13. Enero 2003. http://www.chileriego.cl/revista/rev13/revista13_2.htm. Consulta 19.11.2004.
- GAMBOA C., ENGEL E., KRAUSKOPF E., ARCE P. Y VALENZUELA P. 2003. Transformation of *Pinus radiata* with *Arabidopsis thaliana* CBF genes, Santiago, Chile. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Villa Alemana, Chile. 23-26 de Septiembre de 2003. <http://www>.

scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-97602003000300015&script=sci_arttext&lng=es.
Consulta 7.12.05.

GEZAN, S. 2005. Optimal designs of clonal forestry trials: a simulation study. IUFRO Breeding Theory and Progeny Testing. <http://iufro.uncronopio.org/taxonomy/term/1> . Consulta 25.01.2006.

GLERUM, C. 1980. Electrical Impedance Techniques in Physiological Studies. N.Z. For. Sci. 10(1):196-207.

GONZÁLEZ, J. S/F. Ecofisiología y morfología del estrés debido a factores adversos. <http://www.fao.org/Regional/LAmerica/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contento/libro05/cap2.htm>. Consulta 19.11.2004.

GRIFFIN, A. 1995. Genetic Modification in *Eucalyptus* Breeding. Bridging the Gap Between the Laboratory and Plantation. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 398-402.

GRIFFITH, M.; ALA, P.; YANG, D.; HON, W. Y MOFFATT, B. 1992. Antifreeze Proteins Produced Endogenously in Winter Rye Leaves. Plant Physiol. 100:593-596.

GUTIÉRREZ, B.; IPINZA, R. Y CHUNG, P. 1994. Propagación Vegetativa y Silvicultura Clonal en Eucalipto. Ciencia e Investigación Forestal. Vol 8 (1):139-175.

GUTIÉRREZ, B. 1995. Consideraciones sobre la Fisiología y el Estado de Madurez en el Enraizamiento de Estacas de Especies Forestales. Ciencia e Investigación Forestal. Vol 9(2): 261-277.

- GUTIÉRREZ, B. ; MOLINA, M. ; BALOCCHI, C. y DROPPPELMANN, F. 2001. Desarrollo de una Raza Local de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío en Chile. En: Actas del Simposio Internacional IUFRO, Desarrollando el Eucalipto del Futuro. Valdivia, Chile. 10-15 septiembre, 2001. CD.
- GUTIÉRREZ, B. ; BALOCCHI, C. y DROPPPELMANN, F. 2002. Estrategia y Avances para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío en Chile. En: Actas 1er Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Santiago Chile. 23-25 de octubre, 2002. Facultad de Ciencias Forestales Universidad de Chile. Publicaciones Misceláneas Forestales N° 6. CD.
- HARWOOD, C. 1980. Frost Resistance of Subalpine Eucalyptus Species. I. Experiments Using a Radiation Frost Room. Aust. Jour. Bot. 28: 587-599.
- INFOR. 1986. Especies Forestales Exóticas de Interés Comercial para Chile. Instituto Forestal, Corporación de Fomento de la Producción. Santiago, Chile. 168 p.
- INFOR. 2000. Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío. Documento de formulación proyecto FONDEF D0011036. 8vo. Concurso Nacional de Proyectos de Investigación y Desarrollo FONDEF 2000. Instituto Forestal. Concepción, Chile. 75 p.
- INFOR. 2003. Implementación de Metodología de Transformación Genética en Especies de Eucalyptus. Documento de formulación proyecto. 11° Concurso Nacional de Proyectos de Investigación y Desarrollo FONDEF 2003. Instituto Forestal. Concepción, Chile. 97 p.
- IPINZA, R. y GUTIÉRREZ, B. 1992. Resultados preliminares del enraizamiento de estaquillas de *Eucalyptus globulus* tratadas con altas dosis de ácido indolbutírico. Ciencia e investigación Forestal. Vol 6(1):61-79.

- IPINZA, R. y GUTIÉRREZ, B. 1998. La Multiplicación Clonal en el Mejoramiento Genético Forestal. En: Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V. (Editores). Curso Mejora Genética Forestal Operativa. Valdivia, Chile, 16 al 21 de noviembre de 1998. Pp: 201-218.
- JOHNSON, G. Y WILCOX, M. 1989. Eucalypt Species Trials on Pumiceland. New Zealand Forestry 34(1):24-27.
- KELLER, G.; LADOUCE, N.; TEULIERES, C. and MARQUE, C. 2004. Expressions profiles of 3000 eucalyptus cDNAs under cold, osmotic or salt stress. En: Eucalyptus in a Changing World. International IUFRO Conference of the WP2.08.03 on Silviculture and Improvement of Eucalypts. Aveiro, Portugal. 11-15 october, 2004. CD.
- KUMINSKY, E. y SCARASCIA-MUGNOZZA, G. 1994. Biochemicals Modifications during Cold Hardening of *Eucalyptus* Clones. En: Pereira, J. y Pereira, H. (Editores). *Eucalyptus* for Biomass Production. Lisboa, Portugal. Pp: 143-154.
- LAMBERS, H.; STUART-CHAPIN, F. and PONS, L. 2000. Plant Physiological Ecology. 2nd printing. Springer-Verlag. New York. USA. 540 p.
- LANDIS, T.; TINUS, S.; McDONALD, E. and BARNETT, J. 1992. Atmospheric environment, Vol. 3. *The Container Tree Nursery Manual*. Agricultural Handbook. 674. Department of Agriculture. Forest Service. Washington, D. C., U.S.A., 144 p.
- LARCHER, W. 1995. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 3rd ed. Springer-Verlag. Berlin. Germany. 506 p.
- LEMBKE, C. 1977. N.Z. Forest Products Ltd. Turns to Eucalypts. Aust. For. Ind. Jour. 43(7): 26-31.

- MANSON, A. Y POTTS, B. 1995. Inheritance of Frost Resistance in F1 and Advanced Generations Hybrids of *Eucalyptus globulus* and *E. gunnii*. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 249-250.
- MARIEN, J. 1979. La Selectione Juvenile des *Eucalyptus* pour leur Resistance au Froid. Annales de la Recherches Sylvicoles. AFOCEL, France. Pp: 224-253
- MARQUESTAUT, J.; THIBOUT, H. Y CAUVIN, B. 1977. Essai d'Introduction d'*Eucalyptus* dans le Midi de la France. Annales de la Recherche Sylvicole, AFOCEL.
- MARTIN, B. 1989. The Benefits of Hibridisation: How Do We Breed for Them?. En: Proceeding of the IUFRO Conference: "Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry". Pp: 79-92.
- Mc KIMM, R. Y FLINN, D. 1979. Eucalypt Species, Site Preparation and Fertilizer Requirements for Reforestation of the Toorong Plateaux in Central Victoria. Aust. For. 42(2):117-124.
- MOLINA, M. 2005. Establecimiento y manejo de ensayos clonales. En: Gutiérrez, B.; Molina, M. y Ortiz, O. (editores). Clonación de Raulí. Estado Actual y Perspectivas. UACH-INFOR-CEFOR. Concepción, Chile. Pp: 105-126.
- NIXON, K. 1983. A test of fifteen eucalyptus species and provenances for frost resistance in Natal. En: Proceedings of Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 367-376.
- PALVA, E.; WELLING, A.; TAHTIHARJU, S.; TAMMINEN, I.; PUHAKAINEN, T.; MAKELA, P.; LAITINEN, R.; LI, C.; HELENIUS, E.; BOIJE, M.; ASPEGREN, K.; AALTO, O.; HEINO, P.; SORVARI, S.; KARHU, S.; KANERVO, E. and

- PIHAKASKI, S. 2001. Cold Acclimation and Development of Freezing and Drought Tolerance in Plants. *Acta-Horticulturae* N° 560. Pp: 277-284.
- PARDOS, J. y PITA, P. 1989. Resistence aus Geles de Plants d'*Eucalyptus globulus*: Evaluation Avec des Techniques Bioelectriques. En: Les Estrategies de Selection Face aux Technologies Modernes. Versailles, France. 57 p.
- PARRA, P. y CANALA-ECHEVERRÍA, J. 1994. Resistencia la frío de procedencias y familias de *Eucalyptus nitens* en Aysén. En: Barros, S.; Prado, J. y Alvear, C. (Editores). Actas del Simposio Los Eucaliptos en el Desarrollo Forestal de Chile. Pucón, Chile, 24 al 26 de noviembre de 1993. Santiago, Chile. Abril de 1994. Pp: 439-452.
- PATON, D. 1983. Physiology of Frost Resistance in *Eucalyptus*. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 107-125.
- PRADO, J.A.; PARRA, P.; MOLINA, M.; IPINZA, R. Y LÖEWE, V. 1994. Antecedentes sobre la Resistencia al Frío de Procedencias y Familias de *Eucalyptus globulus*. En: Barros, S.; Prado, J. y Alvear, C. (Editores). Actas del Simposio Los Eucaliptos en el Desarrollo Forestal de Chile. Pucón, Chile, 24 al 26 de noviembre de 1993. Santiago, Chile. Abril de 1994. Pp: 439-452.
- SANCHEZ, N.; VARGAS, J.; RUÍZ, L. y LOPEZ, J. 2004. Repetibilidad de parámetros genéticos en un ensayo Clonal de *Eucalyptus urophylla* en el sureste de México. *Agrociencia* N° 38: 465-475. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2004/jul-ago/art-10.pdf> . Consulta 26.01.2006.
- SÁNCHEZ-OLATE, M.; ZAPATA, J.; RIOS, D.; PEREIRA, G. y ESCOBAR, R. 2003. Efecto del fotoperíodo en el desarrollo de plantas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus* cultivadas en vivero. *Bosque* 24(2): 23-28.

- SANTOS, R. 1997. The Eucalyptus of California. [http:// www. Library.csustan. edu / bsantos / section2.htm](http://www.Library.csustan.edu/bsantos/section2.htm). Consulta 01.08.2005.
- SASSE, J. 1995. Problems with propagation of *Eucalyptus globulus* by stem cuttings. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero 1995. Pp: 319-320.
- SCHÖNAU, A. Y PURNELL, R. 1987. A different Approach to Site Evaluation and Some Preliminary Results. South African Forestry Journal 114: 19-25.
- SERRANO, L. Y PARDOS, J. 1994. Hardening and Cold Resistance in *Eucalyptus globulus*: Water Relations and bioelectrical tests of frost injury. En: Pereira, J. y Pereira, H. (Editores). *Eucalyptus* for Biomass Production. Lisboa, Portugal. Pp: 134-142.
- SHELBOURNE, C. 2000. Some Insighton Hybrids in Forest Tree Improvement. En: Dungey, H.; Dieters, M. and Nikles, D. (editors). Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium: Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Noosa, Quensland, Australia. 9-14 April, 2000. Pp: 53-62.
- SINGH, J. y LAROCHE, A. 1988. Freezing tolerance in plants: A biochemicals overview. Biochem. Cell Biol. N° 66: Pp:650-657.
- SKOLMEN, R. y LEDIG, T. S/F. *Eucalyptus globulus* Labill. Bluegum eucalyptus. [http:// www.na.fs.fed.us/ spfo/ pubs/ silvics_manual/ volume_2/ eucalyptus/ globulus.htm](http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_2/eucalyptus/globulus.htm). Consulta 1.8.2005.
- STRAUSS, S.; BRUNNER, A.; BUSOV, V.; MA, C. and MEILAN, R. 2004. Ten Lessons from 15 Years of Transgenic *Populus* Research. In: Kellison, R.; Mc Cord, S. and Gartland, K. (editors). Forest Biotechnology in Latin America. Proceedings from the Workshop Biotecnología Forestal. Global Biotechnology Forum. Concepción, Chile. 2-5, March 2004. Pp: 97-106.

- TIBBITS, W.; POTTS, B. Y SAVVA, M. 1991. Inheritance of Freezing Resistance in Interspecific F1 Hybrid of *Eucalyptus*. Theor. and Appl. Gen. 83: 126-135.
- TILYARD, P.; POTTS, B. and GORE, P. 2000. Advanced Generation Hibridisation between *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. En: Dungey, H.; Dieters, M. and Nikles, D. (editors). Proceedings of QFRI/CRC-SPF Symposium: Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. Noosa, Quensland, Australia. 9-14 April, 2000. Pp: 514.
- TOVAL, G. 2004. *Eucalyptus globulus* clonal silvicultura in mediterranean climate. En: Eucalyptus in a Changing World. International IUFRO Conference of the WP2.08.03 on Silviculture and Improvement of Eucalypts. Aveiro, Portugal. 11-15 october, 2004. CD.
- UACH. 1997. Avances del programa de trabajo 96-97. Universidad Austral de Chile. Proyecto de Propagación Clonal de Eucalipto. Valdivia, Chile. Abril de 1997. 9 p.
- VOLKER, P. 1995. Evaluation of *Eucalyptus nitens* x *E. globulus* for Commercial Forestry. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 222-225.
- XIE, Y. 2004. Research advances of cold tolerant eucalyptus in southern China. En: Proceedings of International IUFRO Conference: Eucalyptus in a Changing World. Aveiro, Portugal. 11-15 october, 2004. CD.
- ZUÑIGA, G. 2000. *Deschampsia antarctica*: La Planta que Viene del Frío. Bioplanet 1(5):30-32.

ANEXO N° 1

**DETALLES OPERATIVOS DE LA METODOLOGÍA DEL PROYECTO FONDEF D00I1036:
“CAPTURA DE GENOTIPOS PARA EL DESARROLLO DE UNA RAZA DE *Eucalyptus
globulus* TOLERANTE AL FRÍO”.**

En el presente anexo se detallan las pautas de operación definidas para efectuar las actividades comprometidas en el proyecto FONDEF D00I1036 "Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío".

ACTIVIDADES

1. SELECCIÓN DE ÁRBOLES PLUS

Tuvo por objetivo identificar un mínimo de 1.260 individuos superiores, en áreas de frío, en un período de tres años, con una intensidad promedio de selección de un árbol cada 5 hectáreas. Las áreas de frío corresponden a las comunas identificadas en las reuniones del Grupo Eucalipto de la Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal (CMGF)(cuadro 1).

La selección se concentró en áreas de frío coincidentes con el patrimonio de las empresas involucradas en el proyecto, estableciéndose que en el caso de no enterarse el número mínimo de árboles, los individuos faltantes se seleccionarán en patrimonio de terceros. En la práctica no fue necesario prospeccionar plantaciones de terceros.

La operación para esta actividad se dividió en las siguientes fases:

Definición de programa de trabajo

Se efectuó un programa de trabajo con cada empresa participante, para definir y priorizar las áreas y rodales a considerar en el programa de selección. Esta actividad fue coordinada por la dirección del proyecto y la CMGF

Aprobación y asignación de rodales

La aprobación de rodales estuvo a cargo de la CMGF. Consistió en verificar que el rodal se encontrara en áreas de frío; que la plantación fuese mayor de 5 años; y que la calidad del recurso fuera apropiada para efectuar la selección deseada. La aprobación se complementó con visitas a terreno en las que participaron los coordinadores del proyecto.

Durante esta fase se priorizó a aquellos rodales cercanos a la edad de rotación

Una vez aprobados los rodales, fueron asignados a la empresa correspondiente para que implemente en ellos una campaña de selección con la intensidad indicada (promedio un árbol cada 5 ha).

CUADRO 1
COMUNAS DONDE CONCENTRAR LA BÚSQUEDA DE ÁRBOLES PLUS TOLERANTES AL FRÍO

COMUNA	Nº DE PROP./COMUNA	SUPERFICIE (ha)
Colbún	13	273.9
Linares	18	520.5
Longaví	10	262.9
Molina	22	819.3
Pelarco	5	96.4
Pencahue	12	177.6
Rio claro	17	968.7
San clemente	16	547.6
TOTAL VII REGION		3,666.9
Coihueco	3	63.2
Chillán	1	76.8
Chillán viejo	7	554.9
Los Angeles	18	268.6
Mulchén	23	1,200.3
Pemuco	3	383.0
Quilaco	6	1,006.3
Quilleco	3	44.2
San carlos	3	129.1
Santa bárbara	5	417.1
TOTAL VIII REGION		4,080.3
Collipulli	4	353.5
Galvarino	7	94.3
Gorbea	4	154.5
Lautaro	8	1,082.2
Loncoche	1	37.3
Los sauces	5	322.6
Pitrufuquén	2	42.6
Temuco	7	199.9
Traiguén	4	65.7
Victoria	1	12.7
Vilcún	6	163.6
TOTAL IX REGION		2,528.9
La unión	11	745.5
Lanco	6	235.4
Los lagos	8	379.3
Máfil	4	281.3
Osorno	7	256.2
Paillaco	7	151.9
Panguipulli	1	22.4
Purranque	1	190.5
Rio negro	4	150.6
San pablo	4	57.3
Valdivia	14	595.9
TOTAL X REGION		2,470.4
TOTAL PROSPECCIÓN		12,746.5

Selección de árboles candidatos

La selección propiamente tal fue efectuada por contratistas de la empresa correspondiente, bajo su directa supervisión y coordinación. Los costos de esta supervisión corresponden al aporte de la empresa al proyecto (tal como se contempla en las cartas compromiso), mientras que los costos de selección propiamente tales fueron facturados a INFOR y se cancelaron con los fondos que el proyecto contemplaba para esta actividad.

El pago de esta faena al contratista de selección se efectuó en función de las hectáreas prospectadas y del número de individuos seleccionados y aprobados por el proyecto.

Se canceló como máximo un árbol cada 5 ha. El detalle de los valores a cancelar y forma de pago se estableció en los respectivos contratos que INFOR suscribió con cada empresa contratista.

La selección se efectuó bajo los esquemas tradicionales empleados en la CMGF, y en los proyectos de mejoramiento genético conducidos por INFOR, haciendo uso del sistema de los árboles de comparación, completando una ficha de evaluación individual para cada árbol y siguiendo las indicaciones que se detallan a continuación:

Las plantaciones en que se seleccionaron estos árboles estaban en sitios sometidos frecuentemente a bajas temperaturas, así se garantizaba que los mejores árboles correspondían a los que han resistido de mejor forma el frío.

En caso de que el sitio no correspondiese a condiciones de frío (condición que era certificada por la CMGF), los árboles que en él se seleccionaban no constituían parte de la población tolerante al frío (no se consideraban en el proyecto para ningún efecto).

En general, los árboles cumplían los siguientes requisitos

- Encontrarse en rodales coetáneos de densidad uniforme.
- Ser dominante (excepcionalmente codominantes).
- Diámetro superior al promedio del rodal.
- Fuste recto, cilíndrico y sin crecimiento en espiral.
- Copa de diámetro pequeño y balanceada.
- Poseer ramas cortas, de poco diámetro y con ángulo de inserción en el fuste lo más cercano a 90°.
- No estar inclinado.
- Presentar una buena tolerancia a enfermedades, deficiencias y plagas.
- No ser un árbol borde.

Una vez localizado un árbol que reunía estos requisitos, debía ser comparado con los 5 mejores árboles que se encontraban dentro de un radio aproximado de 20 m. Dependiendo de las condiciones del área, dicho radio podía aumentarse hasta 30m.

Los árboles de comparación debían ser elegidos considerando fundamentalmente su volumen, razón por la cual se les medía solamente diámetro y altura, pero sin descuidar las demás características de calidad.

Una vez que un árbol candidato era definitivamente seleccionado, se le asignaba un número el que se marcaba con pintura en dos caras opuestas del tronco a una altura visible. Del mismo modo, se

marcaban los árboles de comparación con números correlativos definitivos del 1 al 5, correspondientes a los anotados en el Formulario.

Cada árbol aprobado recibía un código compuesto por tres letras, las primeras dos identifican a la empresa en cuyo patrimonio se realizó la selección, seguido de la letra F (programa tolerancia al frío) más un número correlativo. Este código se usó para identificar permanentemente al clon durante todas las etapas del proyecto.

Cada árbol candidato a plus, así como a sus respectivos árboles de comparación, fueron evaluados en términos de las siguientes variables:

Altura:

Determinar la razón de altura mediante la siguiente fórmula:

$$A = (Hs / Hc) * 100 - 100$$

Donde: Hs: Altura candidato.

Hc: Altura media 5 árboles de comparación.

Posteriormente, La razón de las alturas se transforma en puntaje para el candidato mediante la escala del cuadro 2.

CUADRO2
ESCALA PARA ASIGNAR PUNTAJE EN FUNCIÓN DE LA SUPERIORIDAD DE ALTURA DEL CANDIDATO RESPECTO A SUS ÁRBOLES DE COMPARACIÓN

SUPERIORIDAD EN ALTURA	PUNTAJE
Menos de 10%	0
10 % - 11%	1
12 % - 13%	2
14 % - 15%	3
16 % - 17%	4
18% - 19%	5
20 %	6
Mayor a 20%	7

Si el árbol candidato es peor que el promedio de los árboles de comparación, se restaban puntos con la misma escala.

Volumen:

Determinar la razón de volúmenes mediante la siguiente fórmula:

$$V = (Vs / Vc) * 100 - 100$$

Donde: Vs: Volumen candidato (según función o D^2H).

Vc: Volumen medio 5 árboles de comparación.

Por cada 10% de exceso de volumen del candidato sobre los 5 árboles de comparación se asigna 1 punto extra.

Calidad de Copa:

Se evalúa subjetivamente desde el punto de vista del candidato respecto a los demás árboles, considerando radio de la copa, tamaño del tronco, competencia bajo la cual ha crecido el árbol, conformación de la copa y dominancia balanceada.

Rango de calificación: 0 a 2 puntos

Rectitud de fuste:

Para determinar rectitud se debe proyectar una línea imaginaria entre el fuste, al centro de la copa, y el centro del fuste en la base del árbol (figura 1).

1. Arbol fuertemente curvado o con curvaturas múltiples
2. Arbol con problemas de rectitud, cercano a 1
3. Arbol con curvaturas menores, cercano a 4
4. Arbol recto

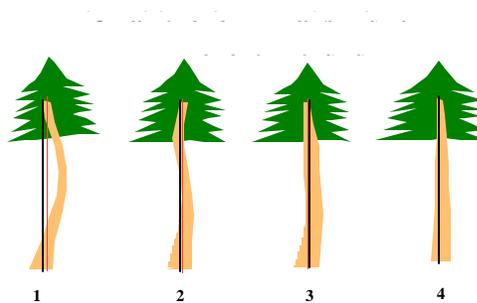


FIGURA 1: Pauta gráfica para evaluar rectitud de fuste

Esta fue una de las variables cualitativas de mayor importancia en la toma de decisión, se prestó especial atención en definir si el árbol era o no recto y en verificar que esto no haya sido alterado por efectos externos, como daños durante el control de malezas, daño mecánico producto de viento en etapas juveniles, etc. Bajo estas circunstancias se aceptó una torcedura basal hasta 1.0 metro desde el suelo.

Calidad de ramas:

Se juzga en forma subjetiva globalizando el diámetro y ángulo de ramas como un solo concepto. Es evaluado de 1 a 4, donde:

1. Ramas marcadamente más gruesas y/o ángulos más agudos que el promedio del rodal.
2. Calidad intermedia cercanas al valor 1
3. Calidad intermedia cercanas al valor 4
4. Ramas de diámetro pequeño y ángulo cercano a los 90°.

2. APROBACIÓN (SANCIÓN)

La aprobación de los árboles seleccionados fue efectuada por la CMGF y tuvo por objetivo verificar que estos cumplen con las condiciones para ser incorporados a las siguientes fases del proyecto. En esta fase se asignó el código definitivo a cada árbol aprobado.

El proyecto canceló a la CMGF los gastos propios del proceso de aprobación, de acuerdo a una tarifa acordada previamente.

Las actividades de supervisión y apoyo a la coordinación efectuadas por la CMGF constituyeron su aporte al proyecto y no fueron canceladas por éste.

3. HABILITACIÓN (VOLTEO) Y MANTENCIÓN DE TOCONES

La habilitación corresponde a la faena requerida para poder obtener retoños de tocón desde los árboles seleccionados y aprobados para su incorporación a las siguientes etapas del proyecto. Se efectuó a fines del invierno de cada temporada de selección. Para estos efectos, en forma posterior a la aprobación se procedió de la siguiente forma:

- Voltrear el árbol seleccionados y los 8 árboles vecinos de acuerdo al esquema de la figura 2, desramando los árboles volteados para asegurar que no hubiese sombra sobre el tocón del árbol selecto.
- En el volteo se tomaron las precauciones necesarias para evitar que los árboles vecinos caigan sobre el tocón del árbol selecto. Se volteó primero a los vecinos y en último lugar el candidato seleccionado
- Para voltear el árbol seleccionado, este se cortó entre 0,3 y 0,5 metro sobre el suelo. Posteriormente se repasará el tocón con una motosierra y cadena de buena calidad, efectuando un corte limpio y sin desprendimiento de corteza, dejándolo a una altura aproximada de 20 centímetros, y con un bisel en su parte superior de 15 a 30°, que evite la acumulación de agua sobre él (figura 3).
- Identificar el tocón con una etiqueta metálica, clavada en el centro del tocón, en la que se registró el código definitivo asignado durante el proceso de aprobación. También se pintó la base del tocón con pintura de color contrastante, a objeto de identificarlo fácilmente.

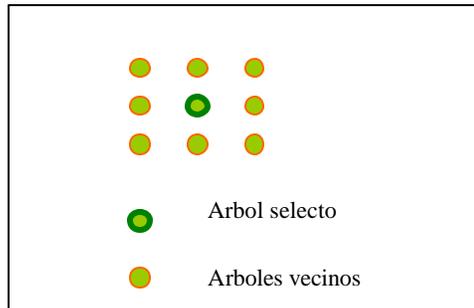


Figura 2: Árboles a voltear para habilitación de individuo seleccionado.

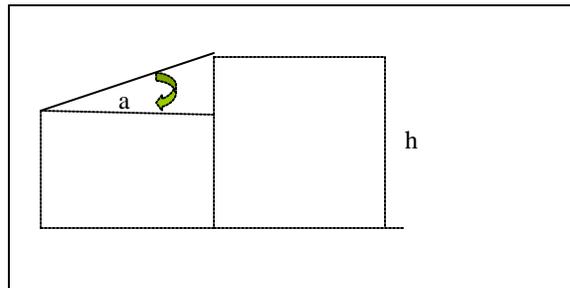


Figura 3: Esquema de tocón de árbol seleccionado (h: 20 cm; a: 15-30°)

Para efectos de monitorear el desarrollo del rebrote que se usaría para la confección de estacas, los tocones fueron revisados al menos una vez al mes, desde el momento de su volteo hasta la recolección de sus retoños para despacharlos a invernadero, donde se les avaluó su capacidad rizogénica mediante ensayos de enraizamiento de estacas.

Con posterioridad a cada visita se emitió un informe a la dirección del proyecto, en el que se indicaba la altura promedio de los retoños y el número promedio de rebrotes por tocón, de acuerdo a la siguiente pauta:

Número de retoños:

Sin brotación

menos de 5 brotes

entre 5 y 10 brotes

entre 11 y 20 brotes

más de 20 brotes

Altura:

Valor promedio aproximado en cm.

Rango de variación aproximado (altura máxima y mínima)

4. COSECHA DE RETOÑOS Y DESPACHO A LABORATORIO

La cosecha de retoños correspondió a la recolección de rebrotes desde el tocón de los árboles seleccionados y su despacho hacia invernadero. Se efectuó en verano, de acuerdo a un programa previamente establecido.

Los rebrotes a coleccionar debían ser sanos, con un adecuado grado de lignificación y pigmentación clorofílica, idealmente sin ramificación axilar. El material coleccionado debía llegar a los laboratorios de Bioforest antes del mediodía, del día siguiente a su cosecha.

Previo a la cosecha se efectuó una reunión de capacitación en terreno para transmitir los criterios de selección, colecta y transporte de los brotes.

El número de retoños a coleccionar y despachar a Bioforest debía permitir obtener al menos 50 estacas por árbol.

5. ENRAIZAMIENTO

La evaluación de enraizamiento se realizó con los retoños despachados desde terreno. Ella se efectuó en los invernaderos de Bioforest S.A., mediante ensayos de enraizamiento que consideraron 3 repeticiones por árbol, de 22 estacas cada una.

Los ensayos se evaluaron a los tres meses. En esa ocasión los clones que presentaban un enraizamiento superior al 50% pasaron a un banco de clones para la generación de las plantas que se usarían en los ensayos clonales.

Los clones que enraizaron entre 30 y 50% fueron re-evaluados con material obtenido desde las estacas enraizadas. Si en esta nueva evaluación arrojaban porcentajes de enraizamiento superiores al 50%, se incluían también en el banco clonal.

Los clones que no cumplían con los requisitos anteriores no fueron considerados.

El proyecto canceló a Bioforest, por el servicio de enraizamiento, una tarifa acordada en forma previa.

6. CONTRATOS Y FORMA DE PAGO

Las faenas de selección de candidatos, habilitación de árboles aprobados, mantención de tocones, colecta y despacho de retoños se efectuaron con contratistas especializados. Para estos efectos se suscribió un contrato tripartito entre INFOR, Empresa asociada al proyecto y Empresa contratista.

La empresa contratista fue la encargada de ejecutar las labores anteriores, bajo la supervisión y coordinación de la empresa asociada y la dirección del proyecto. INFOR fue el encargado de cancelar la operación de la empresa contratista con los fondos que el proyecto contemplaba para tales labores. Los pagos se efectuaron en la medida que se verificaron los avances comprometidos y de acuerdo a las tarifas y forma de pagos previamente acordados con los contratistas y reflejados en sus respectivos contratos.