

Editores

Braulio Gutiérrez • Oriana Ortiz • María Paz Molir

INFOR
445
1a. ed.
c.2

CLONACIÓN DE RAULÍ

ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS



0006791



CLONACIÓN DE RAULÍ: ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS

Editores

Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina.



La información contenida en este documento fue obtenida durante el desarrollo del proyecto FDI 00C7FT-12 “Silvicultura Clonal en Rauli para Incrementar la Productividad de Sitios Forestales en la IX y X Regiones del país”, ejecutado por el centro de experimentación Forestal CEFOR, la Universidad Austral de Chile UACH y el Instituto Forestal INFOR, con la participación de la Corporación Nacional Forestal CONAF y el Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, contando con el financiamiento del Fondo de Desarrollo e Innovación FDI de CORFO.

Copyright © 2005 CEFOR INFOR UACH
Derechos Reservados. Se autoriza su reproducción citando la fuente y reconociendo de manera explícita la fuente de información y el origen de la obra.

Primera edición 2005.
Clonación de Rauli: Estado Actual y Perspectivas
Editores: Braulio Gutiérrez C.; María Paz Molina B. y Oriana Ortiz N.
Tiraje: 500 ejemplares

ISBN. 956-8274-56-1
Registro de Propiedad Intelectual N° 149377 Agosto 2005.

ÍNDICE

AUTORES	iii
AGRADECIMIENTOS	v
PRÓLOGO	vii
1 PROPAGACIÓN VEGETATIVA Y SILVICULTURA CLONAL: ANTECEDENTES GENERALES.	
<i>Braulio Gutiérrez C.</i>	1
2 CLONACIÓN DE RAULÍ	
2.1 Macropropagación vegetativa de raulí: Injertación y enraizamiento de estacas. <i>Oriana Ortiz N. y Braulio Gutiérrez C.</i>	19
2.2 Micropropagación de árboles plus de raulí. <i>Ana María Sabja, Oriana Ortiz y Claudia Triviño.</i>	41
2.3 La embriogénesis somática como alternativa para la regeneración in vitro de raulí y roble. <i>Hermes Castellanos, Manuel Sánchez-Olate y Darcy Ríos.</i>	59
3 ENSAYOS CLONALES	
3.1 Selección de sitios para el establecimiento de ensayos clonales de raulí. <i>Juan Schlatter y Hans Steuer.</i>	75
3.2 Establecimiento y manejo de ensayos clonales. <i>María Paz Molina B.</i>	105
4 IDENTIFICACIÓN Y REGISTRO DE CLONES	
4.1 Identificación molecular de clones de raulí. <i>Viviana Becerra y Mario Paredes.</i>	127
4.2 Propiedad intelectual en obtenciones vegetales: Normativas y Regulación. <i>Braulio Gutiérrez C.</i>	145
5 CONSIDERACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS DE LA CLONACIÓN DE RAULÍ.	
<i>María Paz Molina B.</i>	165

AUTORES

VIVIANA BECERRA

HERMES CASTELLANOS

BRAULIO GUTIÉRREZ

MARÍA PAZ MOLINA

ORIANA ORTIZ

MARIO PAREDES

DARCY RÍOS

ANA MARÍA SABJA

MANUEL SÁNCHEZ-OLATE

JUAN SCHLATTER

HANS STEUER

CLAUDIA TRIVIÑO

AGRADECIMIENTOS

Este libro ha sido elaborado gracias al financiamiento otorgado por el Fondo de Desarrollo e Innovación (FDI-CORFO) al proyecto 00C7FT-12 “Silvicultura Clonal en Raulí para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales de la IX y X Regiones del País”.

El trabajo de investigación y recopilación de antecedentes que en él se representa fue efectuado por diferentes autores, pertenecientes a distintas instituciones chilenas de investigación. Algunas de ellas fueron coejecutoras del proyecto y otras se sumaron desinteresadamente a este esfuerzo para colaborar en la obtención de este libro.

A su vez, la realización del proyecto que da origen a esta obra fue posible gracias a la acción conjunta de profesionales, investigadores y técnicos de CEFOR, INFOR, UACH, INIA y CONAF, así como de representantes y contrapartes técnicas de las empresas COFOMAP S.A., Forestal Neltume Carranco S.A., Agrícola y Forestal Taquihue Ltda. y Agrícola y Forestal Los Lirios Ltda.

A todos ellos, a sus instituciones y a la confianza manifestada por FDI al financiar este programa de investigación, manifestamos nuestro sincero agradecimiento.

PRÓLOGO

A diferencia de la gran controversia y debates ético-morales que genera la clonación de animales y, potencialmente, de seres humanos; la clonación de organismos vegetales a través de técnicas de propagación vegetativa es una actividad socialmente aceptada, que ocurre en la naturaleza y que ha sido practicada por el hombre desde la antigüedad.

Aún así, esta práctica no está libre de detractores, de modo que consideraciones respecto a los riesgos de los monocultivos clonales, variabilidad y amplitud de la base genética continúan creando algún grado de controversia entre especialistas. No obstante, las características distintivas de esta forma de propagación genera aplicaciones de indudable valor en el campo del mejoramiento genético, aspecto que resulta especialmente valioso en el caso de cultivos forestales.

La silvicultura clonal como elemento derivado de la propagación vegetativa brinda la posibilidad cierta de generar y manejar cultivos forestales en una forma ligeramente distinta a la convencional, pero con importantes implicancias positivas en sus aspectos productivos y en la homogeneidad de los productos a obtener. Para lograr esto, no basta con reemplazar el uso de semillas por el de las técnicas de clonación. Muy por el contrario, existen consideraciones fundamentales que de no tenerse en cuenta sólo diluirán las ventajas de la clonación y no generarán ningún beneficio adicional. Entre ellas, la calidad de los individuos a clonar y el compromiso ineludible de probar el material clonado en rigurosos ensayos antes de difundirlo masivamente, son las principales.

Sólo observando estrictamente las consideraciones anteriores se podrá recomendar o sugerir el uso responsable de la clonación y obtener los mayores beneficios que ella pueda brindar.

Habida cuenta de la observación anterior, el paso siguiente es cómo usar en la forma más eficiente la clonación para contribuir efectivamente a mejorar la productividad de los cultivos forestales. Este ha sido precisamente el objetivo fundamental del proyecto "Silvicultura clonal en raulí para incrementar la productividad e sitios forestales en la IX y X regiones del país".

Tal iniciativa, co-ejecutada por el Instituto Forestal (INFOR), la Universidad Austral de Chile (UACH) y el Centro de Producción y Experimentación Forestal (CEFOR) ha sido financiada por el Fondo de Desarrollo e Innovación (FDI de CORFO), surgiendo como una respuesta a la necesidad de diversificar la base productiva del sector forestal y a la conveniencia de integrar modernas aplicaciones biotecnológicas para recuperar y restaurar el potencial productivo de una de las principales especies de los bosques nativos chilenos.

Sin duda, el importante auge que exhiben las modernas aplicaciones biotecnológicas constituye un gran estímulo para hacer uso de sus ventajas en pos de los objetivos perseguidos en la producción forestal. En este sentido, las tecnologías de micropropagación o cultivo in vitro brindan la posibilidad de multiplicar a tasas exponenciales un determinado material genético,

permitiendo masificar rápidamente las ganancias asociadas a los programas de mejora. Junto a ellas, las aplicaciones de la biología molecular en la caracterización del ADN de individuos específicos, también constituyen un apoyo en el mismo sentido, al permitir identificar y certificar que efectivamente un material genético es constituyente de un clon determinado, facilitando su identificación inequívoca.

Por otra parte, y en gran medida como consecuencia de la importancia que adquiere el dominio de material genético de características productivas especialmente relevantes, los derechos de propiedad intelectual y las normativas que regulan estos derechos y sus aplicaciones conforman otro tema que se relaciona con la clonación y que incidirá posteriormente en los negocios que este material puede generar.

Reconociendo la diversidad de temas que se relacionan con el eficiente aprovechamiento clonal de material forestal, particularmente de una especie tan relevante como el raulí, el equipo de trabajo del proyecto FDI "Silvicultura clonal en raulí para incrementar la productividad e sitios forestales en la IX y X regiones del país" consideró pertinente elaborar el presente texto para resumir gran parte de esta información.

En este libro, junto con los alcances técnicos de las temáticas relacionadas con la clonación de raulí, se analizan también los aspectos legales y las consideraciones fundamentales de la silvicultura clonal y los ensayos clonales. También se incluyen las tecnologías tradicionales de propagación vegetativa y se analizan las consideraciones y perspectivas futuras del uso de la clonación en raulí.

La diversidad de temas y la especificidad de cada uno de ellos han determinado que esta obra haya podido concretarse sólo gracias a la desinteresada y experta colaboración prestada por los autores de sus respectivos capítulos. A todos ellos nuestro especial reconocimiento por la dedicación y profesionalismo comprometidos en la obtención de este libro.

*Braulio Gutiérrez C.
Agosto de 2005*

PROPAGACIÓN VEGETATIVA Y SILVICULTURA CLONAL: ANTECEDENTES GENERALES

Braulio Gutiérrez C.¹

INTRODUCCIÓN

La propagación vegetativa, también denominada propagación asexual, agámica o clonal, se ha utilizado desde la antigüedad como una forma de producción de plantas, constituyendo en algunos casos la forma tradicional de multiplicar a algunas especies arbóreas. Ella representa uno de los principales avances de la agricultura primitiva, mediante el cual los mejores individuos de plantas alimenticias podían reproducirse en forma simple encajando en el suelo segmentos de sus tallos y dejándolos enraizar. Posteriormente, el desarrollo de invernaderos y otros elementos auxiliares de la propagación han permitido la multiplicación clonal a gran escala de una amplia gama de plantas usadas para distintos fines productivos.

Independiente de su valor como herramienta de multiplicación, y de su uso como fuente de material homogéneo para investigación, las verdaderas ventajas de la propagación vegetativa se relacionan estrechamente con la calidad de los individuos que se están multiplicando. Por lo mismo, su uso resulta particularmente interesante cuando se integra en el marco de un programa de mejoramiento genético, permitiendo amplificar las ganancias genéticas al propagar masivamente el mejor material generado en el programa, y posibilitando su utilización a través de esquemas de silvicultura clonal.

Las ventajas productivas de las plantaciones clonales han sido largamente reconocidas en el mundo. Éstas, al capturar la varianza genética no aditiva pueden resultar más eficientes que las plantaciones de individuos obtenidos mediante semillas de familias seleccionadas, las cuales sólo traspasan una proporción de su superioridad a sus descendientes, específicamente aquella correspondiente a la varianza genética aditiva. A pesar de esto, aún persisten algunos cuestionamientos respecto al uso de propagación vegetativa y silvicultura clonal, principalmente relacionados con la reducción de la base genética de estas poblaciones y su eventual vulnerabilidad ante efectos ambientales.

¹ Instituto Forestal, Sede Bio Bio. E-mail: bgutierr@infor.cl

Las diferentes posiciones adoptadas por detractores y promotores de la silvicultura clonal pueden dar pie a intensos debates, y llegar a constituir posiciones irreconciliables. Aún así, al analizarla en profundidad esta polémica no parece especialmente relevante. Al respecto, debe considerarse que los esquemas clonales no representan en ningún caso una opción excluyente para el uso de semillas o propagación sexual, la cual indudablemente es la única forma de generar variabilidad y obtener nuevas combinaciones genotípicas que resulten especialmente valiosas para los objetivos propuestos. Por el contrario, ambas, la propagación vegetativa y sexual, deben ser combinadas para cumplir con el objetivo común de aprovechar en la forma más eficiente la variabilidad genética de los recursos forestales.

En la actualidad, la propagación vegetativa, aplicada a través de la macropropagación y micropropagación, es considerada un componente esencial en muchos programas de mejora genética de empresas forestales en diversos países y ha sido utilizada con el propósito de optimizar la captura y el envío de las ganancias genéticas (aditivas y no aditivas) desde los programas de mejoramiento genético a las plantaciones y, por sobretodo, agregar valor a la madera. (Menzies, 1992, MacRae y Cotteril, 1997, cit. por Sabja, 1998).

La tendencia reflejada en el párrafo anterior se ve fuertemente potenciada por los modernos avances de la biotecnología. Así, las tecnologías de micropropagación o cultivo *in vitro*, cada vez más difundidas, ofrecen la posibilidad de multiplicar enormemente el número de copias de un determinado clon y facilitan la adopción de esquemas clonales para el establecimiento de las plantaciones de producción.

En el caso particular de raulí, el programa implementado para efectuar su mejoramiento genético contempló el uso de la propagación asexual como una herramienta para masificar el material genético de mayor valor productivo seleccionado en el transcurso de dicho programa. Esta actividad fue abordada en el proyecto "Silvicultura Clonal en Raulí para aumentar la Productividad de Sitios Forestales de la IX y X Regiones del País", financiado por el Fondo de Desarrollo e Innovación (FDI de CORFO), con el objetivo de implementar protocolos de micropropagación para esta especie y, posteriormente, establecer ensayos en terreno para evaluar el desempeño de los clones bajo esquemas de silvicultura clonal.

El presente libro es también un resultado de dicho proyecto, a lo largo de sus capítulos se describen los aspectos relevantes de la propagación clonal de raulí, siendo este primer capítulo introductorio, el encargado de entregar los antecedentes generales de estas materias y establecer el marco conceptual en el que se inscriben los resultados del proyecto.

Por último, es necesario mencionar que el programa de mejoramiento genético de raulí no se basa sólo en el aprovechamiento clonal de la especie; la clonación es una herramienta más del programa, el cual también utiliza la reproducción sexual a través de semillas para constituir una amplia base genética que respalde el progreso futuro del programa de mejoramiento. Así, se establecieron completos ensayos de procedencias y progenies, en los que se representa gran parte de la variabilidad genética exhibida por esta especie a lo largo de su distribución natural en el país. Los alcances específicos del proyecto original de mejoramiento genético de esta especie pueden ser consultados en detalle en Ipinza *et al.* (2000).

PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La propagación vegetativa es la generación de nuevos individuos a partir de células, tejidos u órganos, sin que se manifieste el proceso de fecundación que implica la fusión de los gametos o células sexuales. Esta forma de reproducción, también conocida como clonación, se basa en el concepto de totipotencialidad de las células, y se presenta en forma natural en algunos organismos inferiores y plantas. La totipotencialidad es la propiedad de cada célula vegetativa viviente de contener toda la información genética necesaria para regenerar al organismo completo del cual forma parte.

Tradicionalmente, en función de las técnicas empleadas, esta forma de propagación se clasifica en dos categorías. La primera, macropropagación, consistente en la formación de raíces o tallos adventicios en estacas y acodos, o en la unión de partes vegetativas en un injerto. La segunda, corresponde a la micropropagación, técnica que permite obtener plantas cultivando en forma aséptica porciones muy pequeñas de células o tejidos de la planta madre en recipientes de vidrio en que se puedan controlar las condiciones ambientales y de nutrición; esta forma de cultivo debe realizarse en condiciones denominadas *in vitro*, en instalaciones o laboratorios especiales, utilizando técnicas asépticas de manipulación y cultivo del material.

Este capítulo no abordará mayores detalles ni aspectos específicos de las técnicas de propagación, por cuanto en este mismo libro se presentan apartados escritos por especialistas, que describen las técnicas de macropropagación (estaquillado e injertación) y de micropropagación (organogénesis y embriogénesis) aplicadas en raulí.

APLICACIÓN DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA

La ventaja característica de esta forma de propagación la constituye su capacidad para capturar y transferir a los nuevos individuos todo el potencial genético de la

planta madre (ortet), permitiendo obtener copias genéticamente idénticas al individuo original. De esta forma, se constituye en una poderosa herramienta al servicio de los programas de mejoramiento genético, debido a que posibilita transferir aquellas características que por su baja heredabilidad no se traspasan eficientemente a la descendencia por vía sexual. Por esta razón, resulta particularmente interesante su utilización para lograr ganancias genéticas en características con un alto componente de variación genética no aditiva, como normalmente lo son el crecimiento, peso seco, contenido de celulosa y otros caracteres de interés forestal.

En investigación, las plantas clonadas constituyen un material homogéneo muy adecuado para ensayos y experimentos. Lo anterior permite disminuir la variación residual en las pruebas estadísticas, consiguiéndose una mejor interpretación de los efectos de los tratamientos en estudio.

Con la propagación asexual también se puede disponer de copias de las plantas de interés en un área centralizada, como un laboratorio o invernadero, para estudios intensivos; además posibilita la preservación de genotipos o combinaciones específicas de genes en bancos clonales para propósitos científicos o posibles usos posteriores en programas operacionales.

En el área operacional o productiva propiamente tal, con la propagación asexual es posible el desarrollo de huertos semilleros o bancos clonales orientados a la producción de semillas o propágulos vegetativos a gran escala, así como el uso directo del material vegetativo para el establecimiento de plantaciones clonales.

Las principales aplicaciones de las técnicas de macro (Gutiérrez, 1998) y micropropagación vegetativa (Sabja, 1998) se resumen en los puntos siguientes:

Macropropagación vegetativa

Todos los métodos de propagación vegetativa han sido probados en árboles forestales, aún cuando el más difundido lo constituye el enraizamiento de estacas. La amplia preferencia manifestada a nivel mundial por este procedimiento obedece a varias razones, entre las que se cuenta la gran cantidad de descendientes que se puede obtener de un árbol individual, evitando los problemas de incompatibilidad de los injertos y costos generalmente más bajos que el de los sistemas de micropropagación (Gutiérrez *et al.*, 1994; Gutiérrez, 1998).

La técnica de arraigamiento de estacas se usa en varios países. Un ejemplo clásico lo constituye el programa de producción de pulpa de eucalipto en Brasil. Allí se ha

instalado extensas plantaciones clonales, homogéneas, de muy alta productividad, excelente poda natural, contenidos de celulosa superiores al 50% e incrementos medios anuales superiores a los 70 m³/ha/año, características que en conjunto han significado un aumento en el rendimiento de los bosques del orden del 112% (Shimizu, 1988).

En el mundo, actualmente se producen millones de plantas de eucalipto por el sistema de estaquillado, principalmente especies subtropicales como *E. grandis*, y una proporción menor pero creciente, de especies de zonas templadas como *E. globulus*. Esta técnica de propagación vegetativa se está desarrollando muy velozmente y ha sido adoptada por empresas como CELBI y SOPORCEL en Portugal y ENCE en España, las que cuentan con programas operativos de clonación y establecimiento de plantaciones clonales de *E. globulus*.

Empresas españolas y portuguesas desarrollaron sus plantaciones operativas de *E. globulus* a partir de estacas, sobre la base de 20 a 30 clones seleccionados de entre 5.000 a 7.000 árboles plus iniciales. Constantemente han ido incorporando nuevos clones, ya sea de nuevas selecciones de campo, o a través de los programas de cruzamientos controlados que provienen de sus programas de mejoramiento genético. La propagación comercial de *E. globulus*, generalmente se inicia con plantas madres mantenidas en platabanda en el exterior o en invernadero, es una operación estacional en la que la mayor actividad de propagación se concentra en primavera y verano (MacRae y Cotterill, 1997, cit. por Sabja, 1998).

En *Pinus radiata*, estacas obtenidas desde plantas de un año de edad forman raíces si se colocan en platabandas. Para inducir la producción de estacas de tallo, las plantas madre se podan cuando tienen 4 meses de edad. Con este sistema se logra una tasa de multiplicación relativamente baja, de 3 a 5 veces por planta, en el primer ciclo, para producir 20 o más estacas el segundo año. En general, las plantas madre se manejan con podas y fertilización para mantenerlas en producción durante 4 a 5 años (Menzies y Aimers-Halliday, 1997).

En Nueva Zelandia, usan la propagación por medio de fascículos de *P. radiata*. Los fascículos son inducidos después de una poda apical en otoño. Posteriormente, durante el invierno, se disponen en contenedores en invernadero y luego se trasladan a platabanda o contenedores más grandes. Más de 80 estacas de fascículos pueden producirse desde una planta de 8 meses de edad, siendo la eficiencia de enraizamiento en invernadero superior al 90% (Menzies y Aimers-Halliday, 1997).

Otra técnica de macropropagación es la injertación. Esta puede conducir a una propagación más rápida de los padres seleccionados. Sin embargo, generalmente es

cara y, a menudo, de una forma u otra, está amenazada por incompatibilidad del injerto, incluso después de un buen comienzo. Estas características confinan el uso del injerto a huertos semilleros y archivos de material, resultando también una forma apropiada para el rejuvenecimiento o revigorización de material adulto, para compatibilizarlo con el estaquillado.

Micropropagación vegetativa

La micropropagación es una técnica de propagación vegetativa *in vitro*. Esta técnica ha sido aplicada con éxito en alrededor de 1.000 especies. En especies forestales, Thorpe *et al.* (1991), detallan un listado de alrededor 70 angiospermas y 30 gimnospermas propagadas exitosamente por medio de cultivo de tejidos.

Las técnicas de micropropagación que usualmente han sido aplicadas en diversas especies forestales, como alternativas comerciales a la propagación por estacas de familias o clones superiores, son la organogénesis (brotes axilares, brotes adventicios) y embriogénesis somática, (Ahuja, 1997, Haines, 1992; Thorpe *et al.*, 1991). Estas técnicas se han utilizado también en la manipulación de estados de maduración, conservación de germoplasma e ingeniería genética de plantas (Libby y Ahuja, 1993a).

La organogénesis implica la diferenciación monopolar de un órgano (brotes o raíces) para dar origen a una planta bajo condiciones estériles de laboratorio. En *Pinus radiata*, la organogénesis es exitosa en un 60% de los genotipos, por lo tanto debe iniciarse un gran número de ellos, para asegurar una cantidad suficiente de clones por familia (Nairn, 1993).

El método de propagación de plantas a través de la multiplicación de brotes axilares, ha sido ampliamente utilizado en la producción comercial de numerosas especies forestales, a partir de explantes juveniles (Ahuja, 1997; Haines, 1992; Nairn, 1993). El método también ha sido aplicado en material adulto, pero con menor éxito, lográndose en algunos casos un cierto grado de rejuvenecimiento en especies como *Sequoia*, *Quercus*, *Eucalyptus* (Ahuja, 1997, Arnaud *et al.*, 1993).

En Nueva Zelandia, empresas como Fletcher Challenge Co. usan la organogénesis a través de brotes axilares para producir anualmente, a escala comercial, entre 2 y 3 millones de plantas micropropagadas de pino radiata (Nairn, 1993; Gleed *et al.*, 1995). En Portugal, Viveros de Herdade de Espirra, ha integrado un laboratorio de micropropagación de *E. globulus* para rejuvenecer el material vegetal y obtener plantas madre de mayor vigor.

El uso de organogénesis a través de brotes adventicios corresponde a la inducción directa de brotes a partir de callos o nódulos meristemáticos. En aquellas especies con buenas respuestas de multiplicación, la producción de brotes es mayor que utilizando la vía de inducción de brotes axilares. En pino radiata, por ejemplo, se ha estimado que a partir de un embrión, los mejores clones pueden producir 260.000 plantas apropiadas para plantación en 2,5 años (Aitken-Christie *et al.*, 1994).

En cuanto a la embriogénesis somática, a diferencia de la organogénesis, en la que los brotes y raíces se desarrollan monopolarmente en distintos medios de cultivo, ésta involucra el desarrollo de embrioides somáticos que experimentan una diferenciación bipolar que genera raíces y tallos en forma simultánea.

En coníferas, la embriogénesis somática ha sido originada principalmente desde embriones zigóticos, mientras que en angiospermas también se han obtenido a partir de otros órganos. Una vez formados los embriones somáticos, éstos deben pasar por el proceso de maduración, germinación y formación de plantas (Fowke y Attree, 1996).

Desde los primeros embriones somáticos logrados en coníferas en 1985, esta tecnología ha sido aplicada en una amplia variedad de especies leñosas, 20 familias de angiosperma y alrededor de una docena de gimnospermas.

El potencial que posee esta técnica está dado por la alta tasa de multiplicación, por cuanto los embriones somáticos pueden crecer en medio líquido, estimándose que un litro de cultivo embriogénico contiene aproximadamente 100.000 embriones somáticos (Haines, 1992). Sin embargo, la tasa de conversión de embrioides a plantas funcionales normalmente es baja. En pino radiata, excepcionalmente, puede fluctuar entre 37 y 95% (Walter *et al.*, 1994).

PRINCIPALES INCONVENIENTES DE LA PROPAGACIÓN VEGETATIVA

A nivel individual, el principal inconveniente de la propagación vegetativa lo constituye la dificultad que se encuentra para propagar árboles fisiológicamente maduros. En este sentido, cuando los posibles árboles madre han alcanzado una edad suficiente como para demostrar su superioridad y han sido reconocidos como individuos deseables de clonar, éstos normalmente ya han perdido su capacidad de ser replicados vegetativamente. Lo anterior es una restricción que dificulta la clonación de árboles adultos de características superiores y obliga a la implementación de técnicas de rejuvenecimiento, o complejos procedimientos de propagación, que demandan un

gasto adicional de tiempo y recursos y que pueden llegar a hacer económicamente inviable la clonación de tal individuo.

La multiplicación clonal también suele crear falsas expectativas en algunos productores, especialmente cuando éstos asumen en forma demasiado estricta, que los propágulos vegetativos de un árbol sobresaliente se comportarán exactamente de la misma forma que el árbol original, o que todos los miembros del clon serán exactamente iguales entre sí y tendrán siempre el mismo comportamiento. Evidentemente, en la práctica ello no es así, y la ausencia de acabados ensayos clonales antes del uso operacional de un clon determinado, suele acrecentar este problema.

En efecto, los miembros de un clon son idénticos al ortet en el sentido de que poseen el mismo genotipo, pero aún así la expresión de los genes y su activación está condicionada por el ambiente en que cada planta se desarrolla y está particularmente influenciado por la edad y posición dentro de la planta madre, así como por tratamientos externos. Como consecuencia de esto, los propágulos no siempre crecerán con el mismo patrón o no tendrán la misma forma que el árbol original.

El fenómeno descrito se conoce como “variación dentro del clon” y frecuentemente se manifiesta como diferentes comportamientos del rameto, dependiendo de características fisiológicas o morfológicas de la fuente de propágulos al momento de realizar la reproducción clonal (efectos “C”)

En rigor, los efectos “C” son formas muy particulares de efectos ambientales internos o microambientales. Ellos comprenden a la ciclófisis o variación dentro del clon como consecuencia de la edad de la planta madre, y la topófisis o efecto de la localización de la estaca en el árbol madre, fenómeno responsable de que algunas veces las plantas propagadas vegetativamente mantengan por algún tiempo un hábito de crecimiento igual al del órgano que ellos constituían en el ortet.

En general, la variación dentro del clon aumenta con la edad del ortet, y en la medida que se acentúa la diferenciación entre órganos, tejidos y células en los rametos. Esta variación aumenta en cada una de las características individuales y, particularmente, para la velocidad de enraizamiento de cada estaca. A diferencia de las características genéticas, la variación dentro del clon está fuertemente influenciada por el medio ambiente y por el estado nutricional de los rametos.

Otra eventual desventaja asociada al uso operacional de plantas obtenidas por enraizamiento de estacas, dice relación con la calidad inferior de la arquitectura de sus sistemas radiculares en relación al exhibido por plantas provenientes de semillas. Efectivamente, existen situaciones en que las raíces adventicias desarrolladas en

propágulos vegetativos son superficiales y desbalanceadas, lo que las hace menos eficientes como estructuras de soporte mecánico del árbol. Aún así, no existen suficientes antecedentes que permitan generalizar un juicio respecto a la superioridad o inferioridad del comportamiento del material vegetativo en relación al de semillas.

SILVICULTURA CLONAL

La propagación vegetativa de árboles forestales ha sido utilizada desde la antigüedad en especies como la *Cryptomeria japonica* y es una práctica muy extendida en álamos y sauces. Sin embargo, la silvicultura clonal como tal es un área relativamente nueva de la ciencia forestal, por cuanto implica algo más que sólo utilizar plantas obtenidas por medios vegetativos. Indudablemente, la capacidad para clonar árboles forestales es el prerrequisito básico para desarrollar silvicultura clonal, pero el solo uso de plantas clonadas en la práctica forestal no es suficiente para que ésta se califique de tal (Libby y Ahuja, 1993 b).

La silvicultura clonal, necesariamente, demanda tener información del desempeño de los clones como tales, obtenida a partir de rigurosos ensayos clonales establecidos en terreno por al menos una rotación y replicados en más de una localidad.

Los clones que se seleccionen para usarlos en esta forma de silvicultura deben ser escogidos en función de su desempeño como tales, respaldado por ensayos, y no solamente por ser réplicas vegetativas de árboles aparentemente promisorios o pertenecientes a familias o procedencias que han tenido un desempeño interesante. Así, mientras mayor información se tenga del clon, mayor será la ventaja que se pueda extraer de los esquemas clonales de silvicultura.

Otra característica distintiva de la silvicultura clonal es que los clones conocidos y confiables se usan en forma repetida por varias generaciones y ciclos de cosecha, aspecto común en el cultivo de álamos, pero poco extendido aun a otras especies forestales.

Una peculiaridad adicional de la silvicultura clonal es que el espaciamiento inicial entre los árboles en las plantaciones de producción es mayor que el empleado con plantas de semillas, o incluso con plantas propagadas vegetativamente a partir de material desconocido (sin información proveniente de ensayos clonales). Esto es consecuencia de la mayor uniformidad de los clones probados en ensayos, y de la confianza basada en la experiencia de manejar clones de desempeño bien conocido.

Se desprende de los enunciados anteriores que la silvicultura clonal y el mejoramiento genético están estrechamente relacionados. De acuerdo con Libby y Ahuja (1993 b) un programa de silvicultura clonal debe estar respaldado por un adecuado programa de mejora genética, en el cual los candidatos sobresalientes de cada generación sean efectivamente probados y contrastados contra los clones originales del programa, y que éstos deben ser reemplazados por los nuevos clones sólo en la medida que los ensayos así lo aconsejen.

BENEFICIOS Y RIESGOS DE LA SILVICULTURA CLONAL

La estructura genética de una población influye en su productividad, estabilidad y resistencia a enfermedades. En teoría, una población genéticamente heterogénea produce más biomasa y otorga una mayor estabilidad a la productividad dentro de un rango de condiciones ambientales. Por el hecho de existir árboles genéticamente distintos, ocupando nichos ecológicos ligeramente diferentes, se produce una utilización más eficiente del espacio ecológico por parte de la población, la que además tendrá una mejor capacidad de respuesta y adaptación frente a cambios producidos en el medio ambiente. Al establecer poblaciones clonales se altera esa estructura, con los consiguientes beneficios y riesgos que ello implica.

Por una parte, la ganancia genética obtenida en operaciones clonales es la mayor posible para un clon dado, pues no existe otra fuente de variación genética que pueda ser explotada. Por otra, una población clonal genéticamente homogénea; en general, tendrá menor plasticidad para enfrentar las modificaciones en las condiciones ambientales.

Efectivamente, un rodal altamente productivo se puede obtener propagando vegetativamente al clon de mayor rendimiento; sin embargo, éste será altamente vulnerable a experimentar pérdidas masivas debido a la acción de insectos, enfermedades u otros cambios adversos en el medio ambiente. Esta situación, si bien ha sido manejada efectivamente en cultivos agrícolas, es especialmente grave y azarosa en las plantaciones forestales, en las que el largo periodo de rotación aumenta la potencialidad de las pérdidas.

Reconociendo el enunciado anterior, se debe destacar que es un error decidir la inversión en silvicultura clonal en base a los beneficios potenciales de un clon determinado, pues los riesgos de pérdida por factores ambientales serán también de gran envergadura. A pesar de lo mencionado, es posible encontrar clones con genotipos que resistan cambios sin afectar su productividad, manteniendo una buena producción

en un rango de condiciones ambientales más amplio, pero esta situación se lograría sólo después de intensos y largos ensayos clonales en distintos sitios.

Por esta razón, la decisión de desarrollar la silvicultura clonal no deberá efectuarse antes de analizar cuidadosamente los beneficios y los riesgos involucrados.

En términos económicos, la decisión de adoptar esquemas de silvicultura clonal o de semillas dependerá en última instancia de una evaluación económica. Esta evaluación deberá considerar la valoración económica de las ganancias genéticas esperadas asociadas a cada alternativa de propagación, y las inversiones en infraestructura y costos de operación de cada una de ellas. Un elemento de juicio adicional lo debe constituir el número de clones propagables y el análisis de riesgos vinculados a los progresivos niveles de ganancia genética esperada, en la medida que se concentre la producción de plantas en los mejores clones del ranking.

Cuántos clones usar

No existe una respuesta definitiva en cuanto a cuál es el número apropiado de clones para realizar plantaciones clonales. Sin embargo, se puede hacer una buena estimación en base a la experiencia y el conocimiento de la variación existente en la especie utilizada. El problema se reduce al manejo de la relación beneficio-riesgo, es decir, a cómo lograr los mayores niveles de mejora seleccionando sólo los mejores clones y, al mismo tiempo, permanecer dentro de rangos aceptables de riesgos de pérdidas. El conocimiento previo de la edad de rotación, la intensidad del manejo, la variabilidad genética de la especie y de los clones involucrados, así como de los posibles riesgos y niveles aceptables de pérdidas deben orientar la respuesta.

En general, el uso de un gran número de clones resulta tan seguro como usar una mezcla similar de plantas de semillas. Utilizar mezclas de muy pocos clones resulta altamente riesgoso, incluso, las mezclas de 2 a 4 clones puede ser menos apropiado que una plantación monoclonal. El uso de 7 a 30 clones resulta un número seguro y razonable, que no se diferencia significativamente de utilizar una mayor cantidad de clones (Libby, 1987, *cit. por* Foster, 1993; Zobel y Talbert, 1988). Debe tenerse en cuenta que mientras mayores sean los trastornos que los árboles deberán enfrentar, mayor es el número de clones que debe utilizarse.

La principal consideración para que los enfoques de silvicultura clonal puedan implementarse con bajos niveles de riesgo, es que los clones a utilizar hayan sido previamente probados en las áreas de plantación propuesta. Entonces, los ensayos

clonales son fundamentales para evaluar el desempeño de todos los clones en los distintos sitios de plantación. De acuerdo con sus resultados, se observará que no todos los clones serán adecuados para todos los sitios (interacción genotipo-ambiente), de modo que sólo los mejores en cada condición deberán utilizarse para forestar esas áreas.

Mezclas de clones v/s bloques monoclonales

Una consideración tan importante como el número de clones a usar en esquemas de silvicultura clonal es aquella relacionada con cómo distribuirlos en terreno. Las opciones extremas corresponden a los mosaicos monoclonales y las mezclas clonales pie a pie.

No existe una postura concluyente respecto a qué estrategia es la más adecuada. La mayoría de los especialistas manifiestan preferencia por las mezclas multiclonales, señalando que ellas son la mejor garantía de éxito ante la posibilidad del ataque de plagas. No obstante, en la práctica se ha observado (Zobel y Talbert, 1988) que muchas enfermedades y plagas se propagan con la misma rapidez en rodales puros que en otros mixtos.

A su vez, los mosaicos de plantaciones monoclonales también evidencian algunas ventajas claras, entre las que Libby (1981, *cit. por* Zobel y Talbert, 1988) señala a las siguientes:

- Cada clon posee su propia curva de crecimiento y patrón de desarrollo. Por lo mismo, al enfrentar la competencia de otro individuo de crecimiento inicial más rápido, algunos clones pueden ser suprimidos al crecer en mezclas.
- La plantación y las operaciones de vivero se simplifican al trabajar con bloques monoclonales.
- La uniformidad del material se maximiza en los bloques monoclonales.
- Ante la evidencia de deficiencias en el desarrollo de un clon determinado, en un esquema monoclonal, éste puede ser eliminado y reemplazado por otro para mantener la productividad de la plantación. Por el contrario, en un esquema de mezcla pie a pie este reemplazo no resulta práctico y, por lo tanto, disminuye la productividad de la plantación.

Los argumentos anteriores han incidido en que sea una práctica común en silvicultura clonal, particularmente en especies de rotación corta como suelen ser los eucaliptos, el utilizar bloques monoclonales de 10 a 20 hectáreas cada uno. Si bien se argumenta

que ellos pueden ser demasiado grandes, en la práctica bloques de menos de 10 hectáreas no resultan operativos para manejarlos como unidades independientes. Aún así, Foster (1993) menciona como combinación apropiada, para minimizar los riesgos del monocultivo y aprovechar eficientemente las ventajas de la silvicultura clonal, el uso de 7 a 30 clones en pequeños parches monoclonales de 2 a 20 hectáreas cada uno.

La experiencia empírica para evaluar la conveniencia de una u otra forma de distribuir los clones es escasa. Investigaciones para evaluar el crecimiento de 5 clones de *Populus deltoides* establecidos como parcelas monoclonales y parcelas mixtas de 100 árboles cada una, señalan que tanto el volumen por hectárea, la altura media, el área basal y el dap adquieren valores intermedios en la parcela mixta respecto a las parcelas de clones puros. Sin embargo, al promediar los resultados de las parcelas puras, éstos son ligeramente inferiores a los de la parcela mixta (Markovic y Herpka, 1986, *cit. por* Foster, 1993).

Análogamente, estudios con *Pinus taeda* señalan que aun cuando la productividad total no se modifica en las parcelas mixtas respecto al promedio de las parcelas de clones puros, en las primeras se produce una mayor diferenciación entre los individuos (se mantiene el promedio pero aumenta la varianza), obteniéndose árboles más grandes y más pequeños que los observados en las parcelas puras (Nance, 1983, *cit. por* Foster, 1993).

CONCLUSIONES

La clonación permite el aprovechamiento de un genotipo único, seleccionado de entre muchas otras plantas por su superioridad en algún aspecto de interés para el hombre, y multiplicarlo para obtener nuevos individuos con el mismo genotipo. Aún así, la identidad genética de los rametos no es garantía de que estos exhibirán exactamente las mismas características y que se desarrollarán igual que el individuo original. Este concepto fundamental debe permanecer presente en todo momento para evitar la creación de falsas expectativas.

La principal ventaja de la propagación vegetativa se encuentra asociada a su uso en el marco de programas de mejoramiento genético. Éste debe considerar la evaluación del material seleccionado mediante su representación en rigurosos ensayos clonales. Sólo de esta forma se podrán implementar esquemas de silvicultura clonal que minimicen los riesgos de pérdidas y permitan obtener con certeza los resultados esperados.

BIBLIOGRAFÍA

Ahuja M.R. 1997. Biotechnology in Forestry: Expectations and Challenges. In: Perspective of Forest Genetics and Tree Breeding in a Changing World. Csaba Mátyás (ed.). IUFRO World Series Vol. 6, Vienna, Austria, 1997. Pp: 45-55.

Arnaud Y.†; Franclet A.†; Travan H. and Jacques, M. 1993. Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. Ann Sci. For. Pp: 273-295.

Aitken-Cristie J.; Maddocks D.; Sigley M.; Hodder V.; Burger, F. and Carter, F. 1994. Embryogenesis of Radiata Pine. En: Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium. Tokyo, Japan. August 31–September 1, 1994. Pp: 91-98.

Browne, R.; Davidson, C.; Steeves, T. and Dunstan, D. 1997. Effects of ortet on adventitious rooting of jack pine (*Pinus banksiana*) long-shoot cuttings. Can. J. For. Res. 27:91-96.

Cañas, I. 1990. Selección individual y multiplicación clonal del *Eucalyptus globulus*. Jornadas Técnicas Forestales “Materiales Forestales de Reproducción en España”. Huelva, España. 8 y 9 de febrero, 1990.

Cauvin, B. 1982. Réjuvénilisation-Multiplication de ortets séniles Eucalyptus. Annales AFOCEL. Pp: 74-105.

CELBI. 1982. Propagacao vegetativa do *Eucalyptus globulus*. Enraizamiento de estacas. Celulosa Beira Industrial. Dpto. Florestal. Figueira da Faz, Portugal. 7 p.

Chaperon, H. 1979. Maduration et bouturage des arbres forestiers. AFOCEL. Etudes et Recherches 12(6): 19-31.

Chaperon, H. 1983. Clonal propagation of eucalypt by cutting in France. En: Proceeding of a workshop on eucalypts in California. Sacramento, California. June, 14-16, 1983. Pp: 108-114.

Foster, G. 1993. Selection and breeding for extremes genotypes. En: Ahuja, M. y Libby, W. (Editores). Clonal Forestry I: Genetic and Biotechnology. Springer Verlag. Berlin, Germany. Pp: 50-67.

Fowke, L. and Attree, S. 1996. Conifer somatic embryogenesis: studies of embryos development and the cell biology of conifer cells and protoplast. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. September, 1996. 2(3): 124-130.

Frampton, L. and Foster, G. 1993. Field testing vegetative propagules. In: *Clonal Forestry I: Genetic and Biotechnology*. Ahuja, M y Libby, W Eds. Ed. Springer-Verlag, Berlin. Germany. 277 p.

Francllet, A. 1979. Rejeunissement des arbres adultes en vue de leur propagation vegetative. *AFOCEL. Etudes et Recherches* 12(6):1-8.

Francllet, A. 1983. Rejuvenation: Theory and practical experiences in clonal silviculture. En: *Proceeding of the 19th Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2: Symposium on Clonal Forestry. Its impact on the improvement and our future forest*. Toronto, Ontario. August, 22-26, 1983. Pp: 96-134.

García, L. 1984. The new eucalypt forest. Lecture given by the 1984 Marcus Wallemberg Prize Winners at the Symposium in Falun Sweden on september 14, 1984. 13 p.

Gleed, J.; Darling, D.; Muschamp, B. and Nairn, B. 1995. Commercial production of tissue cultures *Pinus radiata*. *Tappi Journal* September, 1995. 78(9):147-150.

Guimaraes, M.; Correia, C. and F. Coucelo, F. 1997. Integration of a *Eucalyptus globulus* micropropagation laboratory in a nursery of a company from the portuguese pulp sector. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus* v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species Salvador, Brazil, August 24 to 29, 1997. pp: 79.

Gutiérrez, B., Ipinza, R. y Chung, P. 1994. Propagación vegetativa y silvicultura clonal en eucaliptos. *Ciencia e Investigación Forestal* 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* 9(2):261-277.

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*. UACH, INFOR, CONAF. Valdivia 16 al 21 de noviembre de 1998. Pp: 201-218.

Haines, R. 1992. Mass propagation by cuttings biotechnologies and the capture of genetic gain. Mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Synthesis IUFRO Symposium, Bordeaux. France. Pp: 128-144.

Haines, R. 1994. Biotechnology in Forest tree improvement with special reference to developing countries. FAO Forestry Paper N°118. Roma. 229 p.

Hartney, V. 1980. Vegetative propagation of eucalypts. Aust. For. Res. 10(3):191-211.

Heth, D.; Fanger-Vexler, L. y Reuveni, O. 1986. Mass production of cutting of *Eucalyptus camaldulensis*. Commonwealth Forestry Review 65(3):215-225.

Iannelli, C.; Cardoso, N. y Ortiz, M. 1997. Sistema radicular de mudas de eucalypto produzidas por macroestacas e microestacas. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus* v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species Salvador, Brazil, August 24 al 29, 1997. Pp: 178-182.

Ipinza, R. y Gutiérrez, B. 1992. Resultados preliminares de un ensayo de enraizamiento de estaquillas de *Eucalyptus globulus* tratadas con altas dosis de ácido indolbutírico. Ciencia e Investigación Forestal 6(1):61-79.

Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V. (Editores). 2000. Domesticación y Mejora Genética de Rauli y Roble. Universidad Austral de Chile, Instituto Forestal. Editorial Universitaria, Santiago. 468 p.

Libby W. and Ahuja, M. 1993a. Micropropagation and clonal options in forestry. In: Ahuja M. (Ed) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Forestry Science. Vol 41. Pp: 425 - 440.

Libby W. and Ahuja, M. 1993b. Clonal forestry. En: Ahuja, M. y Libby, W. (Editors). Clonal Forestry I: Genetic and Biotechnology. Springer Verlag, Berlin, Germany. Pp: 1-8.

Lindgren, D. 1977. Possible advantages and risks connected with vegetative propagation for reforestation. En: Symposium, Vegetative Propagation of Forest Tree. Physiology and Practices. Uppsala, Sweden. February, 16 - 17, 1997. Pp 9-16.

MacRae, S. and Cotterill, P. 1997. Macropropagation and micropropagation of *E. globulus*: Means of Capturing genetic gain. Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus* v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species Salvador, Brazil, August 24 al 29, 1997. Pp:102-110.

MacRae, S. and Reis, J. 1997. Seasonality effect on the propagation of *Eucalyptus globulus* by stem cuttings. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of *Eucalyptus* v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species. Salvador, Brazil, August 24-29, 1997. Pp: 172-177.

Maile, N. and Nieuwenhuis, M. 1996. Vegetative propagation of *Eucalyptus nitens* using stem cuttings. South African Forestry Journal N° 175 March 1996. Pp:29-34.

Menzies, M. 1992. Increasing value through technology: Improving the productivity of radiata pine plantations. IAC Conference, Auckland, New Zealand, 2-3 December 1992. 15 p.

Menzies, M. and Aimers-Halliday, N. 1997. Propagation options for clonal forestry with *Pinus radiata*. Deployment Systems and Strategies. In: Proceedings of IUFRO 97, Genetics of Radiata Pine, Rotorua, New Zealand 1-4 December 1997 (FRI bulletin N°203). Burdon, R. and Moore, J. (editors). Pp: 256-263.

Nairn, B. 1993. Commercial micropropagation of radiata pine. In: Micropropagation of woody plants, Forestry Science. Vol 41. Ahuja, M. (ed). Kluwer Academic Publishers. Pp: 383-394.

Rauter, R. 1983. Current status of macropropagation. In: Proceeding of the 19th. Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2: Symposium on Clonal Forestry. Its Impact on the Improvement and our Future Forest. Toronto, Ontario. August, 22-26, 1983. Pp: 58-74.

Sabja, A. 1998. Macro y micropropagación en especies forestales. En: Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V. (editores) Curso Mejora Genética Forestal Operativa. UACH, INFOR, CONAF. Valdivia, 16 al 21 de noviembre de 1998. Pp: 219-232.

Shimizu, J. 1988. La propagación vegetativa en el mejoramiento de las plantaciones industriales. Ciencia e Investigación Forestal 2(2):27-33.

Smith D.L. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. Plant Tissue Culture and Biotechnology 3(2):63-73.

Thorpe T.A., Harry I.S. y P.P. Kumar. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. In: Debergh, P. and Zimmerman, P. (editors) Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publisher. Pp: 311-336.

Walter, C.; Smith, D.; Grace, L.; Hargreaves, O.; Stewart, N. and Warr, A. 1994. Plant Regeneration and Transformation studies with *Pinus radiata* embryogenic tissue. In: Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium. Tokyo, Japan. August 31 – September 1, 1994. Pp: 99 – 106.

Wignall, T.; Brown, S. and Purse, J. 1992. The intensive cultivation of *Eucalyptus grandis* clonal stockplant. In: Proceedings of IUFRO Symposium. Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species. Bordeaux, France. 14- 18, September, 1992. Pp 295-302.

Yang, J.; Chung, J. and Chen, Z. 1995. Vegetative propagation of adult *Eucalyptus grandis* X *E. urophylla* and comparison of growth between micropropagated plantlets and rooted cuttings. Plant Cell Report 15:170-173.

Zobel, B.; Ikemori, I. and Campinhos, E. 1983. Vegetative propagation in Eucalyptus. In: Proceeding of the 19th. Meeting of the Canadian Tree Improvement Association. Part 2: Symposium on Clonal Forestry. Its Impact on the Improvement and our Future Forest. Toronto, Ontario. August, 22-26, 1983. Pp 136-144.

Zobel, B. y Talbert, J. 1988. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Editorial Limusa. México. 541 p.

MACROPROPAGACIÓN VEGETATIVA DE RAULÍ: INJERTACIÓN Y ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS

Oriana Ortiz N.¹ y Braulio Gutiérrez C.²

INTRODUCCIÓN

La extensión de la superficie representada por los bosques de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp *et* Endl.), sumado a la calidad y alternativas de uso de su madera, hacen de esta especie un recurso de alto interés económico, que ha estado tradicionalmente expuesto a una severa presión antrópica que ha llevado a la reducción de su área de distribución y la fragmentación de sus poblaciones.

En la actualidad, estos recursos cobran nueva importancia como una fuente de diversificación de la producción forestal, así como también en la producción de bienes y servicios no madereros. En este contexto, la gran variabilidad que aún representa esta especie a lo largo de su distribución natural, resalta la conveniencia de aplicar herramientas de mejoramiento genético, en conjunto con los nuevos desarrollos biotecnológicos y técnicas silvícolas de avanzada, para incrementar su productividad y obtener un beneficio sustentable de su gran potencial económico e industrial.

En Chile se ha venido desarrollando desde 1997 un programa de mejoramiento genético para raulí por vía de semillas (sexual), sin embargo, éste no permite traspasar a plantaciones operacionales toda la ganancia en volumen aprovechable, representada por los árboles superiores (plus) que este programa ha identificado.

Por su parte, la propagación vegetativa permite transferir toda la varianza genética a los descendientes, permitiendo obtener copias genéticamente idénticas de individuos de alto valor y duplicando de esta forma la ganancia genética asociada a los esquemas sexuales de propagación.

Reconociendo esta situación, se ha planteado la aplicación de modernas herramientas biotecnológicas para escalar el programa de mejoramiento genético actual de raulí y promover esquemas de silvicultura clonal. Esta nueva iniciativa se ha materializado en el proyecto “Silvicultura Clonal en Raulí para Incrementar la Productividad de

¹ Instituto Forestal, Sede Bio Bio. E-mail: oortiz@infor.cl

² Instituto Forestal, Sede Bio Bio. E-mail: bgutierr@infor.cl

Sitios Forestales de la IX y X Regiones del País”, el cual fue financiado por el Fondo de Innovación y Desarrollo, FDI de CORFO.

En términos generales, el referido proyecto busca obtener réplicas vegetativas de árboles de raulí de alto valor productivo, correspondientes a árboles plus seleccionados en anteriores iniciativas de mejoramiento genético, y evaluar el desempeño de este material en ensayos clonales establecidos en terreno. Si bien el objetivo principal es hacer uso de técnicas de micropropagación, también se ha considerado la depuración de tecnologías tradicionales de macropropagación, particularmente de injertación y enraizamiento de estacas, las cuales ofrecen importantes ventajas y posibilidades de aplicación en distintos ámbitos del mejoramiento genético de esta especie.

En el caso de la injertación, esta ha sido reconocida como la herramienta más apropiada para obtener réplicas de árboles de interés para conformar huertos semilleros clonales, debido a que este procedimiento permite conservar la edad fisiológica del árbol, disminuyendo de esta forma el periodo requerido para que sus copias inicien los procesos reproductivos de floración, polinización fructificación y semillación. También resulta de interés como una forma de mantener réplicas de árboles plus en un banco, para abastecer de propágulos a los procesos de micropropagación en laboratorio, o de enraizamiento de estacas en invernadero.

En cuanto al enraizamiento de estacas, este procedimiento ha sido muy utilizado para multiplicar vegetativamente a especies forestales, situación que obedece principalmente al número de copias que se pueden obtener de un árbol individual, evitando las complejidades operativas y problemas de incompatibilidad de los injertos, y con una inversión inicial, costos y complejidad del proceso, menores que en el cultivo *in vitro*.

Atendiendo a lo anterior, en el presente capítulo se sintetizan los procedimientos que han demostrado ser efectivos para multiplicar raulí mediante técnicas de injertación y enraizamiento de estacas. Al respecto se identifican las principales variables que determinan el éxito de estas actividades y se presentan los protocolos operativos, depurados y validados, para obtener rametos injertados e inducir la formación de raíces en estacas de tallo de raulí.

ANTECEDENTES GENERALES

Enraizamiento de Estacas

Las características del enraizamiento de estacas como herramienta de macropropagación vegetativa de especies forestales se mencionan en el capítulo 1 de este mismo libro. Por tal motivo no serán repetidas en este apartado, donde el énfasis se pondrá en los aspectos operativos relacionados con el enraizamiento propiamente tal de raulí.

En tal sentido, se debe reconocer que normalmente la capacidad de desarrollar raíces adventicias es una característica ligada a la fase juvenil de los árboles forestales y desaparece rápidamente en la medida que estos maduran. Por lo mismo, el material utilizado para confeccionar estacas enraizables debe corresponder a un estado juvenil (plantas), o mejor aún, a un estado adulto rejuvenecido (revigorizado). Esta última condición, si bien es menos reactiva que la de los propágulos jóvenes propiamente tales, presenta la ventaja adicional de que permite conocer el desempeño y características del árbol adulto que será objeto de clonación, constituyéndose de alguna forma en una garantía de la calidad del material genético que se multiplica.

Existen distintas formas de rejuvenecer material adulto para compatibilizarlo con la clonación a través de enraizamiento de estacas. Las abundantes experiencias con especies del género *Eucalyptus* han permitido identificar a los retoños de tocón, al material desarrollado a partir de púas injertadas sucesivamente sobre patrones juveniles y a las plantas micropropagadas como fuentes apropiadas de material rejuvenecido para iniciar procesos de multiplicación clonal mediante enraizamiento de estacas.

Particularmente, en el caso de las actividades de enraizamiento de raulí, comprendidas en el proyecto FDI “Silvicultura Clonal en Raulí para Incrementar la Productividad de Sitios Forestales de la IX y X Regiones del País”, se han utilizado los brotes desarrollados en réplicas micropropagadas de árboles plus adultos de esta especie, correspondiendo a material extraído desde plantas micropropagadas, aclimatadas a condiciones de vivero, de 2 a 6 meses de crecimiento. No obstante, también se pueden obtener propágulos enraizables desde copias rejuvenecidas mediante injertación, desde retoños de tocón o brotes epicórmicos.

Injertación

Los antecedentes que se detallaran en este capítulo corresponden en gran medida a la experiencia desarrollada durante la realización del proyecto FONDEF D9611052

“Mejoramiento Genético para Especies de *Nothofagus* de Interés Económico”, los cuales fueron desarrollados y compendiados por Emhart *et al.* (2000).

Injertar es el procedimiento mediante el cual se unen dos porciones de plantas, un patrón (pie o portainjerto) y una púa (yema o porción de rama con varias yemas), de manera que continúen su crecimiento como una sola unidad, donde el patrón aporta su sistema radicular de fijación al suelo y absorción de agua y nutrientes, y la púa desarrolla la parte aérea, manteniendo las características genéticas de la planta donante (Gil *et al.*, 1986).

La técnica de injertación está directamente asociada a las especies, a la época de injertación y también al tamaño de la planta patrón con respecto a la púa. Entre los injertos comúnmente utilizados para especies forestales en Chile, destaca el injerto apical de hendidura o de cuña, que ha sido utilizado extensivamente en *Pinus radiata* y el injerto lateral de botella en eucaliptos, en ambos tipos la púa corresponde a un trozo de tallo con varias yemas. En el caso de *Nothofagus*, se han probado los dos tipos de injerto, dando mejor resultado el apical de cuña, por la dureza del material con que se trabaja.

PROTOCOLO DE ENRAIZAMIENTO DE ESTACAS DE RAULÍ

Preparación de las estacas

El protocolo de enraizamiento de estacas que se describe ha sido concebido como un complemento a las labores de multiplicación de raulí mediante técnicas de micropropagación. Tiene por objeto amplificar el número de copias que se puede obtener a partir de una planta micropropagada, pero sin necesidad de efectuar esta masificación en laboratorio con metodología de cultivo *in vitro*, sino que en condiciones más sencillas, en el ambiente controlado de un invernadero.

Para tal efecto, como fuente de brotes para la confección de estacas enraizables, se usan réplicas micropropagadas de árboles plus adultos, aclimatadas a condiciones de vivero y con 2 a 6 meses de crecimiento.

Al usar este material las estacas pueden ser de dos tipos: apicales o de yema lateral. En ambos casos las estacas confeccionadas deben ser segmentos rectos, corresponder a tejidos de la última temporada de crecimiento, de 3 a 4 cm de longitud, con uno o dos pares de hojas, vigorosas y sanas. No obstante, deben privilegiarse aquellas del eje central de la planta, por cuanto evidencian un mejor comportamiento, en términos de enraizamiento y crecimiento posterior, que aquellas originadas en ramas laterales.

El corte basal de las estacas debe ser recto, ejecutado con tijeras de buena calidad y filo que generen una superficie de corte limpio, sin rasgaduras o jirones en la corteza que ocasionan daños en la zona del cambium, lugar desde donde se originan las raíces adventicias.

Una vez confeccionadas las estacas es recomendable acumularlas, hasta el momento de su plantación, en un balde o recipiente similar conteniendo una solución fungicida (Benlate 0,2 g/l).

Tratamiento hormonal

Para estimular el enraizamiento de estacas es normal utilizar tratamientos hormonales que aporten auxinas exógenas para promover la inducción de las raíces adventicias. Para estos efectos existen productos comerciales, siendo también posible preparar mezclas o soluciones específicas mediante la dilución de auxinas puras en soluciones de alcohol o en polvo talco. Las dosis a emplear son variables fluctuando entre 0 y 10.000 ppm para las mezclas en talco y entre 0 y 1.000 ppm para los remojos en soluciones líquidas.

En el caso de rauli se han obtenido resultados satisfactorios empleando un remojo de las estacas en una solución de ácido indolbutírico (AIB) en concentración de 200 ppm, sin verificarse diferencias estadísticamente significativas al usar dosis más altas (400, 500 y 1.000 ppm).

Para aplicar la hormona se utiliza un recipiente pequeño, donde se deposita sólo la cantidad de hormona necesaria para una jornada de trabajo. Se debe evitar rehusar los excedentes de hormona de aplicaciones anteriores, debido a que la auxina se desnaturaliza con la exposición a la luz.

Sustrato y fertilizantes

Respecto al sustrato de enraizamiento, este debe cumplir las siguientes funciones:

- Sostener las estaquillas durante el período de enraizamiento.
- Proveer humedad a la estaquilla.
- Permitir la entrada e intercambio de aire en la base de la estaca.
- Crear un ambiente de oscuridad, para reducir la penetración de luz a la base de la estaca.

Existe una gran diversidad de sustratos, siendo los más frecuentes las mezclas en distintas proporciones y elementos de turba, perlita, vermiculita, arena, corteza compostada, aserrín y otros. En enraizamiento de estacas de raulí se han ensayado distintos sustratos, obteniéndose resultados apropiados con la utilización de una mezcla en igual proporción volumétrica de turba y perlita.

La turba se caracteriza por una alta capacidad de retención de agua disponible para la planta, proporcionando excelentes condiciones de humedad a la estaquilla; la perlita es un material mineral altamente poroso, que mejora el drenaje del sustrato. La mezcla de estos materiales puede observarse en la figura 1.

La práctica de incorporar fertilizantes en el sustrato de enraizamiento, si bien no promueve la iniciación de raíces adventicias y no resulta aprovechable por la estaca antes de formar sus raíces, resulta muy conveniente para mejorar su crecimiento una vez que ha ocurrido el desarrollo radicular. Se recomienda utilizar fertilizantes de liberación controlada, los cuales se mezclan con el sustrato antes de llenar los contenedores en que se realizará la plantación de las estacas.

Para el enraizamiento de estacas de raulí se ha utilizado OSMOCOTE 15-9-12, mezclándolo con el sustrato de enraizamiento en una proporción de 4 a 5 Kg/m³. Este fertilizante contiene macro y microelementos en su composición química (cuadro 1). Se caracteriza por liberar en forma lenta los nutrientes, debido a que los gránulos de los que está compuesto, están conformados por capas múltiples de polímeros degradables. La liberación de nutrientes se produce cuando el vapor de agua penetra en la capa de polímeros disolviéndola, y la diferencia de presión osmótica resultante provoca que los nutrientes fluyan a través de dicha capa. El tiempo de duración del fertilizante es de aproximadamente 3 a 4 meses, dependiendo de la temperatura.



Figura 1: Mezcla de turba y perlita utilizado como medio para el enraizamiento de estacas de raulí.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FERTILIZANTE OSMOCOTE 15-9-12.

Macroelemento	%
Nitrógeno	15 (7% NH ₄ ⁺ , 8% NO ₃ ⁻)
Fósforo (P ₂ O ₅)	9
Potasio (K ₂ O)	12
Magnesio (Mg O)	1
Azufre	2,3
Microelementos	%
Boro	0,020
Cobre	0,005
Fierro	0,450
Manganeso	0,060
Molibdeno	0,020
Zinc	0,050

Contenedores y plantación de las estacas

Las estacas deben plantarse inmediatamente después de su confección, tomando las medidas necesarias para evitar su deshidratación durante todo el proceso de confección y plantación.

Antes de insertar las estacas en el sustrato, es necesario efectuar una perforación de aproximadamente 2 cm de profundidad. La confección de los hoyos de plantación se realiza mediante un palillo de diámetro ligeramente superior al diámetro de las estacas, confeccionado específicamente para este efecto. Posteriormente se dispone cuidadosamente la estaca en el agujero, y se presiona el sustrato a su alrededor para asentarla. No se debe insertar la estaca a presión, para no dañar los tejidos del corte basal o remover el tratamiento hormonal aplicado en esta zona.

La plantación de las estacas se realiza en tubetes de 120 cc de capacidad, que van dispuestos en una bandeja de PVC, que tiene la particularidad de estar parcialmente cerrada en sus cuatros lados (figura 2), esto permite conservar el calor emitido por la cama caliente, sobre la cual se depositan las bandejas durante el proceso de enraizamiento.



Figura 2: Detalle bandejas y tubetes.

También es importante diseñar un sistema de identificación del material instalado, que debe permitir la individualización inequívoca del clon representado en cada estaca. Este debe facilitar la identificación durante todo el proceso de enraizamiento, pues si en algún momento surgen dudas respecto a la identidad clonal de algún material determinado, deberá desecharse. En la práctica, la marcación individual de los tubetes con etiquetas de tela autoadhesiva, inscritas con plumones indelebles resultan apropiadas para este fin.

Control ambiental y equipamiento para enraizamiento

El enraizamiento de estacas de raulí debe efectuarse bajo condiciones ambientales controladas al interior de un invernadero.

Un importante factor que estimula la rizogénesis adventicia, es la temperatura del sustrato de enraizamiento. Por lo mismo es altamente recomendable aplicar calor a las bases de las estacas, resultando adecuado para este efecto el uso de camas calientes. Estas consisten en un mesón de madera, cuya base es de malla metálica cubierta por

paneles de poliestireno expandido de 3 cm de espesor. El mesón se rellena con arena (hasta 10 cm de altura) y en el interior del relleno se instala un cable calefactor constituido por una resistencia eléctrica gobernada por un termostato, que debe regularse para obtenerse una temperatura del orden de 22°C en la base de las estacas.

Adicionalmente, y con el objeto de mantener las estacas permanentemente humedecidas, se debe disponer de un sistema de aspersión aéreo, que permita contar con una humedad relativa del aire en valores cercanos al 100%. Una instalación sencilla y efectiva para lograr este propósito consiste de una cañería ubicada a 30 - 40 cm de altura sobre los mesones de propagación, dotada con aspersores que proporcionen una lluvia fina y homogénea sobre toda la superficie del mesón.

Un esquema con la estructura básica de un mesón de propagación para enraizamiento de estacas de raulí, con cama caliente y sistema de aspersión, se encuentra en la figura 3.

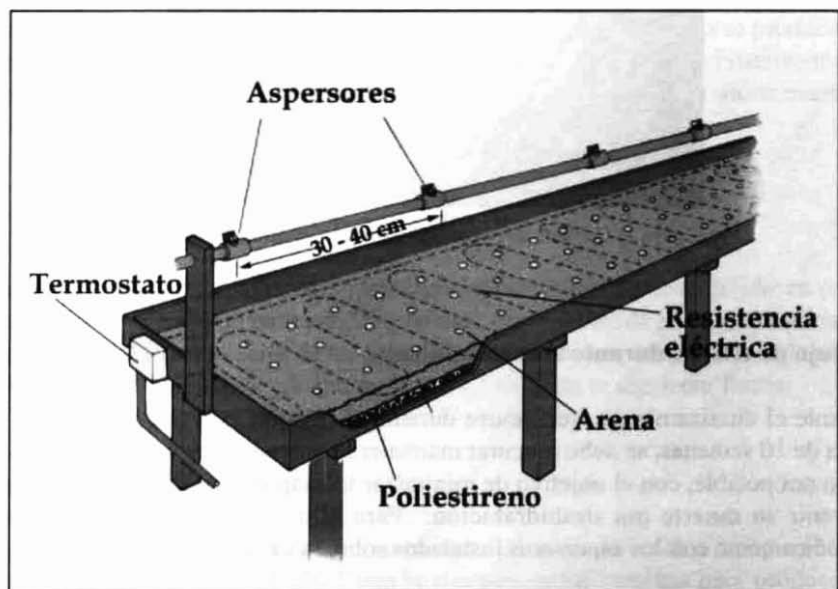


Figura 3: Estructura de un mesón de propagación con cama caliente y sistema de aspersión.

Para efectos de mantener la humedad relativa lo más alta posible, sobre los mesones de propagación es aconsejable disponer una estructura que sustente una cubierta con nylon de invernadero, la cual mejorará considerablemente las condiciones ambientales para el enraizamiento. Detalles de esta estructura se pueden observar en la figura 4.

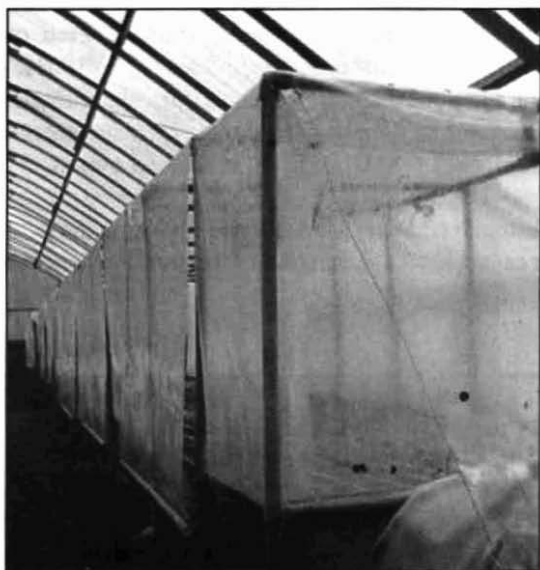


Figura 4: Cubierta de polietileno adosada a la cama caliente.

Manejo de estacas durante el enraizamiento.

Durante el enraizamiento, que ocurre durante el periodo estival y se extiende por cerca de 10 semanas, se debe procurar mantener la humedad relativa del aire tan alta como sea posible, con el objetivo de minimizar la evapotranspiración de la estaca y prevenir su muerte por deshidratación. Para ello, las estaquillas son regadas periódicamente con los aspersores instalados sobre la cama caliente.

Dado que las condiciones ambientales de enraizamiento son muy favorables para la proliferación de hongos, se deben realizar aplicaciones preventivas periódicas de fungicidas sistémicos. Estas se realizan una vez por semana, usando en forma alternada los productos Benlate (0,6 g/l), Captan (1 g/l) y Euparen (2g/l), de modo de evitar el desarrollo de patógenos resistentes a un producto específico. Tales aplicaciones pueden

complementarse con la aspersión de fertilizantes foliares, siendo útil para este efecto una dosis de 2 cc/l de Bayfolán foliar.

Periódicamente, se debe supervisar el estado de las estacas y retirar aquellas que están muertas, para evitar que sean un foco de contaminación, para las restantes estaquillas.

Acondicionamiento

Durante el proceso de enraizamiento las estaquillas permanecen por varias semanas en un ambiente de alta humedad. Por lo mismo, antes de sacarlas a condiciones de vivero deben someterse a un proceso gradual de acondicionamiento que las faculte para sobrevivir en condiciones de intemperie.

Este proceso se inicia después de verificada la formación de raíces y consiste en mantener por cerca de 30 días a las estacas en los mismos mesones de propagación con cama caliente, pero sin cobertura plástica. Durante este periodo se produce una mayor elongación de los brotes y se reduce la turgencia de las hojas. Posteriormente, las plantas se trasladan a vivero bajo sombra, donde se mantienen por una semana con un régimen de riego frecuente.

PROTOCOLO DE INJERTACIÓN DE RAULÍ

Para efectos prácticos, el procedimiento para injertar raulí se puede dividir en cuatro etapas: (i) Preparación de patrones, (ii) colecta y transporte de púas, (iii) injertación propiamente tal y (iv) manejo de los injertos. Los detalles operativos de cada una de estas fases fueron descritos por Emhart *et al.* (2000), de la siguiente forma.

Preparación de patrones

La producción de la planta patrón contempla un periodo de dos temporadas de crecimiento, que se inicia el año 1 con la siembra de las semillas para producir las plantas, y continúa el año 2 con el acondicionamiento de las mismas, para habilitarlas como patrones y proceder a la injertación propiamente tal.

En el caso de raulí, la preparación de patrones se inicia con la siembra de las semillas en contenedores de 80 cc de capacidad, entre fines del invierno y principios de

primavera, previo tratamiento pregerminativo de estratificación o remojo en ácido giberélico. Como sustrato de siembra resulta adecuada la corteza de pino compostada y desinfectada.

Una vez que las semillas germinan, las plantas se someten a un manejo orientado a estimular el crecimiento aéreo y radicular, en forma equivalente a lo realizado en un invernadero de producción forestal convencional, controlando las variables ambientales, fertilización, riego, y aspectos fitosanitarios.

A fines de otoño del año siguiente a la siembra, cuando las plantas ya han crecido una temporada en los contenedores, se trasplantan a macetas de polietileno con una capacidad volumétrica aproximada de 6 litros. El tamaño ideal de la planta al momento del trasplante debe fluctuar entre los 10 y 15 cm de altura y 2 a 4 mm de diámetro de cuello.

Esta segunda temporada de crecimiento generalmente se lleva a cabo fuera del invernadero, bajo malla sombreadora de 50% de filtración. Durante este periodo las plantas se acondicionan como patrones de injertación mediante un programa de manejo que contempla riego, fertilización y podas, el cual se complementa con medidas de control fitosanitario y finalmente con un proceso de endurecimiento de las plantas patrones producidas.

El riego es esencial en esta etapa. La cantidad de agua a utilizar depende directamente de las condiciones climáticas. Como regla general, se debe mantener agua suficiente para evitar problemas de estrés hídrico y desecamiento de las raíces, recomendándose regar frecuentemente en poca cantidad. Las plantas patrones de raulí y roble son muy sensibles a la falta de agua y rápidamente son afectadas por enfermedades de raíces causadas por estrés hídrico.

La necesidad de fertilizantes de las plantas varía dependiendo del estado en que ellas se encuentren. En el caso particular de las plantas patrones de raulí y roble, ha resultado apropiado el uso de fertilizantes solubles aplicados mediante fertirriego, de acuerdo con el programa de fertilización que se detalla en el cuadro 2.

CUADRO 2

PROGRAMA DE FERTILIZACIÓN UTILIZADO EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS PATRONES DE RAULÍ Y ROBLE

Etapa de crecimiento	Objetivo fertilización	Nombre producto	Fórmula (NPK)	Dosis	Frecuencia
<i>Estadio Temprano</i> Primeras 2 semanas 2 semanas posteriores	Inducir raíces Crecimiento	Ultrasol inicial	15-30-15	30 ppm	2 veces por semana
		Ultrasol crecimiento	25-10-10	50 ppm	
<i>Crecimiento óptimo</i>	Crecimiento altura y diámetro	Ultrasol crecimiento	25-10-10	100 ppm	Día por medio
<i>Crecimiento tardío</i>	Crecimiento altura y diámetro y endurecimiento de tejidos	Ultrasol crecimiento	25-10-10	50 ppm	2 veces por semana
		Ultrasol producción	13-6-40	50 ppm	
<i>Fase de acondicionamiento</i>	Endurecimiento de tejidos	Ultrasol producción	13-6-40	30 ppm	1 vez por semana
		Carbonato Calcio	44 % CaO	5 g/planta	

Fuente: Modificado de INFOR, 1998.

Como consecuencia del riego y la fertilización, durante el acondicionamiento de los patrones se produce un gran desarrollo de la parte aérea de las plantas. Por lo mismo, se recomienda efectuar entre noviembre y diciembre una poda apical del tallo principal, eliminando aproximadamente el 50% del volumen aéreo de la planta y cubriendo los cortes y heridas con un sellante de poda.

Junto con mejorar la relación entre volumen aéreo y volumen radicular, la poda prescrita contribuye a conformar una arquitectura de planta más apropiada para ser usada como patrón de injertación. Al respecto, esta induce un engrosamiento del tallo principal, favoreciendo la manipulación y cortes que se harán durante el proceso de injertación. Además, promueve el crecimiento de ramas laterales en la base del patrón, aspecto que es de la mayor importancia, por cuanto cuando el patrón sea decapitado para injertarle la púa, serán estas ramas laterales las encargadas de efectuar fotosíntesis mientras se produce la unión y el desarrollo del injerto.

Después de la poda, aproximadamente a comienzos de febrero, se realiza una etapa de endurecimiento, para fortalecer y endurecer el tallo y las yemas de la planta patrón. Este proceso consiste en la aplicación de fertilizantes ricos en potasio y calcio, los que se aplican de acuerdo al programa de fertilización detallado en el cuadro 1. Durante este periodo se procede también a eliminar la malla de sombra que protegía a las plantas en el vivero.

Durante todo el proceso de producción y acondicionamiento de los patrones se debe implementar un programa de protección fitosanitaria consistente en aplicaciones preventivas de fungicidas e insecticidas. Lo anterior contribuirá a que, al finalizar la segunda temporada de crecimiento, se pueda contar con patrones sanos, rectos, de 30 a 40 cm de altura, un diámetro de cuello cercano a los 10 mm y una conformación de copa que los hace muy adecuados para ser injertados durante la primavera siguiente.

Colecta y transporte de púas

La fuente de púas para injertación debe corresponder a árboles previamente seleccionados en función de la manifiesta superioridad que expresan en aquellas características que son de interés para conservarlas o masificarlas, y que justifican el esfuerzo técnico y económico que involucra la campaña de injertación. En el caso particular de los injertos de raulí que dan origen a este protocolo, ellos corresponden a individuos plus identificados mediante un riguroso proceso de selección, en el marco de un programa de mejoramiento genético.

La colecta de púas debe efectuarse a fines de invierno, siendo las más adecuadas aquellas del último año de crecimiento, sanas, semilignificadas, con yemas latentes, de un largo de 20 a 30 cm, sin presencia de daños por insectos y con las yemas en buen estado. Se recomienda colectar las púas en la parte superior de la copa, en los tallos denominados "chupones", que corresponden a vástagos de gran crecimiento vegetativo, localizados en la porción superior del árbol. Este tipo de material permite realizar los cortes de injertación en material más blando, recto y fácil de trabajar, lo cual favorece el éxito del injerto.

Después de cortar las púas desde los árboles seleccionados, estas se deben almacenar en condiciones de alta humedad (cerca al 100%) y baja temperatura (3 a 5 °C). Para este fin resulta práctico disponer de una caja térmica, hielo, y esponjas humedecidas con una solución fungicida (Benlate 2.5 g/l agua), elementos con los cuales se puede embalar el material vegetal y despacharlo a invernadero para proceder a su injertación (figura 5).

Una vez que las cuadrillas de colecta llegan al invernadero de injertación, el almacenamiento de las púas debe realizarse en cámaras de frío a 3°C, en las mismas cajas térmicas utilizadas para su transporte, con el objeto de asegurar su preservación. Bajo tales condiciones, la vida útil de las púas es de cuatro días desde el momento en que se extraen.



Figura 5: Embalaje de púas para transporte desde terreno a lugar de injertación.

Injertación propiamente tal

En el caso de raulí se han obtenido los mejores resultados usando púas correspondientes a secciones de ramas con varias yemas, de aproximadamente 10 cm de longitud y un diámetro similar al de los patrones. La técnica de injertación recomendada es la denominada apical, de cuña o de hendidura simple, la cual se debe realizar justo antes del inicio de la primavera, procurando que la púa se encuentre en estado de latencia y con las yemas a punto de brotar.

El procedimiento para efectuar el injerto apical de hendidura o cuña consiste en:

- Cortar el ápice del patrón con tijeras de podar justo sobre el lugar de injertación. El lugar de corte en el patrón debe hacerse cercano a la base, pero dejando a lo menos un par de ramas laterales bajo el corte (promedio 7 a 10 cm). Se recomienda que la distancia entre las raíces de la planta patrón y la púa sea la mínima posible.
- Efectuar una incisión longitudinal sobre el extremo del patrón decapitado, de un largo de 4 a 5 cm., continua y uniforme, avanzando por el centro de la sección medular. En esta incisión se insertará posteriormente la púa.
- Mantener el corte cerrado (con pinza de ropa), para evitar desecamiento mientras se prepara la púa.
- Cortar las púas en la sección apical de las ramas, de una longitud de 8 a 10 cm., semilignificadas y 2 a 3 yemas latentes. Es importante que la púa

seleccionada tenga un diámetro similar al del patrón y constatar que las ramillas y yemas no tengan daños.

- Realizar un corte en la púa, en forma de cuña, largo y continuo, de largo similar al efectuado en el patrón, el corte debe comenzar muy superficialmente hasta llegar a la médula, de modo de dejar mayor cantidad de cambium expuesto. Se debe evitar tocar con los dedos la superficie cortada.
- Retirar la pinza de ropa desde el patrón, abrir el corte e insertar la púa de modo que su sección cambial coincida con la del patrón y queden en estrecho contacto. Reponer la pinza de ropa para afirmar la púa dentro del patrón.
- Colocar el elástico de injertación sobre el área de traslape púa-patrón, comenzando desde medio cm más abajo del inicio del corte, envolviéndolo completamente y terminando medio cm más arriba de la unión.
- Cubrir la zona de injertación por sobre el elástico con un sellante de poda y evitar mojar esta zona hasta que el sellante se encuentre seco.
- Por último, colocar una tarjeta de identificación con la fecha de injertación, número del clon y las iniciales del injertador y trasladar el injerto a invernadero bajo condiciones controladas de humedad y temperatura.

Manejo de los injertos

Una vez hecho el injerto, este se mantiene en invernadero y se debe regar abundantemente el sustrato de cada maceta.

Posteriormente, la periodicidad del riego va a depender de las condiciones medioambientales de humedad y temperatura. La turgencia en las hojas nuevas da una pauta para la cantidad de agua necesaria. El sustrato de la maceta también define la periodicidad de riego, si tiene menor o mayor retención de agua, la planta necesitará un riego más o menos periódico, respectivamente.

Los injertos son sensibles a la falta de agua, por lo tanto se debe tener cuidado con el exceso de transpiración ya sea por calor, o por el efecto desecante del viento.

La fertilización en esta etapa es similar a la de producción de plantas patrones, con la diferencia de que no hay una etapa de inducción de raíces, ya que se considera que la planta patrón ha desarrollado un buen sistema radicular durante el segundo año de crecimiento posterior al trasplante. Además, la aplicación de carbonato de calcio se realiza en el estadio temprano, para favorecer la cicatrización. En el cuadro 3, se indica el programa de fertilización a seguir durante la producción de injertos de raulí y roble.

CUADRO 3
PROGRAMA DE FERTILIZACIÓN UTILIZADO EN LA PRODUCCIÓN DE INJERTOS DE RAULÍ Y ROBLE

Etapa de crecimiento	Objetivo fertilización	Nombre producto	Fórmula (NPK)	Dosis	Frecuencia
<i>Estadio temprano</i> 2 semanas	Crecimiento	Ultrasol crecimiento	25-10-10	50 ppm	2 veces por semana
	Cicatrización	Carbonato calcio	44 % CaO	5 g/planta	1 vez
<i>Crecimiento óptimo</i>	Crecimiento altura y diámetro	Ultrasol crecimiento	25-10-10	100 ppm	Día por medio
<i>Crecimiento tardío</i>	Crecimiento altura y diámetro.	Ultrasol crecimiento	25-10-10	50 ppm	2 veces por semana
	Endurecimiento de tejidos.	Ultrasol producción	13-6-40	50 ppm	
<i>Fase de acondicionamiento</i>	Endurecimiento de tejidos.	Ultrasol producción	13-6-40	30 ppm	1 vez por semana

Fuente: Modificado de INFOR, 1998.

Además de controlar el riego y la fertilización, durante el manejo de los injertos se debe poner especial atención a los siguientes aspectos:

- **Control fitosanitario**

Los virus, hongos, bacterias e insectos causan estragos en el desarrollo de los injertos.

La aplicación de fungicidas en esta etapa se realiza cada 10 días, alternando al menos tres productos diferentes para evitar que los patógenos desarrollen resistencia específica a alguno de ellos. Ocasionalmente es necesario aumentar la periodicidad de aplicación, especialmente en los días posteriores a la injertación, y en la época de poda de brotes en la planta patrón.

Particularmente en el caso de *Nothofagus* (roble, rauli y lenga), en el período de brotación de las yemas de la ramilla injertada, se detecta la presencia de una sobrepoblación de pulgones, los cuales en estado adulto producen amarillamiento de las hojas y posterior defoliación, lo cual debe ser controlado con insecticidas. Durante la brotación, también aparecen agallas y larvas que deben ser controladas con insecticidas.

- **Poda de brotes de la planta patrón**

Otra labor cultural que se realiza al cabo de 2 o 3 meses y en forma periódica, es la poda de brotes nuevos del patrón para impedir su desarrollo. Posteriormente, cuando el injerto alcanza un crecimiento de 25-30 cm y logra una masa foliar crítica, se eliminan completamente los brotes y ramas del patrón. La intensidad en la poda de los brotes varía de las especies perennes (coigüe) a las caducifolias (raulí, roble, lenga), en las primeras la poda de los brotes nuevos es más severa, en cambio en las segundas la poda es más suave.

- **Revisión de elásticos de injertación**

Cuando el injerto comienza la etapa de crecimiento óptimo, lo que se refleja en el diámetro de la zona de injertación, se debe revisar el elástico y soltarlo para evitar daños por estrangulamiento. El elástico se elimina definitivamente al cabo de un año, dependiendo del grado y calidad de la cicatrización de la herida.

- **Endurecimiento**

Durante el mes de enero siguiente a la injertación, ya se puede comenzar el proceso de endurecimiento de los rametos injertados. Para este efecto, se deben extraer del invernadero y ubicarlos en vivero bajo un sombreadero de malla «raschell» de 50%. Los injertos pueden permanecer en esta condición hasta el momento de su plantación, en el invierno de ese mismo año.

COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

La injertación y el enraizamiento de estacas son herramientas de macropropagación vegetativa aplicables, con distinta finalidad productiva, a raulí. La injertación puede constituir una forma adecuada para rejuvenecer material adulto para posteriormente propagarlo por otros métodos (cultivo *in vitro* o estaquillado), así como también para

conformar bancos o huertos semilleros clonales. El enraizamiento de estacas puede contribuir a masificar material clonal rejuvenecido, su eficacia ha sido demostrada con material proveniente de plantas micropropagadas, pero no queda claro si su eficiencia en términos de costos versus tasas de multiplicación es mayor que la de este último método. Tampoco se ha explorado la opción de producción masiva de estacas de raulí a partir de un jardín clonal de plantas madres, en un esquema similar al utilizado, por ejemplo, con eucaliptos.

En el caso de raulí se recomienda injertar los árboles superiores en el mes de julio y agosto. El tipo de injerto recomendado es el apical de cuña o hendidura.

La mano de obra capacitada y especializada en este campo, permite mejorar los porcentajes de éxito de la injertación y además, detectar y solucionar problemas de los injertos en forma prematura y eficiente.

La respuesta rizogénica de estacas de raulí, confeccionadas con material rejuvenecido proveniente de plantas micropropagadas, no se ve influenciada en forma significativa por la dosis hormonal utilizada para inducir la formación de raíces. Tampoco se observa un efecto clonal importante, por cuanto todos los clones enraizan en forma homogénea, a diferencia de lo que ocurre con otros materiales, donde existe un fuerte componente clonal en la respuesta rizogénica. Por el contrario, si se observa una respuesta distinta en el enraizamiento, en función del origen de las estaquillas, destacándose que aquellas provenientes del eje central de la planta enraizan en mayor proporción (70 a 90%) que otras originadas en ramas laterales (0 a 50%).

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo, 1991. Técnicas de Injertación en *Eucalyptus globulus*. Establecimiento Programa de Mejoramiento Genético. Bosques Arauco S.A. Cañete, Chile. 22 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, Marzo de 1997.

Barbosa, M. 1987. Manual de Injertos de Especies Forestales. Centro de Genética Forestal, A.C. Boletín Técnico N° 1. Chapingo, México. 66 p.

- Boselli, M. 1986. El Libro de los Injertos. Editorial De Vecchi, S.A. Barcelona, España. 174 p.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broad-leaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13.
- Emhart, V. 1996. Diseño y Establecimiento de un Huerto Semillero Clonal de *Eucalyptus nitens* (Deane *et* Maiden) con fines de Producción, Investigación y Docencia. Tesis de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 79 p.
- Emhart, V. 1998. Propagación Vegetativa mediante Injertos. Curso Mejora Genética Forestal Operativa. 16-21 de Noviembre de 1998. Valdivia, Chile. 153-166 p.
- Emhart, V.; Hernández, M. y Cofré, J. 2000. Injertación en *Nothofagus obliqua* y *N. alpina*. En: Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V. (editores). Domesticación y Mejora Genética de Raulí y Roble. Universidad Austral de Chile, Instituto Forestal. Valdivia, Chile. Pp: 257-282.
- Garner, R. 1987. Manual del injertador. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 338 p.
- Gaymer, M. 1994. Ensayo de una Técnica de Injertación para *Eucalyptus nitens* (Deane *et* Maiden) Maiden. Tesis de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 65 p.
- Gil, L; Pérez, V. y Palomar, J. 1986. El Injerto en los Pinos. Hojas Divulgadoras N° 20. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. 24 p.
- Gutiérrez, B.; Ipinza, R. y Chung, P. 1994. Propagación Vegetativa y Silvicultura Clonal de Eucalipto. *Ciencia e Investigación Forestal*. 8(1): 139-175. 1994
- Gutiérrez, B. 1995. Consideraciones sobre la Fisiología y el Estado de Madurez en el Enraizamiento de Estacas de Especies Forestales. *Ciencia e Investigación Forestal*. 9(2): 261-277. 1995
- Hartmann, H. y Kester, D., 1990. Plant Propagation, Principles and Practices. Editorial Prentice-Hall, Inc. Estados Unidos. 647 p.
- INFOR. 1998. Técnicas para producir plantas forestales en Aysén. Folleto divulgativo. Coyhaique, Chile. 28 p.

Ipinza, R. y Gutiérrez, B., 1992. Resultados preliminares de un Ensayo de Enraizamiento de Estaquillas de *Eucalyptus globulus* Labill. ssp. *globulus*. Ciencia e Investigación Forestal 6(1): 61-79.

Martinez Pastur, G. y Arena, M. 1995. Desarrollo preliminar de protocolos de *cultivo in vitro* para las especies de *Nothofagus* caducifolios patagónicos. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes (Argentina), 24 y 27 Octubre. Pp: 127-136.

Martinez Pastur, G. y Arena, M. 1996. *In vitro* propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. Et Mil. Phytion 58:1-7.

Martinez Pastur, G. y Arena, M. 1997. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Bosque 18(2): 43-50.

Vergara, R. 1995. Métodos de Injertación en Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.). Tesis de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 66 p.

MICROPROPAGACIÓN DE ÁRBOLES PLUS DE RAULÍ (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) PARA EL ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES CLONALES.

Ana Maria Sabja¹, Oriana Ortiz² y Claudia Triviño³

INTRODUCCIÓN

El Raulí, *Nothofagus alpina* Poepp. et Endl. (= *Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst = *Nothofagus nervosa* (Phil.) Krasser), es una de las principales especies de su género, representando el principal recurso forestal del bosque nativo chileno. Árbol endémico de los bosques subantárticos de Chile y Argentina, crece en las laderas de las montañas, a altitudes intermedias entre los 300-1.200 msnm, prefiere los suelos profundos con buen drenaje. Entre los factores limitantes que lo afectan se encuentran las bajas temperaturas, las amplias fluctuaciones térmicas, los suelos muy húmedos y las estaciones secas prolongadas. Especie muy intolerante, exigente de luz. Árbol monoico, caducifolio, puede alcanzar entre los 35 a 40 m de altura y más de 2 m de diámetro, de rápido crecimiento, tronco recto, cilíndrico, poco nudoso y libre de ramas en la parte inferior (Garrido *et al.*, 1979; Hoffmann, 1982).

En la actualidad, estos recursos cobran nueva importancia como una fuente de diversificación de la producción forestal. En este contexto, la gran variabilidad que aún representa esta especie a lo largo de su distribución natural, resalta la conveniencia de aplicar herramientas de mejoramiento genético en conjunto con los nuevos desarrollos biotecnológicos y técnicas silvícolas de avanzada, para incrementar su productividad y obtener un beneficio sustentable de su gran potencial económico e industrial.

Actualmente, en Chile, se encuentra en desarrollo un programa de mejoramiento genético para raulí mediante el uso de semillas (sexual). Los niveles de producción de semillas manifiestan considerables fluctuaciones anuales, las que corresponden a patrones cíclicos de variación (Gutiérrez, 2000; Ipinza y Espejo, 2000). Por otra parte, este proceso de producción transmite solamente una parte de las ganancias genéticas de los individuos seleccionados, siendo siempre una meta deseable el traspasar todo

¹ Fundación Chile, GENFOR. E-mail: asabja@uach.cl

² Instituto Forestal, Sede Bio Bio. E-mail: oortiz@infor.cl

³ GENFOR. E-mail: ctrivino@uach.cl

el potencial de la ganancia genética en volumen aprovechable a las plantaciones operacionales (Kleinschmit *et al.*, 1993).

Para lograr tal objetivo, las estrategias de mejoramiento incorporan las técnicas de propagación de los árboles seleccionados. En este sentido, la propagación vegetativa (asexual), permite transferir toda la varianza genética a los descendientes, duplicando la ganancia genética asociada a los esquemas sexuales de propagación, ya que aprovecha toda la variación genética existente (Ikemori *et al.*, 1994; Kleinschmit *et al.*, 1994; Talbert *et al.*, 1993).

La micropropagación es esencialmente una técnica de propagación vegetativa y, actualmente, es utilizada en la producción de plantas forestales en el ámbito comercial (Ahuja, 1997; Aitken Christie *et al.*, 1994; Cyr, 1998; Gleed *et al.*, 1995; Guimaraes *et al.*, 1997; MacRae y Cotterill, 1997; Smith, 1997). Entre estas se encuentra la organogénesis, técnica denominada comúnmente como micropropagación que utiliza brotes axilares y adventicios (Burger, 1989; Chalupa, 1987; Smith, 1997) y la técnica de embriogénesis somática. Los dos primeros conllevan a la producción de plantas micropropagadas vía organogénesis a través de la formación de estructuras unipolares (brotes que deben ser enraizados en un proceso de varias etapas). En contraste, la embriogénesis somática origina embriones bipolares, es decir, aquellos que generan en forma simultánea la parte aérea y las raíces de una plántula, a través de una serie de etapas similares a la formación embriones zigóticos (Bhojwani y Razdan, 1983; Thorpe *et al.*, 1991; Smith, 1997). Aspectos específicos de la aplicación de la embriogénesis somática en raulí pueden consultarse en el capítulo 2.4 de este mismo libro.

De acuerdo a los antecedentes existentes (Ahuja, 1993; Carson *et al.*, 1992; Franclet *et al.*, 1987; Libby y Ahuja, 1993; Timmis y Aboe-Nil, 1987; Viera *et al.*, 1992), la potencialidad de la micropropagación radica en su alta capacidad de multiplicación, en la reversión y mantención de la juvenilidad y en la producción de plantas con estructura radicular normal, aspectos que en definitiva permiten acceder a una silvicultura altamente productiva.

Existen varios estudios de micropropagación de especies de *Nothofagus* que apuntan a la clonación de los mejores fenotipos (Jordán *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995). En estas especies, se han utilizado las técnicas de organogénesis a partir de trozos de tejidos, yemas, secciones nodales y axilares estériles obtenidos de plantas juveniles, adultas y yemas de esferoblastos (Jordán *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 1997; Martínez y Arena, 1999) y la embriogénesis somática que aún se encuentra

en etapa de investigación (Castellanos *et al.*, 2004), y cuyos alcances se detallan en el capítulo 2.3 de este libro.

Dentro del proceso de micropropagación utilizando organogénesis, se requiere una serie de etapas para la producción de plantas, las que a continuación se detallan:

1. Selección y desinfección del material vegetal a propagar.
2. Establecimiento de los explantes o secciones de tejido en medio nutritivo en condiciones *in vitro*.
3. Multiplicación y elongación de los brotes.
4. Enraizamiento y
5. Aclimatación en invernadero.

La organogénesis en especies de *Nothofagus* ha utilizado medios nutritivos con bajas concentraciones salinas, como es el Broadleaved Tree Medium (BTM), Woody Plant Medium (WPM), y Murashige y Skoog (MS), los que han sido modificados en las concentraciones de los macronutrientes, adición de aminoácidos, sustancias hormonales y vitaminas (Jordán *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995). Sin embargo, Chalupa (1983) y Martínez *et al.* (1995) indican que el medio BTM modificado, ha logrado buenos resultados en las especies de *Quercus* y *Nothofagus*, tanto en la etapa de proliferación de brotes como en la de elongación. Jordán (1984), señala que uno de los componentes determinantes en el cultivo *in vitro* son los reguladores de crecimiento, y el requerimiento de estas sustancias varía considerablemente en función del tejido utilizado y el nivel endógeno de fitohormonas naturales. De este modo, para la proliferación y elongación de explantes de yemas de diferentes especies de *Nothofagus* se han utilizado las citocininas BAP y 2 ip combinados o junto a la auxina NAA o IBA o a la giberelina GA3. En explantes provenientes de embriones, el uso de BAP en combinación con kinetina y GA3 ha entregado buenos resultados (Jordán y Velozo, 1991; Jordán *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1995).

De acuerdo con Martínez y Arena (1995), el estadio óptimo de los brotes y yemas a propagar corresponde al de sus primeras fases de activación, debiendo ser éstos colectados durante otoño y primavera. En el caso de explantes obtenidos desde semillas, éstos se colectan después de 2 a 3 semanas de iniciada la germinación. En forma exitosa también se ha inducido material vegetal proveniente de renovales de 10 a 15 años y de árboles adultos de 200 años de *Nothofagus pumilio*, los que se inducen a brotar en laboratorio durante Agosto-Septiembre, (Martínez y Arena, 1996).

El número de brotes que se obtiene en cultivo *in vitro* de *Nothofagus alpina*, tiene directa relación con el tipo de explante empleado, siendo el más adecuado las yemas apicales y explantes de semilla (Hermosilla, 1998). Sin embargo, para *N. pumilio* no se encontraron diferencias en el número de brotes obtenidos al utilizar como explantes material juvenil o adulto (Martínez y Arena, 1996).

La etapa de enraizamiento en especies de *Nothofagus* se ha realizado con éxito utilizando brotes de alrededor de 2 cm de largo, en tratamientos de oscuridad y distintos tipos y concentraciones de auxinas y medios de cultivos gelificados con agar (Martínez y Arena, 1996; Jordán *et al.*, 1996). Se ha observado que las hojas de plantas micropropagadas son heterotróficas (dependen de una fuente de carbono), pequeñas, delgadas y, a menudo, poseen un pobre desarrollo de tejido epidermal y del mesófilo. Estas características afectan su función fisiológica y determinan la necesidad de un proceso de aclimatación. En varias especies se utiliza con éxito el enriquecimiento con CO₂ durante el proceso de enraizamiento y aclimatación *in vitro*, lo que permite producir plantas autotróficas y con un buen desarrollo cuticular y estomático. (Kosai, 1991). Otra alternativa utilizada en las especies de *Nothofagus* ha sido la aclimatación en forma gradual de plantas micropropagadas en invernadero (Martínez y Arenas, 1996).

Este trabajo, enmarcado en el proyecto FDI 00C7FT-12 «Silvicultura Clonal en Raulí para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales en la IX y X Regiones del País», mediante técnicas de micropropagación, busca obtener plantas plantables de material genético adulto de alto valor, seleccionado en anteriores iniciativas de mejoramiento (árboles plus de raulí) y evaluar el comportamiento de este material mediante el establecimiento de ensayos clonales. En este trabajo se presentan las metodologías utilizadas y los principales resultados obtenidos en el proceso de producción de plantas a través de la técnica de micropropagación.

METODOLOGÍA

Etapa de selección del material vegetal y establecimiento

El material vegetal a micropropagar se obtuvo de 126 árboles adultos, que corresponden a árboles plus de raulí con edades que fluctúan entre 40 y 100 años. Los árboles seleccionados se encuentran localizados en toda el área de distribución natural de la especie, que abarca desde los 35° hasta los 41° de latitud Sur.

Los árboles plus fueron seleccionados en tres iniciativas de mejoramiento genético:

- 1983 - 1989: CONAF, Cooperativa de Mejoramiento Genético (CONAF/UACH/INFOR y Empresas Forestales) y el Complejo Maderero Panguipulli (COFOMAP).
- 1997 - 2000: Proyecto FONDEF D96I1052 «Mejoramiento Genético para Especies de *Nothofagus* de Interés Económico», co-ejecutado por UACH e INFOR
- 1998 - 2001: Proyecto FDI 5551: “Técnicas Silviculturales y Genéticas para cuatro Especies Nativas de Interés Comercial”, ejecutado por INFOR.

CUADRO 1
NÚMERO DE ÁRBOLES PLUS SELECCIONADOS EN LAS DISTINTAS INICIATIVAS DE MEJORAMIENTO GENÉTICO EN RAULÍ.

Iniciativa de Mejoramiento	Número de árboles plus seleccionados (clones)
CONAF	32
UACH - INFOR	49
INFOR	45
TOTAL	126

Los árboles plus fueron seleccionados fenotípicamente en base a la rectitud y el volumen, con una intensidad de selección promedio de un árbol cada 50 hectáreas.

De acuerdo a antecedentes bibliográficos (Martínez Pastur y Arena, 1995; 1996), el material vegetal óptimo para iniciar el cultivo *in vitro* de *N. alpina* adulto, corresponde a brotes apicales proveniente de yemas en desarrollo. Sin embargo, dado que este material vegetal se obtiene solamente durante el inicio del crecimiento vegetativo primaveral, y para avanzar en el proyecto, los primeros cultivos se realizaron durante el mes de diciembre de 2001, utilizando injertos y reinjertos como fuente de explantes con algún grado de rejuvenecimiento y menores niveles de contaminación. En la práctica, el uso de esta metodología demanda de un número inicial de explantes muy

alto, para asegurar que el porcentaje de activación (inicio de elongación de brotes *in vitro*), no sea deficiente en algunos clones. Por esta razón se decidió utilizar yemas en estado de latencia, las que fueron colectadas entre los meses de febrero y julio de 2002 con el fin de mejorar los protocolos de desinfección.

En una fase siguiente, se utilizaron brotes apicales obtenidos de púas colectadas directamente en terreno, durante las dos primeras semanas de septiembre, las cuales se colocaron en agua, por algunos días, en un ambiente controlado, para activar la brotación de las yemas. Una vez que el brote apical se elonga y presenta uno o dos pares de hojas desarrolladas, se procede a cosecharlos para su desinfección y cultivo en laboratorio.

El material vegetal fue esterilizado con hipoclorito de sodio, en concentraciones que variaron de acuerdo al tipo de explante entre 5 y 10%. Luego, en condiciones estériles se lavaron cuatro veces con agua destilada estéril. Los brotes se cultivaron en Broadleaved Tree Medium (BTM) (Chalupa, 1983). El medio de cultivo fue suplementado con 3% de sacarosa, 0,125 mg/l de BAP y 2,3 g/l de Gelrite. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de incubación a 22 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 horas.

Etapas de multiplicación y elongación de brotes

Los explantes se subcultivaron a un medio nutritivo fresco cada 21 días. A medida que ocurría la elongación de los brotes, éstos se seccionaron y cultivaron para continuar el proceso de multiplicación. El medio de cultivo fue BTM, utilizando la misma concentración hormonal de la etapa anterior, pero reduciendo la sacarosa al 2%.

Etapas de enraizamiento

Para esta etapa se utilizó el protocolo de enraizamiento señalado por Martínez Pastur y Arena (1995), en el cual se colocan explantes apicales de 2 a 3 cm de largo con dos pares de hojas, en un medio basal BTM con los macronutrientes reducidos a la mitad, adicionando 0,61 μ M de IBA y 1,5% sacarosa. Los explantes fueron colocados durante una semana en oscuridad y luego en condiciones de luz (fotoperíodo de 16 horas), donde permanecieron hasta el traspaso a la etapa de acondicionamiento (15 a 18 días).

Etapas de acondicionamiento en laboratorio

Para evitar las condiciones de estrés, que usualmente ocurren en plantas micropropagadas al transferirlas a invernadero, se estableció un procedimiento de acondicionamiento en laboratorio que consiste en cultivar los brotes, enraizados y sin enraizar, en envases cerrados que contienen sustrato compuesto por turba y perlita (50%) al que se le adiciona un medio nutritivo líquido (BTM), reducido a la mitad y sin sacarosa, durante un período de dos a tres semanas.

Etapas de aclimatación en invernadero

Luego de la etapa de acondicionamiento en laboratorio, las plantas son trasladadas a invernadero donde son transplantadas a tubetes circulares de 120 cc, en un sustrato compuesto por turba y perlita (50%). Al sustrato, previamente, se le adiciona Osmocote 15-9-12, un fertilizante granular de lenta entrega, en dosis de 5 Kg/m³.

Inicialmente, las plantas son sometidas a condiciones de alta humedad (90%), la que gradualmente se va reduciendo hasta lograr aclimatarlas a condiciones ambientales normales, este proceso tiene una duración de 3 semanas, aproximadamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del material vegetal y establecimiento

A partir de 126 clones de raulí, utilizando brotes apicales de injerto de invernadero, yemas y brotes apicales obtenidos de terreno, se obtuvo un total de 14.158 explantes que fueron cultivados *in vitro*. Esto permitió definir el comportamiento del material vegetal a la desinfección, calidad de material que se activa y continúa en el proceso de micropropagación y comportamiento de los clones durante el cultivo *in vitro*.

Cultivo de brotes apicales de injerto de invernadero

Los primeros cultivos se iniciaron en el mes de diciembre de 2001, utilizando como explantes secciones apicales de púas procedentes de 16 clones adultos injertados y mantenidos en invernadero. A partir de este material se logró establecer *in vitro* 7 clones (Clon N°s 3, 23, 38, 43, 53, 55 y 58).

Cultivo de yemas en latencia

Este material se obtuvo a partir de púas con yemas en latencia del Huerto Semillero Clonal de Huillilemu de CONAF, entre los meses de febrero y julio. Las yemas se desinfectaron, posteriormente se extrajeron las cubiertas de las yemas (péculas) y cultivaron *in vitro* en el medio nutritivo BTM. De los 30 clones iniciados, 21 se mantuvieron en cultivo durante 3 meses, en algunos casos las yemas se desarrollaron, sin embargo; los brotes obtenidos finalmente necrosaron.

Cultivo de brotes apicales de árboles adultos de terreno

La principal dificultad en la aplicación de la técnica descrita por Martínez Pastur y Arena (1996) para obtener brotes a partir de púas en raulí, es que ésta exige su colecta una semana antes de comenzar la brotación (apertura yemas latentes), con una desinfección previa de ellas en terreno.

Los árboles plus se encuentran dispersos en áreas muy extensas, lo que demanda una gran cantidad de desplazamientos; adicionalmente, para obtener el material es necesario escalarlos, por lo que la operación requiere de mucho tiempo y no permitió aplicar el procedimiento de desinfección en terreno.

Luego de algunas pruebas preliminares, el procedimiento con mejores resultados consistió en coleccionar púas durante la primera y segunda semana de septiembre, desinfectarlas (Streptoplus y Captan 1 g/l, en ambos casos) e inmediatamente forzarlas a brotar en condiciones de laboratorio.

En general, al momento de iniciar los cultivos, el estado fisiológico de los brotes era muy heterogéneo, lo que probablemente condicionó que el porcentaje de activación y estabilización del material fuera muy variable entre los distintos clones. Se consideró estabilizado el material cuando el brote desarrollado *in vitro* se separó del explante inicial.

Multiplicación y elongación de brotes

De los 126 clones de raulí llevados a cultivo, se logró estabilizar e iniciar la etapa de multiplicación en 47 provenientes de las diferentes fuentes de origen de los explantes.

La variación clonal que se alcanza con este material adulto, en respuesta a la multiplicación de aquellos que fueron injertados en invernadero, se muestra en la figura 1.

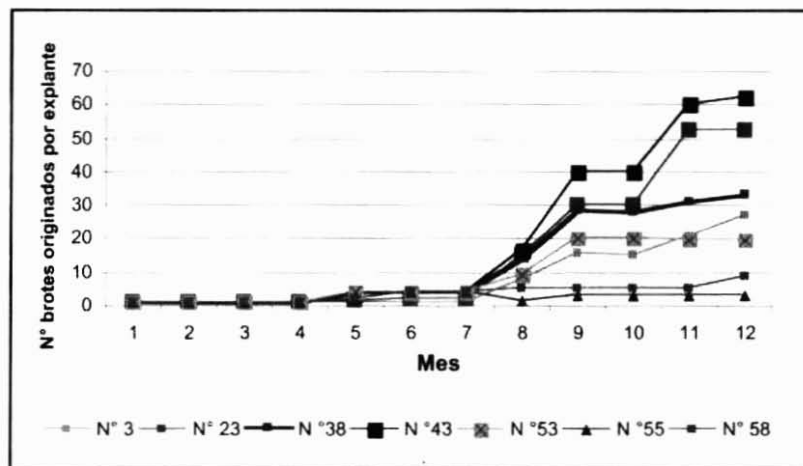


Figura 1: Tasa de multiplicación de brotes de 7 clones en un periodo de 12 meses

La variación clonal que se alcanza con este material se observa en 7 clones, los que presentaron una tasa de multiplicación de 1:1 a 1:4 brotes por explante a los 5 meses de cultivo *in vitro*. A los 12 meses de cultivo, la tasa de multiplicación fluctúa entre 1:2 y 1:62 brotes por explante. Los resultados obtenidos indican que la tasa de multiplicación es variable entre clones, tal como se aprecia en el clon N° 23, que a partir de 5 explantes iniciales generó 151 brotes y en el clon N° 43 con el que desde 3 explantes iniciales se obtuvo 120 brotes, al cabo de 5 meses.

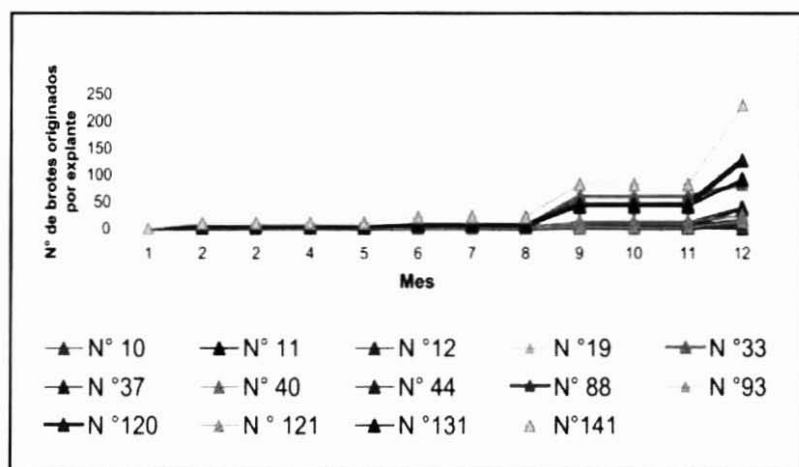


Figura 2: Tasa de multiplicación de brotes en un periodo de 12 meses

La respuesta a la multiplicación de clones provenientes de brotes apicales de árboles adultos de terreno, se ejemplifica en los 14 clones que se muestran en la figura 2. En este caso la tasa de multiplicación observada fue de 1:1 a 1:23 brotes por explante inicial a los 6 meses de cultivo. A los 12 meses las tasas de multiplicación varían entre 1:2 brotes y 1:230 brotes por explante (figura 2). Probablemente, la obtención de mejores resultados con este material se deba al conocimiento adquirido en el manejo de esta especie en cultivo.

Estos resultados demuestran que para la producción masiva de plantas se requiere de un periodo de 12 meses para alcanzar tasas de multiplicación aceptables como se observa las figuras 1 y 2.

En otros estudios, utilizando material juvenil, se han obtenido tasas de multiplicación de 1:7 y 1:11 al cabo de 63 días (Martínez Pastur y Arena, 1996).

Enraizamiento y acondicionamiento en laboratorio

En general, los porcentajes de enraizamiento de brotes durante su permanencia en el medio de inducción de raíces varían de acuerdo al clon. Tal como se muestra en la respuesta de 16 clones (cuadro 2), el porcentaje de brotes que inician raíces en el medio de inducción no es definitivo, ya que este valor se eleva en la etapa de acondicionamiento y aclimatación en invernadero. Esto se observó luego de colocar en sustrato los brotes que no presentaban raíces visibles, los que sobreviven y presentan un crecimiento aéreo activo y desarrollo radicular. El acondicionamiento realizado en laboratorio permitió que las plantas fueran capaces de ser autotróficas antes de su traspaso a invernadero, aminorando de este modo el estrés y la mortalidad de ellas.

CUADRO 2
PORCENTAJE DE PLANTAS ENRAIZADAS IN VITRO Y PORCENTAJE
TOTAL DE PLANTAS ENRAIZADAS DESPUÉS DEL
ACONDICIONAMIENTO DE 16 CLONES DE RAULÍ

Clon	% de plantas enraizadas in vitro	% de plantas enraizadas después de acondicionamiento
3	58	90
12	74	100
23	36	94
37	41	94
38	68	96
40	50	88
43	34	60
44	34	97
53	90	95
58	42	90
88	21	92
93	60	93
120	25	100
121	60	89
131	55	100
141	70	96

Durante esta etapa se observaron aumentos en el tamaño de la hoja, iniciación de raíces, elongación apical y radicular (figura 3). De acuerdo a lo obtenido en ensayos preliminares con material no acondicionado, en algunos clones, este acondicionamiento logró incrementar 3 veces la sobrevivencia del material en invernadero.

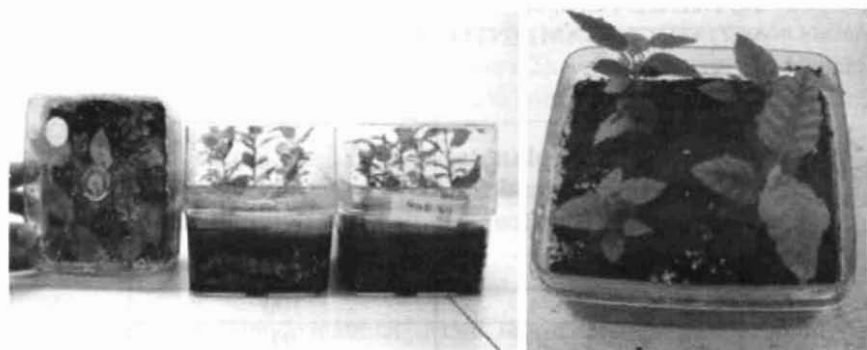


Figura 3: Plantas micropropagadas de raulí, después de dos semanas de acondicionamiento en laboratorio

Aclimatización en invernadero

El procedimiento utilizado para el acondicionamiento y aclimatización de las plantas, reduciendo la humedad en invernadero, ha permitido mantener una alta sobrevivencia de aquellas producidas en laboratorio. Los resultados que se presentan en el cuadro 3 y en las figuras 4 y 5 corresponden a plantas producidas *in vitro* de 39 clones y establecidas en invernadero.

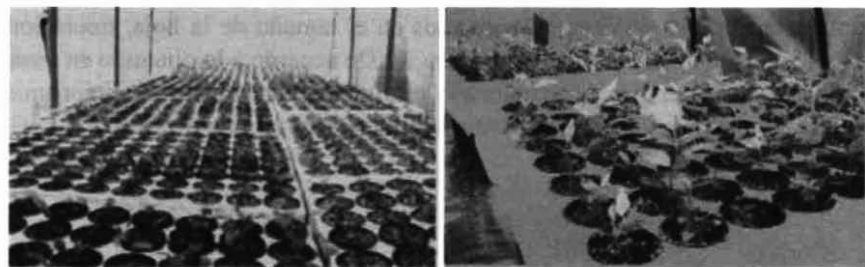


Figura 4: Plantas micropropagadas de raulí en invernadero y en condiciones de alta humedad

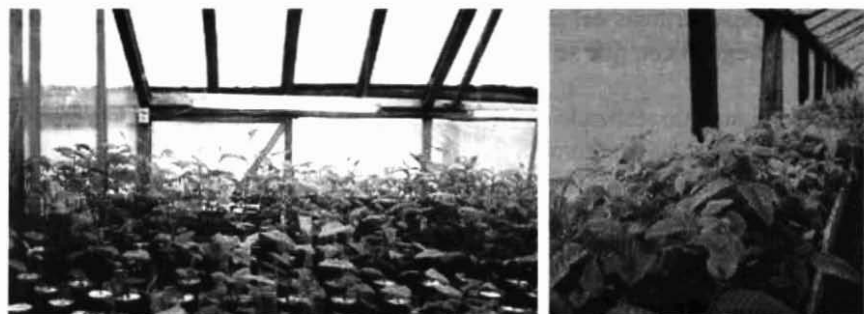


Figura 5: Plantas micropropagadas de rauli, ya aclimatadas en invernadero.

CUADRO 3
NÚMERO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS Y ESTABLECIDAS
EN INVERNADERO DE 39 CLONES DE RAULÍ

Clon	N° de Plantas en invernadero	Clon	N° de Plantas en invernadero
3	284	65	53
6	50	66	252
7	260	69	175
10	130	80	122
11	82	88	482
12	543	93	350
18	57	97	113
19	53	98	151
23	331	102	59
26	98	105	89
33	357	120	507
37	351	121	334
38	325	126	149
40	334	128	80
42	117	130	33
43	315	131	418
44	418	132	175
53	426	138	163
55	103	141	582
58	473	TOTAL	9.394

CONCLUSIONES

Una de las etapas críticas del proceso de micropropagación, es la calidad y sanidad del material vegetal con que se inicia el proceso de multiplicación *in vitro*.

El acondicionamiento realizado en laboratorio logró disminuir a un 5,7% la mortalidad de plantas en invernadero, aumentando significativamente la producción de plantas para su establecimiento. También, se observó que el crecimiento de las plantas no se detuvo una vez traspasadas a invernadero, lo que se traduce en una disminución importante del estrés.

En invernadero se han establecido 9.394 plantas proveniente de 39 clones, para posteriormente plantarlas en ensayos clonales en terreno. Los resultados obtenidos indican que las técnicas de micropropagación permiten obtener plantas aptas para utilizarlas en operaciones de nivel productivo, a partir de material vegetal adulto colectado desde árboles plus.

BIBLIOGRAFÍA

Ahuja, M.R. 1993. Biotechnology and Clonal Forestry. In: Ahuja M. and Libby, W. (Editors) Clonal Forestry I. Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin. Pp:135-144.

Ahuja, M. 1997. Biotechnology in Forestry: expectations and challenges. En: Perspective of Forest Genetic Tree Breeding on a Changing World. IUFRO World Series. Vol 6. Vienna, Austria. Pp: 45-55.

Aitken-Crhistie, J.; Maddocks, D.; Sigley, M.; Hodder, V.; Burger, F. and Carter, P. 1994. Embryogenesis of Radiata Pine. In: Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium. Tokyo, Japan, Aug.31- Sep1, 1994. Pp: 91-98.

Bhojwani, S. y Razdan, M. 1983. Developments in Crops Science (5). Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publishers Company Inc. Pp: 313-337.

Burger, D. 1989. Empress Tree (*Paulownia tomentosa* Steud.). In: Bajaj, S. (Editor) Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag, Berlin. Pp: 359- 369.

Castellanos, H.; Sánchez-Olate, M.; Ríos, D.; Barudy, M. y Cartes, P. 2004. Embriogénesis somática como alternativa potencial para la regeneración *in vitro* del género *Nothofagus*. Inducción y caracterización de callo proembriogénico. Simposio Internacional IUFRO. Rauli Riqueza de los Bosques Templados: Silvicultura Genética e Industria. 14-16 Abril. Chile, Valdivia.

Carson, M.; Vicent, T. and Firth, A. 1992. Control Pollinated and Meadow Seed Orchards of Radiata Pines. Synthesis IUFRO Symposium Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species. Bordeaux, France. Pp: 100-109.

Cyr, D. 1998. Cryopreservation of Embryogenic Cultures of Conifers and its Application to Clonal Forestry. In: Jain, M.; Gupta, P. and Newton, R. (Editors). Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 4. Kluwer Academic Publishers, Boston. (In press).

Chalupa, V. 1983. Micropropagation of Conifer and Broadleaved Forest Trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13:7-39.

Chalupa, V. 1987. European Hardwoods. In: Bonga, J. and Durzan, D. (Editors). Cell and Tissue Culture in Forestry. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperm and Palm. Vol. 3. Martinus Nijhoff Publishers. Pp: 232-248.

Garrido, F.; Ibarra, M.; Steinmetz, J. y Serón, J. 1979. Variación en las poblaciones naturales de raulí, *N. alpina* (Poepp. et Ende) Oerst. Revisión bibliográfica. Documento de trabajo N° 28. FO:DP/CHI/76/003.

Gutiérrez, B. 2000. Áreas productoras de semillas en el mejoramiento genético de *Nothofagus*. En: Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V. (Editores). Domesticación y Mejora Genética de Rauli y Roble. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. Pp: 215-235.

Francllet, A.; Boulay, M.; Bekkaoui, F.; Fouret, Y.; Verschoore – Maryouzet, B. y Walter, N. 1987. In: Bonga, J. and Durzan, D. (Editors). Cell and Tissue Culture in Forestry. General Principles and Biotechnology Vol I. Martinus Nijhoff Publishers. Pp: 232-248.

Gleed, J.; Darling, D.; Muschanp, B. and Nairn, B. 1995. Commercial Production of Tissue Culture Pinus Radiata. *Tapp Journal*. September, 1995. 78(9): 147-150.

Guimaraes, M.; Correja, C. and Coucelo, F. 1997. Integration of *Eucalyptus globulus* Micropropagation Laboratory in a Nursery of a Company from the Portuguese Pulp Sector. IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus v2: Biotechnology Applied to Genetic Improvement of Tree Species. Salvador, Brasil, August 24-29.

Hermosilla, J. 1998. Desarrollo preliminar de protocolos para clonar *in vitro* la especie *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. 83p.

Hoffmann, A. 1982. Flora Silvestre de Chile. Zona Austral. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. Editorial Lord Cochrane. 258p.

Ikemori, Y.; Penchel, R. and Bertolucci, F. 1994. Integrating Biotechnology into Eucalyptus Breeding. Proceedings of the International Wood Biotechnology Symposium. August 31th- September 1st. Tokio, Japan. Pp: 77-84.

Ipinza, R. y Espejo, J. 2000. Biología Reproductiva en *Nothofagus*. En: Ipinza, R.; Gutiérrez, B. y Emhart, V (Editores) Domesticación y Mejora Genética de Rauli y Roble. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. Valdivia, Chile. Pp: 75-93.

Jordán, M. y Velozo, J. 1991. Micropropagación de Rauli (*Nothofagus alpina*). Actas del Segundo Taller Silvícola. Concepción, Chile, 5 de Noviembre. Pp: 57-64.

Jordán, M.; Velozo J y Sabja, A. 1996. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P.et E.) Oerst., Fagaceae. Plant Cell Report 15:795:798.

Kleinschmit, J.; Khunara, D.; Gerhold, H. and Libby, W. 1993. Past, Present and Anticipated Applications of Clonal Forestry. In: Ahuja, M. and Libby, W. (Editors). Clonal Forestry II. Conservation and Application. Springer-Verlag. Berlin. Pp: 9 -41.

Kosai, T. 1991. Micropropagation under Photoautotrophic Conditions. In: Debergh, P. and Zimmerman, R. (Editors). Micropropagation: Technology and application. Kluwer Academic Publishers. Pp: 447-470.

Libby, W. and Ahuja, M. 1993. Micropropagation and Clonal Options in Forestry. In: Ahuja, M. (Editor). Micropropagation of Woody Plants. Forestry Sciences, vol 41. Kluwer Academic Publishers. Pp: 425-442.

- MacRae, S. and Coterill, P. 1997. Macropropagation and Micropropagation of *E. globulus*. Means of Capturing Genetic Gain. Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species. Salvador, Brazil, august 24-29. Pp: 102-110.
- Martinez Pastur, G. y Arena, M. 1995. Desarrollo preliminar de protocolos de cultivo *in vitro* para las especies de *Nothofagus* caducifolios patagónicos. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes (Argentina), 24 y 27 Octubre. Pp.127-136.
- Martinez Pastur, G.; Arena, M. and Caso, O. 1995. *In vitro* Propagation of *Nothofagus obliqua* (Fagaceae). Australian Journal Botanic. 43:601-607.
- Martinez Pastur, G.; Arena, M. y Caso, O. 1996. *In Vitro* propagación de *Nothofagus antartica* a partir de yemas de renovales y esferoblastos de árboles adultos. Jornadas Forestales. Mendoza. Argentina. 2 p.
- Martinez Pastur, G. and Arena, M. 1996. *In vitro* Propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. Et Mil. Phytion 58:1-7.
- Martinez Pastur, G.; Arena, M. and Caso, O. 1997. *In Vitro* Propagation of *Nothofagus pumilio* (OPEP. et Endl). Bosque. 18(2): 43-50
- Martinez Pastur, G. and Arena, M. 1999. Micropropagation of *Nothofagus antartica* from Shaeroblasts and Saplings. Biocell. 21(3): 231-236
- Smith, D. 1997. The Role of *In Vitro* Methods in Pine Plantation Establishment: the Lesson from New Zealand. Plant Tissue Culture and Biotechnology. June. 3(2): 63 -73.
- Talbert, G.; Ritchie, G. and Gupta, P. 1993. Conifer Vegetative Propagation: An Overview from a Commercialization Perspective. In: Ahuja, M. and Libby, W. (Editors). Clonal Forestry I. Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin. Pp: 145 -181.
- Thorpe, T.; Harry, I. and Kumar, P. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. In: Debergh, P. and Zimmerman, P. (Editors). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publisher. Pp: 311-336.
- Timmis, R. and Aboel-Nil, M. 1987. Potential genetic gain through tissue culture. In: Bonga J. and Durzan, D. (Editors). Cell and Tissue Culture in Forestry. General Principle Vol. 3. Martins Nijhoff Publishers. Boston. Pp: 198-215.

Vieiria, J.; Bressam, D.; Diniz, A.; Silva, A. and Freitas, M. 1992. Clonal Silviculture at Champion Paper e Celulosa Ltda.-Brazil. Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fase Growing Forest Tree Species. Tomo I: IUFRO Symposium Bordeaux. France. Pp: 283-291.

LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO ALTERNATIVA PARA LA REGENERACIÓN *IN VITRO* DE RAULÍ Y ROBLE.

Hermes Castellanos¹; Manuel Sánchez-Olate² y Darcy Ríos³

INTRODUCCIÓN

Del conjunto de especies del género *Nothofagus* distribuidos hacia el occidente de la Cordillera de los Andes en Chile, el raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.) y roble (*Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst.) concitan especial atención, particularmente debido a su potencial silvícola. La calidad de sus maderas, su distribución y relativa abundancia en el sur de Chile, los ha convertido en especies de alto interés económico, principalmente en la industria del aserrio (Donoso *et al.*, 1998; Grosse y Quiroz, 1998).

Hasta ahora, las vías de repoblación con estas especies se han basado en el manejo de renovales, debido a su relativa facilidad de retoñación desde el tocón y raíces y su potencial de crecimiento. Según Grosse y Quiroz (1998), dichos renovales, en la actualidad, se encuentran dominados por especies del género *Nothofagus*, pudiéndose encontrar ejemplares de entre 40 y 80 años de edad, aproximadamente. Su regeneración natural también se lleva a cabo a través de semillas, aunque debido a su característica de intolerancia a la sombra, ésta sólo es exitosa en lugares donde el suelo mineral se encuentra expuesto y en presencia de luz (Donoso *et al.*, 1998). A su vez, la repoblación artificial mediante siembra directa no se encuentra exenta de dificultades, debido a variados factores como baja viabilidad de las semillas, condiciones especiales requeridas para la germinación, producción cíclica de semillas, ataque de insectos consumidores del endospermo y embrión de la semilla, entre otros (Loewe *et al.*, 1997a; 1997b).

La micropropagación por vía organogénica, también ha sido aplicada a estas especies con diferentes resultados. Ensayos realizados especialmente con material juvenil de roble (Martínez-Pastur y Arena, 1995; Muñoz, 1999), raulí (Martínez-Pastur y Arena, 1996; Sánchez-Olate *et al.*, 2004), ñirre (Martínez-Pastur *et al.*, 1997) y lenga (Martínez-Pastur y Arena, 1997) dan cuenta de la posibilidad de regenerar *in vitro* crecimiento adventicio de nuevos brotes y raíces, aunque las tasas de proliferación caulinar y niveles de enraizamiento varían considerablemente entre especies e incluso

¹Estudiante Doctorado Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. E-mail: hcastellanos@udec.cl

²Profesor asociado Facultad Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. E-mail: msanche@udec.cl

³Profesor asociado, Facultad Ciencias Forestales, Universidad de Concepción. E-mail: drios@udec.cl

entre procedencias. No obstante, en estudios realizados con raulí, Sánchez-Olate *et al.*, (2004) lograron establecer los protocolos de micropropagación de esta especie, logrando la multiplicación y producción de microtallos viables para la fase de enraizamiento *in vitro*. También se desarrollaron los protocolos para la micropropagación de raulí en el marco del proyecto FDI “Silvicultura Clonal en Rauli para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales de la IX y X Regiones del país”, ejecutado por el Instituto Forestal y la Universidad Austral de Chile. En este caso, se trabajó con árboles plus de raulí, generando copias vegetativas para el establecimiento de ensayos clonales. Los detalles de este trabajo pueden consultarse en el capítulo 2.2 de este mismo libro (Nota del Editor).

Por otra parte, en diferentes investigaciones con otras especies de la familia *Fagaceae*, como aquellos realizados en los géneros *Quercus* (Manzanera, 1992; Fernández-Galiano *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Mauri *et al.*, 2001) y *Castanea* (Xing *et al.*, 1999; Corredoira *et al.*, 2003) se ha logrado inducir embriogénesis somática y caracterizar masas calogénicas de tipo proembriogénico, que dan lugar a la formación de diferentes estados de desarrollo de embriones vegetativos, desde estados globulares a embrioides plenamente diferenciados, los cuales, luego de completar el proceso de maduración y en ocasiones, tratamientos pregerminativos como la deshidratación o almacenamiento en frío, logran germinar e incluso ser transferidos a condiciones *in vivo* en donde crecen satisfactoriamente.

En tal sentido, las técnicas de cultivo *in vitro* mediante la embriogénesis somática proporcionan una valiosa herramienta para la multiplicación de las especies de este género, siendo el potencial para regenerar estructuras bipolares (Margara, 1988) y la alta capacidad regenerativa de este método (Pierik, 1990), dos de las principales ventajas que presenta. De esta manera, el utilizar un explanto apropiado, las características del medio de cultivo y las condiciones ambientales, son tres aspectos clave, los cuales de ser manejados en forma idónea para una especie en particular, probablemente otorguen buenos resultados en inducir esta vía de propagación en muchas especies leñosas (von Arnold *et al.*, 2002).

En este trabajo se analiza el efecto de las condiciones del medio de cultivo, principalmente en cuanto a la concentración de macronutrientes y reguladores de crecimiento en la inducción de masas proembriogénicas a partir de semillas en estados incompletos de maduración de roble y raulí, e identificar aquellas formaciones que presenten características macromorfológicas que permitan inferir su capacidad proembriogénica, expresando su potencial morfogénico para diferenciarse hacia los estados más avanzados de un embrión somático. Lo anterior permite establecer las primeras bases de este tipo de regeneración en estas especies.

METODOLOGÍA

El proceso se inicia con la cosecha de frutos de roble y raulí en estados incompletos de maduración, los primeros, cosechados en la comuna de El Carmen, Provincia del Ñuble, Octava Región y, en el caso de raulí, proporcionados por el Instituto Forestal desde el huerto semillero Huillilemu, comuna de San José de la Mariquina, Provincia de Valdivia, Décima Región de Chile. La colecta de frutos de ambas especies se llevó a cabo entre la segunda y tercera semanas del mes de enero de 2003.

Establecimiento del cultivo

Tras la limpieza de los frutos y eliminación de las brácteas protectoras de la nuez, las semillas fueron puestas en remojo en agua corriente durante 48 horas, al final de las cuales se realizó una prueba de flotación eliminando del estudio aquellas semillas vanas. El procedimiento de asepsia consistió en el lavado de las semillas en una solución de etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos, seguido de un enjuague en agua destilada estéril, para luego efectuar un lavado durante 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 50% (v/v) más 2 gotas de surfactante doméstico (Quix®). La asepsia finalizó con 3 enjuagues sucesivos en agua destilada estéril de 3, 4 y 5 minutos, respectivamente. Todo el proceso se realizó bajo agitación constante. Las semillas quedaron dispuestas para su posterior manipulación en una solución de agua destilada estéril con 100 mg/l de Cloramfenicol®.

Ayudado con una lupa estereoscópica y con material quirúrgico previamente esterilizado, se procedió a eliminar la testa de las semillas a fin de dejar al descubierto el eje embrionario completo y los cotiledones de las semillas (figura 1), sobre los cuales se indujo la formación de callo. Inmediatamente extraídas de la semilla, dichas estructuras fueron cultivadas en los diferentes tratamientos de inducción.

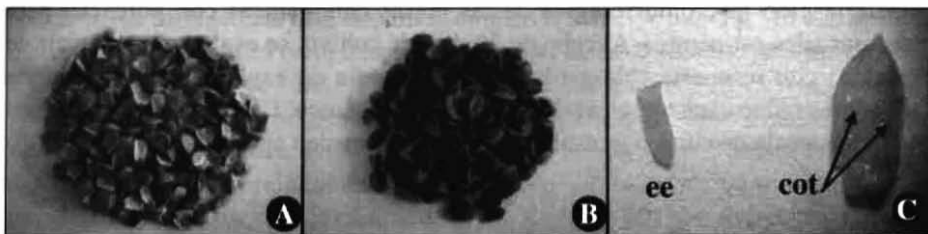


Figura 1: Germoplasma de inicio para la inducción de embriogénesis somática. (A) Semillas de roble. (B) Semillas de raulí. (C) Semilla de roble sin testa seminal, mostrando ambos tipos de explanto, eje embrionario (ee) y cotiledones (cot).

Soluciones minerales base

En los tratamientos de inducción, como base se utilizaron las soluciones minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y WPM (Lloyd y McCown, 1980). Ambas soluciones minerales fueron complementadas con 2 mg/l de tiamina, 2 mg/l de piridoxina, 10 mg/l de ácido nicotínico, 10 mg/l ácido ascórbico, 2 mg/l de pantotenato de calcio, 100 mg/l de m-inositol, 600 mg/l de prolina, 500 mg/l de caseína hidrolizada, 600 mg/l de glutamina, 80 mg/l de sulfato de adenina, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de agar. El pH en todos los casos fue ajustado en $5,8 \pm 0,01$ antes de su esterilización en autoclave a 121°C y 1 atmósfera, durante 20 minutos.

Secuencia de cultivo

Se emplearon 10 tratamientos de inducción (T1 a T10), con los que se probó diferentes tipos y concentraciones hormonales, básicamente del tipo auxinas y citoquininas. En esta etapa, con una duración de aproximadamente 10 semanas, además se evaluó el efecto de la concentración salina en el medio base inductor de callo, para lo cual la solución MS se aplicó con su dosis de macronutrientes diluida a la mitad (tratamientos T1 a T3) y completa (tratamientos T4 a T6). Además se evaluó el efecto que tiene sobre la inducción callogénica una concentración creciente de auxinas en el medio nutritivo (entre 1 y 15 mg/l de 2,4-D) manteniendo la concentración de citoquininas estable, en niveles basales. Por su parte, en los tratamientos T7 a T10, en medio base WPM, se evaluó el efecto de diferentes tipos de auxinas y citoquininas combinadas a bajas concentraciones (entre 0,2 y 2 mg/l de 2,4-D, ANA, zeatina y kinetina) sobre la inducción de embriogénesis somática indirecta, y por tanto, en el potencial para inducir la formación de callo como en las características proembriogénicas de éste. Con el fin de determinar el efecto de las distintas soluciones minerales, tipos y concentraciones hormonales en la inducción de estructuras proembriogénicas, se realizó una caracterización macromorfológica de las masas callogénicas con potencial para regenerar tales estructuras. Al cabo de 30 días de cultivo, se evaluó el porcentaje de explantos con respuesta callogénica y el porcentaje de explantos cuya respuesta callogénica reúne características de tipo proembriogénico. Un resumen esquemático con la secuencia de cultivo y resultados obtenidos pueden apreciarse en la figura 2.

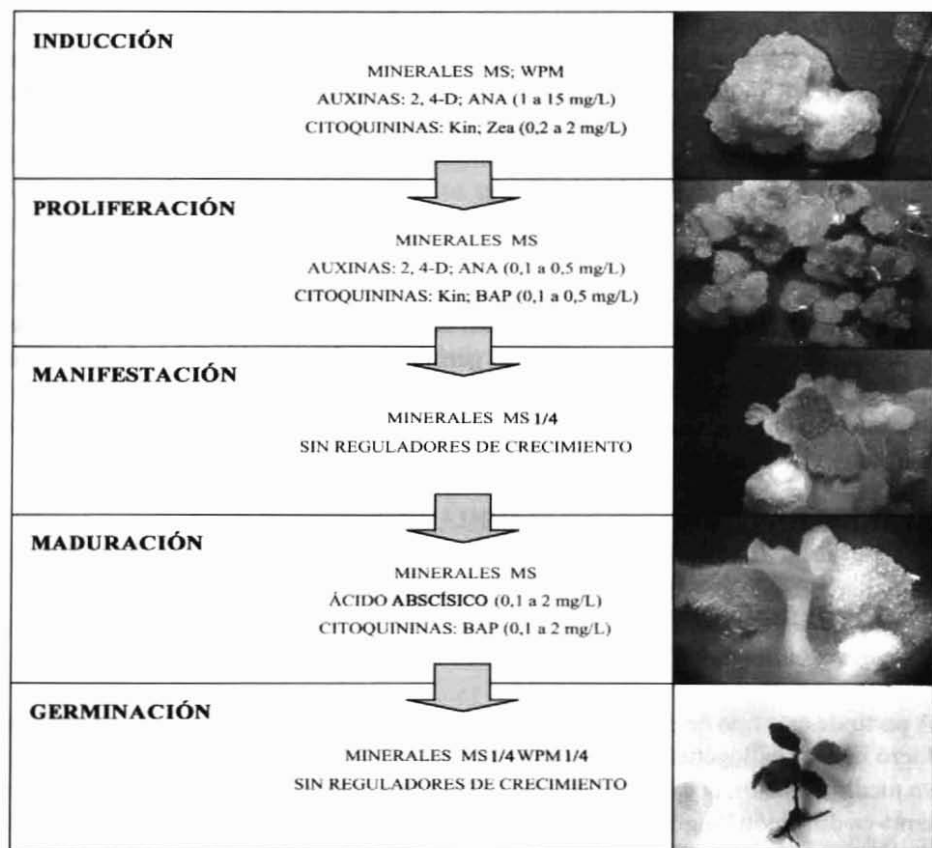


Figura 2: Secuencia de cultivo y resultados obtenidos por etapa en embriogénesis somática en raulí.

Luego de la fase de inducción, los agregados fueron transferidos a la fase de proliferación calogénica. Con este fin se empleó la solución mineral MS con dosis de macro y micronutrientes completa, más la adición de las combinaciones hormonales 2,4-D + kinetina y ANA + BAP a bajas concentraciones, las cuales variaron entre 0,1 y 0,5 mg/l. El cultivo permaneció durante 3 semanas en estas condiciones, sin subcultivo a medio fresco. Posteriormente y con el objetivo de permitir la aparición de neoestructuras embrionarias, los agregados calogénicos fueron transferidos a la fase de manifestación, para lo cual se aplicó la solución MS con sus macronutrientes diluidos a un 25% ($MS_{1/4}$), sin reguladores de crecimiento, durante 3 semanas. Con lo anterior, finaliza la primera de 2 macro-etapas de este ensayo, tras lo cual, empleando embriones somáticos en estado cotiledonar se llevó a cabo la maduración de tales estructuras en medio base MS, un contenido de sacarosa de 30 y 60 g/l y combinaciones

de ácido abscísico (ABA) y la citoquinina BAP, en niveles de entre 0,1 a 2 mg/l, permaneciendo en estas condiciones durante 2 semanas. Por último, se estimuló la germinación de los embriones maduros, tanto en la solución MS como WPM con sus macronutrientes diluidos a un 25%, sin reguladores de crecimiento.

Condiciones ambientales

El cultivo permaneció en oscuridad continua, a temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, desde el comienzo de la fase de inducción hasta los 10 primeros días de la etapa de germinación, tras lo cual, los embriones germinados fueron transferidos a la luz con un fotoperiodo de 16 horas, temperaturas de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ de día y $20 \pm 1^\circ\text{C}$ de noche y una intensidad lumínica de 3.000 lux.

RESULTADOS

Inducción desde Ejes Embrionarios Aislados de Roble

Respuesta callogénica

A partir de este tipo de explanto inicial, transcurridos 10 días de iniciado el cultivo se logró inducir callogénesis en todos los tratamientos empleados. En los primeros días en medio inductor, el eje embrionario (ee) experimentó un ligero aumento de tamaño tanto en dirección longitudinal como transversal, destacándose en general la aparición de las primeras evidencias de callo en uno de sus extremos, correspondiente a la región del epicotilo y, en segundo lugar, a partir de la región radicular, siendo el callo derivado de estas zonas reactivas el que prolifera hasta cubrir completamente el explanto inicial, lo que ocurre aproximadamente a los 20 días (figura 3).



Figura 3: (A) Inducción de callo desde ejes embrionarios de roble. (B) Proliferación celular desde extremos de embrión zigótico (flecha). (C) Agregados pro-embriónicos (flechas) al término de la etapa de inducción.

A los 30 días de cultivo, la respuesta calogénica en roble, osciló entre 72,2% y 94,4% en T4 y T6, respectivamente (cuadro 1), no existiendo diferencias significativas entre tratamientos para esta variable. No obstante, en los tratamientos T7 a T10 (medio base WPM), un promedio de 88,4% de los explantos regeneraron callo, en contraste al 82,1% observado en los tratamientos con medio base MS. Estas respuestas coinciden con otros resultados en fagáceas, en los que se establece que la composición en macrosales de cada tipo de medio de cultivo generan respuestas organogénicas distintas (Xing *et al.*, 1999; Fernández Galiano *et al.*, 2001; Manzanera, 1992). El medio MS con dilución de sus macrosales se aplicó también en un estudio realizado con variedades de *Castanea* empleando cotiledones como material inicial (Piagnani y Eccher, 1990). Los resultados obtenidos en un medio relativamente rico en sales de amonio, muestran que es esencial la presencia de este tipo de compuestos nitrogenados, como urea y purina para inducir embriogénesis somática.

CUADRO 1
PORCENTAJE DE CALLOGÉNESIS Y CALLO PRO-EMBRIOGÉNICO AL TÉRMINO DE LA FASE DE INDUCCIÓN Y POSTERIOR RESPUESTA PRO-EMBRIOGÉNICA DE ACUERDO AL MEDIO INDUCTOR, EN EJES EMBRIONARIOS DE ROBLE.

Tratamiento inducción	Solución mineral	Reguladores crecimiento	Explantos con callo (%)	(%) callo pro-embriogénico	Respuesta medio manifestación
T1	MS 1/2	2,4-D + Kin	74,6	30,2	Callo pro-embriogénico
T2	MS 1/2	2,4-D + Zea	92,8	5,6	Callo pro-embriogénico
T3	MS 1/2	2,4-D + Kin	78,8	24,6	Callo pro-embriogénico
T4	MS	2,4-D + Kin	72,2	62,4	Agregados pro-embriogénicos
T5	MS	2,4-D + Zea	79,8	4,6	Calogénesis
T6	MS	2,4-D + Kin	94,4	9,8	Callo pro-embriogénico, agregados pro-embriogénicos.
T7	WPM	2,4-D + Kin	88,2	30,4	Callo pro-embriogénico
T8	WPM	2,4-D + Zea	92,8	60,2	Callo pro-embriogénico
T9	WPM	2,4-D + Kin + ANA	88,2	60,2	Callo pro-embriogénico
T10	WPM	2,4-D + Zea + ANA	84,6	75,4	Callo pro-embriogénico.

Caracterización macromorfológica.

Con ayuda de la lupa estereoscópica es posible distinguir y caracterizar diferentes tipos de agrupaciones celulares, las que le otorgan a las masas callogénicas un carácter heterogéneo en cuanto a sus características de friabilidad, color, textura, estado de agregación y capacidad de proliferación. Basándose en estas características, a aproximadamente 40 días de cultivo ya existe la posibilidad de identificar diferentes líneas callogénicas tendientes a diferenciarse tras un proceso embriogénico, o por una vía de proliferación no definida. De esta manera, el proceso inductivo sobre embriones zigóticos muestra las siguientes líneas callogénicas:

- **Línea de proliferación no definida (LPND):** Los callos presentan una coloración que va desde el marrón hasta el amarillo pálido. Presentan por lo general una consistencia firme, poco friable, en ocasiones aparentemente húmedos en su superficie. Pese a presentar irregularidades como algunas formaciones nodulares, son formaciones bastante compactas y homogéneas que no dejan lugar a la formación de clusters o agregados celulares. Las zonas más oscuras presentan poca capacidad de proliferación, la cual es más elevada en aquellas zonas de callo más claro.
- **Línea proembriogénica (LPE):** Este tipo de callo presenta coloraciones que abarcan desde marrón claro al amarillo y blanquecino pálido, con muy poca proliferación de células cristalinas alargadas. En apariencia tienen una consistencia firme, pero al manipularlos por lo general se disgregan en múltiples estructuras nodulares. Presentan un estado de agregación bastante irregular, sobre todo a partir de la cuarta semana de cultivo, apareciendo agregados o clusters en su estructura. Tienen una alta capacidad de proliferación, regenerando agregados celulares de las mismas características; sin embargo, la aparición de organizaciones celulares aparentemente independientes del resto del callo, no evoluciona hacia un estado embriogénico temprano.

Inducción de callo Proembriogénico.

Como fue descrito en la caracterización macromorfológica, la inducción de callo a partir de ejes embrionarios derivó hacia una línea proembriogénica, obteniéndose dicha condición en un 56,6% de los explantos en medio WPM, a los 30 días de cultivo. Sin embargo, lo más evidente con respecto a esta variable en este tipo de material de

inicio, es que la inducción de este tipo de callo es mayor a bajas dosis de auxinas y citoquininas, presentándose los mayores porcentajes de callo proembriogénico en los tratamientos T4, T8, T9 y T10 (62,4; 60,2; 60,2 y 75,4%, respectivamente), entre los cuales la más alta concentración auxínica corresponde a 2 mg/l de 2,4-D.

A diferencia de la inducción desde cotiledones aislados, la inducción desde eje embrionario, presenta la pérdida de las características pro-embriogénicas conforme aumenta el período de cultivo, de esta manera, ciertos agregados celulares derivaron hacia una condición de proliferación no definida. Pese a la alta proliferación de callo de apariencia proembriogénica, desde las estructuras nodulares y agregados celulares no se evidencia la aparición de estados embriogénicos tempranos, tal vez debido al estado de maduración de los ejes embrionarios lo que puede indicar una baja capacidad de dediferenciación y morfogénesis de este material. Bajas dosis auxínicas, en ocasiones, combinadas con niveles menores de citoquininas se han empleado con éxito en la inducción de embriogénesis somática en otras especies de la familia Fagaceae (Piagnani y Eccher, 1990; Pinto *et al.*, 1992; Mauri *et al.*, 2001).

La falta de evolución de las líneas proembriogénicas a estados más avanzados en la génesis de embriones somáticos puede deberse a la falta de una secuencia de cultivo y balance hormonal adecuados, así como también a un estado de juvenilidad insuficiente del explanto inicial, lo cual fue declarado por Fernández Galiano *et al.* (1997) como el factor más determinante en la inducción de embriogénesis somática por sobre el medio de inducción, en un ensayo efectuado a partir de embriones zigóticos de *Quercus faginea* en diferentes estados de maduración.

Inducción desde tejido cotiledonar de raulí.

La inducción de callo proembriogénico desde cotiledones presentó patrones de respuesta diferentes a los resultados obtenidos con ejes embrionarios, mostrándose mucho más reactivos a la formación de callo proembriogénico pese a existir en este caso la dificultad inicial de una alta incidencia de contaminación, principalmente bacteriana, aparentemente de tipo endógena, lo que provocó la pérdida de gran parte de este material. Debido a la aplicación que pueda tener la inducción de embriones somáticos (ES) desde semillas, al tratarse de especies nativas, el problema anteriormente mencionado hace necesario la búsqueda de nuevos protocolos de asepsia, idóneos para estos tipos de explanto. Con estos tejidos se obtuvo las dos líneas callogénicas descritas para ejes embrionarios (LPND y LPE); sin embargo, en este caso es posible describir macromorfológicamente una tercera línea de proliferación

celular, la cual luego de aproximadamente 16 semanas de cultivo dio origen a embriones somáticos en estados globulares, los que derivaron a las fases torpedo y cotiledonar.

- **Línea embriogénica (LE):** Este tipo de callo, presente sólo a partir de cotiledones, presenta coloraciones desde amarillo pálido a blanco y una gran proliferación de un tipo celular filamentososo y cristalino que en ocasiones cubre toda la masa callogénica.

Su aspecto es friable, disgregándose en pequeños fragmentos al manipularse, aunque no con tanta facilidad como la LPE. Su capacidad de proliferación es alta, aunque menor que la LPE. Es evidente la formación de agregados o clusters con mucha presencia de célula cristalina, siendo en estas zonas del callo donde es posible identificar embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo (figura 4).

Pese a la alta capacidad de regeneración embriogénica, ésta se presenta de manera asincrónica, pudiendo encontrarse simultáneamente diferentes estados de desarrollo, así como embriones somáticos con malformaciones cotiledonares y germinación precoz, de manera similar a lo encontrado en *Quercus suber* y *Quercus robur* (Manzanera, 1992; Pinto *et al.*, 1992). De igual modo, transcurridos aproximadamente sesenta días de cultivo, es posible apreciar embriogénesis somática directa sobre la superficie cotiledonar, bajo la forma de estructuras globulares que aparecen espontáneamente sin un estado de callo intermedio.



Figura 4: (A) Callo embriogénico, inducido desde cotiledones de rauli. (B) Porción cotiledonar (flecha) de embrión somático de rauli, emergiendo desde agregados pro-embriogénicos. (C) Múltiples zonas de proliferación embriogénica (flechas) luego de 2 semanas en medio de manifestación.

En el caso de embriogénesis somática directa (ES directa), tras la separación de tales estructuras desde el tejido madre en un estado globular, no se obtienen estados más avanzados bajo las condiciones ensayadas. Esta dificultad se supera manteniendo las estructuras embrionarias conectadas al tejido nodriza hasta un estado de torpedo

avanzado o cotiledonar. La capacidad proliferativa de los agregados es similar a lo observado en ejes embrionarios de roble, obteniéndose el mayor porcentaje de callogénesis (92,6%) en el tratamiento 10, en medio base WPM, aplicando en forma combinada las auxinas exógenas 2,4-D y ANA. A su vez, los porcentajes de callo proembriogénico obtenido, en ningún caso superan al mejor tratamiento desde ejes embrionarios, obteniéndose un máximo de un 58% de explantos que regeneraron agregados de estas características en el mismo tratamiento número 10. Sin embargo, la consideración de estas variables por sí solas puede resultar engañosa, puesto que la magnitud de éstas no necesariamente se relaciona al potencial embriogénico del material, como queda demostrado en el tratamiento 6, con elevados niveles de 2,4-D, en el que luego de transferir a medio base sin reguladores de crecimiento se obtuvo embriones somáticos. Las diferentes respuestas obtenidas tras el periodo de inducción, proliferación y manifestación, en lo que resultaron ser las mejores combinaciones hormonales y soluciones minerales empleadas en el estímulo inductivo para cotiledones aislados de semillas de raulí, son resumidas en el cuadro 2.

CUADRO 2

PORCENTAJE DE CALLOGÉNESIS Y CALLO PRO-EMBRIOGÉNICO AL TÉRMINO DE LA FASE DE INDUCCIÓN Y POSTERIOR RESPUESTA PRO-EMBRIOGÉNICA DE ACUERDO AL MEDIO INDUCTOR, EN EJES EMBRIONARIOS DE ROBLE.

Tratamiento inducción	Solución mineral	Reguladores crecimiento	Explantos con callo (%)	(%) callo pro-embriogénico	Respuesta medio manifestación
T1	MS 1/2	2,4-D + Kin	68,4	26,0	Callo pro-embriogénico, estructuras globulares
T6	MS	2,4-D + Kin	89,2	18,8	Estructuras globulares, torpedo, embriones somáticos cotiledonares
T7	WPM	2,4-D + Kin	87,2	37,2	Estructuras globulares, torpedo, embriones somáticos cotiledonares
T10	WPM	2,4-D + Zea + ANA	92,6	58,0	Estructuras globulares, Embriogénesis somática directa

El callo embriogénico fue proliferado en forma satisfactoria, tanto con la combinación hormonal 2,4-D + kinetina, como con ANA + BAP, en los que concentraciones de entre 0,1 y 0,5 mg/l permiten propagar regularmente tejido con un alto potencial embriogénico. La ausencia de reguladores de crecimiento promueve la expresión de todo este potencial, siendo necesaria una fase del cultivo en estas condiciones para lograr la conversión hacia un embrión somático. A su vez, los embriones en estado

cotiledonar fueron madurados bajo una combinación mineral y hormonal, mediante la cual tras la aplicación de ABA se logra controlar la embriogénesis somática recurrente (ES recurrente) que dificulta la conversión a planta; por su parte, mediante las concentraciones ensayadas (0,1 a 2 mg/l) y período de aplicación de BAP (2 semanas) no se observó algún efecto marcado en las tasas de germinación y control de la ES recurrente.

En medio base sin reguladores de crecimiento se obtiene la generación masiva de embriones somáticos, generalmente proliferando desde las regiones del hipocotilo y cotiledonar de los embriones somáticos primarios, siendo posible emplear este tejido como nuevo explanto para la generación de diversas líneas embriogénicas (figuras 5A y 5B). Estas condiciones, en las cuales la aparición de embriogénesis somática se genera principalmente en forma directa desde la epidermis del tejido nodriza, se muestran muy propicias para implementar el uso de cultivo líquido o bio-reactores, para homogenizar los calibres embrionarios, automatizando la producción a gran escala. La germinación de los embriones somáticos corrientemente ocurre en forma espontánea al transferir a condiciones apropiadas, es decir, disminuyendo la concentración salina del medio, sin hormonas exógenas (figuras 5C y 5D), lo cual se ha conseguido bajo las mismas condiciones de cultivo para germinar embriones zigóticos de esta especie (Muñoz, 1999), sin embargo, al igual como ocurre en castaño (Xing *et al.*, 1999), las tasas de conversión a microplántula han sido relativamente bajas, del orden de un 8%, principalmente debido a dificultades en la expresión radicular y/o caulinar, a la aparición de embriogénesis somática secundaria y diversas malformaciones como hipocotilos y cotiledones fusionados.

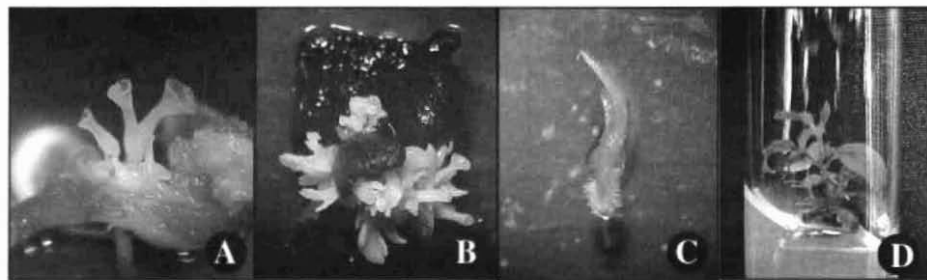


Figura 5: (A) Embriogénesis somática secundaria en raulí. (B) Macizo con alta proliferación de diversos estadios embriogénicos. (C) Germinación *in vitro* de embrión somático de raulí. (D) Microplántula de raulí generada mediante embriogénesis somática, creciendo *in vitro*.

Como puede apreciarse en la figura anterior (5A), los embriones somáticos secundarios, desde el estado globular, se unen al tejido materno por medio de una estructura análoga al suspensor, observado en gimnospermas (von Arnold et al., 2002), lo que permite una manipulación relativamente fácil para su aislamiento, con ayuda de instrumental óptico, ya sea con fines de promover su germinación o estimular la aparición de nuevas estructuras embriogénicas. No obstante los altos niveles de proliferación embriogénica, los cuales se han mantenido por aproximadamente un año sin pérdida aparente del potencial morfogénico, se hace necesario profundizar los conocimientos acerca de la segunda macro-etapa del protocolo, la cual contempla la maduración de los embriones somáticos, su germinación y conversión a planta. Sin duda alguna, resulta interesante estudiar en futuros ensayos el efecto del potencial osmótico y fuente de carbono en la maduración, así como pretratamientos en frío de los embriones, además de todo el proceso de aclimatación y transferencia a condiciones *ex vitro*. Sin embargo, de acuerdo a los antecedentes aquí expuestos, la embriogénesis somática es una realidad como alternativa de propagación tanto en raulí como potencialmente en el resto de los *Nothofagus*, en que el afinamiento de los protocolos desde material juvenil servirán como base para la propagación en masa de tejido adulto seleccionado mediante esta vía.

CONCLUSIONES

Pese a efectuar idénticos tratamientos de inducción para dos tipos de explanto, resguardando a la vez las mismas condiciones ambientales, la obtención de embriones somáticos sólo se logró utilizando cotiledones aislados del eje embrionario, lo que expresa una mayor capacidad embriogénica de este tipo de tejido, bajo las condiciones ensayadas. Dicho fenómeno se presentó tanto a altas dosis auxínicas como a cantidades relativamente bajas de este componente, en este último caso, con una estrecha relación auxina/citoquinina. La transferencia a condiciones sin reguladores de crecimiento es clave para permitir la expresión del potencial embriogénico. El tipo de explanto inicial, su estado fisiológico, estado de maduración de las estructuras embrionarias y el aspecto clonal (genotipo del organismo donante), se han convertido, en este caso, en factores que influenciaron el éxito en la inducción de embriogénesis somática.

Tras la aplicación de tratamientos inductivos que resultaron exitosos en la generación de embriones somáticos, la no aplicación de una etapa de maduración o tratamientos pre-germinativos resulta en la profusión de una muy elevada cantidad de embriones somáticos mediante embriogénesis secundaria, lo cual, aunque dificulta la conversión a planta, permite la regeneración en masa de líneas embriogénicas. Fue posible obtener microplántulas normales luego de un proceso de maduración tras la aplicación de ABA, las cuales crecen satisfactoriamente *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Corredoira, E.; Ballester, A. and Vieitez, A. 2003. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Annals of Botany*. 92: 1-8.
- Donoso, P.; González, M.; Escobar, B.; Basso, I. y Otero, L. 1998. Viverización y plantación de Raulí, Roble y Coigüe en Chile. En: Donoso, C. y Lara, A. (Editores) *Silvicultura de los Bosques Nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Fernández-Galiano, E.; Mauri, P. and García, G. 1997. Somatic embryogenesis induction on *Quercus faginea* LAMK. *Acta Horticulturae*. 447:143-145.
- Grosse, H. y Quiroz, I. 1998. Silvicultura de los bosques de segundo crecimiento de Roble, Raulí y Coigüe en la región centro sur de Chile. En: Donoso, C. y Lara, A. (Editores) *Silvicultura de los Bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago. Chile.
- Jordán, M.; Velozo, J. and Sabja, A. M. 1996. Organogenesis in vitro of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst., *Fagaceae*. *Plant Cell Reports*. 15(10): 795-798.
- Kim, Y.; Youn, Y.; Noh, E. and Kim, J. 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Reports*. 16: 869-873.
- Löewe, V.; Toral, M.; Mery, M.; Camelio, M.; López, C y Urquieta, E. 1997(a). Monografía de Roble. *Nothofagus obliqua*. CONAF, INFOR, FIA. Santiago. Chile.
- Löewe, V.; Toral, M.; Freitte, G.; Camelio, M.; Mery, M.; López, C. y Urquieta, E. 1997(b). Monografía de Raulí. *Nothofagus alpina*. CONAF, INFOR, FIA. Santiago. Chile.
- Lloyd, G. and McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Int. Plant. Prop. Soc. Proc.* 30, 421.
- Manzanera, J. A. 1992. Inducción de embriogénesis somática en Roble (*Quercus robur* L.). *Investigación Agraria, Sistema Recursos forestales*. 1(1):73-81.

- Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Martinez-Pastur, G. and Arena, M. 1995. In vitro propagation of *Nothofagus obliqua* (Fagaceae). Austral Journal Botany. 43:601-607.
- Martinez-Pastur, G. and Arena, M. 1996. In vitro propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Phytion. 58(1/2):1-7.
- Martinez-Pastur, G.; Arena, M. and Caso, O. H. 1997. In vitro propagation of *Nothofagus antarctica* from sphaeroblasts and saplings. Biocell. 21(3):231-236.
- Martinez-Pastur, G. and Arena, M. 1997. Micropropagation of *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Bosque. 18(2):43-50.
- Mauri, P.; Manzanera, J. and Marcote, M. 2001. Cyclic somatic embryogenesis and scheme for multiplication of *Quercus ilex* L. Acta Horticulturae. 560:517-520.
- Muñoz, C. 1999. Alternativas biotecnológicas para la propagación de fagáceas chilenas. El caso del Roble. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Facultad Ciencias Forestales. Concepción. Chile.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum. 15:473-479.
- Piagnani, C. and Eccher, T. 1990. Somatic embryogenesis in chesnut. Acta Horticulturae. 280:159-161.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Pinto, G.; Amaral, R.; Santos, C. y Carnide, O. 1992. Somatic embryogenesis in calli of leaves from three year old *Quercus suber* L. plants. University of Aveiro. Portugal. [http://www.mnd.fh-wiesbaden.de/fag/bio/bolcost_843/html/Santos_\(Carcavelos\).pdf](http://www.mnd.fh-wiesbaden.de/fag/bio/bolcost_843/html/Santos_(Carcavelos).pdf)
- Sánchez-Olate, M.; Ríos, D.; Pedraza, M.; Pereira, G.; Castellanos, H. y Escobar, R. 2004. Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. Bosque 25(1):123-128.

von Arnold, S.; Sabala, I.; Bozhkov, P.; Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ culture*. 69: 233-249.

Xing, Z.; Powell, W. and Maynard, Ch. 1999. Development and germination of American chesnut somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ culture*. 57:47-55.

SELECCIÓN DE SITIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ENSAYOS CLONALES DE RAULÍ (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst.)

Juan E. Schlatter¹ y Hans Steuer²

INTRODUCCIÓN

La especie *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst ha sido fuertemente cosechada en el país, por constituir un árbol de madera muy valiosa. Por este motivo fue floreada, es decir, se cortaron los mejores individuos de cada bosque intervenido. Es así que después de 1980 quedaron muy pocos ejemplares de buena calidad fenotípica. En consideración de esta situación, se inició en 1996 el proyecto FONDEF D9611052 para dar curso a un programa de mejoramiento genético para especies de *Nothofagus* de interés económico, desarrollado por el Instituto Forestal (INFOR) en conjunto con la Universidad Austral de Chile (UACH) y la Corporación Nacional Forestal (CONAF). A este lo siguió un proyecto FDI sobre técnicas silviculturales y genéticas para 4 especies nativas de interés comercial, desarrollado por INFOR, y por una iniciativa de CONAF se instaló el huerto semillero Huillilemu para especies nativas, al cuál le siguió posteriormente un huerto semillero cerca de Neltume, con el apoyo de la empresa Forestal Neltume Carranco S.A. En estos proyectos fueron seleccionados algunos árboles remanentes de raulí, de alta calidad fenotípica, para llevar adelante un plan de mejoramiento genético. De ellos se obtuvo tejido vivo, con el fin de implementar los huertos clonales de individuos de alta calidad, para resguardar las reservas genéticas aún accesibles. De estos huertos es posible obtener semillas y además tejido para proceder a la multiplicación vegetativa, y por este intermedio lograr un gran número de plantas de raulí de alta calidad genética.

El esfuerzo de producir plantas, en calidad de clones, de esos árboles seleccionados, ha sido enorme. Pero, antes de iniciar plantaciones masivas, se consideró fundamental que las plantas producidas por cultivo de tejidos sean ensayadas en las condiciones más representativas para la especie, en sitios en que ella originalmente ha demostrado éxito. Esta problemática ha sido abordada por el proyecto FDI - CORFO 00C7FT-12 "Silvicultura Clonal en Raulí para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales en la IX y X Regiones del País", del cuál este trabajo forma parte.

¹ Universidad Austral de Chile. E-mail: jschlatt@uach.cl

² CEFOR. E-mail: hsteuer@cefor.cl

La selección de los sitios para el establecimiento de ensayos genéticos es un hito muy relevante para la calidad de los resultados a obtener en plantaciones. La razón radica en que la expresión del fenotipo del árbol es una función de su constitución genética y la variación ambiental en la cual crece y se desarrolla. Por lo tanto, mientras menos variable sea el sitio, la expresión fenotípica tiende a reflejar mejor la expresión genética.

El objetivo del presente trabajo es explicar la metodología que se aplicó en la elección de sitios donde establecer ensayos con rauli seleccionado, con su caracterización, para evaluar la reacción que tendrá la especie al ser establecida en entornos diferentes y para identificar una posible interacción entre sitio y genotipo.

MATERIAL Y MÉTODO

ASPECTOS CONCEPTUALES

El sitio es el espacio físico que ocupa un bosque, constituyendo un lugar geográfico con una condición medioambiental propia. El sitio forestal es definido por Schlatter *et al.* (2003) como la combinación de factores del clima y del suelo en un área determinada de la superficie terrestre, con condiciones homogéneas para el desarrollo vegetal. Un sitio se diferencia del vecino por cambios significativos en el crecimiento de los árboles o en la composición vegetal, como respuesta a un cambio en las condiciones medioambientales. El desarrollo logrado por una especie forestal o un bosque, expresado en términos de producción de biomasa, volumen de madera o altura superior de los árboles, es lo que se conoce como calidad o productividad de sitio. Diferentes combinaciones de factores ambientales pueden, en consecuencia, ser causa de resultados distintos en el crecimiento de una especie forestal.

Los factores medioambientales tienen distinta ponderación en su efecto sobre el desarrollo vegetal. El clima es el principal factor porque él define la existencia de especies vegetales en cierta región geográfica e influye en su vigor. El suelo, en cambio, es más importante en la productividad y sólo en casos extremos decide la presencia o ausencia de una especie vegetal. Por este motivo los sistemas de clasificación de sitios se fundamentan en las variables climáticas para los primeros niveles de clasificación y luego en las variables de suelo (Schlatter y Gerding, 1995).

PROCEDIMIENTO

La selección de terrenos para ensayos clonales de rauli, utilizó un sistema de clasificación de sitios desarrollado para Chile por Schlatter *et al.* (1995) para la X región, y por Schlatter *et al.* (1994) para la VII, VIII y IX regiones del país. El sistema se basa en experiencias europeas y fue adecuado a las condiciones del país por Moll y Schlatter (1979), y posteriormente mejorado por Schlatter y Gerding (1995) y Schlatter (1998).

Chile se divide en seis macroregiones diferenciadas en sentido latitudinal (Schlatter e Hidalgo, 1982) (Figura 1). Para el presente proyecto se consideró las macroregiones Centro (3) formada por las regiones VII, VIII y IX, y Sur (4), formada por la X Región, las que cubren la distribución geográfica del rauli.

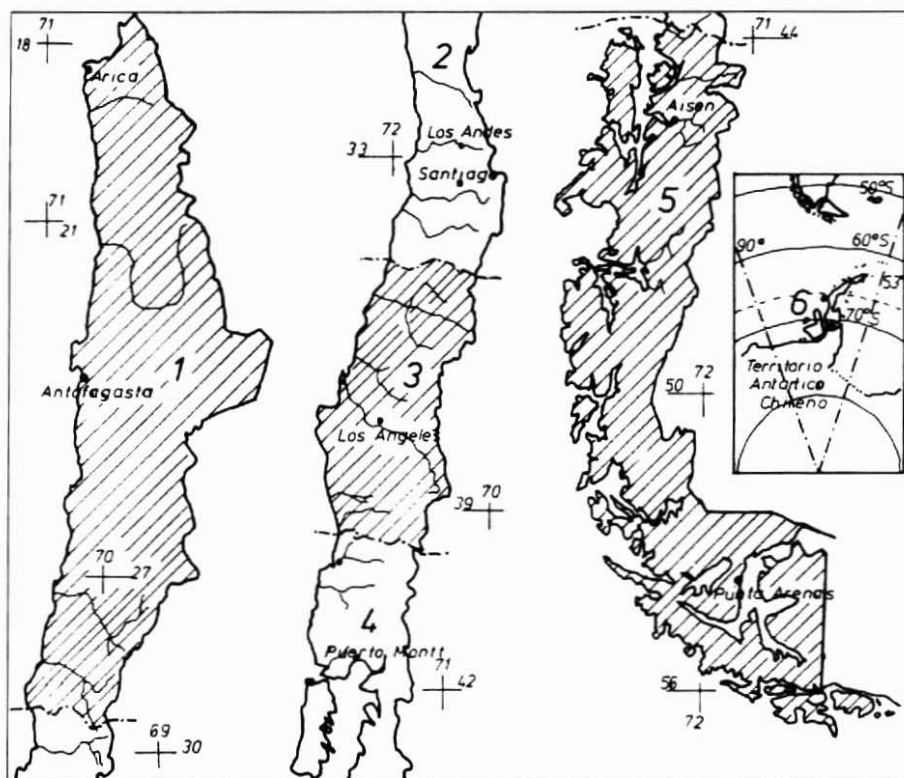


Figura 1: Regiones macroclimáticas en Chile.

Cada una de estas macroregiones se subdivide en unidades geográficas menores:

- *Zona de crecimiento*: Subdivisión de una región macroclimática; Se define por la variación longitudinal del clima, causada por cambios geomorfológicos mayores (cordilleras). Es aplicable para explicar el cambio de especies y las diferencias de productividad. Estas subregiones se caracterizan en función de las variables climáticas: precipitación anual, humedad relativa del aire (estival), número de heladas y período libre de heladas.
- *Distrito de crecimiento*: Subdivisión de la anterior; Se define por el clima en su variación latitudinal (aproximadamente cada 30 minutos de grado). Permite precisar la elección de especies forestales y determinar diferencias de productividad en la zona de crecimiento, también sirve de base para diseñar ensayos a escala mediana (Ej.: 1:250.000). Está compuesta por varias áreas de crecimiento. Las variables climáticas que considera, además de las anteriores son: temperatura promedio anual y la longitud del período seco.
- *Área de crecimiento*: Subdivisión de la anterior, representada por unidades geomorfológicas mayores, distinguiéndose por niveles altitudinales (cada 400m existe un cambio climático significativo) y por diferencia en el material de origen y/o morfología de los suelos. Asocian grupos de sitios afines para la planificación forestal.

La distribución natural de *Nothofagus alpina* se utilizó como base para la búsqueda de sitios representativos, recurriendo para ello a material cartográfico del Laboratorio para Sistemas de Información Geográfica del Instituto de Silvicultura de la UACH, que posee las últimas actualizaciones del catastro de bosque nativo. Por lo tanto, se obtuvo el material cartográfico base: la distribución natural de los tipos forestales Roble-Raulí-Coigüe y Coigüe-Raulí-Tepa, a escala 1:250.000, para las provincias de Malleco, Cautín y Valdivia. Además, se utilizó la información del sistema de clasificación de sitios indicado anteriormente (SOT, Schlatter y Gerding, 1995), también a escala 1:250.000. Luego, para poder definir las zonas y distritos de crecimiento a los cuales están suscritas las áreas elegidas como representativas de *Nothofagus alpina*, se traslaparon ambas coberturas.

La clasificación de sitios citada no distingue áreas de crecimiento en la zona de crecimiento de alta cordillera (zona 4), donde en general se concentra la mayor proporción de *Nothofagus alpina*. Es por ello que la caracterización de las áreas de

crecimiento en esta zona se efectuó de manera individual. Para este fin se emplearon antecedentes como el de los suelos volcánicos de Chile (INIA, 1985), cartas IGM con curvas de nivel y la descripción climática de Santibáñez y Uribe (1993). Información como las series de suelo y las altitudes también fueron traslapadas y ajustadas a la base cartográfica ya antes descrita (figuras 2, 3 y 4).

El proyecto en que se enmarca este trabajo contemplaba la selección de 6 sitios dentro de las regiones IX y X, abarcando y representando las dos regiones macroclimáticas (Centro y Sur) donde se distribuye principalmente *Nothofagus alpina*, inserto en los tipos forestales Roble-Raulí-Coigüe y Coigüe-Raulí-Tepa.

Las áreas con raulí de la Cordillera de la Costa no fueron consideradas en la selección de sitios debido a que:

- La principal población de raulí se encuentra en la Cordillera de los Andes.
- Raulí se encuentra disgregado en la Cordillera de la Costa y ocupa allí sitios de menor interés productivo para la especie.

El restringido número de sitios para el proyecto obligó ponderar en primer lugar las variaciones climáticas latitudinales dentro de las regiones del área natural de raulí, desde Malleco al sur, manteniendo una equidistancia entre ellos. En segundo lugar se consideró la variable altitud: 500 – 800msnm (9 – 10°C) y 800 – 1000msnm (8 – 9°C, temperatura media anual).

La IX Región del país se caracteriza climáticamente por una abundante pluviometría y un periodo seco estival de 3 a 5 meses. Estas condiciones determinan en forma significativa las características de la composición florística y el nivel de productividad del bosque.

Por otra parte, la X Región se distingue climáticamente por presentar una alta pluviometría, que favorece la formación de bosques de alta producción. Esporádicamente puede presentar un periodo seco de 1-2 meses, el cual sin embargo no afecta a la vegetación boscosa. Más grave resulta el efecto del exceso de precipitaciones invernales, que satura suelos delgados en terrenos planos y deprimidos. Hacia el sur, las bajas temperaturas constituyen una limitante creciente para el desarrollo de los árboles.

Los sitios seleccionados para establecer los ensayos clonales de raulí considerados en el proyecto, se ubican en las provincias de Malleco, Cautín y Valdivia (figuras 2, 3 y 4, respectivamente).

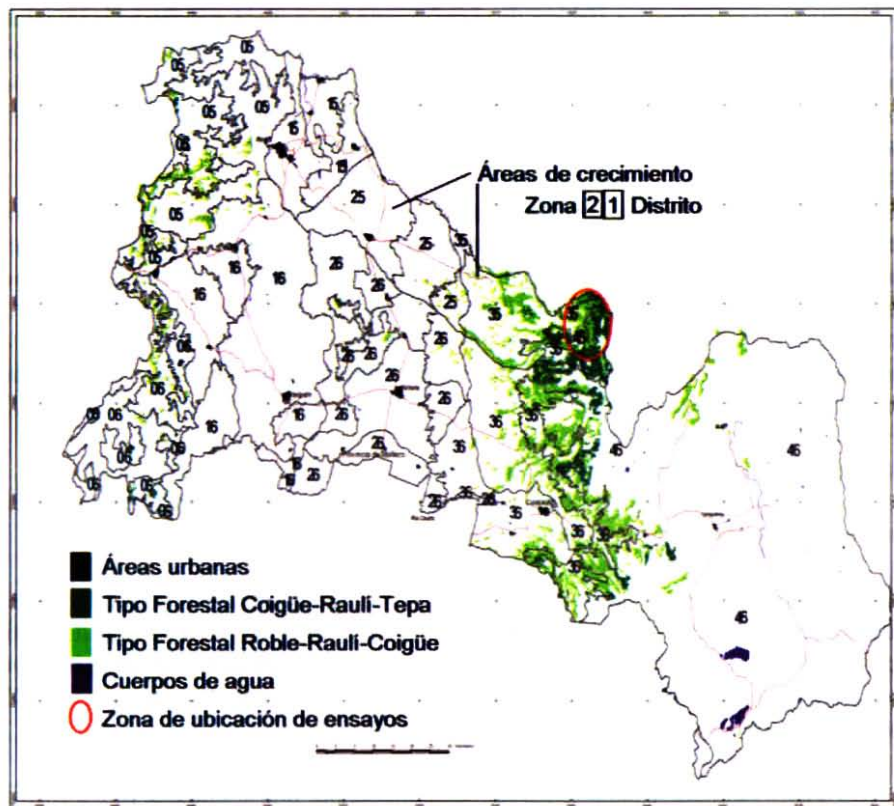


Figura 2: Ubicación de ensayos en la Provincia de Malleco

La figura anterior y las siguientes muestran el resultado de sobreponer las cartas de la clasificación de sitios y la distribución de los tipos forestales con raulí. Sobre estas cartas base se indica el lugar en que se seleccionaron los sitios para los ensayos.

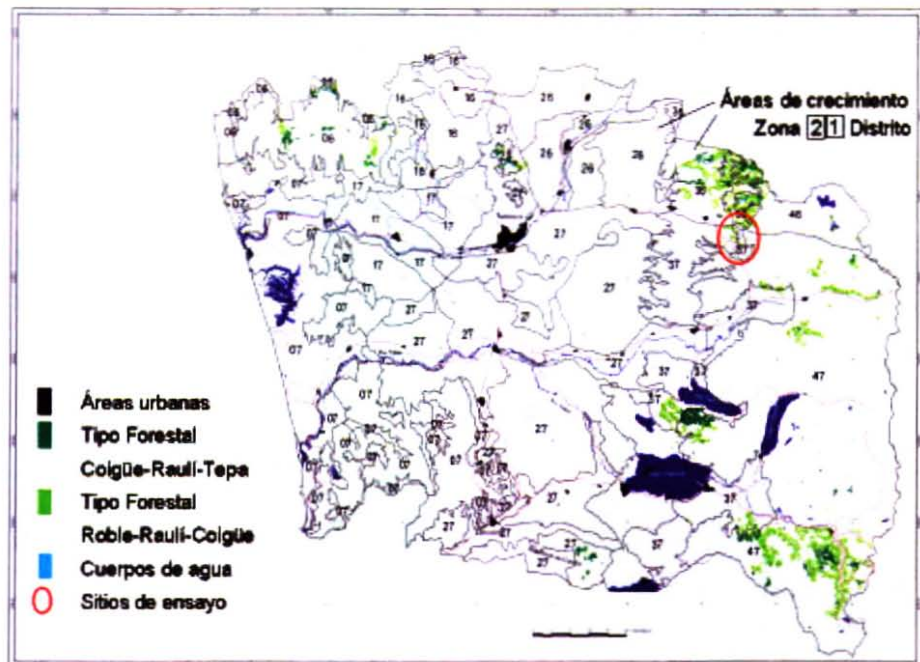


Figura 3: Ubicación de ensayos en la Provincia de Cautín

En la provincia de Malleco se seleccionaron 2 sitios sobre suelos de la serie Santa Bárbara, en exposiciones Sur, a 700m y 900m de elevación y con una precipitación entre 2.500 y 3.000mm anuales. En la provincia de Cautín los sitios se seleccionaron sobre la serie Huerere, en exposiciones Sur y Oeste, en altitudes de 500 y 800m y con una precipitación aproximada de 3.000mm anuales. En la provincia de Valdivia se seleccionó un sitio sobre suelos de transición entre la serie Liquiñe y la serie Ralún, a 870msnm., en una exposición Oeste; un segundo sitio se seleccionó sobre la serie Ralún, a 700msnm., con exposición Noroeste. Ambos sitios de la provincia de Valdivia presentan una precipitación superior a los 4.000 mm anuales.

De norte a sur se privilegió sitios más cálidos a medida que el clima es más frío, en consideración a la preferencia de la propia especie. En todos los sitios los ensayos se previeron en bosques degradados, con una cobertura de 20 – 50 % (árboles adultos en estado de vejez), de acuerdo a la preferencia propia de la especie, de regenerar bajo

cobertura de protección. En estos bosques se procedió a controlar el sotobosque, generalmente de coligüe y/o de regeneración y rebrote de especies nativas, muchas de ellas dañadas por ramoneo animal.

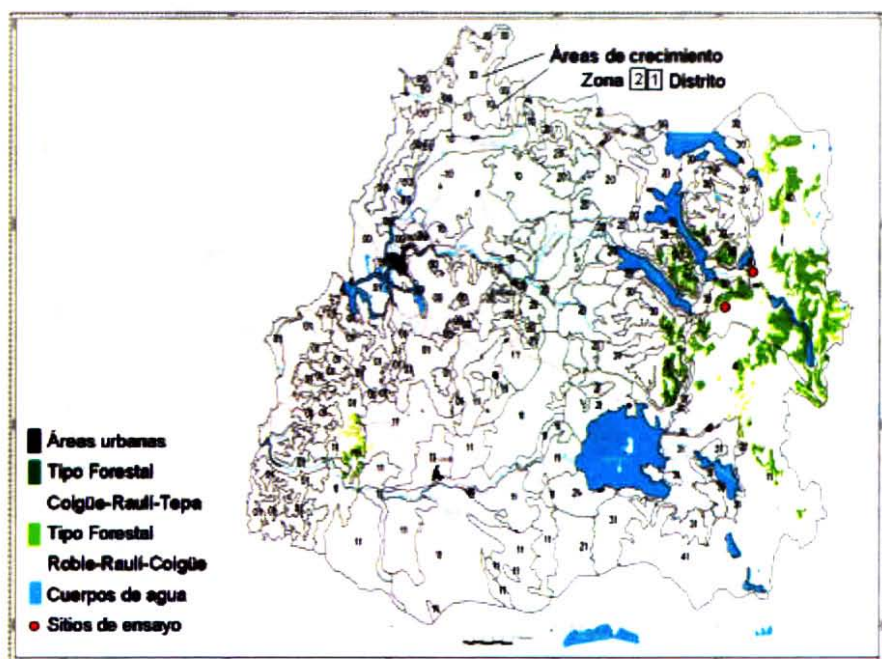


Figura 4: Ubicación de ensayos en la provincia de Valdivia

CARACTERÍSTICAS DE LOS SITIOS PARA LOS ENSAYOS

SITIOS SELECCIONADOS EN PROV. DE MALLECO: RESERVA FORESTAL MALLECO, SECTOR NIBLINTO

Sitio bajo (Reserva Malleco, sector Niblinto. Prov. Malleco)

Ladera baja en una colina, con exposición Sur-Oeste, a 745msnm, con 45% de pendiente, recta a cóncava, pero con contorno convexo a recto. El sitio presenta drenaje rápido y un estrato arbóreo dominante de raulí, tinoe y coigüe, y codominante de