0000459

GOBIERNO DE CHILE

INFOR
Instituto Forestal

Silvicultura y Producción

SAUCE-MIMBRE

Salix spp.

Publicación realizada
en el marco del Proyecto
Desarrollo Integral del
Cultivo y la Industrialización
del sauce mimbre ejecutado
por INFOR e INTEC-Chile
con financiamiento de
FDI-Corfo / FONDEF







Huérfanos 554
Casilla 3805
FonoFax (56-2) 693 0700
e-mail: info@infor.cl
www.infor.cl
Santiago

27 NOV. 2002

INSTITUTO FORESTAL
BIBLIOTECA
Santiago-Chile

№6765



Foto portada: Plantación de *Salix*

Silvicultura y Producción
SAUCE-MIMBRE *Salix* spp.

Proyecto FONDEF/FDI/INFOR/CORFO
«Desarrollo Integral del Cultivo y la Industrialización del Sauce - mimbre»

EDITOR: Marta Abalos R.

Mayo, 2002
Santiago - CHILE

Textos
Gina Vaccarezza V.
Dibujos y fotos
Emilio Benavides
Diseño
Patrica Artigas A.
M. Antonia Díaz E.
1ª Edición
Santiago de Chile, Marzo 2001
Registro de propiedad intelectual : 118.409
ISBN : 956-7727-64-3

Nuestros sinceros agradecimientos a todas las personas e instituciones que participaron en el proyecto y que sin su aporte no habría sido posible lograr esta tarea.

PARTICIPANTES
Instituciones
INTEC-Chile
INN
Universidad del Bío-Bío
Universidad de Chile
Universidad de Concepción
PROCHILE
Comisión Nacional del Alamo
CONAF
INIA-Carillanca
DUOC
INACAP
I.Municipalidad de Vicuña
CET
Empresas
Afodegama
Agromim S.A.
Ambientes «A»
Artesanías Omar Mena
Agricola y Forestal El Alamo
Catas- Chile
Constructora e Inmobiliaria Génesis
Chimbandes
Enrique Matthei Jensen
El Rey
Julia Pereira Zepeda
Mimbres Chile Ltda.
Multimetal
Sherwin-Williams
Smartwood
Suc. Etelvino Villanueva

Instituto Forestal INFOR
Santiago
Huérfanos 554
Casilla 3085
Fono: 69 30 700
Fax: 69 30 890
Email: info@infor.cl
Concepción
Camino a Coronel Km. 7.5
Casilla 109 C
Fono: 41 - 370 027
Fax: 41 - 370 031
Email: info@infor.cl
Valdivia
Fundo Teja Norte
Casilla 385
Fono: 63 - 211 476
Fax: 63 - 218 968
Coyhaique
Baquedano 645
Casilla 385
Fonofax: 67 - 233 585

Para más información
visite las páginas web
www.salix.cl www.infor.cl y
www.mimbre.cl.

INSTITUTO FORESTAL
BIBLIOTECA
Santiago - Chile

PRESENTACION

ROBERTO IPINZA C.
DIRECTOR EJECUTIVO - INFOR



La investigación y generación de conocimientos para añadir valor al proceso de producción forestal, desde la propagación de plantas hasta la comercialización de bienes finales, es una de las tareas relevantes del Instituto Forestal. Una revisión breve de lo realizado por INFOR lleva a reconocer su rol protagonista en la introducción de especies forestales, la prueba y adaptación de técnicas y tecnologías en el procesamiento industrial y en el desarrollo de nuevos productos. La transferencia y difusión de los resultados de su labor de investigación, es también primordial para INFOR; especialmente cuando los receptores de esa comunicación son segmentos de medianos y pequeños productores.

El documento que ahora presenta el Instituto Forestal cumple fielmente las tareas enunciadas, entregando una recopilación del trabajo realizado por el proyecto FONDEF/FDI "Desarrollo Integral del Cultivo e Industrialización del sauce-mimbre", el cual pretende que, en un volumen único, el lector pueda encontrar los resultados más relevantes obtenidos durante los 4 años de arduo trabajo de investigación desarrollado por el equipo del proyecto y profesionales especialistas de una amplia gama de materias; todo lo cual redunda en aportar al país, y muy particularmente a los profesionales de instituciones del agro y a pequeños empresarios dedicados al cultivo y fabricación de productos de mimbre, información y antecedentes que ponen al Salix, entre otras muchas especies forestales que con tecnologías en silvicultura y manejo - algunas en la frontera del avance biotecnológico y de la industrialización - entregan interesantes rentabilidades.

Con este documento, y los otros publicados antes por el Instituto Forestal relativos al cultivo e industrialización del sauce mimbre, el equipo de investigadores, liderado por la ingeniero forestal señora Marta Abalos R. y el propio Instituto Forestal, esperan haber contribuido al desarrollo del sector y de la comunidad en particular.

CONTACTOS

Sra Marta Abalos Romero
Director del Proyecto
Instituto Forestal
Huerfanos N° 554 Santiago
Fono 69 30 750
Fax 69 30 890
Email: mabalos@infor.cl

Sra Vivianne Palma
Jefe Area Suelo y Fertilizantes
Universidad Católica de Temuco
Manuel Montt N° 056 Temuco
Fono 45 - 205 433
Fax 45 - 211 034
Email: vpalma@uctem.cl

Sr Patricio Parra Sanhueza
Director de Proyecto "Certificación Sanitaria"
Instituto Forestal
Huerfanos N° 554 Santiago
Fono 69 30 750
Fax 69 30 890
Email: pparra@infor.cl

Sr Hugo Campos de Quiróz
Ingeniero Agrónomo Ph D
Estación Experimental Semillas Pioneer-Chile
Fono 82 10 046 anexo 136
Fax 82 10 045
Email: CamposH@phibred.com

Sr Patricio Chung G
Ingeniero Forestal
Instituto Forestal
Huerfanos N° 554 Santiago
Fono 69 30 704
Fax 69 30 890
Email: pchung@infor.cl

Sra Rose Marie Garay M
Ingeniero Forestal
Depto Tecnologia de la Madera
Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Chile
Avda Santa Rosa N° 11315 Santiago
Fono 67 85 907
Fax 54 14 1 31
Email: rgaray@abello.dic.uchile.cl

Sr Genaro Gotelli
Ingeniero Civil Mecánico
Magister en Ingenieria Mecánica
Depto Ingenieria en Maderas
Universidad del Bio Bio
Avda Collao N° 1202 Concepción
Fono 41 - 261 200
Fax 41 - 313 897
Email: jgotelli@ubiobio.cl

Sra Ramona Villalón
Ingeniero Agrónomo
División de Normas
Instituto Nacional de Normalización
Matias Cousiño N° 64, Piso 6 Santiago
Feno 44 10 330
Fax 44 10 427

Sr Ramiro Gutiérrez
Product Manager
Area Manufacturas
PROCHILE - Santiago
Av Bdo O'Higgins N° 1315, Piso 2
Fono 56 59 2 27
Fax 69 60 639
Email: rgutier@prochile.cl

Sr Carlos Leal T
Ingeniero Forestal
Representante
SMARTWOOD-Chile
Casilla N° 1259 Valdivia
Fono 63 - 292 826
Fax 63 - 294 300
Email: calt@smtp.uach.cl

INDICE

Prólogo

I. GENETICA Y SILVICULTURA

IDENTIFICACION GENETICA EN ESPECIES DEL GENERO *Salix* MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS
Patricio Chung G. 3

MICROPROPAGACION DE *Salix* spp. A TRAVES DE MERISTEMAS FOLIARES
Patricio Chung G., Basilio Carrasco G. 16

CLASIFICACION TAXONOMICA DE ESPECIES DEL GENERO *Salix*
Patricio Chung G. 28

ANALISIS MOLECULAR EN SAUCE - MIMBRE
Hugo A. Campos de Quiroz, Braulio Soto, Cristián Ibañez 56

RESULTADOS DE ENSAYOS DE INTRODUCCION DE *Salix* spp. EN LA ZONA NORTE, CENTRAL Y SUR DE CHILE
Marta Abalos R., Hernán Soto G., Aldo Salinas R. 80

EVALUACION DE LA TASA DE CRECIMIENTO Y ABSORCION DE N-P-K EN *Salix viminalis* EN EL PRIMER AÑO DE ESTABLECIMIENTO
Vivianne Palma P., Alex Moscoso, Paola Cicarelli, Carolina Iturriaga 126

SITUACION FITOSANITARIA DE LAS ESPECIES DEL GENERO *Salix* PRESENTES EN CHILE
Patricio Parra, Marcos Cohen, Jorge Faúndez 145

AGENTES DE DAÑO EN PLANTACIONES DE *Salix* spp. EN CHILE 172

ESTUDIO FENOLOGICO DE ESPECIES DEL GENERO *Salix* PRESENTES EN CHILE
Patricio Chung G. 196

II. PRODUCCION INDUSTRIAL

COMPARACION DE POTENCIALIDADES DE EMPLEO INDUSTRIAL DE MIMBRE Y RATAN
Rosemarie Garay M. 209

CARACTERIZACION FISICO - MECANICA DE *Salix* spp.
Rosemarie Garay M. 222

IDENTIFICACION DE PRODUCTOS PARA EL CONTROL FITOSANITARIO DE SAUCE-MIMBRE
Rosemarie Garay M. 241

ENSAYOS NORMALIZADOS A PRODUCTOS TIPO
Genaro Gotelli V., Alvaro Briones S. 253

SOLUCIONES CONSTRUCTIVAS EN LA INDUSTRIA DEL MIMBRE
Genaro Gotelli V., Alvaro Briones S. 262

Ficha Técnica 2
ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA FABRICACION DE MUEBLES DE MIMBRE. 270

Ficha Técnica 3
NORMA CHILENA OFICIAL NCh2039. Of1998. Mimbre - Características físicas. 280

Ficha Técnica 4
NORMA CHILENA OFICIAL NCh2532. 2000. Muebles de mimbre - Requisitos. 285

CURVADO DE MADERA SOLIDA PARA USO COMO COMPONENTE DE MUEBLES DE MIMBRE
Genaro Gotelli., Alvaro Briones S. 303

EVALUACION DE PINTURAS Y BARNICES, TECNICAS DE APLICACION Y FORMULACION DE RECUBRIMIENTOS PARA EL MIMBRE
Rosemarie Garay M. 316

Ficha Técnica 5
SISTEMAS DE APLICACION DE RECUBRIMIENTOS PARA MIMBRE. 333

Ficha Técnica 6
RECUBRIMIENTOS ESPECIFICOS PARA MIMBRE. 340

CONTENIDO DE EXTRAIBLES Y CAPACIDAD ENERGETICA TOTAL EN *Salix viminalis*
Cristian Durán S. 345

CONTENIDO LIGNOCELULOSICO DE *Salix viminalis* PARA PRODUCCION DE BIOENERGIA
Diego Gallardo B. 361

PRODUCCION DE CARBON UTILIZANDO DESECHOS DE MIMBRE
Mitsumasa Urata, Patricio Chung G., Marta Abalos R. 379

III. MERCADO

OPORTUNIDADES DE MERCADO PARA EL MIMBRE CHILENO
Marta Abalos R., Alejandro Montes 395

Ficha Técnica 7
EVALUACION DE LA RENTABILIDAD DE LA PRODUCCION DE MIMBRE. 411

EL DISEÑO COMO VARIABLE COMPETITIVA EN LA INDUSTRIA DEL MIMBRE
Ramiro Gutiérrez, Marta Abalos R. 414

CERTIFICACION DEL MANEJO FORESTAL Y CADENA DE CUSTODIA DE PLANTACIONES DE SAUCE-MIMBRE
Carlos Leal T., Marta Abalos R. 426

PROLOGO

Con el objetivo de transformar la tradicional actividad artesanal del mimbre en una actividad de carácter industrial que genere productos capaces de satisfacer las necesidades domésticas y de exportación, el Instituto Forestal, INFOR, e INTEC- Chile, en colaboración con Universidades e Institutos del país, dieron inicio en 1997 al proyecto «Desarrollo Integral del Cultivo e Industrialización del sauce-mimbre»; proyecto que se orientó a la Investigación y Desarrollo de tres áreas:

Area Genética y Silvicultura,
Area Desarrollo de Productos y Procesos,
Area Detección y Prospección de Mercados

El objetivo propuesto en el Area Genética y Silvicultura, fue incrementar los rendimientos de cultivo y la calidad de la materia prima mimbre, fomentando la ampliación de la superficie de mimbre cultivada en Chile y la incorporación de nuevas localidades al cultivo de la especie. En ese contexto, el INFOR estableció ensayos a lo largo del país, en los que fueron probadas especies y procedencias de Salix spp. *En cada uno de estos ensayos se siguieron rigurosos procedimientos de establecimiento, manejo y cuidados culturales, para asegurar un desarrollo y calidad óptimos de las especies ensayadas, mereciendo un especial cuidado el control de malezas, los riegos y el control fitosanitario.*

Paralelamente, y con el fin de aumentar la variabilidad genética y evitar los problemas asociados al monocultivo, INFOR realizó la internación al país de nuevos clones de Salix procedentes de Suecia, Canada, y Reino Unido. Dichos clones debieron ser cultivados in vitro, en el laboratorio del Instituto Forestal, los cuales después de largas etapas de multiplicación y aclimatación, fueron establecidos exitosamente en terreno y se espera prontamente que puedan ser ensayados para determinar su adaptación, rendimiento y calidad en nuevas localidades del país.

En la etapa de postcosecha del mimbre, y con el fin de fomentar la utilización de materia prima de óptima calidad, el Instituto Forestal encargó al Instituto Nacional de Normalización el desarrollo de una Norma Chilena, para definir grados de calidad de acuerdo a las dimensiones y defectos de la materia prima. Esta Norma está siendo utilizada actualmente por productores locales los cuales se han visto beneficiados por un mejor precio en función de la calidad de la materia prima.

En el área de transformación, un importante paso dado fue la realización de una misión tecnológica a Asia, que permitió conocer aspectos competitivos de la Industria del ratán, materia prima con la cual se elabora una gran variedad de productos de alto valor agregado, que se exportan en grandes volúmenes a países desarrollados de Norteamérica y Europa. Este know-how tecnológico y de fabricación, fue incorporado en la primera empresa industrial de muebles de mimbre nacida al amparo del proyecto: Chimbandes, localizada en la VI región.

Tecnologías como corcheteras neumáticas, utilización de tornillos en vez de los tradicionales clavos, uso de ensambles y uniones, han sido incorporados últimamente a una nueva generación de productos, permitiendo un mejoramiento sustancial de su calidad y vida útil.

Otro factor abordado fue el desarrollo de nuevas formulaciones de pinturas y barnices, con las cuales se mejora la apariencia y vida útil de los productos en servicio.

En paralelo a estos desarrollos tecnológicos, se elaboró una segunda Norma orientada a la fabricación

de muebles de mimbre, la cual especifica tipos de ensambles, uniones y terminaciones aceptadas y define la calidad de los productos en función de los resultados de pruebas físicas y mecánicas.

El éxito logrado en los ensayos de sauce-mimbre, en varias regiones del país, motivó la realización de una fase de transferencia tecnológica y capacitación en producción de manufacturas de mimbre. Es así como en la actualidad existen cerca de 160 personas capacitadas integrando grupos de trabajo en las localidades de Vicuña, Salamanca, Curicó, Lota, Yumbel y Temuco.

En el área de mercado, uno de los principales logros fue la identificación de nichos para la colocación de los muebles de mimbre en el exterior, lo que fue posible gracias a la participación de empresarios del rubro en importantes ferias de Latinoamérica y Europa, contando para ello con el valioso apoyo de PROCHILE.

Otro de los éxitos fue la realización del primer Salón Nuevas Tendencias del Mimbre, impulsado por INFOR en diciembre de 1999, en el cual se presentaron cerca de 30 prototipos de muebles de mimbre, elaborados por Escuelas e Institutos de diseño del país en conjunto con industriales del mueble y artesanos del mimbre. Este evento puso en relieve la importancia del diseño como factor competitivo para el posicionamiento de los muebles de mimbre chilenos en el exterior.

Dado que en el mundo, especialmente en Europa y Norteamérica, existe una fuerte tendencia a preferir productos forestales provenientes de un manejo sostenible de bosques y plantaciones, se realizó una certificación de las plantaciones de sauce-mimbre de la VI región, la cual luego de una exhaustiva auditoría de los aspectos sociales, económicos y ambientales ligados al cultivo del mimbre, dio como resultado una evaluación positiva, que califica a los productores del mimbre con una nota de 3,98 en una escala donde el máximo es 5,0. Esta certificación permitirá que la materia prima procedente de estas plantaciones y los productos fabricados con ellas, exhiban el sello distintivo FSC otorgado por el Consejo Mundial de Manejo Forestal, lo cual abrirá importantes nichos de mercado para estos productos en el exterior.

Finalmente, debido a que los desarrollos logrados en el campo de la Silvicultura y la Producción, están intimamente ligados a la comercialización de los productos, fue creada una unidad comercializadora y showroom permanente de productos. En este lugar se exhiben productos de alta calidad y diseño, los que están orientados a satisfacer las necesidades de clientes de los sectores de mayores ingresos del país y clientes institucionales que compran para sus restoranes, hoteles y centros vacacionales. Esta base de operaciones se constituirá en el corto plazo en el vínculo con el comercio exterior.

Los aspectos anteriormente esbozados reflejan el trabajo realizado a lo largo de 4 años de ejecución del proyecto, los que son presentados ahora en este libro, el cual busca constituirse en una referencia tanto para aquellos que están comprometidos con el desarrollo de esta industria, como para aquellos que en un mañana cercano lo estarán, aportando trabajo y creatividad al fortalecimiento de esta nueva opción productiva nacional.

Todos estos desarrollos no habrían sido posibles sin el fuerte apoyo del Estado, manifestado a través de los fondos para proyectos de Investigación Científica y Tecnológica: FDI y FONDEF, y sin el valioso aporte y colaboración de los profesionales e Instituciones que participaron en la ejecución del proyecto, a los cuales se debe la realización de sus logros. A todos ellos nuestros agradecimientos.

Marta Abalos Romero
Directora General - Proyecto FDI/FONDEF
"Desarrollo Integral del Cultivo y la Industrialización del Sauce-mimbre"



Para la obtención de plantaciones de mimbre de calidad que permitan contar con la materia prima requerida para competir en los diversos mercados donde existen oportunidades interesantes para el mimbre chileno, se requiere contar con información para desarrollar una silvicultura adecuada, que incluya desde la selección de la especie y el espaciamiento de plantación hasta los cuidados culturales ; temas que se presentan en este capítulo.

- ***IDENTIFICACION GENETICA EN ESPECIES DEL GENERO Salix MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS***
  Patricio Chung G.

- ***MICROPROPAGACION DE Salix spp. A TRAVES DE MERISTEMAS FOLIARES***
  Patricio Chung G., Basilio Carrasco G.

- ***CLASIFICACION TAXONOMICA DE ESPECIES DEL GENERO Salix***
  Patricio Chung G.

- ***ANALISIS MOLECULAR EN SAUCE - MIMBRE***
  Hugo A. Campos de Quiroz, Braulio Soto, Cristián Ibañez

- ***RESULTADOS DE ENSAYOS DE INTRODUCCION DE Salix spp. EN LA ZONA NORTE, CENTRAL Y SUR DEL CHILE***
  Marta Abalos R., Hernán Soto G., Aldo Salinas R.

- ***EVALUACION DE LA TASA DE CRECIMIENTO Y ABSORCION DE N-P-K EN Salix viminalis EN EL PRIMER AÑO DE ESTABLECIMIENTO***
  Vivianne Palma P., Alex Moscoso, Paola Cicarelli, Carolina Iturriaga

- ***SITUACION FITOSANITARIA DE LAS ESPECIES DEL GENERO Salix PRESENTES EN CHILE***
  Patricio Parra, Marcos Cohen, Jorge Faúndez

- ***AGENTES DE DAÑO EN PLANTACIONES DE Salix spp. EN CHILE.***

- ***ESTUDIO FENOLOGICO DE ESPECIES DEL GENERO Salix PRESENTES EN CHILE***
  Patricio Chung G.

IDENTIFICACION GENETICA EN ESPECIES DEL GENERO *Salix* MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROFORESIS

Patricio Chung G.[1]
1 Ing. Forestal, Subgerencia de Tecnologias Silvicolas, Instituto Forestal, INFOR, Chile

RESUMEN

En el contexto del proyecto "Desarrollo Integral del Cultivo y la Industrialización del Sauce-mimbre" desarrollado por el Instituto Forestal (INFOR), y tomando en consideración la existencia de poblaciones de especies del género *Salix* a lo largo del país, se estableció una colecta de material vegetativo, que comprendió un total de 102 individuos y tuvo como objetivo la obtención de genotipos de calidad superior para ser utilizados en plantaciones comerciales. La técnica utilizada en este estudio para determinar las diferencias genéticas entre individuos fue la electroforesis con geles de almidón.

Se utilizaron 16 tinciones para igual número de enzimas, las cuales dieron como resultado la visualización de las bandas para más de 10 enzimas investigadas.

Los resultados arrojados por este estudio indican que existe una casi nula variabilidad de *Salix viminalis* en las poblaciones cultivadas y asilvestradas en Chile. Esta afirmación se hace extensiva también a las especies *S. alba*, *S. purpurea*, *S. caprea* y *S. x rubens* (*S. alba* x *S. fragilis*).

En *S. humboldtiana* se pudo comprobar una alta variabilidad dentro de las diversas poblaciones de donde se extrajo material para el análisis de electroforesis. El resultado para esta especie es alentador por cuanto esta especie podrá ser trabajada en futuros programas de mejoramiento.

INTRODUCCION

En Chile, *Salix viminalis* ha sido utilizado por muchos años para trabajos de cestería, mueblería y artesanías menores en mimbre. El material obtenido de esta especie proviene en su mayoría de la VI región, zona de Chimbarongo, donde ha sido trabajado en forma artesanal sin ningún esfuerzo claro por mejorar su manejo y calidad.

Un aspecto fundamental para esta actividad es la existencia de diferentes genotipos que permitan determinar la variabilidad genética de la especie. Una de las técnicas de laboratorio que permite visualizar el genotipo de un organismo es la electroforesis, que puede ser definida como el movimiento de las enzimas en un gel bajo la influencia de una corriente eléctrica. Para individualizar cada individuo se necesitan marcadores genéticos los cuales pueden ser de varios tipos (siempre que sean producto de los genes). Los mejores candidatos para marcadores son las proteínas, compuestas de aminoácidos.

La gran variación existente en las enzimas constituye una herramienta eficaz en la aplicación directa en el mejoramiento genético, a través de su potencial uso en la evaluación y selección de individuos superiores, relacionando en forma específica las isoenzimas con los aspectos de crecimento, productividad o calidad de la materia prima.

OBJETIVOS

Determinar la existencia de variabilidad en individuos de *Salix* spp. dentro del rango de domesticación en Chile, obteniendo protocolos de tinción confiables para la identificación genética a nivel de isoenzimas.

MATERIAL Y METODO

Para la realización del trabajo se utilizaron 91 individuos de *Salix* spp. de un total de 102 colectados, entre la IV y X regiones del país (cuadro 1).

Cuadro 1. Especies y número de individuos utilizados

Especie	N° de individuos	Rango geográfico	Especie	N° de individuos	Rango geográfico
Salix viminalis	42	VI a X Regiones	*Salix purpurea*	3	VIII a IX Regiones
Salix alba	4	VII a X Regiones	*Salix humboldtiana*	19	IV a VII Regiones
Salix x rubens	9	RM a X Regiones	*Salix matsudana*	4	IX a X Regiones
Salix caprea	6	VI a X Regiones	*Salix babylonica*	4	IV y VIII Regiones

En la realización del estudio se utilizaron materiales, equipos de laboratorio y productos químicos disponibles en el laboratorio de INFOR, tales como agitadores magnéticos, cámaras horizontales, succionador de pipetas, agitador de tubos, pesa electrónica, refrigerador, centrífuga, horno eléctrico, peachímetro, destiladora de agua, entre otros.

La escasa bibliografía sobre estudios de electroforesis realizados en el género *Salix*, determinó que todos los posibles sistemas a trabajar se extrajeran de protocolos correspondientes a sólo dos estudios previos realizados con *Salix viminalis* (THORSEN, 1996), *S. eriocephala* y *S. exigua* (ARAVANOPOULOS, 1992). De estos trabajos se extrajeron 16 recetas (cuadro 2), en las cuales cada una de las tinciones fue chequeada y algunas modificadas.

Cuadro 2. Enzimas investigadas

Enzimas investigadas	E.C.N°	Abrev.	Enzimas investigadas	E.C.N°	Abrev.
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	AAT	Glycerate 2-dehydrogenase	1.1.1.29	GDH-2
Acid phosphatase	3.1.3.2	ACP	Glucose-6-phosphate isomerase	5.3.1.9	PGI
Aconitase	4.2.1.3	ACO	Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	IDH
Alkaline phosphatase	3.1.3.1	ALP	Malate dehydrogenase	1.1.1.37	MDH
Diaphorase	1.6.4.3	DIA	Phosphoglucomutase	2.7.5.1	PGM
Endopeptidase	3.4.13.9	EP	6-Phosphogluconate	1.1.1.44	6-PGD
b-Galactosidase	3.2.1	b-GAL	dehydrogenase		
b-Glucosidase	3.2.1.21	b-GLU	Shikimate dehydrogenase	1.1.1.25	SKDH
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.2	GDH			

Preparación de las muestras

El material utilizado correspondió a las 4 ó 5 primeras hojas de brotes tiernos, las que fueron tomadas desde la punta de las ramas y extraídas con tijera. Luego se colocaron en bolsas plásticas con su respectiva identificación y se introdujeron en un contenedor hermético, el cual mantuvo una temperatura cercana a los 0° C para preservar la viabilidad de las proteínas hasta el momento de su maceración y almacenamiento en el congelador a -80° C.

Cabe señalar que las muestras que pueden evaluarse mediante esta técnica pueden ser de distinto origen: semillas, hojas, corteza, etc. Cada material tiene su propio método de extracción de isoenzimas, siendo este proceso muy específico y delicado, ya que las enzimas se desnaturalizan rápidamente.

Cada muestra estuvo constituida por 150 mg de hoja fresca (4 a 5 hojas), las que se lavaron con agua destilada y desionizada y se secaron con papel absorbente. Luego se cortaron en pedazos pequeños y se trituraron en un mortero con 0.7 ml de *buffer* de extracción frío. (cuadro 3; Sistema de extracción 1 o 2 según corresponda).

Cuadro 3. Sistemas de extracción

Sistema de extracción 1			Sistema de extracción 2		
8	%	PVP (7:1 de 40M; 360M)	2	%	Tergitol 15-S-9
0.3	M	Sucrosa	2	%	PEG (20M)
0.5	MM	EDTA	8	%	PVP (7:1 40M; 360M)
1	MM	Ditiotreitol	50	mM	Acido ascorbico
1	MM	Acido ascorbico	0.4	mM	NAD
0.1	%	Bovine Serum Albumin	0.1	%	Bovine serum albumin
0.4	MM	NAD	0.2	mM	Pyridoxal 5'-phosphate
0.3	MM	NADP	0.3	M	Sucrosa
0.2	MM	Pyridoxal 5'-phosphate	12	mM	Cysteine-HCl
			0.66ml		β-mercaptoethanol
Se ajustó a pH 6.7 con 1M Tris y se adicionó 0.66 ml b-mercaptoethanol para 100 ml de buffer.			*Se disolvió en 0.05 M borate buffer(pH 7.1) a un volumen final de 100 ml. Se ajustó nuevamente el pH al final y se adicionó b-mercaptoethanol sólo previo al uso.*		

Hecha la maceración de las muestras con su respectivo *buffer*, la mezcla se vació a un tubo Ependorf de 1.5 ml y se puso en hielo hasta que todas las muestras fueron preparadas. Luego se centrifugó en frío a 15.000 rpm durante 5 minutos, para posteriormente ser almacenados en el congelador a -80° C hasta la electroforesis.

Preparación de los *buffer* y geles

Existen diferentes sistemas de *buffer* electrolítico y composiciones para los geles de almidón, dependiendo de los sistemas enzimáticos que se trabajen. En este estudio se prefirieron los propuestos por THORSEN (1996): geles de almidón al 12,5% que se detallan a continuación:

Sistema A (ASHTON y BRADEN, 1961). Este sistema necesita la preparación de dos soluciones *stock* que deben llevarse a pH 8.1.

- Stock 1: 0.191M de ácido bórico y 0.05 M de hidróxido de litio
- Stock 2: 0.0 51M de tris y 0.008 M de ácido cítrico

El gel se preparó con la mezcla del Stock 1 y el Stock 2 en una relación 1:9. El *buffer* electrolítico sólo ocupó la solución Stock 2.

Sistema B (CLAYTON y TRETIAK, 1972). En este sistema el buffer del gel se prepara con 0.002 M de ácido cítrico y el *buffer* electrolítico con 0.04 M de ácido cítrico. El gel y el buffer electrolítico se ajustan ambos a pH 6.5 con N-(3-aminopropyl)-morpholine. Posteriormente, al gel y al *buffer* del ánodo se le agrega 30 mg de NAD cada 100 ml.

Sistema C (CHELIAK y PITEL, 1984). En este caso, el gel se preparó con 0.01 M de Histidina-HCl y 0.28 mM de EDTA, ajustándose a un pH 7.0 con 1 M de tris. El *buffer* electrolítico se preparó con 0.125 M de tris, llevádose a pH 7.0 con 1 M de ácido cítrico.

Preparación del gel

En este estudio se empleó para cada cámara 380 ml de gel y 400 ml de buffer electrolítico. Los pasos a seguir para la preparación del gel se describen a continuación (fotos en Anexo):

a) Pesar el almidón y preparar los buffers el día previo. Los buffers se pueden almacenar en el refrigerador por un mes, pero se debe verificar regularmente el pH.
b) Poner el almidón en frascos Erlenmeyer de 1000 ml
c) Añadir el gel buffer para disolver todo el almidón
d) Calentar la mezcla en el mechero y agitar constantemente hasta que espese, tomando un color casi trasparente
e)Vaciar la mezcla en los moldes y remover cualquier burbuja, protuberancia o partícula extraña. Además, tratar de emparejar la superficie moviendo el molde para que quede nivelado.
f) Dejar enfriar a temperatura ambiente por 30 minutos. Luego se deja en el refrigerador por otros 15 minutos.
g) El gel ya endurecido se cubre con alusa plastic para evitar el resecamiento hasta la

carga de las muestras. Se debe poner cuidadosamente para evitar que se formen depresiones en la superficie del gel.
h) El molde es fijado mediante elásticos para prevenir el derrame (goteo) de los geles antes del fraguado.

Durante la preparación del gel se sacaron las muestras del congelador y se pusieron a deshielar a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente, las muestras se colocaron en hielo hasta el proceso de carga.

Cargado de las muestras

La carga de las muestras se realizó de acuerdo a la siguiente pauta (fotos en Anexo):

a) Se quita la envoltura plástica y se desarma el molde del gel.
b) Con un escarpelo se hacen cortes rectos a lo largo de la longitud del gel y a 5 cm desde el origen catódico (marca origen)
c) Se remojan trozos de papel filtro (3x10 mm) con el flotante de la muestra y se ponen verticalmente en el corte del gel.
d) El exceso de solución es removido sólo antes de cargar, poniendo las muestras en papel absorbente.
e) Se debe poner cuidado en no tocar con el papel filtro los restos celulares en el fondo de los microtubos (tubos Ependorf).
f) Una vez apoyada la muestra en el gel es recomendable no rectificar la posición.
g) Cuando se lleve puesta la mitad de las muestras se aconseja medir lo que se lleva ocupado del gel y lo que resta, para ajustar el espaciamiento entre muestras.
h) Una muestra de papel filtro con azul de metileno es puesta en medio del gel para mantener la huella de la migración durante y después de la electrofóresis.
i) Se cargan 30 a 35 muestras por cada gel.
j) Después de cargar el gel, ambos lados se presionan fuertemente para asegurar contacto cercano y movimiento uniforme de la corriente.
k) La superficie del gel se cubre con envoltura plástica para prevenir desecamiento y condensación.
l) Ambos tanques de la cámara se rellenan con el *buffer* electrolítico. El ánodo y cátodo se conectan al gel mediante un paño empapado en el *buffer*. Se debe cuidar de poner el paño en forma pareja sobre ambos costados del gel. La envoltura plástica se corre 1,5 cm desde ambos extremos.
m) Sobre el gel se pone una bolsa con hielo bien molido.
n) Se corre la electrofóresis en el refrigerador para mantener el enfriamiento durante el proceso.
o) La electrofóresis se continua hasta que el *buffer* haya migrado una distancia suficiente. Para la mayoría de las especies y los tejidos 5 a 8 cm de migración (3 a 4 horas de

electroforesis) es suficiente para resolver claramente y separar la mayoría de las bandas.

Corte de los geles

La gran ventaja de los geles de almidón en comparación con los de poliacrilamida es la oportunidad de rebanarlos y teñirlos simultáneamente para una gran cantidad de sistemas enzimáticos. Para rebanar los geles se usaron de guía reglas de acrílico (20x260x1 mm ó 2 mm.) y el corte se hizo con un nylon para pescar del 0.2mm. Las reglas de acrílico se pusieron a ambos costados del gel y el corte se realizó desde fuera hacia el cuerpo de la persona, colocando pedazos de gel desechado como tope (Ver Anexo 1).

Después de rebanar, el corte que contiene la superficie del gel a veces fue descartado y en otras ocasiones se utilizó para intentar otras tinciones. Los cortes se marcaron con el propósito de identificar fácilmente la posición exacta de cada muestra, generalmente cortándose la orilla superior izquierda.

Después de cortar los geles de almidón, cada rebanada es transferida a cubetas de tinción individuales. Esto requirió práctica para evitar que durante la transferencia se rompieran los geles. Se debe considerar que a mayor grosor del gel, es más fácil manipularlo, pero a su vez requiere mayor cantidad de buffer de tinción.

Tinción de los geles

La preparación de cada solución de tinción se comenzó 15 a 20 min antes de terminar la electroforesis. Los productos se agregaron en este orden: buffer, sustrato y coenzima (con agitador magnético).

Preparación de las tinciones

1. AAT*		2. ACP*		3. ACO*	
AAT *buffer* pH 6.5	50 ml	0.2 M Acetato de sodio, pH 5.0	50 ml	0.2 tris pH 8.0	45 ml
Fast blue BB salt	100 mg	a-Naphthyk acid phosphate	100 ml	Acido Cis-aconitico	5 ml
		Fast garnet GBC salt	60 ml	MI0.1 $MgCl_2$	1 ml
		1% MgC12 (peso/vol)	2.5 ml	Isocitric dehydrogenase *	1 ml
				* Sigma Cat. N I-2002	
				NADP	1 ml
				MTT	1 ml
				PMS	0.5 ml
4. ALP*		**5. DIA***		**6. ENP****	
H2O destilada	50 ml	0.2 M tris pH 8.0	50 ml	ENP assay buffer pH 5.55	100 ml
Sodium-b-naphthyl acid		2,6-Dichlorophenol indopheno	1 ml	a-N-benzoyl-DL-arginine-b-	
Phosphate	25 mg	NADH	20 ml	Naphthylamide-HCl	50 mg
Fast blue RR	25 mg	MTT	1 ml	Black K salt	50 mg
MgSO4.7 H2O	60 mg			MgC12	100 mg
MgC12 1% (peso/vol)	1 mg				
7. b-GAL***		**8. b-Glu*****		**9. GDH ***	
4-Methylumbelliferyl-b-D		4-Methylumbelliferyl-b-D-glucoside	20 mg	tris-HCl 0.2 M, pH 8.0	50 ml
-galactoside	20 mg	Citrate-phosphate buffer 0.05 M,	10 ml	L-glutamic acid	400 mg
Citrate-phosphate	20 ml	pH 4.0		NAD	2 ml
Buffer 0.05 M, pH 4.0				NBT	1 ml
Ver bajo luz UV (360 mm).		Ver bajo luz UV (360 mm		PMS	0.5 ml
La enzima aparece como bandas		La enzima aparece como bandas			
fluorescentes. Fotografiar		fluorescentes. Fotografiar			
inmediatamente con filtro amarillo.		inmediatamente con filtro amarillo.			
10. GDH-2*		**11. PGI***		**12. IDH***	
tris-HCl 0.2 M, pH 8.0	50 ml	0.2 M tris, pH 8.0	50 ml	0.2 M tris pH 8.0	50 ml
DL-glyceric acid		Fructose-6-phosphate	25 ml	0.1 M $MgCl_2$	1 ml
(hemi calcium salt)	80 mg	Glucose-6-phosphate		0.1 M IsoAcido citrico	45 mg
NAD	1 ml	dehydrogenase20 u		NADP	1.5 ml
NBT	1 ml	NADP	1 ml	MTT	1 ml
PMS	0.5 ml	MTT	1 ml	PMS	
		PMS	0.5 ml		0.5 ml
13. MDH*		**14. PGM***		**15. 6-PGD***	
0.2 M tris pH 8.0	50 ml	0.2 M tris pH 8.0	50 ml		
2 M Sodium-L-malate pH 7.0	6 ml	$MgCl_2$ 1%	2 ml	0.2 M tris pH 8.0	50 ml
NAD	1 ml	Glucose-1,6-diphosphate		0.1 M $MgCl_2$	5 ml
NBT	1.5 ml	(disodium salt)	1 ml	6-Phosphogluconic acid	40 mg
PMS	0.5 ml	Glucose-1-phosphate	15 mg	(trisodium salt)	
		NADP	1 ml	NADP	1 ml
		Glucose-6-phosphate		MTT	1 ml
		Dehydrogenase ** Sigma N. G-5885	15 mg	PMS	0.5 ml
		MTT	1 ml		
		PMS	40 u.		
		Otras tinciones utilizadas para mejorar los resultados			
16. SKDH*		**17. SOD50***		**18. ADH***	
0.2 M tris pH 8.0	50 ml	mM tris-HCl pH 8.0	50 ml	50 mM tris-HCl pH 8.0	50 ml
0.1 M $MgCl_2$	5 ml	Riboflavina	2 mg	Etanol	0.2 ml
Shikimic acid	40 mg	EDTA	1 mg	NAD	1 ml
NADP	1 ml	NBT	1 ml		
MTT	1.5 ml				
PMS	0.5 ml				

* *Incubar en oscuridad a 37º C hasta que aparezcan las bandas*

** *Incubar en oscuridad a 37 ºC por 60 minutos*

*** *Incubar en oscuridad a 37 ºC por 45 minutos*

Buffer de tinción

AAT *buffer*		**ENP assay *buffer* pH 5.55**		**tris-maleic *buffer* pH 6.4**	
a-Ketoglutarate (2-oxoglutarago)	0.38 g	Stock solution pH 3.7:		Solution A	
L-aspartic acid	1.38 g	Trizma base	24.2 g	0.2 M Tris	3.63 g
PVP-40	5 g	Maleic acid	23.2 g	agua	150 ml
EDTA	0.5 g	H2O deionized	1 L	Solution B	
Sodium phosphate dibasic		Assay		0.2 M Maleic acid	2.32 g
(Na2HPO4)	7.5 g	5 (stock): 3 (H2O):		agua	100 ml
Sodium phosphate (NaH2PO4)		2 (0.2 M NaOH)		Add solution B to A while stirring,	
7.5 g				to bring the pH to 6.4	
Agua destilada	500 ml	**0.05 Citrate-phosphate *buffer* pH 4.0**		**0.2 M tris-maleate buffer pH 6.0**	
0.2 M Acetate pH 5.0		Na2HPO4 (anh)	3.55 g	Trizma base	12.11 g
Sodium acetate.3H2O	11.48 g	Acido citrico (anh)	5.25 g	Maleic acid	11.61 g
Glacial acetic acid	3.6 ml	H2O deionized	500 ml	H2O adjust pH with NaOH	500 ml
Deionized	500 ml	**0.1 M Acetate pH 5.2**			
0.2 M tris-HCl pH 8.0		Na acetate.3 H2O	6.8 g		
Trizma base	96.8 g	H2O hasta ajustar pH con			
Deionized H2O	4 L	HCl	500 m		
adjust pH 8.0 with HCl		**0.2 M tris-Maleate pH 5.3**			
0.1 M Calcium-chloride		Trizma base	24.2 g		
CaC12.2H2O	1.47 g	Malic acid	23.2 g		
H2O	100 ml	Deionized H2O	1 L		

Sustrato para la fijación de enzimas

D-F-6-P (PGI)		**IDH**		**NADH**	125 mg
D-fructose-6-phosphate	125 ml	Isocitric dehydrogenase	300 mg	Deionized H2O	10 ml
(disodium salt)		H2O	10 ml		
Deionized H2O	10 ml				
G-1,6-DP		**MTT**		**NBT**	
Glucose-1,6-diphosphate	10 mg	MTT tetrazolium	500 mg	Nitroblue tetrazolium	500 mg
Deionized H2O	28 ml	Deionized H2O	50 ml	Deionized H2O	50 ml
G-1-P		**NAD**		**PMS**	
Glucose-1-phosphate	0.85 g	NAD	200 mg	Phenazine methosulfate	500 mg
Deionized H2O	50 ml	Deionized H2	O 20 ml	Deionized H2O	50 ml
G-6-PDH		**NADP**		**6-PGA**	
Glucose-6-phosphate	1000 u	NADP	250 mg	6-Phosphogluconic acid	400 mg
Dehydrogenase		Deionized H2O	25 ml	H2O	20 ml
H2O	50 ml				

Soluciones madres

Black K salt		**Cis-aconitic acid**		**0.1 M MgC12**	
Fast black K salt	600 mg	Cis-aconitic acid	1g	MgC12.4H2O	2.03 g
H2O	20 ml	Deionized H2O		Deionized H2O	100 ml
		Adjust pH 8.0 with NaOH			
Fast Blue BB salt		**0.1 M L-isoAcido citrico**		**0.2 M NaOH pH 14.0**	
Fast Blue BB salt	1000 mg	Na3 DL-isoAcido citrico	2.94 g	NaOH	4 g
H2O	20 ml				
2M Sodium-L malate pH 7.0		Deionized H2O	100 ml	H2O	500 ml

Con un frasco en baño de hielo con agitador mag-mix, disolver 26.82 g L-malic acid en 50 ml de agua. Mientras se agita, lentamente añadir 160g NaOH. Agregar agua hasta completar un volumen total de 100 ml, ajustar a pH 7.0 con NaOH.

Registro

Luego de teñidos y antes de la caracterización, se descartó el buffer de tinción y se reemplazó por agua de la llave. Estos fueron llevados hasta la mesa de contraste donde los geles pudieron ser fotografiados y registrados en papel transparente para asegurar la información obtenida en ese instante. En cada fotografía o registro se anotó la fecha y la tinción usada.

ANALISIS Y RESULTADOS

Se efectuaron 9 corridas de electroforesis, obteniendose bandas para más de 10 enzimas. En casi todas se presentaron diferencias entre las diferentes especies de *Salix*. Las recetas originales basadas en la literatura encontrada fueron modificadas para mejorar la visualización de las bandas. La falta de tinción o la excesiva coloración de éstas impedían un bandeo claro, por lo que se modificó la concentración de algunas substancias. Se trabajó directamente con los individuos sin tener ensayos previos que permitieran afinar más las tinciones que se estaban ocupando.

A medida que se avanzó en el número de corridas, la técnica y la claridad de las bandas fueron mejorando. A pesar de todo, los resultados preliminares fueron bastante aceptables.

Los resultados obtenidos mediante la utilización de isoenzimas fueron posteriormente validados con trabajos mediante marcadores moleculares, técnica mucho más exacta para la diferenciación de genotipos.

Uno de los resultados importantes fue la nula variabilidad de *Salix viminalis* en las muestras obtenidas en terreno. Por la gran dispersión de las muestras, es probable que esta especie no tenga una gran variabilidad genética y que todos los individuos pertenezcan a un mismo clon originario. Dentro de los tipos de bandeo se pudo diferenciar *Salix alba*, *Salix babylonica*, *Salix purpurea*, *Salix caprea*, *Salix matsudana*, *Salix humboldtiana*, *Salix x rubens* y *Salix viminalis*.

La única especie que presentó variabilidad fue *S. humboldtiana*, lo que entrega posibilidades alentadoras para futuros trabajos de mejoramiento genético con esta especie.

CONCLUSIONES

Uno de los objetivos importantes en la industrialización del sauce-mimbre, es aumentar la calidad de la materia prima y mejorar los procesos de manufactura mediante el empleo de plantas genéticamente superiores. Los resultados arrojados por los trabajos de electroforesis, no son muy alentadores por la poca variabilidad encontrada en *S. viminalis*, principal especie utilizada en Chile en el establecimiento de cultivos destinados a la cesteria, lo que implica un nulo mejoramiento en las características físicas, tecnológicas y de resistencia por medio de las razas locales.

La importación de material extranjero que permita aumentar la calidad de los productos y la variabilidad del género *Salix* en Chile, como también la introducción de nuevas especies, es esencial para lograr una diversificación de la materia prima y obtener buenos resultados en la fabricación de muebles. El utilizar una especie con antecedentes de baja variabilidad genética puede generar problemas derivados del monocultivo, tales como baja resistencia a plagas y/o enfermedades, poca elasticidad frente a cambios de mercado, crecimientos restringidos a ciertos suelos y climas, entre otros.

Es de gran importancia efectuar ensayos de procedencias con material extranjero. En el caso de Suecia, se ha rescatado una gran diversidad de clones de *S. viminalis* dentro de su rango natural, produciendo a su vez híbridos para diferentes climas, suelos y tipos de producto. Aunque con objetivos distintos, este material sería muy valioso y muy conveniente para su introducción.

Otras especies importantes son *S. purpurea* y *S. triandra*, las cuales no son muy conocidas en Chile, pero se adaptan a condiciones parecidas a *S. viminalis* y poseen características similares en cuanto a flexibilidad de sus ramas, propiedad requerida para la industria del mueble de mimbre.

En el análisis de electroforesis, la especie *S. purpurea* presente en Chile manifestó el mismo problema que *S. viminalis* en cuanto a su restringida variabilidad, planteándose para estas dos especies la introducción de otros clones que permita contar con una mayor amplitud genética.

Especies como *S.triandra* y otras que pudieran ser afines a los objetivos planteados, debieran ser introducidos para obtener un abanico de posibilidades para la producción de material adecuado para la industria del mueble de mimbre.

En el caso de la especie *S. humboldtiana* se encontró una mayor variación genética, coincidiendo con su calidad de especie autóctona en Chile.

Otras especies presentes en Chile y que fueron analizadas como *S. x rubens*, *S. caprea o S. alba*, no presentaron grandes variaciones en el material genético, agregándose a esto la poca aptitud para utilizarlas en manufacturas de muebles.

Por último, dada la escasa diversidad de las especies de *Salix* y la poca variabilidad dentro de cada una de ellas en las plantaciones locales, susceptibles de utilizarse en el proceso de manufactura de muebles, es imprescindible la importación de material genético que permita una mayor diversidad intra e interespecífica.

BIBLIOGRAFIA

ARAVANOPOULOS, F.A. 1992. Dynamics of electrophoretic spectra in families of *Salix eriocephala* Michx. and *Salix exigua* Nutt., and their implementation in breeding research. Toronto, Canada. Universidad of Toronto, Thesis degree of Doctor of Philosophy. 164 p.

EATON, L. 1993. Endogamia en eucalyptus. Valdivia, Chile. En: Curso de actualización de cruzamientos controlados con énfasis en eucalipto. Serie Técnica. Fac. de Ciencias Forestales. UACH. s. p.

THOMPSON, M.; HODGSKISS, P.; NUNNALLY, L.; HUNTER, S. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Forest service. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. General Technical Report PWS-64. 18 p.

THORSEN, J. 1996. Description of the genetic structure on *Salix viminalis* L. in nature by isozymes and morphological (quantitative) traits. Uppsala, Sweden. Swedish University of Agricultural Sciences. Department of plant breeding research. Uppsala Genetic Center. Thesis Degree of Licentiate 27 p.

ANEXO



Preparación del gel.



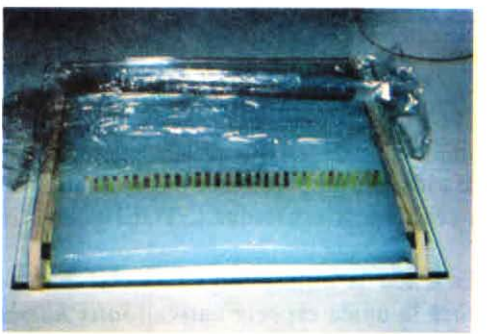
Colocación de extractos en papel filtro y postura en la placa de gel de almidón.



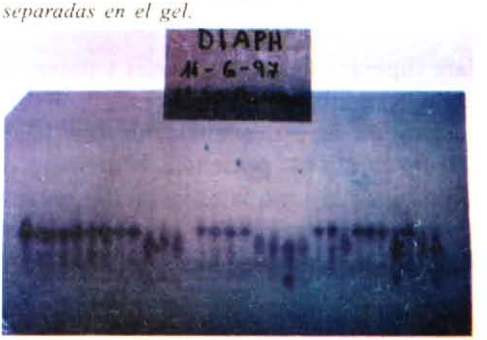
Corte del gel con hilo de nylon para su posterior tinción.



Preparación del material vegetativo con muestras de cada procedencia.



Vista de las muestras en forma separadas en el gel.



Aspecto de un zimograma después de una corrida para teñir la enzima DIAPH.

MICROPROPAGACION DE *Salix* spp. A TRAVES DE MERISTEMAS FOLIARES

Patricio Chung G.[1] y Basilio Carrasco G.[2]
1 Ing. Forestal, 2 Ing. Agrónomo M.Sc., Subgerencia de Tecnologías Silvícolas, Instituto Forestal, INFOR, Chile.

RESUMEN

En este artículo se detallan los procedimientos empleados en la micropropagación de meristemas foliares de 25 procedencias de *Salix* spp. como una medida efectiva y rápida para sanear material vegetal valioso con problemas sanitarios. Se probaron diferentes protocolos de desinfección del material vegetal, dando los mejores resultados la aplicación alternada de una mezcla de fungicidas (Benlate y Captan) y una solución de cloro comercial al 10% por 20 minutos.

El medio de cultivo utilizado en el proceso de multiplicación fue una modificación de MURASHIGE Y SKOOG (1962). Las hormonas aplicadas para la multiplicación y enraizamiento de los explantes fueron benziladenina (BA) y ácido giberélico (GA_3), siendo 0.1 mg de BA y 1.0 mg de GA_3 las concentraciones más efectivas. En la etapa de aclimatación, el sustrato con mejores resultados fue la mezcla en partes iguales de arena de Lampa y Sunshine M16 5 Plug, alcanzando una sobrevivencia superior al 80%.

INTRODUCCION

El cultivo de muchas especies del género *Salix* ha aumentado considerablemente en las ultimas décadas en Europa y Estados Unidos debido, fundamentalmente, a su gran versatilidad de usos, alta producción de biomasa, elevada tasa de crecimiento, facilidad de establecimiento y resistencia a heladas (STOEHR *et al*, 1989).

En Chile la utilización comercial de especies del género *Salix* es todavía restringida pues la única especie nativa (*Salix humboldtiana*) no tiene una aplicación conocida y las pequeñas áreas cultivadas son monoespecíficas (*Salix viminalis*), especializadas sólo en la producción de varas para la fabricación de artesanía.

Para superar estas restricciones y potenciar el cultivo de *Salix* spp., el Instituto Forestal (INFOR) dentro de sus proyectos de diversificación forestal, introdujo desde Suecia una muestra de 25 procedencias de este género. El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) detectó en ellas la presencia de un hongo cuarentenario (*Diplodina microsperma*) y por lo tanto, determinó la eliminación preventiva de todas las plantas. Consecuentemente se procedió a desarrollar un programa de micropropagación, destinado al saneamiento de dicho material vegetal.

La micropropagación de meristemas foliares es en la actualidad una metodología ampliamente utilizada a nivel mundial para la multiplicación clonal de especies forestales (DHAWAN, 1993). Su exitosa aplicación se debe, básicamente, a su facilidad técnica y a la rápida

obtención de un gran número de plantas clonales en una pequeña superficie y en cualquier época del año (ESPEJO *et al*, 1990). Además, permite obtener plantas libres de organismos fitopatógenos lo que la hace una alternativa interesante para mantener y multiplicar masivamente especies valiosas que presenten algún problema sanitario.

OBJETIVOS

Uno de los principales objetivos de este estudio fue el rescate de 25 procedencias de *Salix* spp. con problemas cuarentenarios a través de las técnicas del cultivo de tejidos. Paralelamente se buscó la obtención de protocolos de desinfección, multiplicación, enraizamiento y aclimatación para cada una de las procedencias.

MATERIAL Y METODO

Material Vegetal. En el programa de micropropagación se utilizaron 25 procedencias de *Salix* spp. introducidas desde la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Uppsala, Suecia. La identificación de cada procedencia se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Identificación de las especies y procedencias de *Salix* spp. utilizadas en el programa de micropropagación.

Especies	Identificación de las Procedencias
S. stipularis (hib)	UK
Salix viminalis	UK BOWLES HIBRID
Salix viminalis	UK MULATIN
Salix viminalis	UK 445 DE BIARDII
Salix viminalis	SWE 78183
Salix viminalis	SWE 79046
Salix viminalis	SWE 78112
Salix triandra	UK Black Maul
Salix purpurea	CAN ONTARIO PUR12
China shrub	CAN. ONTARIO S-67
Belgicum Red	HOLANDA
Salix dasyclados	UK
Salix dasyclados	SWE 77056
Salix dasyclados	SWE 79097
Salix dasyclados	SWE 81090
Salix burjatica	UK KORSO
Salix burjatica	UK GERMANY
Salix burjatica	UK-83
Salix calodendron	UK
Salix sericans	UK COLES
Salix sericans	UK REIFENWEIDE
Salix eriocephala	CAN.ONTARIO 558
Salix eriocephala	CAN. ONTARIO ER63
S.eriocephala x pentandra	CAN. ONTARIO 601
S.eriocephala x exigua	CAN. ONTARIO 611

Medio de Cultivo: Tomando como base el medio nutritivo (MS) desarrollado por MURASHIGE Y SKOOG (1962) para plantas de tabaco, se probaron 3 diluciones (100%, 50%, 25%) del medio basal, presencia o ausencia de benziladenina (BA) y 3 concentraciones de ácido giberélico (GA_3).

El proceso de micropropagación fue llevado a cabo en tres etapas: desinfección del material vegetal, multiplicación y aclimatación.

La desinfección del material vegetal se realizó en una cámara de flujo laminar, donde ramillas de *Salix* spp., con aproximadamente 15 brotes, fueron sumergidas en una mezcla de fungicidas (Benlate 200mg/l; Captan 200 mg/l) por 30 minutos y tratadas con una solución de hipoclorito de sodio al 10% por períodos de 10, 20, 30 y 40 minutos. Los trozos fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril y finalmente las ramillas se dividieron tratando de dejar un par de meristemas foliares por corte.

Para la multiplicación, cada trozo desinfectado fue introducido en frascos con medio de cultivo MS para inducir el desarrollo de brotes foliares. Al cabo de 5 semanas, los frascos con abundantes brotes fueron seleccionados para su multiplicación. Los explantes fueron divididos y nuevamente cultivados en medio MS. Este procedimiento fue realizado hasta obtener 500 explantes para cada procedencia.

Durante toda la etapa de multiplicación, los explantes se mantuvieron en una sala con temperaturas que fluctuaron entre 21y 22°C y 16 horas de luz artificial (40uE/m^2s).

En cuanto a la aclimatación, los explantes que mostraron un adecuado desarrollo de raíces y follaje fueron sometidos al proceso de aclimatación. Para ello las plantas se extrajeron cuidadosamente de los frascos y con abundante agua se eliminaron los restos de medio adheridos a las raíces para evitar la proliferación de hongos.

Posteriormente, los explantes fueron transplantados a cubetas plásticas estériles (33cm x 20cm x 10cm) con aproximadamente 3.300 cm^3 de sustrato húmedo estéril. Se probaron tres tipos de sustrato: arena, vermiculita y una mezcla en partes iguales de arena de Lampa y mezcla Sunshine M16 5 Plug (70%-80% turba canadiense esfagnacea, perlita fina, dolomita, yeso agrícola y agentes humectantes).

Las cubetas fueron selladas con plástico (alusaplast) y se mantuvieron en una sala a 22°C y 16 horas de luz (40uE/ m^2 s). Al cabo de 7 días se iniciaron las aplicaciones de riego, fungicidas y fertilizante (MS al 50%). Cuando se verificó que las plantas respondían al sustrato, fueron gradualmente expuestas al medio ambiente externo antes de llevarlas al invernadero.

Monitoreo de las condiciones fitosanitarias. Durante todas las etapas de la micropropagación de *Salix* spp. se monitoreó la presencia de organismos, fitopatógenos, cuya identificación fue llevada a cabo en los laboratorios de SAG.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto de la desinfección del material vegetal. El tratamiento de desinfección que permitió mantener niveles de asepcia mayores al 70% consistió en sumergir las ramillas en una mezcla de fungicidas e hipoclorito de sodio al 10% por 30 y 20 minutos, respectivamente. El uso de cloro comercial por un período superior a 30 minutos provocó necrosis de los tejidos en todas las procedencias estudiadas.

Efecto de diferentes concentraciones de nutrientes en el medio basal. Para todos los medios de cultivo se mantuvo la misma composición química basal detallada en el cuadro 2, sólo se modificaron las concentraciones de los nutrientes en el medio (100%, 50% y 25%).

Después de una serie de ensayos se pudo determinar que las concentraciones de nutrientes al 100% y 50% mostraron un mejor desarrollo de los explantes existiendo escasa diferencia entre ellas. Por lo tanto, la concentración al 50% se mantuvo durante todo el desarrollo del programa de micropropagación.

Efecto de los reguladores de crecimiento. Se emplearon 3 dosis de GA_3 (0,1; 0,5 y 1,0 mg/l de medio de cultivo) en presencia o ausencia de BA (0,1 mg) y BA solo. Después de una serie de experimentos preliminares se determinó que los mejores tratamientos eran 1,0 mg de GA_3, 0,1 mg de BA y la combinación de ambas concentraciones hormonales. Tales resultados permitieron diferenciar las siguientes etapas en el proceso de multiplicación, inducción de brotes, elongación de brotes y desarrollo de raíces.

a) Inducción de brotes. La inducción de brotes varió según la procedencia y la hormona aplicada. Como se puede apreciar en el cuadro 3 el 60% de las procedencias estudiadas indujo brotes al aplicar 0,1 mg de BA al medio basal. Al cabo de 4 a 5 semanas mostraban 2 a 8 brotes foliares de 5 a 10 mm de largo (ejemplo ver Anexo figura 1).

De todas las procedencias que desarrollaron brotes en presencia de BA, sólo *Salix triandra* procedencia UK Black Maul, dio origen a una masa amorfa de hojas quebradizas (vitrificación). Este desorden fisiológico ha sido reportado en *Salix babylonica*, siendo atribuido a la aplicación de citoquininas como BA al medio basal (GASPAR *et al.*, 1987).

En la mayoría de las investigaciones sobre micropropagación de especies forestales se señala que BA estimula el crecimiento de brotes foliares (WOLTER, 1970; WINTON, 1968; BERGMAN *et al*, 1992; AHUJA, 1987; MINICHA, 1987). Estudios realizados

en diferentes clones de *Salix* spp. (BERGMAN et al, 1984;1992), en *S. exigua* (STOEHR *et al*, 1989) y en el híbrido *S. matsudana x alba* (BHOJWANI, 1980) demuestran que la aplicación de 0,1 mg/l de BA estimula la proliferación de aproximadamente 2-4 brotes por explante.

Similares resultados han sido descritos por AGRAWAL Y GEBHARDT (1994) para el híbrido *S. fragilis x lispoclados*, en el que la aplicación de 0,2 mg/lt de BA aumentó en 5 veces la proliferación de brotes. POPE et al, (1990), obtuvo una respuesta similar en *S. gooddingii* pero utilizando una mayor concentración de BA (0,4 mg/l). Además lado, un 28% de las procedencias desarrolló brotes cuando se aplicó al medio 0,1 mg de BA más 1,0 mg de GA_3 y sólo un 12% lo hizo en presencia de 1,0 mg de GA_3.

Al analizar más detalladamente el cuadro 3, se puede observar que existieron algunas diferencias intraespecíficas en la inducción de brotes. Es así como en *S. viminalis*, la procedencia UK445 DE BIARDII desarrolló un número óptimo de brotes en presencia de BA más GA_3 (figura 2). En *S. dasyclados* la procedencia UK fue la única que respondió a BA, mientras que cada una de las 3 procedencias de *S. burjatica* respondió a un tratamiento hormonal específico.

b) Elongación de brotes. La elongación de brotes fue afectada principalmente por el tratamiento hormonal y la procedencia. Las procedencias que presentaban una buena producción de brotes en presencia de BA, tuvieron a su vez una deficiente elongación de ellos.

Cuando se aplicó sólo GA_3 al medio, la mayoría de las procedencias de *Salix* originaron 1-3 brotes delgados y poco vigorosos en un período de 4-5 semanas. Este resultado influyó negativamente en la supervivencia de las plantas al momento de su aclimatación. Sin embargo, este tratamiento hormonal fue óptimo para un 24% de las procedencias (cuadro 3), las cuales lograron brotes más vigorosas comparados con los otros 2 tratamientos.

Si bien el GA_3 no ha sido muy utilizado en los trabajos de micropropagación de *Salix* spp., se sabe que estimula el desarrollo vegetativo pues permite la elongación y crecimiento de tallos (NIKELL, 1991). IHRIG Y BEIDERBECK (1995), describen el desarrollo de delgados brotes foliares en *S. alba* cuando es micropropagada en presencia de GA_3, lo cual es similar a los resultados obtenidos en este estudio.

La elongación de brotes fue óptima para la mayoría de las procedencias cuando ambas hormonas se aplicaron al medio basal. En estas condiciones un 76% de las procedencias mostraron brotes más vigorosos comparados con los otros tratamientos (cuadro 2; Anexo figura 3).

c) Desarrollo de raíces. La inducción de raíces se logró sin la presencia de auxinas, ocurriendo en forma paralela al crecimiento de los brotes del explante e independiente de la hormona utilizada en el medio.

Cuando se aplicó BA como único suplemento hormonal, algunas procedencias formaron raíces a pesar de que esta hormona ha sido asociada con la inhibición del desarrollo radicular (BERGMAN *et al.*, 1992; AHUJA, 1987). En *S. stipularis*, *S. triandra* y en algunas de las procedencias de *S. viminalis* y *S. burjatica* se observó un número inferior a 5 raíces por explante; mientras que en las demás procedencias su proliferación fue escasa o nula. El uso de GA_3 favoreció el desarrollo de raíces en todas las procedencias, sin embargo, el crecimiento de éstas, asociadas a un buen desarrollo de la parte aérea, sólo se dio en 6 procedencias (cuadro 2).

Como se puede apreciar en las figuras 2 y 3, el mayor número de raíces se observó cuando GA_3 más BA fueron aplicadas al medio.

Cuadro 2. Medios óptimos utilizados en las etapas de inducción, elongación y enraizamiento de las distintas especies y procedencias de *Salix* spp.

Especies	Identificación de las Procedencias	Inducción			Elongación y Enraizamiento		
		a	b	c	a	b	c
S.stipularis(hib)	UK	+				+	
Salix viminalis	UK BOWLES HIBRID	+					+
Salix viminalis	UK MULATIN	+					+
Salix viminalis	UK 445 DE BIARDII		+				+
Salix viminalis	SWE 78183	+				+	
Salix viminalis	SWE 79046	+				+	
Salix viminalis	SWE 78112	+				+	
Salix triandra	UK Black Maul	+				+	
Salix purpurea	CAN ONTARIO PUR12		+			+	
China shrub	CAN. ONTARIO S-67	+				+	
Belgicum Red	HOLANDA	+				+	
Salix dasyclados	UK	+				+	
Salix dasyclados	SWE 77056		+			+	
Salix dasyclados	SWE 79097		+			+	
Salix dasyclados	SWE 81090		+			+	
Salix burjatica	UK KORSO		+			+	
Salix burjatica	UK GERMANY	+				+	
Salix burjatica	UK-83			+			+
Salix calodendron	UK		+			+	
Salix sericans	UK COLES	+				+	
Salix sericans	UK REIFENWEIDE	+				+	
Salix eriocephala	CAN.ONTARIO 558	+				+	
Salix eriocephala	CAN. ONTARIO ER63	+				+	
S.eriocephalax pentandra	CAN. ONTARIO 601			+			+
S.eriocephala x exigua	CAN. ONTARIO 611			+			+
Porcentaje		**60**	**28**	**12**	**0**	**76**	**24**

Nota : a= MS + 0,1 mg de BA; b= MS + 0,1 mg de BA + 1,0 mg de GA_3; c=MS + 1,0 mg de GA

Finalmente es necesario señalar que durante la etapa de elongación de brotes y enraizamiento, el tratamiento hormonal óptimo fue aquel que permitió obtener explantes con un desarrollo más equilibrado entre la parte aérea y radicular, lo cual facilitó su posterior aclimatación.

Aclimatación. Durante el proceso de aclimatación se evaluaron 3 tipos de sustratos: vermiculita, arena y mezcla de arena con mezcla Sunshine.

La vermiculita y la arena permitieron inicialmente un buen desarrollo de las plantas. Sin embargo, al cabo de algunas semanas se produjo una elevada mortalidad (>50%) debido a una excesiva retención de humedad, deficiente desarrollo de la masa radicular y una elevada proliferación de hongos.

La combinación de arena más mezcla Sunshine dio los mejores resultados, por lo tanto, este sustrato se siguió utilizando durante toda la etapa de aclimatación.

Tomando en cuenta estas consideraciones, los explantes con un buen desarrollo de follaje y raíces fueron transplantados a cajas de plástico con aproximadamente 3.300 cm^3 de sustrato húmedo y estéril (Anexo figura 4). Las cajas fueron selladas con plástico (alusaplast) por una semana, luego de lo cual se comenzó la aplicación de fertilizante y fungicida. Después de 10 días de crecimiento, las plantas fueron gradualmente expuestas a condiciones de menor humedad relativa.

Uno de los aspectos críticos durante la aclimatación es la regulación del tiempo de exposición de las plantas a las condiciones ambientales externas, para evitar la elevada mortalidad que se produce durante esta etapa, la que se debería, principalmente, a las anormalidades morfológicas que presentan las plantas cultivadas *in vitro* (ausencia de cutícula cerosa, reducido número de tricomas y estomas constantemente abiertos). En estas condiciones, las plantas mantienen una elevada tasa de evapotranspiración, por lo tanto, si no se manejan adecuadamente las condiciones de humedad relativa, se produce una excesiva mortalidad por efecto de la deshidratación (DONNELLY Y TISDALL, 1993).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la mejor estrategia de aclimatación (>80% de supervivencia) fue acondicionar las plantas lentamente durante 45 días. En el transcurso de este período las plantas fueron expuestas al medio externo por 20 min, 2h, 5h y 10h durante la primera, segunda, tercera y cuarta semanas, respectivamente, dejándolas definitivamente expuestas al medio externo por el resto del tiempo.

Las plantas aclimatadas fueron transplantadas a bolsas individuales con una mezcla en partes iguales de corteza de pino y arena (Anexo figura 5), y luego fueron llevadas a invernadero para continuar con su crecimiento y endurecimiento.

Condiciones Fitosanitarias. Durante la etapa de multiplicación *in vitro*, se apreció aproximadamente un 3% de mortalidad debido a contaminación por bacterias y hongos de los géneros *Penicillium*, *Botritis* y *Aspergillus*.

En el proceso de aclimatación el ataque por hongos fue otro factor importante que generó pérdida de plantas (> 50%). Como medida preventiva durante todo este proceso se aplicó fungicida (Benlate 200mg/l y/o Captan 200 mg/l) 2 veces por semana, reduciendo la mortalidad a menos de un 10%. Además, para favorecer un mayor crecimiento de las plantas se realizaron fertilizaciones foliares semanales con medio MS al 50%.

En el transcurso de las etapas de multiplicación, aclimatación y crecimiento en invernadero, el SAG verificó la ausencia del hongo cuarentenario *Diplodina microsperma*, por lo que las plantas fueron liberadas de la cuarentena fitosanitaria.

CONCLUSIONES

La desinfección del material vegetal con fungicidas e hipoclorito de sodio permitió mantener una baja incidencia de agentes fitopatógenos y la eliminación total del hongo cuarentenario *Diplodina microsperma*.

El uso del medio MS dio excelentes resultados para las 25 procedencias de *Salix* spp. Sin embargo, se observaron algunas diferencias intra e interespecificas en la inducción de brotes, elongación y enraizamiento de los explantes dependiendo del tratamiento hormonal aplicado.

Un 60% de las procedencias indujo brotes cuando se aplicó 0.1 mg de BA al medio. Mientras que para un 28% y 12% de las procedencias los resultados fueron óptimos al utilizar 0,1 mg de BA + 1,0 mg de GA_3 y 1,0 mg de GA_3, respectivamente.

En la etapa de elongación la aplicación de 0,1 mg de BA + 1,0 mg de GA_3 permitió un desarrollo rápido y vigoroso de un 76% de las procedencias (más de 1 brote por explante). Las restantes procedencias (24%) presentaron un mejor crecimiento cuando se utilizó 1,0 mg de GA_3 en el medio, pero a diferencia del anterior tratamiento, la mayoría de los explantes elongaron un brote.

La formación de raíces se obtuvo sin la aplicación de auxinas y fue paralela al crecimiento aéreo de los explantes. Si bien la aplicación de BA generó raíces y un gran número de brotes en la mayoría de las procedencias, su lento desarrollo aéreo limitó severamente su éxito en la etapa de aclimatación. En términos generales, el tratamiento hormonal empleado para la elongación de brotes fue utilizado a su vez para generar un adecuado crecimiento radicular.

Una etapa crítica en el proceso de micropropagación de *Salix* spp. fue la aclimatación, donde tuvieron especial importancia el tipo de sustrato utilizado y la estrategia de acondicionamiento al medio externo. El uso en partes iguales de arena de Lampa y una mezcla comercial de turba (Sunshine) mostró ser un sustrato poroso y liviano, que permitió un adecuado crecimiento de las plantas. La estrategia de acondicionamiento fue llevada a cabo a través de la exposición gradual del material vegetal al ambiente externo. En estas condiciones se obtuvo una sobrevivencia mayor al 80%.

Sin lugar a dudas, el material aséptico producido mediante el cultivo *in vitro* es el método más eficiente para importar material vegetal libre de organismos fitopatógenos. No obstante, el ingreso de plantas o segmentos sin la incorporación de esta tecnología es riesgosa por la posible contaminación del material. En tales circunstancias el país tiene la obligación de aplicar los mecanismos de resguardo correspondientes, como la cuarentena fitosanitaria. Esta medida impide el uso inmediato del material hasta el levantamiento de la cuarentena. Si durante este período, se detecta la presencia de algún organismo patógeno cuarentenario, el material tiene que ser completamente eliminado.

Sin embargo, como ha quedado demostrado en este estudio, la utilización del cultivo *in vitro* permite el rescate de material valioso, eliminando en forma rápida y eficiente la presencia de organismos patógenos. Además, el trabajo es desarrollado en un mínimo de espacio, obteniéndose plantas en forma constante durante todo el año, lo que permitiría aplicar esta metodología a situaciones similares, especialmente cuando el material vegetal es valioso y no existe otra alternativa capaz de rescatarlo en un corto lapso de tiempo.

BIBLIOGRAFIA

AHUJA, M.R. 1987. In vitro propagation of poplar and aspen. Dordrecht, Netherlands. In: Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Case histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms Martinus Nijhoff Publishers. v 3, pp: 207-220

AGRAWAL, DC ; GEBHARDT, K. 1994. Rapid micropropagation of hybrid willow (Salix) established by ovary culture. Journal-of-Plant-Physiology. 143 (6):763-765.

BERGMAN, L; ARNOLD, S ; ERIKSON, T. 1984. Culture of Salix species in vitro. Rapport,-Avdelningen-for-Energiskogsodling,-Institutionen-for-Ekologi-och-Miljovard,-Sveriges-Lantbruksuniversitet. No. 36, 26 p.

BERGMAN, L.; ARNOLD, S ;ERICKSON, T. 1992. Culture of Salix species in vitro. Florence, Italy. In Hall, D. O., Grassi, G. y Scheer, H. (eds.). Proceedings of 7th International Conference on Biomass for Energy and Industry, 5-9 October. 28 p.

BHOJWANI, S.S. 1980. Micropropagation method for a hybrid willow (Salix matsudana x alba NZ-1002). New Zealand Journal of Botany 18: 215-220.

DHAWAN, V. 1993. Micropropagation of nitrogen-fixing trees. Dordrecht, Netherlands. In: Ahuja, M.R. (ed.).

Micropropagation of woody plants (Forest science v.41). Kluwer academic publisher, Pp: 303-315.

DONNELLY, D.; TISDALL, L. 1993. Acclimatization strategies for micropropagated plants. Dordrecht, Netherlands. In Ahuja, M.R. (ed.). Micropropagation of woody plants (Forest science v.41). Kluwer academic publisher. Pp:153-166

DRIVER, J. A ; SUTTLE, G.R.L. 1987. Nursery handling of propagules. Dordrecht, Netherlands. In Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. Specific principles and methods: growth and developments. Martinus Nijhoff Publishers. v 2, pp: 320-335.

ESPEJO, J.; ARCE, P.; ROJAS P. 1990. Perspectivas del uso de la micropropagación en la silvicultura. Revista Chile Forestal, Documento Técnico nº 44. 7p.

GASPAR, TH.; KEVERS, C.; DEBERGH, P.; MAENE, L.; PAQUES, M. ; BOXUS PH. 1987. Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. Dordrecht, Netherlands. In Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (eds.). General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers. v 1, pp: 152-166.

IHRIG, D. ; BEIDERBECK, R. 1995. In vitro culture of ‚Wirrzopf' tissue of Salix alba L. Journal-of-Plant-Physiology 145: 1-2:178-180.

MINICHA, S.C. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of forest trees. Dordrecht, Netherlands. In: Bonga, J.M. y Durzan, D.J. (eds.). Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff Publishers. v 1, pp: 50-66.

MURASHIGE,T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

NICKELL, L. 1991. Use of growth regulating chemical.. New York, USA. In: Raghavendra, A.S. (ed.). Physiology of Trees. John Wyley and Sons, Inc.,. Pp: 467-487.

POPE, D.P.; BROCK, J.H. ; BACKHAUS, R.A. 1990. Vegetative propagation of key southwestern woody riparian species. Desert-Plants 10(2): 91-95.

STOEHR, M.U.; CAI, M.; ZSUFFA, L. 1989. In vitro plant regeneration via callus culture of mature Salix exigua. Can. J.For. Res. 19:1634-1638.

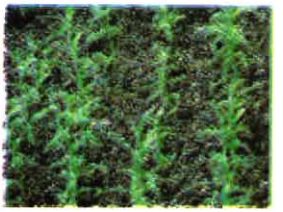
WINTON, LL. 1968. Plantlet formation from aspen tissue culture. Science 160: 1234-1235.

WOLTER, J. 1970. Root and initiation in aspen callus cultures. Science 219: 509-510.

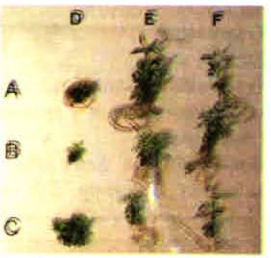
ANEXO



1.Desarrollo de Salix burjatica (Procedencia UK GERMANY) en medio MS más 0.1 mg de BA.



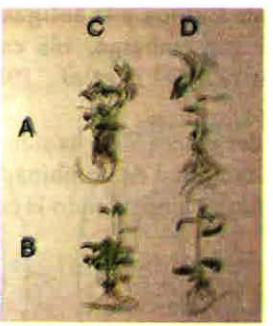
4.Plantas de Salix stipularis (hib).Procedencia UK creciendo en arena más mezcla Sunshine (1:1).



2.Efecto de 3 tratamientos hormonales sobre el desarrollo de 3 procedencias de Salix spp.: A= Salix burjatica (UK GERMANY); B= Salix viminalis (UK 445 DE BIARDII); C= Salix viminalis (UK MULATIN); D= MS + 0.1 mg de BA; E= MS + 1.0 mg de GA_3 + 0.1 mg de BA; F= MS + 1.0 mg de GA_3



5.Planta de Salix sericans Procedencia UK COLES. creciendo en arena más corteza de pino (1:1).



3.Efecto de 2 tratamientos hormonales sobre el desarrollo de 2 procedencias de Salix spp: A= Salix burjatica (UK KORSO); B= Salix dasyclados (SWE 77056); C= MS + 1.0 mg de GA_3 + 0.1 mg de BA; D= MS + 1.0 mg de GA_3

CLASIFICACION TAXONOMICA DE ESPECIES DEL GENERO *Salix*

Patricio Chung G.[1]

1 Ing. Forestal, Subgerencia de Tecnologías Silvícolas, Instituto Forestal, INFOR, Chile.

RESUMEN

Dada la importancia de algunas especies de *Salix* en el abastecimiento tanto de mimbre como de otras materias primas, es fundamental conocer sus características taxonómicas para su identificación, puesto que el material suministrado por cada una de estas especies e híbridos poseen cualidades diferentes (VICIOSO, 1951).

El presente trabajo presenta los resultados del estudio realizado en *Salix* spp. basado en aspectos referentes a características de las hojas, tallos, flores y estípulas para clasificar taxonómicamente los sauces empleados en el proyecto "Desarrollo Integral del Cultivo y la Industrialización del Sauce- mimbre", ejecutado por el Instituto Forestal (INFOR).

Este conocimiento permitirá establecer que especie de las identificadas, puede ser utilizada para una determinada actividad, obteniendo con ello mayor seguridad en sus usos y aplicaciones.

En los sauces estudiados se encontraron similitudes con *Salix alba*, *Salix viminalis*, *Salix purpurea*, *Salix caprea*, *Salix humboldtiana*, *S. humboldtiana* var. *fastigiata*, *S. x rubens (S. alba x S. fragilis)*, y *S. alba* var. *vitellina*.

INTRODUCCION

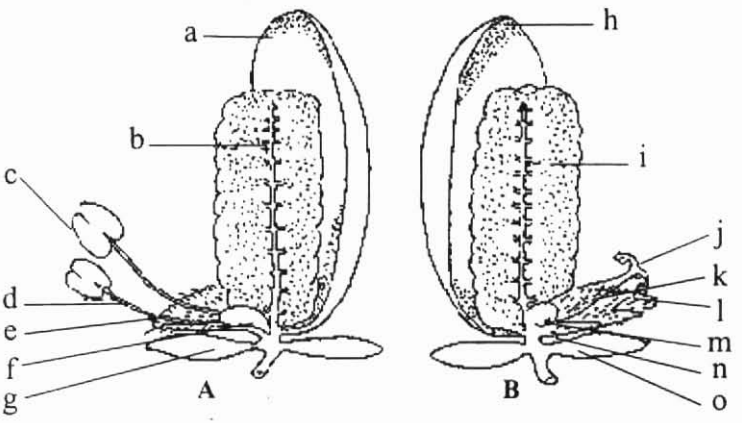
La taxonomía de los sauces ha sido estudiada por aproximadamente dos siglos, obteniéndose aportes interesantes para el reconocimiento de las especies e híbridos. Tales son los casos de Skvortsov (1968), para sauces de Europa y la antigua U.S.S.R.; y Dorn (1976) para los sauces de América del Norte. Sin embargo, aún existe un gran desconocimiento sobre todo de los sauces asiáticos (ZSUFFA *et al.*, 1984).

Tradicionalmente, la identificación del género *Salix* ha sido difícil, ya que a la gran variedad de especies existentes, se suma la facilidad de combinación entre ellas en un ambiente natural, formando numerosos híbridos y aumentando la complejidad de su clasificación.



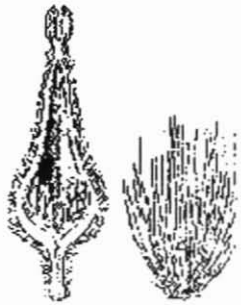
Distribución mundial de *Salix* spp.
Salix deriva de la palabra Celta sallis (sal=cerca; lis=agua). Dentro del género *Salix* existen cerca de 400 especies y más de 200 híbridos conocidos. En el presente, el género *Salix* se encuentra en casi todo el mundo, siendo abundante en las Islas Británicas, Europa, Asia, Japón, China, América del Norte, y Canadá. Existen también como plantas enanas alpinas en el Artico. En América del Sur, *S. humboldtiana* es su principal especie. En el caso de América Central, existen 9 especies endémicas que se encuentran en México, Guatemala y Puerto Rico. Otras especies de *Salix* se ubican en la India, Egipto y ciertos lugares del Norte de Africa, existiendo en Africa tropical 12 especies, de las cuales 10 son endémicas. En Australia existen especies de *S. alba* y *S. fragilis*, híbridos de las dos especies y un cierto número de otras especies que han sido recientemente importadas por Nueva Zelanda. Especies de *Salix*, en su mayoría nativas, se han encontrado en las islas de Greenland, Terranova, e Islandia. Otro pequeño número está presente en las islas tropicales de Ceilán, Islas Canarias, Madeira, las Filipinas, y Madagascar.

El género *Salix* está constituido mayoritariamente de árboles y arbustos deciduos que presentan amentos, usualmente firmes y rectos, abiertos, ocasionalmente encorvados o raramente caídos. Cada amento está compuesto de gran cantidad de pequeñas flores compactas, todas protegidas por una escama floral, las que pueden ser enteras, dentadas, glabras o peludas y varían en color de acuerdo a la especie.



A: Amento masculino
(a) Escama del brote;
(b) Raquis;
(c) Antera;
(d) Filamento;
(e) Escama floral;
(f) Nectario;
(g) Bractea.

B: Amento femenino
(h) Escama del brote;
(i) Raquis;
(j) Estigma;
(k) Estilo;
(l) Ovario;
(m) Escama floral;
(n) Nectario;
(o) Bractea.



C D

C: Sección longitudinal de un ovario de Salix sp. *Se presentan 2 carpelos concrescentes en un ovario unilocular, con placentas parietales y numerosos rudimentos seminales anátropos.*

D: Semilla de Salix sp. *En la cápsula se presentan numerosas semillas diminutas, con gran cantidad de pelos y sin tejido nutricio. Es posible alargar su conservación guardándolas en recipientes cerrados con bajo contenido de humedad.*

De acuerdo a Newsholme (1992), el género *Salix* consta de 3 subgéneros principales:

Subgénero *Salix* (Amerina) o sauce verdadero: tipicamente árboles rectos, semipéndulos o péndulos y grandes arbustos con hojas angostas, acuminadas y serradas. Los amentos aparecen desde las puntas de los brotes, en un brote axilar producido por un tallo del año anterior. Los tallos florales varían en longitud, teniendo hojas normales sin crecimiento de brotes axilares. Los amentos poseen escamas florales uniformemente coloreadas. Pueden encontrarse 2 o más nectarios en flores masculinas y 1 a 2 en las femeninas.

Subgénero *Caprisalix* (Vetrix), mimbreras y sargas: arbustos y árboles pequeños con una gran variación en las hojas, algunas angostas, acuminadas, oblongas, obovadas o redondeadas, con márgenes enteros o toscamente serrada o dentadas. Los amentos son frecuentemente precoces y sésiles emergiendo desde cicatrices de hojas del año anterior sobre ramas desnudas. Tanto la flor masculina como femenina posee un solo nectario. La punta de las escamas florales es a menudo de color café oscuro, y el ovario es peludo en muchas especies.

Subgénero *Chamaetia*: arbustos enanos, rastreros, árticos o de montaña con pequeñas hojas redondeadas o romas. Los amentos son producidos en la punta de un tallo con crecimiento ordinario sosteniendo brotes axilares normales. Las escamas florales son frecuentemente teñidas con rosado, rojo o purpúrea, y los nectarios están unidos.

Características botánicas para la identificación de las especies del género *Salix*

Amentos. Los *Salix* son deciduos, poseen sexos separados, obteniéndose plantas masculinas y femeninas. Excepcionalmente las flores de un amento pueden ser bisexuales o producir flores masculinas y femeninas al mismo tiempo, como en el caso de *S. aegyptiaca*. Existe una gran variación entre la longitud y forma de los amentos de acuerdo a la especie. Un rasgo específico es la relación entre la producción de hojas y de amentos. Cuando los amentos son producidos antes que las hojas, como en *S. viminalis* y *S. daphnoides*, el término descriptivo es precoz. Cuando las hojas y los amentos se producen en sincronía, se utiliza el término coetáneos, como en *S. alba*, *S. babylonica* y *S. amygdaloides*. Cuando los amentos aparecen después de las hojas, las cuales están bien formadas, se les denomina serotinos, como *S. pentandra* y *S. triandra*. En *S. bockii* es excepcional ya que la producción de amentos es a fines de otoño, mientras otros como *S. triandra 'Semperflorens'*, produce algunas flores durante toda la primavera y el verano.

Glándulas. Entre las flores se sitúan pequeños nectarios o glándulas, encontrándose también en la axila de las escamas florales. En algunas especies estas glándulas pueden ubicarse en la punta del peciolo.

Organos reproductivos femeninos. Las flores femeninas poseen un solo ovario que contiene 2 placentas parietales a las cuales los óvulos se adhieren. El ovario es elevado sobre un pedicelo o puede ser sésil. De acuerdo a las especies el ovario varía en forma y puede ser glabro, con pelos en forma espaciada o colocados densamente. El estilo es solitario, corto, algunas veces bifurcado en la parte superior o no está presente en algunas especies. Existen 2 estigmas, usualmente dividido en 2 lóbulos. Cuando madura el ovario forma una cápsula dehiscente con 2 ó 4 valvas. Las semillas son numerosas, muy pequeñas y poseen un penacho de largos pelos que le sirven para la dispersión por viento.

Organos reproductivos masculinos. En las flores masculinas, el número de estambres varía de 1 a 20. Muchas especies tienen 2 estambres, *S. triandra* tiene 3, *S. pentandra* 5 a 8 y *S. humboldtiana* 8 a 20 estambres. *S. purpurea* y *S. sitchensis* tienen parcial o completamente filamentos unidos con un solitario estambre. Los amentos de unos pocos *Salix* del Ártico, tienen un reducido número de flores. *S. rotundifolia* generalmente tiene sólo 3. Los brotes florales en algunas especies son generalmente cortos, con pocas hojas rudimentarias o bracteas debajo del amento. Los brotes de invierno son protegidos por una escama solitaria no resinosa; brotes terminales se presentan sólo en algunas especies enanas.

Hojas. Las hojas son deciduas a excepción de algunos como *S. myrsinites* que regularmente retiene sus hojas hasta la aparición de las nuevas la siguiente primavera. Las hojas de los *Salix*, muestran un marcado rango de variación entre especies en tamaño, textura y forma. El rango de tamaño se extiende desde los 5 a 10 mm de longitud hasta los 25 cm de largo por 12 cm de ancho. Existe una marcada diferencia de textura y grosor. Las hojas son simples con peciolos relativamente cortos y márgenes dentados, denticulados o enteros. Se presentan pelos por debajo o por encima de las hojas, mientras que la superficie frecuentemente es glabra y algunas veces brillante. La superficie de abajo de muchas especies es glauca de un color gris azulado. Las hojas jóvenes a menudo presentan coloraciones rosas, purpúreas o café, son de fina estructura y frecuentemente cubiertas con muchos pelos delgados (pubescentes) que pueden dispersarse con la maduración. El rango en la forma de las hojas va desde largas, lanceoladas, cónicas, hasta las orbiculares o circulares de *S. tarraconensis* y varias especies alpinas. La formación de las hojas es generalmente alterna, pero en el caso de *S. purpurea* y especies relacionadas a ésta, pueden ser opuestas.

Estípulas. Las estípulas corresponden a pequeños foliolos rudimentarios y se encuentran en muchos *Salix*, son sésiles, unidos en la conjunción entre el peciolo y el tallo. Estos son deciduos, sólo se presentan en brotes jóvenes o son persistentes, asignándole una identificación de las especies por sus características en tamaño, forma y márgenes.

Corteza. Existen variaciones en el color y textura de la corteza entre las especies.

OBJETIVOS

Validar la identificación preliminar de una colección de sauces utilizados por el Instituto Forestal en ensayos a lo largo del país.

MATERIAL Y METODO

El trabajo fue desarrollado en el vivero Parque las Palmeras, de propiedad de la Municipalidad de Renca, en la ciudad de Santiago, Chile. El material utilizado correspondió a 13 individuos pertenecientes a diferentes especies del género *Salix*, de 18 meses de edad, provenientes

de estacas leñosas de 30 cm de longitud, que fueron establecidas en platabandas a 50 cm de distancia entre sí, completando un total de 10 estacas por especie.

La identificación preliminar de los sauces utilizados en los ensayos se presenta en el cuadro 1.

Cuadro 1. Identificación preliminar de especies del género *Salix*

Especie N°	Identificación Preliminar	N° de individuos
1	*Salix alba*	1
2	*Salix purpurea*	1
3	*Salix viminalis*	4
4	*Salix cinerea*	2
5	*Salix humboldtiana* var. s/i	1
6	*Salix humboldtiana*	2
7	*Salix alba*	1
8	*Salix fragilis*	1

s/i: variedad sin identificar

Cada una de las especies fue observada durante su ciclo de crecimiento, realizándose anotaciones referentes a características taxonómicas relevantes, que pudieran servir para la identificación; confirmando o rechazando la identificación preliminar llevada a cabo al inicio de los trabajos. La validación taxonómica se basó en características de los principales órganos de la planta, como: tallos, hojas, flores, glándulas, estípulas y otras. Estos datos fueron comparados con los antecedentes obtenidos de las posibles especies parentales, descritas en el Anexo.

RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se realiza una descripción de cada una de las especies estudiadas, de acuerdo a características de las hojas, flores, tallos y otros datos que sirvieron para su identificación.

Especie 1: Identificación preliminar *Salix alba*

Floración Desde fines de septiembre a mediados de octubre. Flores femeninas cuya floración es de tipo coetánea. El amento es de 6 cm de largo por 0,5 cm de ancho; raquis verde y pubescente con pelos claros y cortos al igual que el pedúnculo. La flor posee un ovario sésil a cortamente pedunculado de color verde y glabro, siendo su estilo corto y el estigma de color verde claro el cual se divide en lacinias ligeramente recurvadas. Presenta una escama de color verde claro y poco pubescente de 0,3 cm de largo y un nectario aplanado que abraza la mitad de la base del ovario, de un color cristalino verde amarillento. La flor alcanza un largo aproximado de 0,35 cm.

Follaje Las hojas son alternas de 10 a 15 cm de largo por 2-3 cm de ancho presentando un pedúnculo corto de 0,7 a 1 cm de largo de un color verde amarillento. Presencia de estípulas pequeñas de 3 a 5 mm de color verde, acuminadas y dentado glandulosas. En ramillas nuevas se presenta algo de pubescencia de color verde a café. Las hojas son de color verde y algo lustrosas en su cara superior y verde claro y opaco en su parte inferior por la presencia de pubescencia. Presenta orillas con un aserrado fuerte y glandulosas. Las hojas nuevas presentan una forma oval para luego pasar a un estado oval lanceolada. Caduco.

Ramas Las ramas van desde un color café rojizo en su base hasta pasar a un tono amarillo anaranjado a medida que se llega a la punta, además de una escasa pubescencia. Presenta yemas de color café a café rojizo, con una pequeña depresión en la punta. Presenta ramas largas las cuales se ramifican en su tercio inferior. Tiende a seguir produciendo brotes desde la base de las ramas.

La especie 1, presenta una gran similitud con las características de *Salix alba*. Las diferencias son: la poca presencia de pubescencia en brotes, ramillas y yemas, y el tono amarillento de las ramas.

Especie 2: Identificación preliminar *Salix purpurea*

Floración Desde mediados de septiembre hasta mediados de octubre. Flores femeninas. La floración es precoz. El amento presenta un largo de 3 cm por 0,5 cm de ancho, además de un raquis de color verde pubescente. El ovario es sésil, pubescente, presentando un estilo corto y un estigma de color morado rojizo. La escama es pubescente y de 1 mm de largo. Posee en su extremo un color negruzco, siendo verde en su base. La flor mide 2 mm de altura y posee un nectario el cual se divide en 3 puntas.

Follaje Hojas lineares de 4 a 5,5 cm de largo por 1 a 1,3 cm de ancho de color verde oscuro-opaco en su cara superior y un verde plomizo en su cara inferior. Son opuestas a levemente alternas. Presentan un aserrado suave. Cortamente pedunculadas alcanzando los 2 a 3 mm de largo y leve tono rojizo en su cara inferior. Caduco.

Ramas Las ramas son de un color plomizo en su parte inferior tomándose café rojizo a morado a medida que aumenta la altura de la rama. No presentan ramificaciones en el primer año o son muy escasas. Presenta tendencia a brotar en su base. Las ramillas nuevas son de un color café rojizo en su lado asoleado, siendo verdoso en el lado sombrío.

En la especie 2, la forma, colorido y posición de las hojas tiene un similitud muy cercana con *S. purpurea*. Existe una sola diferencia dada por la forma del nectario, el cual posee tres puntas obtusas a diferencia de *S. purpurea*, la cual presenta un nectario aovado-oblongo.

Especie 3 : Identificación preliminar *Salix viminalis*

Floración Su floración en la zona central transcurre entre septiembre y mediados de octubre. Flores femeninas. Floración de tipo precoz. Estos amentos son laterales, erectos, sésiles. Son cilíndricos, obtusos, de 4 a 6 cm por 10 a 12 mm, floración centrífuga y raquis pubescente; escamas oblongas, agudas y a veces casi redondeadas, blanco a rosadas en la base, negruzcas en el ápice y largos pelos; 1 nectario largo, estrecho, un poco recurvado. La flor femenina presenta un ovario ovoide a cónico, con un pequeño pedúnculo pubescente; 1 nectario linear, levemente arqueado hacia el

raquis; estilo lampiño, casi tan largo como el ovario; estigmas amarillos, filiformes, poco más cortos que el estilo y divididos.

Follaje Hojas linear lanceoladas de 12 a 14 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho con márgenes irregulares y nervación central amarillenta. Un poco redondeado en su base y largamente acuminada en su ápice. Hojas caducas, alternas, con peciolo corto que alcanza un máximo de 1 cm de largo; de color verde oscuro y un poco brillante en la cara superior, plateado en la inferior debido a la presencia de abundante pubescencia. Estipulas caducas, pequeñas, de color verde claro, de 0,5 cm de largo, linear-lanceoladas, largamente acuminadas y ligeramente aserradas.

Ramas Alcanza los 4 a 5 m de altura. Posee ramas largas y flexibles, aterciopeladas al inicio, de color verde opaco y finalmente de un verde amarillento. Ramas gruesas con la corteza lisa y verdosa o gris pardusca, con gran cantidad de lenticelas. Yemas semiaovadas, de ápice romo, aterciopeladas, finalmente pardas, adosadas a las ramas.

Las características de esta especie son similares a las de la especie *Salix viminalis*. Las flores femeninas, predominantes en todas las plantas de esta especie, presentan una flor característica de color verde a verde-amarillento. Este último color, dado por los estigmas de color amarillo cristalino al estar receptivas. Las ramas de color verde presentan gran cantidad de lenticelas. Las hojas linear - lanceoladas son de tono verde oscuro en su cara superior y plomizo en el envés, por la gran pubescencia.

Especie 4: Identificación preliminar *Salix cinerea*

Floración Desde mediados de agosto a mediados de octubre. Floración de tipo precoz.
Flores masculinas, presentan 2 estambres libres de 1,3 cm de largo, teniendo un solo nectario de color verde claro. La escama es de 0,5 cm de largo, pubescente, de color café oscuro en la mitad superior y verde claro en su parte inferior. El conjunto floral alcanza una longitud mayor a los 5 cm por 1,8 cm de ancho. El conjunto de flores es muy llamativo en estos clones resaltando un fuerte color amarillo brillante.
En las flores femeninas, el ovario es de color verde, poco pubescente y alargado con un corto estilo dividido en 2 y el estigma en forma de V. Presenta una escama pubescente llegando a la mitad del largo de la flor, presentando un color café oscuro en su parte superior y un verde claro en la inferior. La flor posee una longitud de 0,5 cm y un solo nectario. El conjunto floral alcanza los 3 cm de largo por 1 cm de ancho. Presentan un largo pedicelo.

Follaje Las hojas son alternas de 11 a 13 cm de largo por 3 a 4 cm de ancho; con un peciolo de color verde de 5 a 6 mm de largo. Al inicio las hojas presentan un color verde oscuro y muy pubescente, para luego pasar a un verde lustroso y con poca vellosidad en su parte superior. En el envés de la hoja se presenta un verde claro, opaco dado por la cantidad de vellosidad. Al iniciar el crecimiento de las hojas nuevas, se pueden apreciar estípulas grandes de aproximadamente 1 cm de largo, que van desapareciendo a medida que envejece la hoja. Caduco.

Ramas Ramas de color verde en su tercio inferior, para luego tornearse hacia la punta de un color café rojizo. Presenta prominentes yemas florales de color café a café rojizo en la mitad superior de las ramas. En su mitad inferior se presentan yemas pequeñas y aplanadas de color verdoso las que corresponden a yemas foliares. Las ramas de un año presentan pocas a escasas ramificaciones. Las ramas nuevas presentan gran pubescencia dándoles un color verde plomizo. Bajo la corteza, se aprecia en la madera una superficie lisa.

La especie 4, clasificada inicialmente como *Salix cinerea*, se asemeja mucho por su floración de color amarillo oro en plantas masculinas, tanto a *Salix cinerea* como a *Salix caprea*.

S. cinerea, de acuerdo a Cremer (1995), presenta de 10 a 15 venas en las hojas, y la madera bajo la corteza presenta estrías. La especie 4 presenta de 10 a 12 venas en sus hojas, encontrándose bajo la corteza una madera lisa, por lo que se rechaza la identificación preliminar, identificándose esta especie como *S. caprea*.

Especie 5: Identificación preliminar *Salix humboldtiana*, var. s/i

Floración Florece desde inicios de septiembre hasta mediados de octubre. Flores masculinas. Floración de tipo coetánea. Presenta 4 a 7 estambres de 3 a 5 mm de largo, pubescentes, soldados en su base y con 5 nectarios de color amarillo rojizo. El raquis glabro es de color verde con algunas tonalidades rojizas. La escama es verde de 1,5 mm de largo y escasamente pubescente.

Follaje Las hojas de 6-10 cm de largo por 5 a 6 mm de ancho presentan forma linear lanceoladas, acuminadas, finamente serradas de color rojizo y base aguda. Las hojas son alternas, siendo las ramillas de color café rojizo. Presenta peciolos cortos de 3 a 5 mm de largo, con un color rojizo en gran parte de su longitud. Es perenne, perdiendo solamente las hojas de los dos tercios inferiores. Presenta estipulas muy pequeñas menores a 1 mm de color verde amarillento.

Ramas Tallo de color verde plomizo, de gran rectitud, presentándose pocos fustes por planta. Las ramillas son delgadas y puestas en un ángulo agudo con respecto al fuste, de color amarillo verdoso torneándose rojizo en su parte superior. No presenta poda natural, quedando insertas en el tronco. Las ramillas más finas mueren mientras que las gruesas logran brotar al año siguiente.

La especie 5, presenta características que la asemejan a la identificación inicial, basadas en el número de estambres (4 a 7) y el número de nectarios (5). Además de sus hojas linear - lanceoladas con borde aserrado, acuminadas y base aguda. Sin embargo, existen diferencias dadas por las pocas ramificaciones laterales gruesas y crecimiento extremadamente monopódico. Además de presentar un follaje que es perenne en el tercio superior del fuste.

Del Fierro *et al.*, (1998), citando a Donoso (1978), menciona la variedad *Salix humboldtiana* Willd. var. *fastigiata* André, de crecimiento monopódico que crece principalmente en la zona de Copiapó, la cual concordaría con las características identificadas en la especie 5.

Especie 6: Identificación preliminar *Salix humboldtiana*.

Floración Florece desde septiembre hasta mediados de octubre. Se presentan individuos femeninos y masculinos. Floración de tipo coetánea.
Flores femeninas, presentan un ovario globoso, poco pubescente y pedunculado, casi no presenta estilo, siendo el estigma de color verde cristalino, la flor mide 3 mm alcanzando el ovario los 2 mm con 1 mm de pedúnculo. Presenta una escama de color verde muy poco pubescente y un solo nectario de color amarillo. El raquis de la inflorescencia es de color verde y poco pubescente. Esta mide 3,3 cm de

largo por 0,6 cm de ancho.
Flores masculinas presentan 4 estambres de 5, 5 mm de largo cubiertos por una escama de color verde claro de 3 mm, poco pubescente. Además existen 4 nectarios de color amarillo que rodean los estambres. La inflorescencia posee un largo de 6,5 cm por 1,1 cm de ancho, teniendo un raquis verde y medianamente pubescente.

Follaje Caduco. Las hojas de 10 a 13 cm de largo y 7 a 8 mm de ancho, presentan un pecíolo corto de 5 a 8 mm de largo de tonalidad rojiza en su parte basal al igual que las ramillas nuevas. Crecen en forma alterna. Son de forma linear lanceoladas, de borde aserrado, base aguda y acuminadas. La nervadura central notoria y de color verde claro, siendo las hojas de color verde más oscuro. Estas crecen en forma espiralada. Presenta una estípula linear muy pequeña de 1 mm de largo de color verde amarillento con algunas tonalidades rojizas.

Ramas Tallo de color verde plomizo con moteados de color café rojizo principalmente en la inserción de las ramas, presentándose pequeñas grietas y una linea perpendicular a la rama y por debajo de la ramilla. Las ramillas son más gruesas que la especie 5 y puestas en ángulos mayores a 45°.

En este sauce, el tipo de flor masculina es muy parecido a la especie anterior, pero con un número menor de estambres (4) y nectarios (4). Presenta ramificaciones gruesas y corteza gruesa y rugosa en algunos sectores. El crecimiento es más achaparrado, pero presenta un tronco central bien definido. Las hojas, de forma lineal - lanceoladas, son mucho más largas que en la descripción de la especie parental.

Especie 7: Identificación preliminar *Salix alba*.

Floración No se produjo floración. Su menor velocidad de crecimiento podría haber influido en el desarrollo de yemas florales, produciéndose ésta, probablemente, en la próxima estación de crecimiento.

Follaje Caduco. Hojas iniciales de color café rojizo con una tonalidad plomiza en el envés. A medida que madura, la hoja pasa a un color verde oscuro en el haz y un verde claro en el envés. Poseen un largo de 12 a 16 cm por 1,5 a 2,3 cm de ancho y un aserrado notorio. La forma es oval lanceolada con pecíolos cortos acompañados por estípulas semiacorazonadas prominentes de 0,5 a 1 cm de largo, con bordes dentados y un color verde oscuro en el haz y plateado por el envés debido a la presencia de pilosidad. Las hojas se presentan en forma alterna y casi en espiral.

Ramas Las ramillas son rojizas, siendo las ramas de un color amarillo anaranjado.

La especie 7, por las características de las hojas, ramas y forma de crecimiento, es muy similar a *Salix alba*, siendo distintos el color de las ramas, brotes y hojas. Las ramas presentan gran flexibilidad, de un llamativo color amarillo - anaranjado, lo que permite suponer que es una variedad de esta especie. El tipo de hojas, en cuanto a la forma de la lámina y el aserrado de los bordes, es muy parecido a la especie parental. Los brotes presentan un fuerte color rojo en sus puntas, al igual que en el borde aserrado de las hojas. Se presenta una tonalidad rojiza en las raíces, lo que no es característico de *Salix alba*.

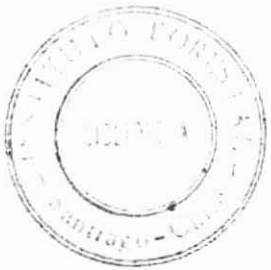
Especie 8: Identificación preliminar *Salix fragilis.*

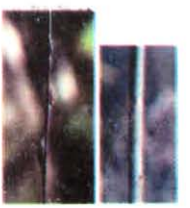
Floración Se produce a inicios de septiembre hasta fines de octubre. Flores masculinas. Floración de tipo coetánea. La inflorescencia presenta 5,9 cm de largo por 1,2 cm de ancho. El raquis es de color verde y pubescente. Presenta 2 estambres libres de 0, 5 cm de largo y 2 nectarios de forma aplanada y de color amarillo. La escama mide 0,2 cm de largo y es pubescente de color verde claro. La inflorescencia posee una longitud cercana a los 1,7 cm de largo por 0,7 cm de ancho.

Follaje Presenta hojas iniciales de color verde plateado por su pubescencia, para transformarse en verde oscuro algo brilloso en el haz y verde plomizo opaco por el envés. Las hojas son caducas y poseen un largo de 11 a 15 cm por 2 a 3 cm de ancho. Presenta bordes aserrados e inicialmente estípulas muy acuminadas con un largo de 1,2 cm. Peciolo de 6 a 7 mm de largo de color verde. Presencia de glándulas en el peciolo cerca de la base del limbo.

Ramas Los tallos presentan un color verdoso a verde plomizo y de textura lisa. Las ramillas son de un tono café rojizo.

La especie 8 presenta ciertas características que la acercan a *S. fragilis*, tales como el número de nectarios, estambres, presencia de glándulas en el peciolo; siendo lo más característico la facilidad de las ramas para romperse. Sin embargo, la base de las hojas son algo agudas respecto a la forma redondeada de *S. fragilis*, además, según Cremer (1995), las raíces de las estacas de esta especie deberían ser rosadas cuando crecen en agua, siendo las de este sauce, blancas. Se agrega a esto, la longitud de los estambres, siendo estos igual al doble del largo de la escama. Por estas razones la especie no correspondería a *S. fragilis*.



	S. alba	*S. purpurea*	*S. viminalis*	*S. caprea*
ARBOL ADULTO				
FUSTE				
HOJAS				
RAMAS				
FLOR				
	Flor femenina	*Flor femenina*	*Flor femenina*	*Flor fem.* *Flor masc.*
ESTIPULAS				
	Estipulas muy pequeñas			

	S. humboldtiana var. fastigiata	*S. humboldtiana*	S. alba var. vitellina	*Salix x rubens*
ARBOL ADULTO				
FUSTE				
HOJAS				
RAMAS				
FLOR	 *Flor masculina*	 *Flor masc.* *Flor fem.*	 *Sin presencia de flor*	 *Flor masculina*
ESTIPULAS				

Estipulas muy pequeñas

CLAVE TAXONOMICA

Clave para a las especies estudiadas

1. Identificación sin la presencia de flores. 2
1. Identificación en base a las características de la floración. 7
2. Caduco. 3
2. Perenne. 6
3. Hojas linear-lanceoladas. 4
3. Hojas oval-agudas de borde aserrada y ondulada. Peciolo corto. Estípulas grandes.Caducas. Hojas iniciales verde oscuro muy pubescentes, finalizando con una hoja verde oscura algo lustrosa por el haz y verde claro opaco por el envés producido por la presencia de gran vellosidad Especie 4
3. Hojas lineares de color verde opaco en su cara superior y un verde plomizo en su cara inferior. Cortamente pedunculada. Opuestas a levemente alternas. Ramas de color café rojizo oscuro a color plomizo en su base. Especie 2
3. Hojas oval-lanceoladas, fuertemente aserradas, pedunculadas, de color verde lustroso por el haz y verde plomizo por el envés. Presenta estípulas grandes. 5
4. Hojas finamente aserradas y acuminadas. Nervadura central notoria. Alternas. Peciolo corto de tonalidad café-rojiza. Presenta moteados en la corteza del tronco de color café-rojizo, principalmente en la inserción de las ramas. 8
4. Hojas alternas y presencia de un corto pedúnculo. Estipulas caducas y pequeñas de color verde, de forma linear lanceolada. Las hojas son de color verde oscuro y algo lustrosas en la cara superior, plateado en la inferior debido a su gran pubescencia.
Presenta márgenes irregulares, con la nervación central amarillenta y suavemente ondulada. Las ramas son flexibles, de color amarillento o amarillo verdoso y salpicadas de lenticelas. Especie 3
5. Presenta un color de tallo amarillo a amarillo anaranjado con ramillas de color café rojizas. Inicialmente presentan las hojas de un color café rojizo con una tonalidad plomiza en el envés, para pasar luego a un color verde oscuro en el haz y un verde claro en el envés. Las hojas son alternas. Las estipulas son prominentes de forma semiacorazonada que desaparecen en las hojas adultas. Especie 7
5. Presenta un color de tallo verdoso a verde plomizo con ramillas de color café rojizas. Las hojas son inicialmente de color verde plateado por la presencia de pubescencia, pasando luego a un color verde oscuro en el haz y verde plomizo opaco por el envés.
Las hojas son de bordes alternas. Las estípulas son largamente acuminadas y grandes, siendo caducas en hojas adultas. Especie 8
5. Presenta tallos de color café rojizo en su base para pasar a un tono amarilloanaranjado hacia la punta. Las ramillas son de un color café rojizo. Las hojas son de color verde y verde claro opaco por el envés. Las hojas son aproximadamente opuestas presentan una forma oval a oval-lanceoladas. Presentan un pedúnculo corto acompañadode una estipula pequeña de color verde. Especie 1
6. Hojas finamente aserradas y acuminadas de color verde oscuro en el haz y verde más claro en el envés, con una tonalidad rojiza en las puntas y orillas de las hojas. Nervadura central notoria. Alternas. Peciolo corto de tonalidad café-rojiza. El tallo es de color verde plomizo y las ramillas amarilla verdosa a café rojizo en la parte superior de la planta. Especie 5
7. Flores femeninas. 8
7. Flores masculinas. 11
8. Floración de tipo coetánea. Presencia de un solo nectario. 9
8. Floración precoz. Presencia de un solo nectario. 10
9. Amento de aproximadamente 6 cm de largo por 0,5 cm de ancho. Presencia de un raquis verde y pubescente. La flor con un ovario cortamente pedunculado de color verde y glabro, estilo corto y estigma de color verde claro. La escama de color verde claro y escasamente pubescente. Nectario aplanado de color verde amarillento cristalino. La flor posee un largo aproximado de 0,35 cm. Especie 1

9. El amento mide aproximadamente 3,3 cm de largo por 0,6 cm de ancho. Raquis de color verde y poco pubescente. Ovario globoso, poco pubescente y pedunculado. Casi no presenta estilo, siendo el estigma de color verde cristalino. La flor mide aproximadamente 3 mm alcanzando el ovario los 2 mm con 1 mm de pedúnculo. Escama de color verde muy pubescente. Especie 6

10. El amento mide aproximadamente 3 cm de largo por 0,5 cm de ancho. Presenta un raquis pubescente de color verde. El ovario es sésil, ovoide, pubescente, con un estilo corto y un estigma de color morado. Escama pubescente de color verde en su base y de color negruzco en el ápice. Nectario en forma de corona. Especie 2

10. Amento de aproximadamente 4 cm de largo por 1,2 cm de ancho. Presenta un raquis pubescente. El ovario de forma ovoide a cónica, escasamentepedunculado, pubescente. Escamas oblongas o aovadas y pubescentes, con la base de un tono rosado y el ápice negruzco. Nectario linear. Estilo lampiño, tan largo como el ovario. Estigmas amarillos y filiformes. Especie 3

10. El amento de aproximadamente 3 cm de largo y 1 cm de ancho. El ovario deforma ovoide alargado, escasamente pubescente, estilo filiforme dividido en lacinias. Especie 4
Escama muy pubescente alcanzando a la mitad del largo de la flor, presentando un color café oscuro en su parte superior y un verde claro en la inferior. Presenta un raquis pubescente. La flor alcanza una longitud de 0,5 cm.

11. Floración Precoz. Presenta un solo nectario. 12

11. Floración Coetánea. 13

12. Amento con raquis pubescente de 5 cm de largo por 1,8 cm de ancho. Especie 4
Inflorescencia muy llamativa de color amarillo brillante. Presenta 2 estambres libres de 1,3 cm de largo. Escama de 0,5 cm de largo, pubescente, de color café oscuro en la mitad superior y verde claro en la inferior.

13. Presencia de 1 a 2 nectarios. 14

13. Presencia de más de 2 nectarios. 15

14. Amento de 5,9 cm de largo por 1,2 cm de ancho aproximadamente. Raquis de color verde pubescente. Presenta 2 estambres libres de 0,5 cm de largo y 2 nectarios aplanados de color amarillo. Escama de 0,2 cm de largo y pubescente de color verde. Especie 8

15. De 3 a 4 estambres de 5,5 mm de largo, cubiertos por una escama de color verde claro de 3 mm y poco pubescente. Presenta 4 nectarios de color amarillo. La inflorescencia es de 6,5 cm de largo por 1,1 cm de ancho, con un raquis verde y medianamente pubescente. Especie 6

15. De 4 a 7 estambres de 3 a 5 mm de largo con algo de pubescencia y soldados en su base. Presentan nectarios de color amarillo rojizo. El raquis es de color verde con algunas tonalidades rojizas y glabro. La escama es verde de 1,5 mm de largo y escasamente pubescente. Especie 5

CONCLUSIONES

De acuerdo a las caracteristicas de la floración, follaje y ramas para las especies estudiadas, y conforme a las similitudes de estos individuos con las posibles especies parentales, se puede afirmar que:

Especie 1	presenta similitud con	*Salix alba*
Especie 2	presenta similitud con	*Salix purpurea*
Especie 3	presenta similitud con	*Salix viminalis*
Especie 4	presenta similitud con	*Salix caprea* en condición de híbrido
Especie 5	presenta similitud con	*Salix humboldtiana* var. *fastigiata*
Especie 6	presenta similitud con	*Salix humboldtiana*
Especie 7	presenta similitud con	*Salix alba* var. *vitellina*
Especie 8	presenta similitud con	*Salix x rubens* (*Salix alba* x *Salix fragilis*)

La gran facilidad de estas especies de cruzarse en un ambiente natural y además producir híbridos fértiles, indica que podrían existir tipos y variedades dentro del territorio nacional que pueden servir a distintos objetivos, por lo que se debe continuar colectando material nacional y realizando ensayos para evaluar los genotipos.

La identificación taxonómica abre el camino hacia la producción de genotipos selectos bajo cruzamientos controlados, logrando con ello caracteristicas deseables en un solo individuo.

El mercado cada dia es más cambiante, por lo que a futuro se deberá poseer una gama de genotipos de distintas cualidades para enfrentar estos cambios.

BIBLIOGRAFIA

CREMER, K.W. 1995. Willow Identification for River Management in Australia. Canberra, Australia. CSIRO Division of Forestry. Technical Paper N°3. 21 p.

DEL FIERRO, P.; PANCEL, L.; RIVERA, H.;CASTILLO, J.C. 1998. Experiencias Silviculturales del Bosque Nativo de Chile. Recopilación de antecedentes para 57 especies arbóreas y evaluación de prácticas silviculturales. Proyecto Manejo Sustentable del Bosque Nativo. Santiago, Chile. CONAF ; Sociedad Alemana de Cooperación Técnica. 420 p.

FAO. 1980. Los álamos y los sauces en la producción de madera y la utilización de las tierras. Roma, Italia. Colección FAO: Montes N° 10. 349 p.

FONT QUER, P. 1963. Diccionario de Botánica. Barcelona, España. Editorial Labor. 1244 p.

LANZARA,P. ; PIZZETTI, M. 1980. España. Guía de árboles. Madrid, España. Editorial Grijalbo. 300 p

MARZOCCA, A. 1985. Nociones Básicas de Taxonomía Vegetal. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Serie de Libros y Materiales educativos N° 62. 272 p.

NEWSHOLME, C. 1992. Willows the Genus *Salix*. Portland, Oregon, USA. Timber Press. 224 p.

STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. Y SCHIMPER, A.F.W. 1974. Tratado de Botánica. Barcelona, España. Editorial Marin. 798 p.

VICIOSO, C. 1951. Salicaceas de España. Madrid, España. Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias. Ministerio de Agricultura. 131 p.

ZSUFFA, L., MOSSELER, A. AND RAJ, Y. 1984. Prospects for Interspecific Hybridization in Willow for Biomass Production. Sweden. In Perttu, K. Ed. Ecology and Management of Forest Biomass Production Systems. Dept. Ecol. And Environ. Res., Swed. Univ. Agric. Sci. Rep. 15:261-281.

GLOSARIO

Acuminada	: Hoja que termina en punta
Ahusada	: Formación constituida por tenues canalículos, los cuales se van atenuando a ambos extremos.
Aleznado	: Hoja estrechada hacia el ápice hasta rematar en punta fina.
Alternas	: Originado a diferentes niveles desde un eje central, siguiendo un camino en espiral a lo largo del tallo.
Amento	: Conjunto de flores reunidas en una espiga densa, unisexual, por lo común pedunculada y aclamideas (sin perianto)
Antesis	: Desarrollo floral, desde el instante de la abertura del capullo hasta la marchitez de la flor.
Aovada	: Hoja de forma parecida a un huevo, con su parte más ancha en la porción inferior.
Arbol	: Planta leñosa que produce un tronco principal y ramificaciones laterales que constituyen una copa más o menos diferenciada y elevada.
Arbusto	: Planta leñosa menor a 5 m de altura que produce vástagos o ramificaciones desde la base, sin formar un tronco principal.
Bífido	: Organo dividido en dos porciones que no llegan a la mitad de su longitud total.
Bivalvas	: Que poseen dos valvas o que se abren en dos valvas que divergen.
Brácteas	: Organo foliáceo situado en la proximidad de la flor y distinto por su tamaño, forma, consistencia, color, etc., de las hojas normales y de las que, transformadas, constituyen el cáliz y la corola.
Brotes axilares	: Puntos vegetativos situados lateralmente en los tallos en la axila superior de la hoja
Brotes florales	: Puntos vegetativos que dan origen a los primordios florales.
Brotes terminales	: Puntos vegetativos que se encuentran en el extremo de los tallos.

Cápsula : Tipo de fruto, el cual se abre longitudinalmente y con regularidad y pueden proceder de ovarios súperos o ínferos, con 2 o más carpelos, los cuales pueden estar abiertos o cerrados, resultando en una cápsula unilocular o plurilocular.

Centrípeta : Algo que avanza o se dirige desde la periferia hacia el centro.

Coetáneo : Dícese de los amentos que aparecen simultáneamente con las hojas.

Coriáceo : Hoja de consistencia recia, aunque con cierta flexibilidad.

Cuneiforme : Parte inferior con bordes rectos y convergentes, sin tomar en cuenta la forma de la porción apical de la lámina.

Deciduo o Caduco : Hoja no persistente, que cae después de su madurez.

Dehiscente : Fenómeno a favor del cual una cápsula o antera se abre espontáneamente al llegar su madurez.

Divergente : Que van en sentidos opuestos.

Envés : Cara inferior o adaxial de la lámina.

Escama floral : Tipos de hojuelas algo membranosas o duras y casi siempre enteras, los cuales contienen en su axila flores o ramos.

Estambres : Organo masculino que, en flores de las angiospermas, traen los sacos polínicos. Este consta de la antera y el filamento; cuando este falta, se dice que la antera es sésil. Por lo común, la antera está compuesta de dos tecas, y cada una de éstas la integran dos microsporangios o sacos polínicos; ambas tecas se unen por una porción de tejido que recibe el nombre de conectivo. En los sacos polínicos se contienen las micrósporas, que reciben el nombre de granos de polen, y el de polen el conjunto de ellos.

Estilo : Parte superior del ovario y porción media del pistilo que se prolongada en forma de estilete. Posee una longitud variable y finaliza en uno o varios estigmas

Estípite : Sustentáculo, generalmente rollizo y más o menos largo, de un órgano.

Estípula : Órganos presentes de a pares, que corresponden a apéndices foliáceos bracteiformes basales.

Filiforme : Hoja de forma de hebra, delgado.

Foliácea : Hoja de aspecto o de la naturaleza de las hojas.

Glabro : Desprovisto absolutamente de pelo o vello.

Glauca : De color verde claro, con matiz ligeramente azulado

Haz : Cara superior o abaxial de la lámina

Lacinia : Segmento, por lo general profundo, angosto y de ápice agudo.

Lampiñas : Que carece de pelo o vello.

Lanceolada : Hoja con forma de lanza, más ancha más debajo de la parte media y cónico hacia el ápice.

Lenticela : Ciertas protuberancias visibles a simple vista y con una abertura de forma lenticular que reemplaza a los estomas de la desaparecida

epidermis, utilizando a estas para el cambio de gases de la planta.

Limbo (Lamina) : Porción laminar de la hoja.

Linear : Largo y angosto, con márgenes aproximadamente paralelos.

Nectario : Glándula capaz de segregar nectar, localizado en la base del ovario o estambres de *Salix* sp.

Nervio axil : Nervio central de la hoja

Oblicua : Con lados desiguales.

Oblongo(a) : Referido a las hojas, aproximadamente rectangular, más ancho en el medio con márgenes cercanamente paralelos, o ligeramente convexos.

Obovado(a) : De forma inversamente ovada, donde la parte más ancha se ubica en la mitad superior.

Opuesta : Que surgen a un mismo nivel desde lados opuestos de un eje.

Ovario : Estructura constituido por la base de una hoja carpelar concrescente por sus bordes, o por varias hojas carpelares soldadas, por lo menos, en su parte inferior, en la que contienen el o los rudimentos seminales. Constituye la parte basal del pistilo, y después de la polinización experimenta una serie de transformaciones que lo convierten en fruto.

Ovulo : Semilla inmadura

Patente : Hojas, ramas, etc., que forman un ángulo muy abierto con el tallo en que se insertan, que pueden alcanzar los 90 °.

Pecíolo : Corresponde al pedúnculo foliar (cuando falta, se dice que la hoja es sésil).

Pedicelo : Ramificación o especie de pecíolo floral que sostiene cada flor en una inflorescencia compuesta.

Pedúnculo : Eje que sostiene a toda la inflorescencia.

Persistente : Permanecer unido.

Picuda : Hoja que remata en punta a modo de pico.

Pilosidad : Que posee pelos

Placenta parietal : Se refiere a la disposición de la placenta en el ovario. Para este caso, la placenta se encuentra en las paredes del ovario.

Pluriovulado : Ovario del carpelo y del lóculo que tiene varios rudimentos seminales (óvulos)

Precoz : Los amentos aparecen en ramas desnudas antes que las hojas

Pubescente : Hoja que posee pelos cortos, muy finos y suaves al tacto.

Raquis : Eje central de la inflorescencia

Sésil : Cualquier órgano o parte orgánica que carece de pie o soporte.

Sinandro : Estambres más o menos unidos congénitamente.

Tomentoso : Cubierto con denso pelo lanudo o pubescente.

Trasovado

Transovado : Hoja con figura de huevo, colocado de manera que su parte más ancha corresponda a la superior del órgano considerado.

Unilocular : Con una sola cavidad o lóculo

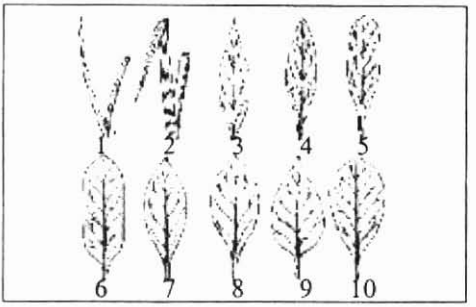


Figura 1. Forma de las hojas: (1) acicular; (2) lineal; (3) lanceolada; (4) oblanceolada; (5) espatulada; (6) oblonga; (7) eliptica; (8) oval; (9) ovada y (10) obovada.

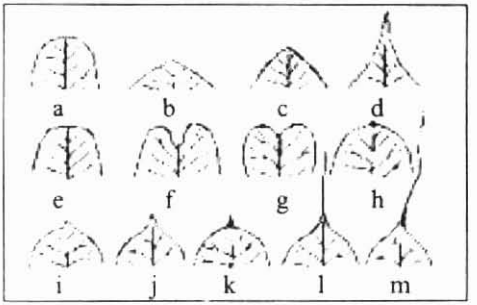


Figura 2. Ápice de las hojas: (a) redondeado; (b) obtuso; (c) agudo; (d) atenuado; (e) truncado; (f) emarginado; (g) retuso; (h) cuspidado; (i) mucronado; (j) acuminado; (k) espinoso; (l) aristado y (m) caudado.

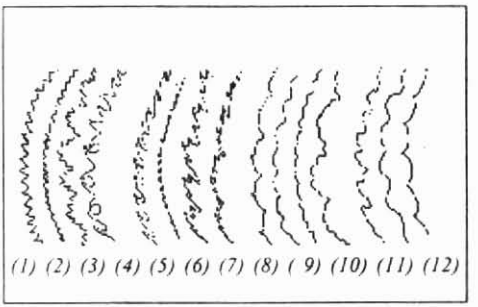


Figura 3. Tipos de bordes de las hojas: (1) dentado; (2) denticulado; (3) doble dentado; (4) aserrado; (5) serrulado; (6) doble aserrado; (7) crenado; (8) crenulado; (9) Doble crenado; (10) sinuado; (11) ondulado y (12) sinuado repando.

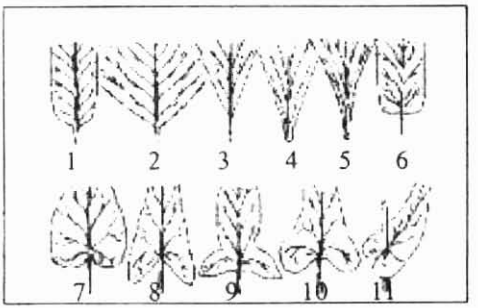


Figura 4. Tipos de bases de las hojas: (1) redondeada; (2) obtusa; (3) aguda; (4) cuneada; (5) atenuada; (6) truncada; (7) cordada; (8) sagitada; (9) hastada; (10) auriculada; (12) abrazadora.

ANEXO

DESCRIPCION DE ESPECIES DE *Salix* PARENTALES DE LOS CLONES ESTUDIADOS

***Salix alba* Linné**

Nombre común	Sauce blanco, White Willow
Distribución natural	El área de origen comprende Europa exceptuando el extremo norte, Asia occidental y una parte reducida de África septentrional
Hábitat	Se ubica en sectores cercanos a ríos, lugares húmedos y a la orilla de los arroyos, alcanzando hasta más de 1500 msnm. Crece en todo tipo de suelos incluso compactos, pantanosos, ácidos o alcalinos, siempre que sus raíces dispongan de humedad suficiente. Prefiere los suelos aluviales fértiles donde da buenos resultados económicos.
Descripción general	Árbol de 20 a 25 m de altura con un diámetro máximo de 60 cm. La copa es amplia, formada por largas ramas ascendentes y separadas, de color gris plateado, mientras que las ramificaciones jóvenes, largas y flexibles, presentan corteza verde rojiza o bien marrón rojiza. La corteza del tronco es de color gris y se fractura con la edad.
Follaje	Las hojas presentan peciolos desprovistos de glándulas y con estípulas estrechas y caducas, las que poseen una lámina lanceolada y acuminada de 7 a 10 cm atenuándose gradualmente hacia la extremidad, con mayor anchura en la mitad basal, márgenes finamente dentados y provistos de glándulas verdes y débilmente brillantes por encima, más pálidas en su cara inferior, de color plateado debido a los pelos.
Flores	Estas se reúnen en amentos que aparecen simultáneamente con las hojas. Las flores masculinas de hasta 7 cm de longitud disponen de dos estambres y anteras amarillas y 2 nectarios. Las femeninas son más delgadas y ligeramente pedunculadas con un solo nectario; ovario cónico, sésil, glabro y 2 estigmas partido en dos.
Frutos	Son cápsulas glabras subsésiles y las semillas poseen un vilano blanco.
Subespecies, híbridos y/o variedades	*Salix alba* L. var. *argentea* Wimm.(*S. alba* var. *sericea* Gaud.; *S. alba* y/o variedades var. *splendens* Schneid.) 'Silver Willow'; *Salix alba* var. *aurea* 'Gold Leaf Willow'; *Salix alba* L. 'Britzensis'; *Salix alba* L. *coerulea* (Sm) Koch, (S. 'Caerulea' *S. alba calva* var. G.F.W. Meyer) 'Cricket Bat Willow' or 'Blue Willow'; *Salix alba* L. '*Cardinalis*'; *Salix alba* L. 'Chermesina'; *Salix alba* L. 'Chrysostela'; *Salix alba* L. x *Salix babylonica* L. (*S.* x *salamonii*); *Salix alba* L. x *Salix fragilis* L. (*S. rubens*); *Salix alba* L. 'Liempde'; *Salix alba* L. var. *vitellina* x *Salix babylonica* (*S. x Chrysocoma* Dode.); *Salix alba* L. var. *vitellina* 'Pendula' (Spath.) Rehd; *Salix alba* L. 'Vitellina Tristis'

***Salix humboldtiana* Willd.**

Nombre común	Sauce chileno, Sauce amargo, Sauce colorado, Sauce negro, Sauce cimarrón y Sauce de Castilla.
Distribución natural	Especie originaria de América del Sur y Central. En Chile crece desde Copiapó (III Región) hasta Concepción (VIII Región), desde el nivel del mar hasta los 600 msnm., principalmente en la Cordillera de la Costa y el Valle Central (Rodriguez et al, 1983). Se desarrolla en tres climas: mediterráneo marino, mediterráneo subtropical semiárido y desierto subtropical marino. La tolerancia de temperaturas está entre los -3,2°C a 9,9°C para la mínima y de 16,5°C a 31,3 °C para la máxima. La temperatura media es de 14°C y las precipitaciones van desde los 22 (clima marino húmedo patagónico) a 1.330 mm anuales.
Hábitat	Se ubica en lugares húmedos y a veces arenosos, a lo largo de los ríos, esteros y lagos, como también en zonas bajas y sectores inundados. En la mayoría de los casos se encuentra aislado o formando pequeños grupos asociados a matorral de tipo ribereño.
Descripción general	Arbol de 10 a 18 m de altura. Tronco recto de 20 a 80 cm de diámetro. Corteza gruesa, pardo grisácea, muy rugosa. Ramas largas, gruesas, tiesas, ramitas parduscas.
Follaje	Hojas lineal-lanceoladas, dentado-aserradas, glabras de 2 a 5 cm de longitud, peciolo de 4 a 5 mm de longitud. Posee nervadura central prominente, siendo acuminadas en el ápice y con base aguda.
Flores	Unisexuales. Amentos masculinos solitarios, cilíndricos. Amentos femeninos cilíndricos. Florece de septiembre a noviembre. Aparecen en el extremo de ramillas nuevas de 5 a 7 cm de largo. Las flores masculinas ubicadas en la axila de una bráctea entera, aovado-acuminada, verdosa, llevan de 4 a 10 estambres, acompañados de 4 a 5 nectarios con los que atrae a los insectos para la polinización. Las femeninas, con brácteas y nectarios semejantes a la flor masculina, ovario elipsoideo, unilocular, de unos 2 mm de alto, pluriovulado, coronado por un estigma bífido.
Frutos	Cápsulas ovadas, muy pequeñas, uniloculares, bivalvas, cortamente pediceladas. Su maduración ocurre desde fines de primavera a comienzos del verano. Estas encierran numerosas semillas ahusadas, provistas de un penacho algodonoso blanco que facilita su dispersión por el viento al momento de su dehiscencia.
Subespecies, híbridos y/o variedades	*Salix humboldtiana* Willd. var. *fastigiata* André: 'Sauce álamo'. De crecimiento monopódico, crece principalmente en la zona de Copiapó y noroeste argentino; *Salix humboldtiana* Willd var *martiana* Anders; *Salix humboldtiana* Willd cv. '*Pyramidalis*'.

Salix cinerea L.* ssp. *cinerea

Nombre común	Grey Sallow
Distribución natural	Esta subespecie se ubica ampliamente en Europa, extendiéndose hasta Siberia.
Hábitat	Se encuentra en zonas pantanosas y de alta humedad.
Descripción general	Es un arbusto ramudo de 3 a 6 m de altura; ramillas densamente pubescentes en los primeros 2 años; el leño con prominentes estrías.
Follaje	Las hojas son obovadas u oblongas con márgenes serrados y ondulados; lámina verde pardusca y cortamente pubescente por arriba, densamente

	pubescente por debajo. Estípulas anchamente auriculares, grandes y persistentes.
Flores	Los amentos son precoces, crecen erectos, sésiles, llegando a ser cortamente pedunculados, estrechamente ovoides de 2 a 3 cm de largo por 0,5 a 1 cm de ancho; brácteas cortas y pubescentes; escama floral café oscuro, oblongo, agudo y densamente peludo. Flores masculinas con 2 estambres libres, filamentos glabros de 5 a 8 mm de longitud, anteras oblongas y amarillas; nectario oblongo. Las flores femeninas son más pequeñas; ovario en forma de botella, pubescente; pedicelo usualmente más largo que el nectario; estigma oblongo, erecto o desplegado, sub-entero o con doble abertura.
Subespecies, híbridos y/o variedades	*Salix cinerea* ssp *oleifolia* Macreight (*S. atrocinerea* Brot.) "Rusty Sallow"; *Salix cinerea* 'Tricolour'; *Salix cinerea* 'Variegata'.

Salix fragilis* var. *fragilis

Nombre común	Sauce, Mimbrera, Bardaguera blanca, Salgueiro, Saratxa, Crack Willow.
Distribución natural	Se extiende por casi toda Europa, Cáucaso, Persia, Asia Menor, Altai, Siberia, naturalizada en América. Al igual que otras especies cultivadas por largo tiempo, es difícil precisar de dónde es autóctona y dónde ha sido introducida.
Hábitat	Se ubica en lugares húmedos y a orillas de las corrientes de agua.
Descripción general	Árbol de 8 a 15 m de altura, tronco recto de 30 a 50 cm de diámetro, ramas adultas lampiñas, lustrosas, casi patentes, fácilmente quebradizas en su axila. Yemas aovadas y acuminadas, derechas un poco curvadas, pardo rosadas o amarillentas, lampiñas, lustrosas.
Follaje	Hojas lanceoladas u oblongo lanceoladas, oblicuas y largamente acuminadas, pubescentes en su juventud, después lampiñas, bastante coriáceas, verdes y lustrosas en el haz, más pálidas o glaucas en el envés y en éste muy prominente el nervio axil; aserrado glandulosas en el margen. Pecíolo de 1 a 2 cm, lampiño, generalmente con 2 glándulas en su parte posterior adyacentes a la base del limbo. Estípulas cortas y anchas, semiacorazonadas, dentado-glandulosas, persistentes en los ramos gruesos y fugaces en los otros.
Flores	Amentos coetáneos, cilíndricos, laterales, sobre pedúnculos pilosos, guarnecidos en su base con brácteas foliáceas enteras; escamas aovado-oblongas, amarillentas, pilosas, caducas; las flores masculinas son densas, poseen 2 estambres libres de filamentos pilosos en su base; anteras amarillas ovales; 2 nectarios; los amentos femeninos más laxos; flores con ovario oviforme, lampiño, sobre pedicelo más largo que los 2 nectarios; estilo corto; estigmas bífidos con las ramas divergentes.
Frutos	Cápsula aovado- cónica.
Subespecies, híbridos y/o variedades	*S. fragilis* L. var. *furcata* (Seriuge ex Gaudia); *S. fragilis* L. var. *russelliana* (Sm.)Koch; *S. fragilis* L. var *decipiens* (Hoffm.) Koch; *S. fragilis* L. var. *bullata* Spath

***Salix purpurea* L.**

Nombre común	Purple Osier Willow, Purpleosier Willow, Blue Arctic Willow, Basket Willow, Sarga, Sargatillo, Sauce colorado, Sargatilla fina, Saciña,

	Mimbrera, Salic, Zumarica.
Distribución natural	Existe en casi toda Europa, desde Andalucía a Laponia y desde Inglaterra y Portugal hasta el Cáucaso, de donde pasa a Asia, llegando hasta el Japón. Se encuentra también en Africa del Norte. Se cultiva en América.
Hábitat	Se ubica en sitios húmedos; orillas de pantanos, lagunas y cursos de agua. Puede alcanzar altitudes de hasta 2000 msnm., pero se encuentra con mayor frecuencia en pisos inferiores y montanos.
Descripción general	Los tallos maduros en la primera estación de crecimiento poseen un color rojo púrpura con brotes rojo brillante, con las ramas ultra delgadas. Los tallos tienen una posición erguida cuando son jóvenes, llegando a ser horizontales a arqueados y separados. Existe una gran cantidad de tallos en un denso dosel, pero las ramillas de cada rama son cerradamente paralelas una de la otra. Cuando los tallos son más viejos poseen un color gris oliva claro pero las ramas todavía lisas pasando luego a una textura ligeramente fisurada en ramas basales maduras. Los tallos pueden ser cortados y usados en la producción de canastos (de aquí se debe su nombre común). El término tronco no es aplicable excepto para *S purpupea* 'pendula' que es injertado en un tronco de *Salix* estándar. Su forma corresponde a un arbusto de tamaño mediano a grande. Posee una rápida tasa de crecimiento. En su estado juvenil posee un crecimiento oval, mientras que en su estado adulto es redondeado.
Follaje	Las hojas de color azul verdoso, alternas a espiraladas, linear a oblanceolado, serrada, de color azul plateado en el envés y cortamente pecioladas. Las hojas se ubican en forma densa a lo largo de un fino tallo, y fácilmente se agitan por el viento en forma armónica. El color del follaje de verano se mantiene durante el otoño.
Flores	Dioico, de color verde claro a amarillo verdoso, aparece en primavera, erecto, amento relativamente duro de 2,5 a 5 cm de largo y generalmente paralelo al tallo, precoces a coemergente con el follaje, opuestos o casi opuestos, laterales, casi o totalmente sésiles, bracteados basilarmente, cilíndricos densifloros, de 2 a 5 cm de largo y 5 a 12 mm de ancho, patentes o curvadas, con el raquis velloso y las brácteas oblongo-lanceoladas, cano-sedosas por debajo, de coloración rojiza en la antesis. Las flores masculinas se ordenan en forma centrípeta; escamas de unos y otros trasovadas, obtusas, atro-rojizas en su ápice, de tonalidad más clara y verdosa en la base, con pelos blancos, largos y abundantes; un solo nectario en las flores masculinas aovado-oblongo, un tercio de la escama, en las femeninas un poco más corto y obtuso; 2 estambres soldados, formando un sinandro que unas veces sólo afecta a los filamentos y otras también a las anteras; éstas rojas al principio, amarillas en la polinización y finalmente negruzcas. Cápsula pequeña, ovoidea, obtusa, blancotomentosa o subsedosa, sésil o casi sésil; estilo muy corto, recio, rojizo, lampiño; estigmas cortos, purpurinos al principio, parduscos después de la floración, bífidos, con las lacinias casi erectas, con poca frecuencia enteras. Son ornamentalmente insignificantes y a menudo inadvertido.
Frutos	Frutos ornamentalmente insignificantes que contienen pequeñas semillas en plantas femeninas.
Subespecies, híbridos y/o variedades	*Salix purpurea* var. *amplexicaulis* (*S. amplexicaulis*); *Salix purpurea* L. 'Angustifolia';

Salix purpurea 'Eugenii';
Salix purpurea 'Gold Stones';
Salix purpurea var. *gracilis* (var. *nana*);
Salix purpurea var. *helix* (L.) Koch;
Salix purpurea 'Irette';
Salix purpurea var. *japonica* Nakai (*S. koriyanagi* Kimura);
Salix purpurea ssp. *Lambertiana* Sm (*S. purpurea* var. *latifolia* Kern.);
Salix purpurea var. *multinervis* (*S. integra* Thunb.);
Salix purpurea 'Nancy Saunders';
Salix purpurea 'Nicholsonii Purourascens';
Salix purpurea 'Pendula';
Salix purpurea 'Procumbens';
Salix purpurea 'Rana';
Salix purpurea 'Richartii';
Salix purpurea var. *sericea* Koch;
Salix purpurea 'Uralensis'.

***Salix viminalis* L.**

Nombre común	Mimbrera, Mimbre, Osier.
Distribución natural	Se distribuye en Europa central y septentrional, Siberia y Asia templada. Se cultiva y crece en forma espontánea y asilvestrada en toda Europa y América.
Hábitat	Se ubica en hondonadas húmedas y en la vera de los cursos de agua, preferentemente en altitudes menores. Rara vez sobrepasa los 500 msnm cuando es cultivado.
Descripción general	Arbusto de 8 a 10 m, de tronco y ramas gruesas con la corteza lisa y verdosa o grisáceo-pardusca, salpicadas de lenticelas. Las ramillas son muy largas y flexibles, abundantes, inicialmente pubescentes dándoles un color blanquecino para luego quedar lampiñas y pardo-verdosas. Las yemas son semiaovado-oblongas, picudas o subobtusas, aterciopeladas, finalmente pardas y apegadas a las ramas.
Follaje	Las hojas son algo blandas, lineares o lanceolado-lineares, de 8 a 15 cm de longitud por 5 a 12 mm de ancho. Atenuado-cuneiformes en su base; largamente acuminadas en su ápice, enteras o glanduloso-denticuladas y a veces algo onduladas en el margen; verde oscuras y poco lustrosas por el haz, sedoso-plateadas y lustrosas por el envés, con un nervioaxil muy prominente y formando un ángulo recto con los numerosos nervios laterales. Peciolo corto, algo dilatado en su base, inicialmente pubescente. Estípulas caducas, pequeñas, linear-lanceoladas, largamente acuminado-alesnadas, ligeramente denticulado-glandulosas. Caducas y alternas.
Flores	Amentos precoces, laterales, erectos, un poco bracteados en su base, sésiles o los fructíferos cortamente pedunculados; estos son cilíndricos, obtusos, de 4-6 cm de largo y 5-7 mm de ancho; las flores masculinas son aovado-oblongos, densifloros, de 3-4 cm por 10-12 mm, de floración centrífuga, con el raquis peloso; escamas oblongas o aovadas, agudas o subobtusas y a veces casi redondeadas, pardo-rosadas en la base, negruzcas en el ápice, largamente pelosas; flores masculinas con 2 estambres de filamentos libres y lampiños, anteras aovado-oblongas, amarillo-doradas, volviéndose parduscas después de la polinización; un nectario largo, estrecho, truncado, un poco recurvado. La flor femenina posee cápsula ovoideo-cónica, aguda, casi sésil pubescente o tomentosa;

	un nectario linear, levemente arqueado hacia el raquis, más largo que el pedicelo; estilo lampiño, grácil, casi tan largo como el ovario; estigmas amarillos, filiformes, poco más cortos que el estilo y por lo común enteros, a veces partidos en lacinias, pudiendo alcanzar la división casi en su totalidad.
Frutos	Cápsulas sésiles cubiertas de pilosidad.
Subespecies, hibridos y/o variedades	Gran cantidad de diferentes clones ha sido producida en varias generaciones por sus caracteristicas especiales en cesteria. Algunos conocidos ejemplos son: 'Aquatica Gigantea', 'Black Osier', 'Yellow Osier', 'Irish Rod', 'English Rod', 'Black Satin', 'Brown Mirriam', 'Gigantea Korso', 'Mealy Top', 'Reader's Red', 'Stricta', 'Utelescens', y 'Superba'

***Salix caprea* L.**

Nombre común	Sauce cabruno, Goat Willow o Great Willow
Distribución natural	Se distribuye en casi toda Europa, en gran parte de Asia, Japón e Islas británicas.
Hábitat	Se ubica preferentemente en lugares frescos y húmedos y en las orillas de cursos de agua. Tolera las tierras secas, creciendo naturalmente en las faldas de montañas y cerros.
Descripción general	Árbol pequeño, de 6 a 11 m de altura, muy ramificado, con frecuencia naciendo de la base del tronco, formando una arquitectura ancha. La corteza de color pardo grisáceo o verdosa, lisa en las ramas jóvenes, agrietada en los troncos viejos. Las ramas presentan al inicio un color blanquecino pubescente, posteriormente lampiñas, redondeadas. La madera descortezada es lisa. Las yemas son grandes, oblongo cónicas, curvadas en la punta, de color pardo rojizas, al comienzo pubescentes, y cambiando a lampiñas rápidamente.
Follaje	Hojas grandes, entre 4 y 11 cm de largo y 2 a 6 cm de ancho. Por lo corriente, el largo es una y media vez el ancho de la hoja. Presenta una forma elíptica o anchamente ovales, redondeadas o cordada en la base, ápice cortamente agudo y generalmente curvada. Los márgenes son ondulados y con un serrado glandular. El haz de la hoja es de color verde, presenta pubescencia cuando jóvenes, y más tarde se vuelven lampiñas; por el envés presentan una pubescencia grisácea a blanquecino, persistente. El nervio central de la hoja muy prominente, con nervios laterales entre 6 y 10, bastante notorios y formando con el eje un ángulo muy abierto. El pecíolo de 1 a 3 cm de largo, pubescente o lampiño. Contiene estípulas auriculares, aguda con márgenes dentados y ondulados, usualmente deciduos.
Flores	Presenta amentos precoces, sésiles a cortamente pedunculados. Son ovoides, erectos y miden por sobre los 3 cm de largo por 2 cm de ancho. La escama floral es aovada, obtusa a subaguda, con la punta de color oscuro con una tupida cubierta de pelos sedosos. Las flores femeninas con un ovario cónico a aovado plateado sujeto por un largo pedicelo con pubescencia, estilo muy corto, estigmas elípticos enteros y raramente divididos. Las flores masculinas con dos largos estambres, glabros, con filamentos de 1 cm de largo y anteras doradas. Las flores presentan un solo nectario

Subespecies, híbridos y/o variedades	*Salix caprea* L. var. *sphacelata* (SM) Wahlenb. *Salix x capreola* Kern. (*S. caprea* L. *x S. aurita* L.) *Salix reichardtii* Kern. (*S. caprea L. x S. cinerea L.*) *Salix x dasyclados* Wimm. (*S. caprea x S. cinerea x S. viminalis*) *Salix x seringeana* Gaud. (*S. elaeagnos* Scop. x *S. caprea* L.). *Salix x balfourii* Lint. (*S. caprea* L. *x S. lanata* L.) *Salix* 'Latifolia' (*S. caprea* L. *x S. myrsinifolia* Salisb.) *Salix caprea* 'Pendula' *Salix x laurina* Sm. (*S. caprea* L. *x S. phylicifolia* L.) *Saiix x wimmeriana* Gren. & Godr. (*S. purpurea* L. x *S. caprea* L.) Salix *x laschiana* Zahn. (*S. repens* L. x *S. caprea* L.) *Salix x sericans* Tausch. Ex Kern. (*S caprea* L. x *S. viminalis* L.)

DESCRIPCION DE ASPECTOS BOTANICOS



Amento femenino de Salix sp.



Amento masculino de Salix sp.



Semillas en etapa de dispersión de Salix sp.

IMAGENES DE ALGUNAS ESPECIES PARENTALES



Follaje de S. alba.



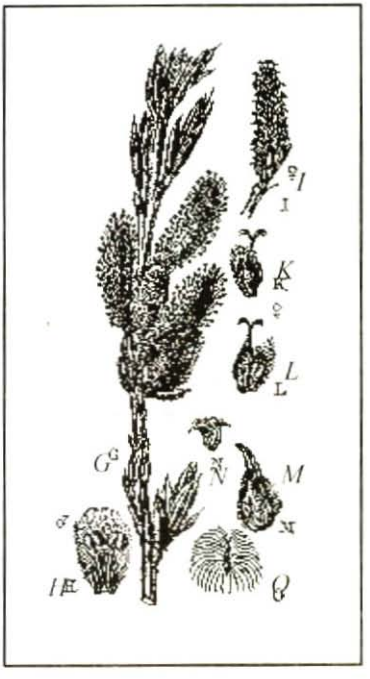
Flores masculinas de S. alba.



Formación de frutos desde flores femeninas en S. cinerea.



Yemas florales en etapa de abertura en S. cinerea.



El dibujo corresponde a S. viminalis el cual muestra una rama florífera masculina (G); un amento femenino(I); flores masculinas y femeninas con sus escamas tectrices(H, K y L); frutos (M y N) y su semilla (O).



Forma y color de yemas de S. purpurea.



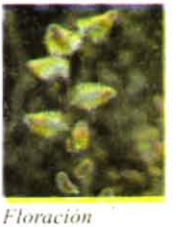
Floración masculina de S. fragilis.



Arbol de S. fragilis creciendo en un río.



Arbusto adulto de S. purpurea.



Floración masculina de S. purpurea.

ANALISIS MOLECULAR EN SAUCE - MIMBRE

Hugo A. Campos de Quiroz[1], Braulio Soto[2] y Cristian Ibañez[2]
1 Ing. Agrónomo Ph.D.,2 Ing. Forestal, Unidad de Biotecnología y Protección Vegetal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Centro Regional de Investigación Carillanca, Temuco, Chile.

RESUMEN

El presente articulo presenta los resultados obtenidos en el desarrollo de tres estudios aplicando marcadores moleculares RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) a especies del género *Salix* evaluadas en Chile, en el contexto del proyecto"Desarrollo Integral del Cultivo e Industrialización del Sauce-mimbre". En primer término se presenta el estudio "Análisis Molecular de Procedencias Introducidas de *Salix* spp.", posteriormente los resultados obtenidos en "Análisis Molecular de Genotipos Endémicos de *Salix humboldtiana* Willd." y finalmente "Análisis Molecular de Procedencias Seleccionadas de *Salix* spp."

Los estudios entregan aspectos específicos de gran importancia para la futura masificación de esta especie en el país, debido a sus múltiples usos y al mismo tiempo, un interesante avance a nivel investigativo en la utilización de marcadores moleculares.

INTRODUCCION

Dentro de los Productos Forestales No Maderables (PFNM), de creciente importancia en el país, destaca el conjunto de especies *Salix* spp. (FAO, 1998), cuyo número a nivel mundial sobrepasa las 400 especies. Este género pertenece a la familia *Salicaceae* y comprende tres generos principales: *Salix, Caprisalix y Chamaetia* (NEWSHOLME, 1992).

Estas especies constituyen valiosas alternativas para establecer rotaciones cortas y plantaciones intensivas para la producción de biomasa energética, compuestos químicos y fibra, y se adaptan bien a las condiciones financieras de pequeños agricultores, los cuales no sustentan los extensos períodos de cosecha de las especies leñosas tradicionales, aún con aquellas de rápido crecimiento como *Eucalyptus* spp. En el mundo, a partir de las especies *de Salix* se produce un extenso rango de productos, como muebles, cercos ornamentales, bates de cricket, entre otros, mientras que en Chile representan una importante fuente de materia prima para la artesanía y la fabricación de muebles. Además, ciertas especies de *Salix* presentan adecuadas condiciones para su utilización en la recuperación de riberas embancadas a lo largo de ríos y en la consolidación de tierras degradadas por erosión debido a su sistema radicular extendido.

Un importante esfuerzo nacional liderado por el Instituto Forestal (INFOR) se encamina a desarrollar integralmente la industria del sauce-mimbre, e incluye entre otras actividades, introducir y evaluar mediante ensayos, especies de *Salix* introducidas como *S. viminalis*,

S. purpurea y S. alba, entre otras, para identificar aquellas procedencias altamente productivas y que mejor se adapten a las condiciones existentes en el país.

Una de las tendencias más recientes en la investigación forestal es la integración de la biotecnología como complemento a la investigación forestal tradicional. La biotecnología posee varias líneas de acción, entre las cuales destacan la transgénesis y la aplicación de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares permiten detectar variabilidad genética directamente a nivel de ADN y han sido aplicados en numerosas especies forestales, como *Eucalyptus, Acacia, Pinus, Amentotaxus, Picea* entre otras. El empleo de marcadores moleculares presenta ventajas frente a alternativas tecnológicas como isozimas, principalmente en términos de productividad. Sin embargo, la ventaja fundamental se debe a que mediante marcadores moleculares es factible analizar la totalidad del genoma de una especie forestal determinada, mientras que utilizando isozimas solamente se analiza una fracción limitada del mismo (CAMPOS DE Q. Y SALVO, 1995).

A nivel nacional, el desarrollo de marcadores moleculares se ha desarrollado principalmente en especies de importancia agrícola (OJEDA *et al.*, 1998; NARVAEZ *et al.*, 1998). Este estudio constituye una de las iniciativas pioneras al respecto dentro del ámbito forestal mediante la utilización de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), el marcador molecular de mayor aplicación dentro del área forestal a nivel mundial.

Un elemento esencial para el éxito de un proyecto para desarrollar al sauce-mimbre en Chile, es contar con aquellos genotipos adecuados. Sin embargo, más allá del número de genotipos disponibles, presenta mayor importancia la diversidad genética que ellos representan. En el presente artículo se presentan los resultados obtenidos con la caracterización molecular de genotipos de *Salix* introducidos y endémicos, además de aquellos que se encuentran en la etapa de evaluación de campo.

ANALISIS MOLECULAR DE PROCEDENCIAS INTRODUCIDAS DE *Salix* spp.

OBJETIVOS

Desarrollar eficazmente un protocolo RAPD para *Salix* spp., para aplicarlo al análisis de diversidad genética e identificación genotípica en procedencias de *Salix* spp. introducidas en Chile. El material vegetal utilizado corresponde a un conjunto de procedencias importadas, las cuales permiten ampliar la base genética del género *Salix* presente en Chile.

MATERIAL Y METODO

El material vegetal empleado correspondió a plantas *in vitro* de los genotipos indicados en el cuadro siguiente:

Cuadro 1. Genotipos y procedencias de *Salix* spp.

Código	Especie	Procedencia
a	*Salix viminalis*	UK Bowles Hybrid
b	*Salix viminalis*	UK Mulatin
c	*Salix viminalis*	UK455 De Biardii
d	*Salix viminalis*	SWE 78183
e	*Salix viminalis*	SWE 79046
f	*Salix viminalis*	SWE 78112
g	*Salix purpurea*	Can Ontario Pur 12
h	Belgicum Red	Holanda
i	*Salix dasyclados*	UK
j	*Salix dasyclados*	SWE 77056
k	*Salix dasyclados*	SWE 79097
l	*Salix dasyclados*	SWE 81090
m	*Salix dasyclados*	UK Korso
n	*Salix burjatica*	UK Germany
o	*Salix burjatica*	UK-83
p	*Salix calodendron*	UK
q	*Salix stipularis*	UK
r	*Salix sericans*	UK Coles
s	*Salix sericans*	UK Reifenweide
t	*Salix eriocephala*	Can Ontario 558
u	*Salix eriocephala*	Can Ontario ER63
v	*Salix eriocephala x pentandra*	Can Ontario 601
w	*Salix eriocephala x exigua*	Can Ontario 611
x	China shrub	Can Ontario S-67

La extracción de ADN a partir de *Salix* spp. se dificulta debido a la presencia de grandes cantidades de fenólicos, carbohidratos y otros compuestos. Partiendo del protocolo base publicado por Ojeda *et al.*, (1998), se desarrolló un protocolo que permite obtener ADN en adecuada cantidad y calidad, utilizando un *buffer* de extracción basado en el detergente CTAB y posterior separación de fases mediante cloroformo. El ADN se cuantificó mediante lecturas espectrofotométricas λ260 y fluorométricas λ465, y la calidad del ADN se determinó mediante el análisis l260/280. La integridad general del ADN se verificó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa. Una vez diluido, el ADN se disolvió en *buffer* 1XTE y posteriormente, se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C. Todos los reactivos utilizados para extraer ADN, enzimas, reactivos PCR, así como los compuestos empleados en las etapas posteriores del análisis correspondieron a reactivos "pureza biología molecular".

Se desarrolló un protocolo que permite la rápida y eficaz obtención de RAPDs en *Salix* spp., determinándose las condiciones óptimas PCR (Polymerase Chain Reaction) necesarias. Los partidores utilizados fueron adquiridos de Operon Technologies (USA), y corresponden a decámeros con un contenido de C+G entre 60% y 70%. Las reacciones RAPD se desarrollaron en un termociclador Perkin Elmer 480.

Los productos RAPDs fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. El tampón utilizado para los geles y el tampón de corrida fue 1X TBE. La concentración de agarosa fluctuó entre 1% y 2% en función del tamaño de los productos PCR a separar. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 kb ladder (GIBCO). Una vez finalizado el análisis electroforético, los geles fueron teñidos con una solución 1 mg/ml de Bromuro de Etidio y posteriormente visualizados en un transiluminador UV. Las imágenes de los geles se procesaron mediante un sistema digital Kodak KD1D, siendo grabadas y posteriormente procesadas.

Este estudio exclusivamente incluyó bandas reproducibles. Las imágenes y bandas fueron analizadas y codificadas cuidadosamente en dos ocasiones por dos personas de forma independiente. Los datos se analizaron con el software NTSYSpc (ROHLF,1990). Se calcularon valores de similitud según Nei & Li y Jaccard. Posteriormente se construyó mediante UPGMA una matriz de conglomerados anidados según niveles de similitud basados en datos de RAPD. El Análisis de Componente Principal fue desarrollado con el software NTSYS. La bondad de ajuste del análisis de conglomerados se evaluó a través del test de Mantel, basado en 1.000 permutaciones de la información original.

RESULTADOS Y DISCUSION

El protocolo original utilizado generó ADN de calidad insuficiente, por lo tanto, se realizaron varias modificaciones. Los mejores resultados se obtuvieron al agregar compuestos antioxidantes y protectores como 2β Mercaptoetanol y PVPP al *buffer* de extracción. De este modo se obtuvo ADN de adecuada calidad en términos de peso molecular y baja degradación.

Cuadro 2. Concentración de ADN obtenida a partir de procedencias de *Salix* spp.

Código	Concentración de ADN (ng/µl)	Código	Concentración de ADN (ng/µl)
a.	970	m	1035
b	585	n	385
c	530	o	4200
d	385	p	315
e	1250	q	845
f	450	r	500
g	350	s	565
h	340	t	410
i	380	u	435
j	805	v	305
k	1125	w	470
l	905	x	710

Las concentraciones de ADN obtenidas fluctuaron entre 1250 ng/µl (procedencia *Salix eriocephala* Can Ontario 558) y 315 ng/µl (procedencia *Salix burjatica* UK Korso). Tales

variaciones se encuentran dentro del rango normal al utilizar tejidos vegetales.

El análisis λ260/280 indica la calidad y pureza del ADN extraído y fluctuó entre 1,45 y 2,2, rango considerado adecuado. Al comparar la optimización del sistema de extracción de ADN para especies como trébol rosado, trigo y cebada y la requerida para procedencias de *Salix* spp, este último grupo de especies requirió una mayor cantidad de modificaciones y precauciones, sin embargo, finalmente generó ADN de adecuada calidad para sustentar reacciones PCR. El protocolo desarrollado para *Salix* spp permite procesar un elevado número de muestras por día (70-90) y además, no genera desechos tóxicos de difícil eliminación como Fenol.

Una reacción RAPD implica numerosos componentes que interactúan entre sí de modo complejo, en consecuencia, se hace necesario optimizar sus concentraciones. Puesto que optimizar cuatro componentes evaluando solamente 3 niveles para cada uno requiere 64 (4^3) reacciones PCR, es necesario utilizar mecanismos alternativos que permitan identificar la combinación RAPD óptima a un menor costo y mayor velocidad. Utilizando la metodología indicada en Ojeda *et al.*, (1998), las condiciones RAPD óptimas para *Salix* spp. corresponden a 0,5 mM de Mg^{+2} ; 0,2 mM dNTPs; 25 pmoles de partidores, 1 unidad de Taq polimerasa y 100 ng de ADN en un volumen final de 25 µl. La reproducibilidad de la técnica se confirmó mediante el desarrollo de RAPDs a partir de muestras independientes de ADN de la misma planta, generándose idénticos resultados.

En relación a los partidores utilizados, éstos correspondieron a partidores de 10 nucleótidos de extensión adquiridos de Operon. Un total de 41 partidores fueron evaluados en genotipos de *Salix* spp seleccionados con el objeto de identificar aquellos que permitan detectar la mayor cantidad de variabilidad genómica en la especie. De este modo se aceleró el desarrollo del protocolo necesario para *Salix* spp, el número de partidores utilizados fue inferior a los utilizados en otras especies forestales como *Pinus pinaster*, en el que se incluyeron 520 partidores Operon (Plomion *et al.*, 1995). El cuadro 3 presenta los partidores Operon evaluados y aquellos seleccionados para su utilización amplia en las procedencias estudiadas.

De un total de 42 partidores evaluados solamente 10 (23,8%) de ellos generaron RAPDs de calidad apropiada. Este valor porcentual es inferior a los alcanzados con otras especies forestales (FURMAN *et al.*, 1997), lo cual se debe al inferior número de partidores utilizado en comparación a los estudios citados, los cuales emplearon 88 y 1.000, respectivamente. Aquellos partidores de las series AA y BA resultaron particularmente útiles, aún cuando son completamente distintos a nivel de secuencia de ADN. Lo anterior permite analizar distintas regiones del genoma en *Salix* spp. y por lo tanto, generar información de mayor confiabilidad.

En relación al ciclo térmico utilizado, contempló las siguientes etapas: 42 ciclos de 0,5 min a 94°C, 1 min a 35 °C y 1,5 min a 72 °C . Como testigos negativos se utilizaron reacciones incluyendo agua estéril en lugar de templada. Las reacciones anteriores fueron cubiertas con aceite mineral y desarrolladas en un termociclador Perkin Elmer 480.

Cuadro 3. Partidores Operon evaluados

Partidor	Resultado	Partidor	Resultado
AK01	X	AA09	X
AK04	X	AA10	✓
AK07	X	AA13	X
AL07	X	AA14	✓
AL09	X	AA17	✓
AL15	X	AA18	X
AC06	X	AA20	X
AC10	X	AB03	X
AC12	X	AB04	X
AC17	X	AB10	X
AC20	X	AB16	X
BA01	✓	AB18	X
BA02	X	AB20	X
BA06	✓	AC06	X
BA07	✓	AC10	X
BA08	✓	AC12	X
BA10	✓	AC13	X
BA14	✓	AC14	X
AA06	X	AC16	X
AA07	✓	AC17	X

✓: Resultado positivo
X: Resultado negativo

En forma general, los fragmentos RAPDs obtenidos fluctuaron entre 550 y 3.500 pb (pares de bases), tal como en otras especies forestales analizadas. Una vez identificados 10 partidores Operon que generaron información adecuada, 24 procedencias de *Salix* spp. fueron sometidas a un análisis completo con los partidores indicados. El cuadro 4 resume la información obtenida por partidor.

Cuadro 4. Partidores utilizados e información generada

Partidor	RAPDs amplificados	RAPDs polimórficos	%	Partidor	RAPDs amplificados	RAPDs polimórficos	%
AA07	6	6	100	BA08	7	6	86
AA10	9	9	100	BA10	12	12	100
AA14	10	10	100	BA14	7	6	86
AA17	8	6	75	**Valor promedio**	**8,8**	**8,2**	**92,4**
BA01	7	6	86				
BA06	11	10	91				
BA07	11	11	100				

Los valores de polimorfismo encontrados son elevados, lo cual confirma la gran variabilidad existente dentro del género *Salix*. El porcentaje de RAPDs polimórficos es muy elevado y muy similar al determinado para *Nicotiana* (95,7%) (YU Y LIN, 1997), lo cual indica que RAPDs constituyen un excelente marcador molecular para el análisis de éstas y otras especies forestales, debido a que una gran proporción de ellas son polimórficas y en consecuencia, generan información útil.

En paralelo a la cantidad total de variación generada se determinó su calidad. Para esto, las distancias genéticas se compararon con los valores generados de forma aleatoria a partir de la misma base de datos. Los valores Z determinados (equivalentes a un valor t de Student) indicaron un adecuado ajuste, el que sin embargo, podría ser incrementado utilizando un número mayor de partidores, para así analizar de forma más homogénea el genoma de *Salix* spp. A pesar de lo anterior, la resolución alcanzada es suficiente para los objetivos propuestos, particularmente considerando la limitada envergadura del presente estudio.

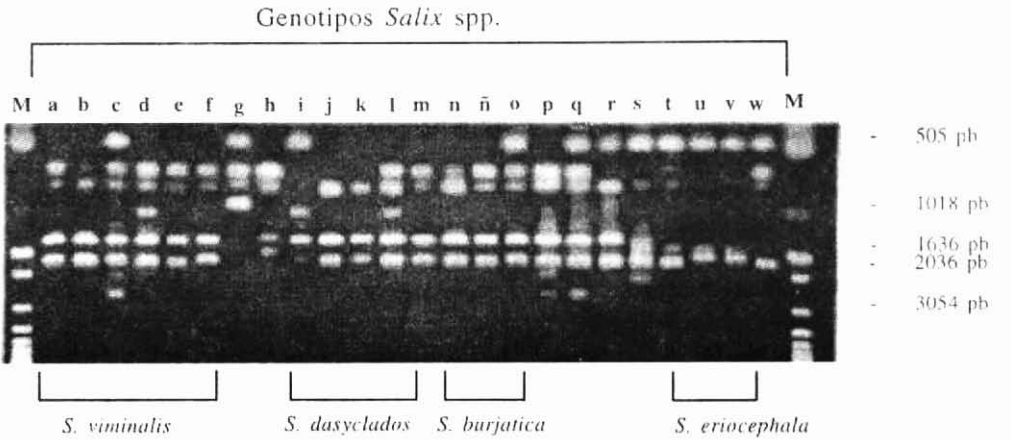
Una aplicación directa e inmediata del protocolo RAPD desarrollado fue la identificación molecular de clones de *Salix* spp.

La figura 1 presenta el resultado del análisis RAPD efectuado con el partidor BA-08, en el que se observa que mediante RAPDs es posible obtener una gran cantidad de bandas variables entre distintas procedencias. Además, ellas se presentan dentro de un amplio rango de peso molecular, lo cual permite analizar distintas áreas genómicas, incrementando la confiabilidad del análisis. Por ejemplo, todas las procedencias de *S. viminalis* (genotipos a-f) presentan bandas comunes de aproximadamente 2.000, 1.800, 900 y 800 bp. Del mismo modo, en la figura 1 se puede ver una gran similitud molecular entre las procedencias de *S. eriocephala* y sus híbridos, debido a su parentesco genético.

La totalidad de las procedencias fueron diferenciadas, inclusive pares como *S. dasyclados* SWE 77056 y SWE 79097, los cuales aunque presentando patrones muy similares muestran una banda dentro del rango 1.700-1.500 bp que permite diferenciarlas. Dentro de *S. eriocephala* las procedencias Can Ontario ER63 y los híbridos Can Ontario 601 y Can Ontario 611 se diferencian mediante fragmentos de aproximadamente 800 pb. Estos resultados reflejan la efectividad obtenida mediante el uso de RAPDs en procedencias de *Salix* spp., en contraposición al álamo donde fue necesario utilizar 12 tinciones isozímicas para

identificar un grupo de 27 clones (COMISION NACIONAL DEL ALAMO, 1998).

Figura 1. Diferenciación de procedencias *Salix* spp mediante RAPDs



M : Marcador de peso molecular
pb : Pares de bases

Los resultados documentados en este informe solamente corresponden al inicio del análisis molecular de procedencias de *Salix* spp. en el país, sin embargo, ellos tienen significativas consecuencias para la aplicación de biotecnología y el desarrollo silvícola de dichas y otras especies de valor forestal, puesto que indican la existencia de una gran cantidad de variabilidad genética factible de ser encauzada mediante mejoramiento genético. Del mismo modo, la información generada indica que RAPDs podrían ser utilizados en sistemas de certificación molecular de identidad genética, permitiendo de este modo proteger la propiedad intelectual derivada de procedencias identificadas por su adecuado comportamiento en Chile y/o mediante el mejoramiento genético de la especie. Lo anterior también permitiría monitorear la eficiencia operacional de los viveros productores de genotipos *Salix* en el país, ya que posibilitaría chequear molecularmente la integridad genética del clon, reduciendo el riesgo de clasificaciones y comercialización errada de clones *Salix* que tendrían un impacto económico negativo para productores y viveristas

Mediante los software utilizados, una gran cantidad de distancias genéticas pareadas fueron determinadas, permitiendo la comparación de todo par de procedencias deseado. La unidad de distancia empleada correspondió al índice de similitud de Jaccard, frecuentemente empleado en el análisis molecular de plantas mediante RAPDs. Mientras mayor sea el valor de tal índice, menor es la diversidad genético molecular entre los individuos comparados.

Se aprecia una gran diversidad en el grado de similitud genética existente entre las procedencias

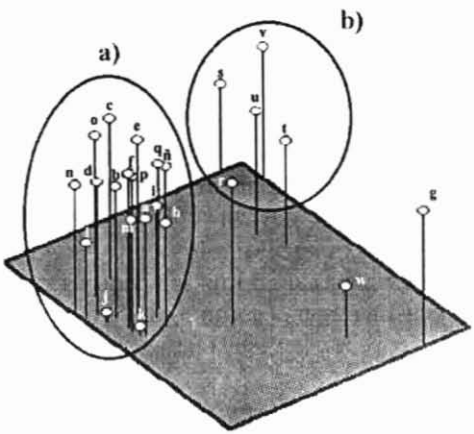
estudiadas, las cuales fluctuaron entre 0,1786 (para *Salix dasyclados* procedencia UK y *Salix eriocephala* x *exigua* procedencia Can Ontario 611) y 0,7556 (*Salix dasyclados* procedencias SWE 77056 y 79097).

La información generada permite además identificar aquellas especies que presentan una mayor homogeneidad a nivel de procedencias en términos de similitud genética. Al respecto, la similitud genética promedio de *Salix viminalis* y *Salix dasyclados* alcanzó a 0,40 y 0,49 respectivamente, indicando una mayor diversidad genética que incrementa las posibilidades de encontrar procedencias de buena adaptación y productividad entre genotipos de *Salix viminalis*. Es importante recalcar que una mayor homogeneidad entre procedencias indica un mayor grado de homogeneidad y/o parentesco genético, lo cual puede afectar negativamente su adaptación y comportamiento frente a plagas y/o enfermedades.

La información molecular permite complementar el conocimiento sobre comportamiento fenotípico y origen geográfico de las procedencias, permitiendo cuantificar y detectar diferencias y similitudes a nivel molecular. Considerando la importancia, costos y requerimientos operacionales asociados con los ensayos de procedencia en *Salix* spp. y otras especies forestales, la integración de tecnología de marcadores moleculares aporta información que permite tomar decisiones más informadas en relación a la selección de procedencias, haciendo más efectivo el largo proceso de identificación de genotipos bien adaptados a las condiciones productivas del país.

Aún cuando los valores de similitud genética *per se* producen una considerable cantidad de datos, mediante un adecuado análisis es posible generar un mayor número de inferencias. La figura 2 presenta los resultados de una Análisis de Componente Principal, el que permite la ordenación tridimensional de las procedencias *Salix* spp incluidas en este

Figura 2. Análisis de Componente Principal



estudio.
En la figura 2 se observa que existen dos agrupaciones principales de procedencias:

a) Aquellas pertenencientes a *S. eriocephala* y sus híbridos más las procedencias *S. sericans.*
b) Aquellas procedencias de las especies *S. viminalis, S. purpurea, S. dasyclados, S burjatica, S. calodendron, S. stipularis.*

Las procedencias China shrub (x) y particularmente *S. purpurea* (g) se alejan en términos genéticos de los grupos principales mencionados anteriormente.

Lo anterior refleja que no sólo es posible analizar pares de procedencias o especies, también es factible estudiar de forma simultánea grupos de procedencias y sus respectivas especies, determinándose así aquellas de mayor divergencia genética lo cual complementa la información disponible para la selección de procedencias. Es posible definir grupos divergentes de especies, aspecto de enorme importancia para el eventual mejoramiento genético del género *Salix* en Chile, ya que en este grupo de especies uno de los principales mecanismos de mejoramiento corresponde a la producción de híbridos y en la medida en que más divergentes sean los progenitores existe una mayor posibilidad de generar individuos valiosos debido a la mejor utilización de la heterosis derivada de la hibridación.

CONCLUSIONES

De los resultados generados mediante el presente estudio es posible concluir varios aspectos, entre los que destacan el hecho de que la aplicación de marcadores moleculares permite generar una gran cantidad de información genética de modo más productivo que otras alternativas. La plataforma tecnológica necesaria para aplicarlos en especies forestales ya ha sido desarrollada en el país. Además, la información generada mediante RAPDs permite incrementar la eficacia y productividad de actividades forestales como el análisis de procedencias. También, utilizando RAPDs es factible diferenciar a nivel molecular procedencias de *Salix* spp, lo cual tiene numerosas implicancias positivas para el desarrollo de la especie en el país.

Existe un adecuado nivel de diversidad genética entre las procedencias de *Salix* spp. analizadas, la cual varía entre las especies incluidas, detectándose dos grandes agrupaciones de procedencias, las cuales concentran una significativa fracción de la variabilidad disponible.

Las procedencias introducidas capturan una cantidad importante de diversidad genética y cumplen efectivamente su finalidad, esto es incrementar la base genética disponible para desarrollar la industria del sauce-mimbre en el país.

ANALISIS MOLECULAR DE GENOTIPOS ENDEMICOS DE *Salix humboldtiana* Willd.

INTRODUCCION

Una metodología complementaria para identificar procedencias de *Salix* spp. valiosas, consiste en evaluar poblaciones naturalizadas de este género, cuya distribución en Chile se extiende entre las regiones IV y XI. Las especies de *Salix* spp. observadas en el país corresponden principalmente a *S. babylonica, S. alba,* y *S. viminalis*. Existe también una especie nativa, *S. humboldtiana* Willd., considerada la única *Salicaceae* endémica de América del Sur, por lo que presenta un gran potencial ya que debiera mostrar una mejor adaptación a las condiciones ambientales y de sitio nacionales que aquellas especies introducidas.

S. humboldtiana Willd. es un árbol grande de forma fastigada, hojas largas lanceoladas, que florece entre septiembre y noviembre y frecuentemente se encuentra en las cercanías de ríos y cuerpos de agua (NEWSHOLME, 1992). El conocimiento de la diversidad y relaciones genéticas existentes entre individuos *de S. humboldtiana* Willd. es muy limitado.

El desarrollo de marcadores moleculares en especies leñosas ha permitido el análisis molecular de especies de géneros tan diversos como *Quercus, Pseudotsuga* y *Fagus* (AAGARD *et al.*,1998). La información generada mediante RAPDs complementa al análisis fenotípico de procedencias nativas de *S. humboldtiana* Willd., permitiendo determinar relaciones y valores de diversidad genética directamente a nivel molecular.

OBJETIVOS

Realizar un análisis genético mediante marcadores moleculares RAPDs a un grupo diverso de procedencias de *S. humboldtiana* Willd. De este modo, evaluar el potencial de genotipos endémicos de *Salix* para contribuir al desarrollo industrial del sauce-mimbre en Chile.

MATERIAL Y METODO

Se evaluó un conjunto de 16 procedencias de *S. humboldtiana* Willd.; las que se describen en el cuadro 5.

Cuadro 5. Genotipos de *Salix humboldtiana*

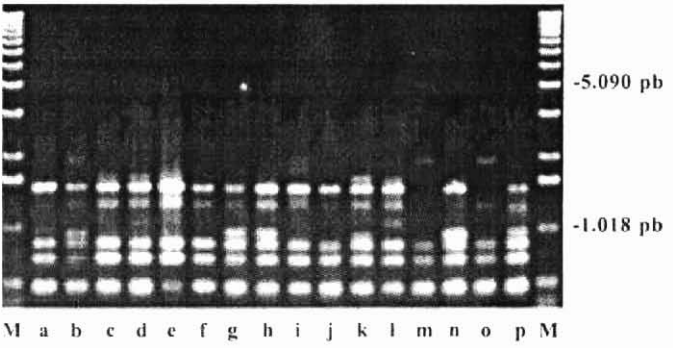
Código	Especie	Procedencia
a	*Salix humboldtiana*	La Serena
b	*Salix humboldtiana*	Ovalle
c	*Salix humboldtiana*	Cabrero
d	*Salix humboldtiana*	Cogoti
e	*Salix humboldtiana*	Maintencillo
f	*Salix humboldtiana*	San Marcos
g	*Salix humboldtiana*	Los Vilos
h	*Salix humboldtiana*	Las Condes
i	*Salix humboldtiana*	La Ligua
j	*Salix humboldtiana*	Imperial
k	*Salix humboldtiana*	Angol
l	*Salix humboldtiana*	Yumbel
m	*Salix humboldtiana*	Montegrande
n	*Salix humboldtiana*	Palqui
o	*Salix humboldtiana*	Coelemu
p	*Salix humboldtiana*	La Paloma

Las reacciones RAPD y posterior análisis de las información molecular se llevaron a cabo según lo indicado en la sección Análisis molecular de procedencias introducidas de *Salix* spp.

RESULTADOS Y DISCUSION

El riguroso control de las variables que afectan las reacciones RAPD permitió obtener resultados reproducibles. Además, las reacciones basadas en la misma muestra de ADN independientemente extraído y amplificado con el mismo partidor generaron resultados RAPD idénticos. Esto confirma los resultados de Campos De Quiroz (1999b) y Kovo (1998) en relación a la replicabilidad de RAPDs en especies leñosas. Los productos PCR observados se encontraban en el rango de 650 a 3000 pares de bases. La figura 3 presenta los RAPDs obtenidos con el partidor BA 08 en 16 procedencias *S. humboldtiana*.

Figura3. RAPDs obtenidos con el partidor BA-08 en las 16 procedencias *S. humboldtiana* Willd. analizadas (Códigos indicados en cuadro 5).



De 45 partidores evaluados se seleccionaron 18, los cuales generaron mejores resultados en términos de replicabilidad RAPD. Durante la selección de partidores el grado de polimorfismo observado fue ignorado a objeto de reducir desviaciones en los valores de diversidad genética. El cuadro 6 presenta los resultados obtenidos por partidor utilizado y sus secuencias.

Cuadro 6. Propiedades de los diferentes partidores

Partidor	Secuencia partidor 5'-3'	Número de productos polimórficos
AA07	CTACGCTCAC	5
AA10	TGGTCGGGTG	7
AA14	AACGGGCCAA	8
AA17	GAGCCCGACT	8
AK14	CTGTCATGCC	6
AK04	AGGGTCGGTC	5
BA01	TTCCCCACCC	6
BA06	GGACGACCGT	7
BA07	GGGTCGCATG	7
BA08	CCACAGCCGA	3
BA10	GGACGTTGAG	8
BA14	TCGGGAGTGG	5
AA08	TCCGCAGTAG	6
BB03	TCACGTGGCT	5
G04	AGCGTGTCTG	12
H08	GAAACACCCC	8
AW4	AGGAGCGACA	8
Promedio		**6,8**

Niveles comparativamente reducidos de variabilidad se observaron entre las procedencias *S. humboldtiana* Willd. analizados y el número promedio de bandas RAPD variables (alelos), por partidor fue 6,8 mientras que en un estudio basado en una amplia gama de especies de *Salix* dicho valor alcanzó a 10,1 bandas polimórficas por partidor (CAMPOS DE QUIROZ, 1999a). Un menor número de bandas variables por partidor fue observado en *S. humboldtiana* para todos los partidores comunes incluidos en ambos estudios, reflejando la comparativamente reducida diversidad genética detectada en *S. humboldtiana* Willd. El rango de bandas variables por partidor en otras especies leñosas como *Populus tremuloides* fluctúa entre 4 a 7, mientras que en *Berthotelia excelsa* hasta 14 bandas RAPD fueron observadas por partidor.

Un total de 107 bandas RAPD fueron incluidas en este estudio, valor superior a otros estudios en especies leñosas y superior a las 95 bandas RAPD reportadas por Triest *et al.* (1997) para analizar híbridos de *S. alba* y *S. fragilis*. En *Populus tremuloides* y *Picea abies* el número de bandas RAPD incluídas alcanzó a 28 y 42 respectivamente (SCHEEPERS *et al.*, 1998; YEH *et al.*, 1995). En consecuencia, el número de bandas RAPD que sustentan el presente estudio se considera apropiado.

Tanto la cantidad como la calidad de información generada mediante RAPDs permite su utilización en el análisis genético de *S. humboldtiana* Willd. y otras especies leñosas, especialmente al comparar sus requerimientos analíticos y costos de desarrollo frente a otros sistemas de marcadores moleculares.

Diferencias significativas fueron observadas en la magnitud de los valores de similitud genética entre procedencias. Los valores de similitud de Nei & Li más elevados se observaron entre los pares genotípicos Angol/Yumbel (0,91) y Cogoti/Maitencillo (0,84), mientras que aquellos valores más reducidos se detectaron entre los procedencias San Marcos y Coelemu (0,38). El coeficiente de similitud Nei & Li promediado para todas las combinaciones fue 0,6 mientras que un valor de 0,36 fue observado al analizar una amplia gama de especies de *Salix* spp. (CAMPOS DE QUIROZ, 1999a).

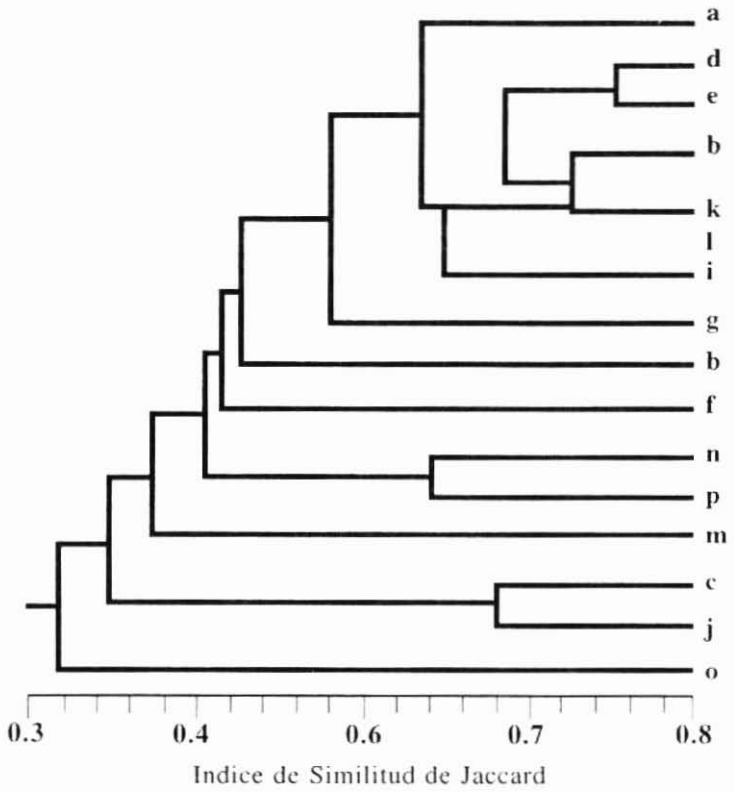
Con el objetivo de representar visualmente las distancias genéticas y generar agrupaciones genotípicas mediante un análisis de conglomerados se generaron fenogramas, los cuales permiten reflejar distancias genéticas entre individuos similares desde una perspectiva genética. Fenogramas basados en los valores de similitud de Nei & Li y Jaccard fueron generados y comparados con el objeto de determinar la consistencia estadística del análisis de conglomerados. Ambos fenogramas resolvieron las 16 procedencias *S. humboldtiana* Willd. de una manera consistente y similar, aún cuando reflejaron los distintos coeficientes de similitud en que ellos se basan (figura 4).

El análisis posterior se basa exclusivamente en los resultados de Nei & Li. Se observan numerosas relaciones genéticas, y a un valor Nei & Li de 0,48 se observa una ramificación de la cual se desprenden dos subgrupos: uno incluyendo procedencias *S. humboldtiana* Willd. del Norte de Chile y un segundo subgrupo que incluye procedencias de la Región Centro-Sur de Chile. Dentro del primer subgrupo los pares Palqui/La Paloma y Maitencillo/ Cogotí aparecen como genéticamente similares entre sí. Del mismo modo, las procedencias Angol y Yumbel aparecen como muy similares entre sí, puesto que aún a un valor Nei & Li de 0,9 (valor máximo 1,0) no fueron separadas. Esta información es valiosa en términos de conservación de especies y puede utilizarse para coleccionar germoplasma genéticamente diverso, el cual se adapta mejor a condiciones climáticas variables y además, para reducir la pérdida de germoplasma valioso. Del mismo modo, la información generada mediante RAPDs puede ser utilizada como complemento durante el proceso de selección de genotipos de *S. humboldtiana* para el establecimiento de ensayos de procedencia, puesto que determina agrupaciones y además cuáles genotipos son más similares o diversos entre sí.

Las procedencias Angol y Yumbel fueron agrupadas junto a las procedencias del Norte de Chile. Considerando que las condiciones climáticas de Angol son más calurosas y secas que lo esperado de su latitud (37° 35'y 38° 2' lat. Sur) debido a la sombra de lluvia causada por la Cordillera de Nahuelbuta, es factible que la procedencia *S. humboldtiana*

Willd. proveniente de Angol sea originaria del Norte de Chile y que a partir de ésta se derive la procedencia Yumbel mediante propagación vegetativa. De este modo se explica la estrecha relación genética observada entre las procedencias *S. humboldtiana* Willd. Angol y aquellas del Norte de Chile y además, la elevada similitud genética Nei & Li observada entre las procedencias Angol y Yumbel (figura 4).

Figura 4. Fenograma de procedencias de *S. humboldtiana* basado en el índice de similitud genética de Jaccard (códigos indicados en cuadro 5)



La procedencia Las Condes fue agrupada junto con aquellas procedencias originarias del Norte del país y además exhibe una elevada similitud genética con aquellas de Angol y Yumbel, lo cual probablemente refleja el movimiento antrópico de material de propagación vegetativa de *S. humboldtiana* Willd. a lo largo del país, a la vez de permitir la identificación de una procedencia ampliamente establecida en Chile.

La calidad estadística del ajuste del análisis de conglomerados fue evaluada mediante la construcción de matrices cofenéticas. El valor de correlación cofenético observado (equivalente al coeficiente Z del test de Mantel) fue 0,94 dentro de una escala 0-1, reflejando así un excelente ajuste del análisis de conglomerados y en consecuencia una elevada confiabilidad estadística de la información generada.

La hibridación interespecífica entre especies *Salix* es un fenómeno frecuente (NEWSHOLME, 1992) y constituye la mayor fuente de variación para el mejoramiento genético de *Salix* spp. Procedencias *de S. humboldtiana* Willd. seleccionadas en términos de diversidad molecular y fenotipo podrían ser utilizadas en programas de cruzamientos con procedencias introducidas de otras especies de *Salix* a objeto de introducir genes de adaptabilidad desde *S. humboldtiana* Willd. hacia procedencias de *Salix* de superiores propiedades tecnológicas. Considerando la asociación entre el grado de heterocigosis y la producción de biomasa en *Salix eriocephala* recientemente reportado (ARAVANOPOULOS Y ZSUFFA, 1998), el uso de información molecular ofrece una valiosa fuente de información para los programas de utilización de *Salix* spp en Chile.

CONCLUSIONES

Algunas de las principales conclusiones obtenidas a partir de este estudio permiten establecer que las procedencias endémicas de *S. humboldtiana* nacionales analizadas presentan una menor diversidad molecular que otras especies de *Salix* sin embargo, a pesar de la reducida diversidad genética observada, RAPDs permitieron determinar relaciones genéticas y discriminar entre las procedencias *de S. humboldtiana* Willd analizadas. Los fenogramas construidos reflejan adecuadamente el origen geográfico de las procedencias analizadas y la información molecular generada mediante RAPDs constituye un valioso aporte para la selección de procedencias de *S. humboldtiana* Willd.

ANALISIS MOLECULAR DE PROCEDENCIAS SELECCIONADAS DE *Salix* spp.

OBJETIVOS

Aplicar RAPDs a un conjunto de procedencias de *Salix* seleccionadas por su buen comportamiento en Chile.

MATERIAL Y METODO

El material vegetal empleado correspondió a clones colectados a partir de un ensayo de introducción de *Salix* spp establecido en la localidad de Niágara, comuna de Vilcún (IX Región), Chile.

Los siguientes genotipos fueron muestreados:

Cuadro 7. Genotipos y procedencias de *Salix* spp.

Código	Especie	Procedencia
a	*Salix alba*	Coelemu
b	*Salix purpúrea*	Angol
c	*Salix viminalis*	Chimbarongo
d	*Salix viminalis*	Angol
e	*Salix viminalis*	Coyhaique
f	*Salix caprea*	Longaví
h	*Salix humboldtiana*	Quirihue
i	*Salix caprea*	Valdivia
j	*Salix viminalis*	Coyhaique
k	*Salix alba* var *vittelina*	Llanquihue
l	*Salix x rubens*	Yumbel

Las reacciones RAPD y el posterior análisis de la información molecular se llevaron a cabo según lo indicado en la sección Análisis Molecular de Procedencias Introducidas de *Salix* spp.

RESULTADOS Y DISCUSION

El protocolo de extracción de ADN permitió obtener ADN de adecuada calidad en términos de peso molecular y baja degradación. Las concentraciones de ADN obtenidas fluctuaron entre 1200 ng/µl (procedencia *Salix humboldtiana* Quirihue) y 315 ng/µl (procedencia *Salix caprea* Longaví) (cuadro 8). La variación observada se encuentra dentro del rango normal de la especie.

El análisis λ260/280 indica la calidad y pureza del ADN extraído y fluctuó entre 1,3 y 1,9 rango considerado adecuado. El protocolo desarrollado para *Salix* spp. permite procesar un adecuado número de muestras por día (70-90).

Cuadro 8. Concentración de ADN obtenida a partir de procedencias de *Salix* spp.

Código	Concentración de ADN (ng/µl	Código	Concentración de ADN (ng/µl)
a	850	h	1200
b	695	i	915
c	530	j	1050
d	850	k	695
e	675	l	540
f	450		

Los partidores utilizados correspondieron a partidores de 10 nucleótidos de extensión adquiridos de Operon. Un total de 51 partidores fueron evaluados en genotipos de *Salix* spp. seleccionados con el objeto de identificar aquellos que permitan detectar la mayor cantidad de variabilidad genética en esta especie. El cuadro 9 presenta los partidores Operon evaluados y aquellos seleccionados para su utilización amplia en las procedencias estudiadas.

Cuadro 9. Partidores Operon evaluados

Partidor	Resultado	Partidor	Resultado	Partidor	Resultado
AA07	X	AC07	✓	A018	✓
AA09	X	AC10	X	AP10	✓
AA10	X	AC12	X	AQ20	✓
AA12	✓	AC13	X	AV16	✓
AA13	X	AC14	X	AV20	X
AA14	X	AC17	X	AW04	✓
AA17	X	AC20	X	AX14	✓
AA20	X	AG04	✓	BA01	X
AB03	X	AK01	X	BA02	X
AB04	X	AK04	✓	BA06	✓
AB10	X	AK07	X	BA07	✓
AB14	✓	AK12	✓	BA08	✓
AB16	X	AK14	✓	BA10	X
AB17	✓	AL07	X	G04	✓
AB18	X	AL09	X	H08	✓
AB20	X	AL15	X	H16	✓
AC06	X	A011	✓	H18	X

✓: Resultado positivo
X: Resultado negativo

De un total de 51 partidores evaluados, 21 (41,1%) de ellos generaron RAPDs de calidad apropiada (cuadro 9). Este valor porcentual es similar a los observados en otras especies forestales (FURMAN *et al.*, 1997). Aquellos partidores de las series A, B, G y H resultaron particularmente útiles.

Los fragmentos RAPDs obtenidos fluctuaron entre 350 y 2.800 pb (pares de bases), rango similar al observado en otros individuos *Salix* spp. analizados anteriormente.

Una vez identificados los 21 partidores Operon que generaron información adecuada, las 11 procedencias *Salix* spp fueron sometidas a un análisis completo con los partidores seleccionados. El cuadro 10 resume la información detectada por partidor.

Cuadro 10. Partidores utilizados e información generada

Partidor	RAPDs amplificados	RAPDs polimórficos
AA12	6	6
AB14	9	7
AB17	10	6
AC07	8	6
AG04	7	6
AK04	11	8
AK12	11	7
AK14	7	6
A011	12	7
A018	7	6
AP10	8	5
AQ20	6	4
AV16	9	6
AW04	12	8
AX14	9	6
BA06	10	4
BA07	12	8
BA08	8	6
G04	9	5
H08	8	6
H16	11	5
Valor promedio	**8,8**	**6,04**

Los valores de polimorfismo encontrados son elevados, lo cual confirma la gran variabilidad existente dentro del género *Salix*. El porcentaje de RAPDs polimórficos observados (68%) es similar al encontrado en otras especies forestales.

El número de locus incluidos en el presente estudio (121 bandas RAPD) es superior al alcanzado con los dos estudios anteriores con genotipos *Salix* spp., lo que permite dar una buena consistencia estadística a la información generada. En consecuencia, la resolución alcanzada se considera adecuada al considerar la limitada envergadura del presente estudio.

Se observó un importante número de bandas variables entre las procedencias seleccionadas de *Salix* spp. Además, ellas se presentan dentro de un amplio rango de peso molecular.

Se observa una adecuada cantidad de variabilidad genética entre las procedencias seleccionadas de *Salix* con todas las procedencias analizadas, presentando un patrón RAPD distinto tanto para el partidor AX-14 como para el resto de los partidores evaluados.

La unidad de distancia empleada correspondió al índice de similitud de Nei & Li, el cual fluctúa entre 1 y 0. Mientras mayor sea el valor de tal índice menor es la diversidad genético molecular entre los individuos comparados.

Se observó una cantidad adecuada de diversidad genética entre las procedencias *Salix* spp. estudiadas, y el índice de Nei & Li promedio observado alcanzó a 0,41. El menor valor Nei & Li se encontró entre procedencias de distintas especies (valor 0,2 para el par *Salix humboldtiana* procedencia Quirihue y *Salix caprea* procedencia Valdivia) mientras que su mayor valor se observó en un par de procedencias de la misma especie (valor 0,87 para las procedencias *Salix viminalis* Chimbarongo y Coyhaique). Lo anterior es relevante puesto que indica que la información generada mediante RAPDs posee sentido biológico. Sin embargo, no solamente permite discriminar entre sí procedencias de *Salix* spp., a la vez permite cuantificar con precisión el grado de diferencia existente entre un par dado de procedencias. El cuadro 11 presenta los valores Nei & Li determinados entre todas las combinaciones posibles de pares de procedencias.

Cuadro 11. Indice Nei & Li de similitud genética determinado para pares de combinaciones de procedencias de *Salix* spp.

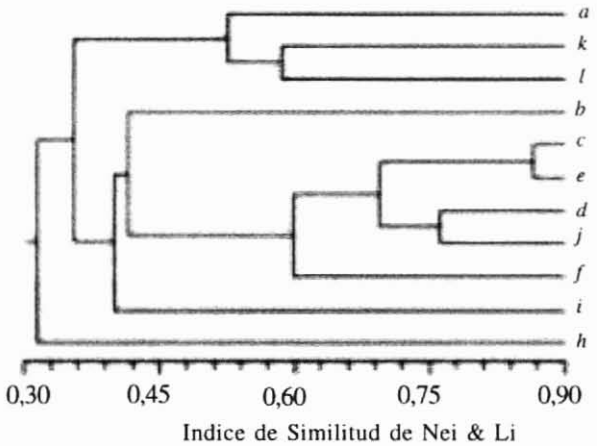
	a	b	c	d	e	f	h	i	j	k	l
a	1										
b	0,34	1									
c	0,4	0,45	1								
d	0,29	0,33	0,71	1							
e	0,39	0,46	0,87	0,74	1						
f	0,46	0,46	0,66	0,53	0,63	1					
h	0,32	0,23	0,36	0,28	0,32	0,51	1				
i	0,41	0,34	0,41	0,39	0,35	0,5	0,2	1			
j	0,37	0,33	0,64	0,76	0,68	0,56	0,29	0,38	1		
k	0,5	0,41	0,33	0,27	0,29	0,41	0,27	0,36	0,21	1	
l	0,55	0,43	0,42	0,24	0,35	0,38	0,31	0,31	0,29	0,58	1

Al analizar los valores de similitud calculados, se desprende que el conjunto de procedencias como un todo captura una cantidad importante de diversidad genética. Lo anterior indica que la labor de selección de procedencias no solamente ha sido eficiente en términos fenotípicos (es decir, identificando aquellas procedencias de mejor valor en evaluaciones de campo), también ha permitido mantener una cantidad importante de diversidad genética, aumentando las posibilidades de encontrar procedencias de buena adaptación y productividad entre genotipos de *Salix* spp.

Los valores de similitud genética Nei & Li per se producen una gran cantidad de información, sin embargo, es posible generar un mayor número de inferencias a partir de su representación gráfica. La figura 5 presenta el análisis de conglomerados de procedencias de *Salix* spp obtenido a partir de la información molecular. La bondad del ajuste del análisis de

conglomerados se determinó mediante el test de Mantel, el cual produjo un valor de 0,85 que corresponde a un ajuste de naturaleza "muy bueno", por lo que los resultados alcanzados son estadísticamente confiables y consistentes.

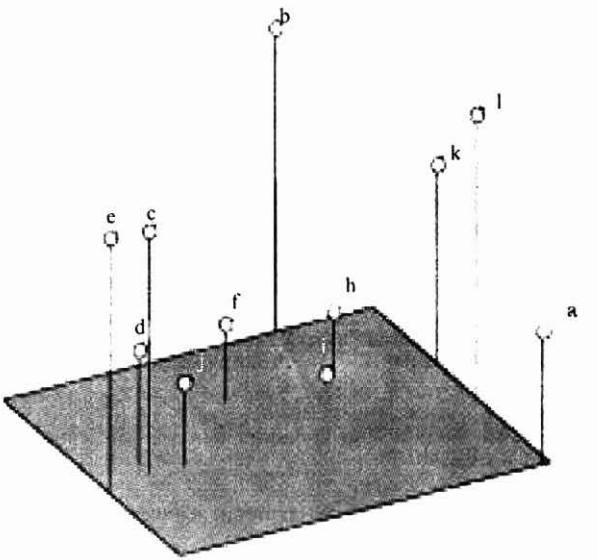
Figura 5. Análisis de conglomerados obtenidos con procedencias seleccionadas *Salix* spp. (códigos de procedencias se encuentran en el cuadro 7)



Se observa que el genotipo más separado de las restantes procedencias corresponde a *Salix humboldtiana* procedencia Quirihue, relevante ya que esta especie corresponde al inicio *Salix* endémico de América Latina, y por lo tanto, representa un pool genético distinto al de las otras procedencias existentes en Chile derivadas de especies utilizadas en Europa o Norteamérica. Dentro de las otras especies estudiadas, es posible observar en general, un menor grado de diversidad genética entre aquellas correspondientes a *Salix viminalis*. Además, es posible establecer que el par de procedencias *S. viminalis* Chimbarongo y Coyhaique-e presentan una mayor similitud entre sí que con las otras procedencias *S. viminalis* estudiadas. En términos prácticos, las procedencias *S. viminalis* son más similares entre sí que el resto de las procedencias, sin embargo, es perfectamente posible diferenciarlas en términos de similitud genética mediante RAPDs, lo cual es importante para su utilización práctica.

Considerando la importancia de las procedencias *Salix* spp estudiadas para el desarrollo de la industria asociada en Chile, se procedió a desarrollar un Análisis de Componente Principal (ACP), el que permite la ordenación tridimensional de las procedencias de *Salix* spp. incluidas en el estudio, haciendo posible apreciar con mayor precisión las relaciones existentes entre las procedencias analizadas (figura 6).

Figura 6. Análisis de Componente Principal obtenido con procedencias seleccionadas de *Salix* spp (códigos de procedencias se encuentran en el cuadro 7).



El análisis simultáneo de diversas especies de *Salix* spp y sus respectivas procedencias permite detectar aquellas de mayor divergencia genética, complementando la información disponible para la selección de procedencias. Además, de este modo se definen grupos divergentes de especies y procedencias, lo cual posee relevancia para el eventual mejoramiento genético del género *Salix* en Chile.

CONCLUSIONES

A partir del presente estudio se puede concluir que el número de locus incluidos (121) imprime una adecuada confiabilidad estadística al análisis de diversidad genética. Además, ha sido posible establecer que como grupo, las procedencias de *Salix* spp seleccionadas capturan una valiosa diversidad genética. Las procedencias de *Salix viminalis* corresponden a las más similares entre sí, a pesar de lo cual pueden ser divididas en dos pares: Chimbarongo-Coyhaique-e y Angol-Coyhaique-j. Finalmente, la procedencia *S. humboldtiana* Quirihue se encuentra genéticamente alejada de las restantes procedencias, lo que concuerda con su origen genético endémico. Del mismo modo, el análisis ACP identifica a la procedencia *S. purpurea* como la más distante a las restantes procedencias.

AGRADECIMIENTOS

Tanta la visión de Marta Abalos (INFOR) para integrar tecnologías de marcadores moleculares al desarrollo de iniciativas forestales en Chile como al apoyo de laboratorio deVerónica Ojeda que permitió los estudios reportados.

BIBLIOGRAFIA

AAGARD, J.; KRUTOVSKII, K. ; STRAUSS, S. 1998. RAPD and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. Heredity 81: 69-78.

ARAVANOPOULOS, F.; ZSUFFA, L. 1998. Heterozygosity and biomass production in *Salix eriocephala*. Heredity 81: 396-403.

CAMPOS DE QUIROZ, H. 1999a. Molecular analysis of *Salix* spp. provenances with RAPDs. Submitted to Silvae Genetica.

CAMPOS DE QUIROZ, H. 1999b. Identificación molecular de clones *Salix* mediante RAPDs. Ciencia e Investigación Forestal. En prensa.

CAMPOS DE QUIROZ, H. 1995. Marcadores moleculares. Conceptos. AgroSur. 23 (1): 68-75.

FAO. 1998. Productos forestales no maderables en Chile. Santiago, Chile. Serie Forestal n. 10. 65 p.

FAO. 1980. Los álamos y los sauces en la producción de madera y la utilización de las tierras. Roma, Italia. Colección FAO: Montes N° 10. 349 p.

FURMAN, B; GRATTAPAGLIA, D.; DVORAK, W. ; OMALLEY, D. 1997. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. Mol. Ecol. 6: 321-331

INFOR-INIA. 1999.Informe de Avance Convenio INFOR-INIA. Análisis molecular de *Salix humboldtiana*.15 p

INFOR-INIA. 1998. Informe de Avance Convenio INFOR-INIA. Análisis molecular de genotipos *Salix* spp. 12 p.

NARVAEZ, C.; CASTRO, H.; VALENZUELA, J.; MUÑOZ, C. ;HINRICHSEN, P. 1998. Uso de marcadores moleculares para identificación de variedades de vid. Talca, Chile. In: IV Congreso Nacional de Biotecnología. 84 p.

NEWSHOLME, C. 1992. Willows the genus *Salix*. Portland, Oregon, USA. Timber Press. 224 p.

OJEDA, V; ORTEGA, F. ; CAMPOS DE Q.H. 1998. Marcadores moleculares en trébol rosado (*Trifolium pratense* L.) I. RAPDs. Talca, Chile. In: IV Congreso Nacional de Biotecnología. 87 p.

ROHLF, J. 1990. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Software.

SCHEEPERS, D.; ELOY, M-C. ; BRIQUET, M. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce *(Picea abies)*. Theor. Appl. Genet. 94: 480-485.

SKOV, E. 1998. Are RAPD-markers reproducible between different laboratories ?. Silvae Genetica 47 (5-6): 283-287.

TRIEST, L.; B. DE GREEF; R DE BONDT; D VANDENBOSSCHE; M D'HAESELEER; J. VAN SLYCKEN; E. COART. 1997. Use of RAPD markers to estimate hybrydization in *Salix alba* and *Salix fragilis*. Belgian Journal of Bot. 129 (2): 140-148.

WILLIAMS, JGK ; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, A. ;TINGEY, S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary markers are useful as genetic markers. Nucl. A. Res. 18: 6531-6535.

YEH, F.; CHONG, DK.; YANG, RC. 1995. RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (Populus tremuloides Michx.) from Alberta. Journal of Heredity 86: 454-460.

YU, Y-L ; LIN, T-Y. 1997. Construction of phylogenetic tree for *Nicotiana* species based on RAPD markers. J. Plant Res. Pp. 187-193.

RESULTADOS DE ENSAYOS DE INTRODUCCION DE *Salix* spp. EN LA ZONA NORTE, CENTRAL Y SUR DE CHILE

Marta Abalos R.[1], Hernán Soto[2], Aldo Salinas[2]
1 Ing. Forestal, 2 Técnicos Forestales, Subgerencia de Tecnologías Silvícolas, Instituto Forestal, INFOR, Chile

RESUMEN

El presente artículo presenta los resultados de los ensayos de introducción de especies del género *Salix*, establecidos entre las regiones IV y XI de Chile, realizados en el marco del proyecto "Desarrollo Integral del Cultivo y la Industrialización del Sauce-mimbre", ejecutado por INFOR.

Los ensayos fueron establecidos en julio de 1997 y evaluados durante los tres años siguientes, en sus características de rendimiento de cosecha (t/ha) y calidad de varas para su utilización en manufacturas de mimbre.

Los resultados obtenidos permiten confirmar el potencial de crecimiento del sauce mimbre en una amplia distribución geográfica, que abarca desde la zona norte (IV región) hasta la zona sur del país (IX región), y en sectores específicos de las regiones X y XI.

INTRODUCCION

El sauce-mimbre es una especie ampliamente conocida en Chile y el mundo por sus cualidades para la fabricación de productos, tales como cestas, embalajes y muebles. Su utilización data desde principios de la historia del hombre. Sin embargo la masificación de su cultivo, conoció su máximo esplendor en la primera mitad del siglo pasado. A partir de entonces comenzó su declinación en los países industrializados, principalmente por el encarecimiento de los factores productivos y la fuerte competencia de productos sustitutos.

No obstante lo anterior, la revalorización de los productos naturales y el reconocimiento del trabajo artesanal junto a las posibilidades que éste abre al mundo rural, ha incentivado nuevamente su cultivo en regiones y localidades que presentan ventajas comparativas y competitivas para su cultivo y transformación industrial.

Dentro de Latinoamérica, Chile destaca por presentar las mejores condiciones para este cultivo, dadas por el clima, la fertilidad de sus suelos y por la disponibilidad de recursos técnicos y humanos para abocarse a la producción de materia prima y manufacturas de mimbre.

Si bien el cultivo del sauce-mimbre se realiza en Chile desde la época de la colonia, cuando fue introducida la especie *Salix viminalis* procedente de España, hasta ahora su producción se ha concentrado solo en una localidad del país: Chimbarongo (VI región), siendo desconocidas las características de su cultivo, manejo e industrialización en otras zonas del país.

Especies de *Salix* utilizadas como mimbre

El término mimbre (osier -francés-, basket willows -inglés-, vime -portugués-) es utilizado para designar una gran variedad de sauces[1], cuyas características (varas erguidas, largas y flexibles) permiten que sean utilizados en trabajos de cestería.

Referencias de estos sauces aptos para mimbre se encuentran ampliamente citados en la literatura, desde 1900. *Salix viminalis* es una de las especies más difundidas por la importancia que su cultivo representó en el viejo mundo a mediados del siglo pasado. Otras de estas especies son: *Salix purpurea*, muy apreciada por la gran flexibilidad de sus varas; *S. alba* var. *vitellina*, destacable por el color amarillo de sus ramas; *S. x rubra* (híbrido de *S. viminalis* x *S. purpurea*), *S. fragilis*, *S. triandra*, *S. x calodendron*, *S. x dasyclados*, *S. x mollisima (Salix viminalis x Salix triandra)* y *S. amigdaliana* (MALDONADO, 1926; OPAZO 1939; POHJONEN, 1984).

Además se utilizan como mimbre un conjunto de híbridos de *Salix viminalis* que han sido mejorados: *S. viminalis* North Ireland, *S. viminalis* Gigantea, *S. viminalis* Mullatin, *S. viminalis* Lars 4/16, *S. viminalis* English Rod, *S. viminalis* Bowles Híbrid (GREZ, 1992).

Condiciones de crecimiento

Entre las principales características que poseen las especies de *Salix*, que hacen que sea una especie interesante para el cultivo, se encuentran: su fácil reproducción y buen establecimiento, abundante rebrote vegetativo después de la cosecha, rápido crecimiento juvenil, altas tasas de fotosíntesis neta, copas estrechas y ramas erguidas, tolerancia a la competencia en manejo a alta densidades, uso eficiente de agua y nutrientes, resistencia a pestes y enfermedades y posibilidad de ganancia genética a través de mejoramiento genético y selección clonal (GREZ, 1992).

Los sitios adecuados para el crecimiento de *Salix* spp. se caracterizan por poseer inviernos con temperaturas mínimas cercanas a los 0°C, que permiten establecer un período de receso vegetativo. Durante la estación de crecimiento las temperaturas pueden alcanzar máximos mensuales superiores a los 30°C y *Salix* responde bien siempre que se proporcione un apropiado abastecimiento de agua (INFOR, 1998).

En cuanto a suelo, los sauces en general poseen una gran adaptabilidad a cualquier tipo de suelo, excepto los pantanos, prefiriendo sin embargo, terrenos planos de texturas medias, aireados, con abundante materia orgánica y de al menos una profundidad de 30 cm (INFOR, 1998). OPAZO (1939), señala que los suelos arcillosos compactados en la superficie, impermeables y poco aireados son inconvenientes, porque no permiten

1 En América Central y Sudamérica el término mimbre se utiliza para designar a especies de bejuco que crecen en forma natural en los bosques tropicales.

que se desarrolle un sistema radicular adecuado. En el otro extremo, los suelos arenosos también serían inadecuados debido a su escasa capacidad de retención de agua. Los suelos salinos, o con pH inferior a 5, tampoco serían apropiados para el cultivo y lo mismo ocurre con suelos pobres en fósforo (FAO, 1980).

El abastecimiento de agua durante la estación de crecimiento de la especie es requisito indispensable (superior a 8.000 m^3/ha), no obstante no soporta agua detenida por largo tiempo durante ese período (INFOR, 1998). La creencia que los sauces crecen mejor en suelo húmedo se basa en que estas especies se desarrollan en forma natural a orillas de lagos y ríos, sin embargo, experiencias realizadas en Europa por Pohjonen (1984), señalan que se obtienen rendimientos más altos en terrenos arados, en lugar de bordes de ríos.

Las condiciones del sitio tienen también una gran influencia sobre la retoñación. Existen diferentes necesidades para diferentes especies, considerando la disponibilidad de nutrientes y agua. La apropiada elección del sitio y la especie a plantar para el objetivo final es uno de los aspectos más importantes para lograr retornos económicos satisfactorios. Esta adecuada elección se traducirá en un mayor vigor, brotación más abundante y menor daño por plagas y enfermedades (GOLFARI, 1959, citado por GREZ, 1992).

La mejor forma de clasificar los sitios para diferentes especies y clones de *Salix*, es investigar el comportamiento de éstas en diferentes localidades y comparar su crecimiento y producción.

Las técnicas de establecimiento y variables como el espaciamiento o densidad de plantación, son también muy importantes para obtener una abundante producción de mimbre.

Pohjonen (*op. cit.*) recomienda arar el suelo a una profundidad mínima de 25 cm, preferentemente 50 o 60 cm, para permitir que las raíces se desarrollen y penetren el subsuelo.

Asimismo, el control de malezas durante la fase de establecimiento, es una de las actividades más críticas en el cultivo de *Salix*, pues su proliferación impondrá una fuerte competencia que redundará en una pérdida de crecimiento (INFOR, 1998).

La época de plantación de las estaquillas de *Salix*, es en junio o julio, antes del inicio de la brotación. Estas estaquillas pueden ser de largo variable, sin embargo, se recomienda entre 15 a 30 cm, siendo 20 cm la medida más usada (GREZ, 1992). El grosor de las estaquillas puede ser variable, sin embargo diámetros menores a 8 mm, no son recomendados pues al hincarlas en el terreno pueden romperse. La procedencia de estas estaquillas, puede ser de cualquier parte de una rama que no esté brotada, pero es esencial que no presente daños. Los mejores resultados de brotación y prendimiento se obtienen con estaquillas procedentes de ramas jóvenes (2 a 3 años), pero de preferencia de ramas

tiernas de un año (FAO, 1980; POHJONEN, 1984; CARNAVALE, 1955 citado por GREZ, 1992).

Los espaciamientos para la producción de mimbre tienen como objetivo producir la mayor cantidad de varas de calidad como sea posible y por lo tanto, las plantaciones son de alta densidad. Si se desea obtener varas finas los espaciamientos disminuirán y viceversa. Estudios en Europa indican que el rendimiento en biomasa aumenta con la densidad.

Experiencias de Tsanov (1968) con *Salix viminalis, S. purpurea, S. trianda*, y *S. rubra* establecidos a diferentes espaciamientos, demostraron que a 80x10 cm se alcanzaba un rendimiento de 29 toneladas verde/ha con *S. americana x S. daphnoides*, seguido por *S. trianda* con 28 t verde/ha. A 80x30 cm los rendimientos alcanzaron 19 t verde/ha en S. trianda, seguido por *S. viminalis* con 18 t verde/ha. Con el espaciamiento más denso la máxima productividad fue lograda 2 a 3 años antes que a menores densidades.

En otra experiencia, Tsanov (1974) comparó el crecimiento de diez especies y variedades de sauces productores de mimbre a cuatro espaciamientos. Los sauces más promisorios fueron *S. trianda, S. americana x S. daphnoides, S. viminalis x S. purpurea* y *S. viminalis*. Los mejores crecimientos se obtuvieron en suelos aluviales y suelos chernozem, donde el incremento anual de las varas excedió los 2 a 2,5 m y la producción fue de 25 a 30 t verde/ha. El mejor espaciamiento fue 60x15 cm (11 plantas/m^2) y 70x20 cm (7,1 plantas/m^2).

Canov (1965) comparó la producción de mimbre a espaciamientos de 40x40, 80x40, 60x60 y 80x80 cm, recomendando los espaciamientos menores: 40x40 y 80x40 cm.

Aunque las experiencias en producción de mimbre son escasas, no así son las reportadas para plantaciones energéticas de *Salix*. Esto, porque estas especies han demostrado una gran capacidad para convertir la radiación solar en energía química. Los valores de producción de 10 a 12 t seca/ha/año, son comunes en *Salix*, las que también pueden ser logradas con otros géneros, tales como *Populus, Betula o Alnus*, pero a una rotación de 5 a 10 años (CHRISTERSSON, 1993).

Las plantaciones energéticas se caracterizan por rotaciones cortas (3-10 años) y densos espaciamientos (1-6 plantas/m^2). En Suecia utilizando cultivos intensivos de clones cuidadosamente seleccionados de *Salix*, se logran rendimientos de 6 a 32 t verde/ha/año con expectativas de llegar a 40 t verde/ha/año (ANDERSON *et al.*, 1983). En el Reino Unido, estas plantaciones energéticas producen al menos 16 t/ha/año (ANDERSON *et al.*,1983).

Los resultados de experimentos con *S. eriocephala* demuestran que la producción de biomasa puede alcanzar de 15 a 20 t seca/ha/año, obtenidas a partir de material no mejorado,

a un espaciamiento de 1x0,5 m y cosechado en rotaciones de 1-3 años. Estos resultados serían substancialmente incrementados a través de selección clonal, ya que se ha observado una gran variación dentro de familias (MOSSELER *et al.*, 1988).

OBJETIVOS

Evaluar el comportamiento en rendimiento de cosecha (t verde y seca/ha) y calidad de materia prima de varias especies de *Salix* en localidades seleccionadas de las regiones IV a XI del país.

MATERIAL Y METODO

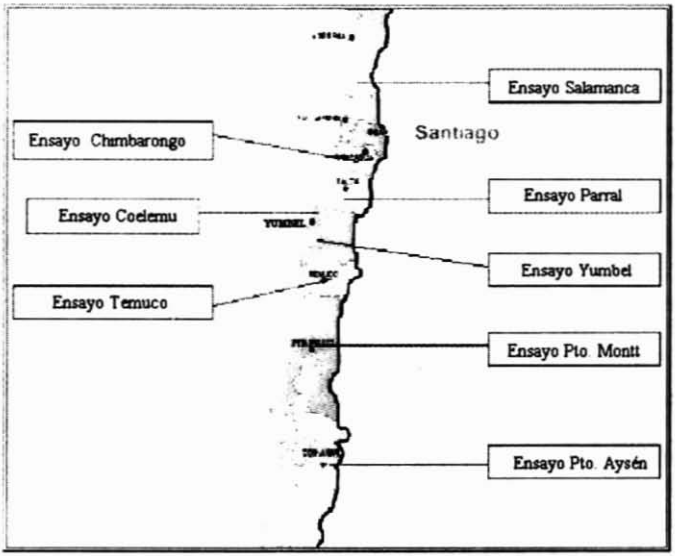
Localización de los ensayos: Para el establecimiento de los ensayos se seleccionaron 8 localidades del país (cuadro 1) de las regiones IV a XI, las cuales cumplían con el requisito de ser terrenos agrícolas de clase II a IV con disponibilidad de riego.

Para el establecimiento de los ensayos se realizaron convenios con propietarios particulares. El cuadro 1y figura 1 indican las localidades y las coordenadas geográficas de cada uno de los ensayos:

Cuadro 1. Localización de ensayos de *Salix* spp.

Ensayo	Región	Localidad Bioclimática	Zona	Latitud	Longitud m.s.n.m	Altitud
1	IV	Salamanca	Precordillera andina	31°54' S	70°46' W	800
2	VI	Chimbarongo	Valle Central	34°43' S	71°4' 'W	290
3	VII	Parral	Valle Central	36°27' S	71°47' W	174
5	VIII	Coelemu	Influencia costera	37°13' S	72°42' W	87
4	VIII	Yumbel	Valle Central	37°13' S	72°34' W	169
6	IX	Temuco	Valle Central	38°41' S	75°25' W	200
7	X	Puerto Montt	Influencia costera	41°26' S	73°07' W	88
8	XI	Puerto Aysén	Costa	45°24' S	72°42' W	10

Figura 1. Localización geográfica de los ensayos de *Salix* spp.



Especies y procedencias ensayadas: Para los ensayos se utilizaron clones de *Salix* de las especies y los lugares de procedencia que se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Especies y lugares de procedencia de *Salix* spp.

N°	Especie	Lugar de procedencia
1	*Salix alba*	Coelemu
2	*Salix purpurea*	Angol
3	*Salix viminalis*	Chimbarongo
4	*Salix viminalis*	Angol
5	*Salix viminalis*	Coyhaique
6	*Salix caprea*	Longaví
7	*Salix humboldtiana* var. *fastigiata*	Cogotí
8	*Salix humboldtiana*	Quirihue
9	*Salix caprea*	Valdivia
10	*Salix viminalis*	Coyhaique
11	*Salix alba* var. *vitellina*	Lago Llanquihue
12	*Salix x rubens*	Yumbel

Diseño estadístico. El diseño estadístico utilizado fue de parcelas al azar, correspondientes a cada una de las especies ensayadas (E1,....E12), con 3 repeticiones por ensayo (R1, R2, R3). En cada una de las 36 parcelas se establecieron 30 individuos distanciados entre sí a 0,50 cm. Cada ensayo fue rodeado de una doble hilera de aislación con individuos de la especie 4. La superficie total de cada ensayo fue de 0,04 ha. El cuadro 3 presenta un esquema del diseño utilizado en los ensayos.

Cuadro 3. Diseño de los ensayos de *Salix* spp.

Repeticiones	Especies					
R 1	E7	E9	E1	E11	E12	E3
	E2	E8	E10	E4	E6	E5
R 2	E6	E7	E12	E8	E3	E1
	E10	E11	E9	E4	E2	E5
R 3	E1	E6	E7	E5	E11	E8
	E4	E9	E2	E10	E3	E12

Establecimiento de los ensayos. Los ensayos fueron establecidos entre julio y septiembre de 1997, a excepción del localizado en Temuco que fue establecido en agosto de 1998, luego que el ensayo original (en la localidad de Nueva Imperial) fuera eliminado por falta de cuidados culturales por parte de su propietario.

El procedimiento seguido en cada localidad consistió en:

- Análisis de suelo: Fueron obtenidas muestras de suelo a 20, 40 y 60 cm de profundidad, las que fueron enviadas al Laboratorio de Suelos de la Universidad Austral de Chile para su análisis.

- Roce: La vegetación herbácea y arbustiva presente en los lugares de ensayo fue eliminada mecánicamente o por aplicación de herbicidas.

- Cercado: El perímetro de los ensayos fue cercado mediante un empostado de polines de pino impregnado, dispuestos cada tres metros. El cierre se realizó mediante malla hexagonal de 1,20 m de alto con 3 hebras de alambre de púas.

- Trabajo al suelo: Cada ensayo fue labrado a una profundidad de 50 a 60 cm, mediante tractor agrícola y arado tipo cincel; posteriomente se realizó la nivelación del terreno para impedir la acumulación de agua, y finalmente se realizó un rastraje para mullir y lograr una suave superficie que facilitara el desarrollo de las raíces. En algunos casos fue necesario un subsolado para solucionar problemas de compactación.

- Preparación del material de plantación: Para la plantación se utilizaron estaquillas de 25 cm. de longitud, obtenidas de ramillas de dos a cuatro años de edad, de un ejemplar adulto de las especies y procedencias de *Salix* indicadas en el cuadro 2.

- Plantación: Primeramente se encuadró el terreno para lograr la alineación de las estaquillas. Luego se procedió a hincar en el terreno, a unos 15 cm de la superficie, cada una de éstas, a un distanciamiento de 0,5 x 0,5 m, dejando sobre la superficie dos a tres yemas, para lograr un buen desarrollo aéreo.

Mantención y cuidados de los ensayos: Los trabajos practicados durante las temporadas 98/99/2000 consistieron en:

- Control de malezas: Se realizó en forma manual cada año entre septiembre y noviembre (hasta el cierre de las copas). Este control se realizó sobre toda la superficie del ensayo, con la finalidad de evitar la competencia de las malezas e impedir la disminución del crecimiento de los individuos de *Salix* ensayados.

- Control fitosanitario: Las primeras aplicaciones se realizaron a partir del mes diciembre de cada temporada, utilizando Captan y Tamaron 600, para el control de hongos e insectos, respectivamente. Las dosis aplicadas fueron de 20 g de Captan y 4 cc de Tamaron disueltos en 10 litros de agua. Esta aplicación preventiva se realizó en forma pulverizada, cada 20 días.

- Fertilización: En enero de 1998 y a los 4,5 meses de establecidos los ensayos, se realizó una fertilización, siguiendo las recomendaciones realizadas por el laboratorio de diagnóstico de la U. Austral. Esta fertilización tuvo por objetivo aplicar las correcciones y sugeridas, de acuerdo a las deficiencias presentadas por el suelo. Las dosificaciones fueron de 50 g a 70 g de Fosfato Diamónico por planta, para los ensayos de Salamanca, San Fernando, Parral, Coelemu, Yumbel y Temuco, lo que fue aplicado a una profundidad de 10 cm del suelo y a 25 cm de distancia de la estaquilla. En Puerto Montt y Puerto Aysén se aplicó 50 g de Nitrato de Potasio, 30 g de Sulfato de Potasio y Magnesio y 30 g de Roca acidulada por planta, a 5cm de éstas en bandas de 30 cm de largo.

- Riego: Dado que el mimbre requiere de una cantidad importante de agua para su desarrollo, las indicaciones fueron regar cada ensayo en forma regular cada 8 a 10 días (dependiendo de la zona), a partir del mes de septiembre y hasta mediados de marzo. Estos riegos se realizaron en todos los ensayos mediante tendido.

- Cosechas: Debido a que el mimbre es un cultivo anual, entre julio y agosto de1998, 1999 y 2000, luego de la caída de las hojas, se realizó la cosecha; ocasión que fue utilizada para efectuar los análisis de rendimiento y calidad de las diferentes especies. La cosecha fue realizada en forma manual, con tijeras de podar. Una vez cosechado el material, las cepas se desinfectaron y sellaron para evitar el ataque de hongos, utilizando Benlate en dosis de 20 g por cada 10 litros de agua, y el sellador Podex Látex, que se aplicó con brocha sobre todos los cortes efectuados.

Evaluación de los ensayos. En marzo 1998 se realizó la primera evaluación de los ensayos para determinar la mortalidad alcanzada; procedimiento que fue realizado nuevamente al cabo de cada cosecha. La mortalidad para el conjunto de los ensayos fue de un 4,9%

en 1998, 5,0% en 1999 y 6,1% en el 2000; siendo la principal causa en el primer año la utilización de estaquillas de más de 3 años y la plantación tardía, en tanto que en el segundo año, el principal problema fue el déficit hídrico (por falta regular de riego), y en el tercer año, principalmente afectó una helada de primavera ocurrida en la localidad de Temuco (PARRA, *et al.*, 2000).

Las estaquillas muertas fueron replantadas con el mismo material genético, cuidando de no reponer con estaquillas demasiado delgadas para evitar que los individuos fueran sometidos a una fuerte competencia que terminaría por asfixiarlos.

Entre julio y agosto de 1998, 1999 y 2000, se realizaron los análisis de rendimiento de cosecha y calidad de las varas de las especies establecidas en los ensayos.

La unidad muestral sobre la cual se realizaron estas evaluaciones correspondió a 5 cepas o plantas madres fijas por parcela, las que fueron escogidas al azar. Las variables analizadas, en cada vara mayor de 0,8 m de las cepas escogidas, fueron: longitud, diámetro basal y defectos (rectitud, presencia de ganchos, nudos y daños).

Para obtener el rendimiento de cosecha o cantidad de biomasa, por especie y ensayo, las varas de las cepas escogidas, en las tres repeticiones, fueron clasificadas en los tipos indicados en el cuadro 4.

Cuadro 4. Clasificación de varas según tipos

Tipo	Diámetro en la base (mm)
Finas	2 – 4
Medianas	5 – 11
Gruesas	> 12

El producto obtenido de cada uno de estos tipos fue pesado en romana y extrapoladas estas mediciones a la hectárea.

Dado que las mediciones directas de biomasa entregaron resultados en medidas de peso verde (t verde/ha), se obtuvieron muestras para cada especie, las que fueron enviadas al laboratorio del Departamento de Tecnología de la Madera de la Universidad de Chile, para la cuantificación del contenido de humedad. Las muestras (10 por especie) de 42 cm de longitud, obtenidas del tercio medio de las varas de cada una de las especies y localidad, fueron analizadas por GARAY (2000) según el método de gravimetría. Dada la variabilidad de los contenidos de humedad obtenidos para las diferentes especies, según el año de cosecha y localidad, se ajustó el modelo (1.0) que relaciona la densidad básica (g/cc), promedio de los tres años de cosecha analizados (1998/1999/2000) con el contenido de humedad, según especie y localidad.

(1.0) $$\hat{Y}_{ij} = b_0 + b_1 X_{ij} + b_2 X_{ij}^2 + e$$

Donde:

$\hat{Y}_{ij}$ = Contenido de humedad de la especie i en la localidad j (i= 1,...12), (j= 1,....8)
X_{ij} = Densidad básica promedio (1998/99/00) de la especie i en la localidad j.
e = error de la estimación

Parámetros		R^2
b_0	73,888532	0,855
b_1	479,775895	
b_2	-751,494900	

El contenido de humedad estimado fue utilizado para transformar el peso verde (t verde/ha) en peso seco (t seca/ha) y realizar el análisis estadístico de especies y localidades.

Análisis estadístico. Para determinar las diferencias entre las variables de rendimiento productivo: total de varas por hectárea (TVHA), biomasa verde por hectárea (BVHA) y biomasa seca por hectárea (BSHA), entre las especies de *Salix* spp. y entre localidades, se realizaron análisis de varianza, utilizando el programa estadístico SAS (1994). En el caso de diferencias significativas, las comparaciones entre medias se realizaron empleando la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

En el análisis de las variables de rendimiento productivo se utilizó el modelo estadístico (1.1):

(1.1) $$Y_{ijk} = \mu + A_i + L_j + S_k + A_i \times L_j + L_j \times S_k + e_{ijk} \qquad (R^2 = 0,8440)$$

Donde:

Y_{ijk} = Rendimiento de cosecha (t verde/ha, t seca/ha) y total de varas/ha.
μ = Media poblacional
A_i = Efecto fijo del i-ésimo año (i= 1, 2, 3)
L_j = Efecto fijo de la j-ésima localidad (j= 1, 2,.....,8)
S_k = Efecto fijo de la k-ésima especie (k= 1, 2,.....,12)
$A_i \times L_j$ = Interacción entre año y localidad
$L_j \times S_k$ = Interacción entre localidad y especie
e_{ijk} = Error experimental

Para analizar la calidad de las varas entre especies y localidades, se elaboraron variables discretas, las que fueron comparadas mediante la Prueba de X^2 ($p \leq 0,05$). Estas variables definieron la calidad como excelente, buena, regular o mala, en función de cuatro atributos:

rectitud de las vara, presencia de ganchos, nudos y daños (por agentes bióticos o abióticos). El cuadro 5 define los categorías según los defectos presentados por las varas y el Cuadro 6 la calidad en función de las categorías evaluadas, según lo indicado en la Norma Chilena 2039 of.1998.

Cuadro 5. Categorías según atributos de las varas

Categorías	% de las varas analizadas			
	Rectitud	Ganchos	Nudos	Daños
0	≥ 90%	0-10%	0-10%	0-10%
1	85-89%	11-15%	11-15%	11-15%
2	76-84%	16-24%	16-24%	16-24%
3	≤ 75%	≥ 25%	≥ 25%	≥ 25%

Cuadro 6. Grados de calidad según categorías

Calidad	Grados de calidad según Nch. 2039	Categorías
Excelente	Grado 1-2	0000
Buena	Grado 2	1000; 1100; 1110; 1111; 0100; 0110; 0111; 0011; 0001; 0010; 0001; 0012; 0102; 0112, 1112
Regular	Grado 3	2000; 0200; 0202; 2222; 2111, 2112, 2121
Mala	Subestándar[1]	0300; 0301; 0303; 0330; 0331; 0333; 1300, 3000, 3100

Modelo causal

Los resultados de la variable BSHA para todas las localidades (variable dependiente), se relacionaron con las variables de sitio (variables independientes) indicadas en el cuadro 7, para determinar su efecto en los resultados de cosecha obtenidos y así explicar el comportamiento de *Salix* spp. en los diferentes sitios de crecimiento. El procedimiento utilizado fue un análisis de regresión Stepwise (SAS, 1994).

Cuadro 7. Variables de sitio de los ensayos de *Salix* spp.

Ensayo	Salamanca	Chimbarongo	Parral	Coelemu	Yumbel	Temuco	P. Montt	P. Aysén
				Variables climáticas				
T°media anual (°C)	14,44	13,70	14,08	15,23	13,27	10,02	10,69	9,11
T°máx media anual (°C)	21,79	20,70	20,60	20,40	19,55	15,36	14,75	12,8
T° min media anual (°C)	7,09	6,70	7,60	8,10	6,99	4,68	6,63	5,74
T° minima absoluta (°C)	1,50	-3,20	-3,60	-1,70	-2,60	-4,80	-3,20	-3,20
T° mes más cálido (°C)	26,50	28,10	28,80	31,30	28,00	21,50	19,30	17,20
T°mes más frio (°C)	4,50	2,90	3,50	4,60	4,30	2,30	4,10	2,10
Precipitación anual (mm)	342,00	582,00	1.025,20	641,70	1.054,80	1.394,00	2.021,00	2.973,30
Evaporación anual (mm)	1.052,00	1.233,00	1.331,00	1.791,80	1.481,00	920,90	792,00	510,00
Humedad relativa (%)	64,00	73,50	67,70	71,33	61,25	80,92	81,70	82,7
Periodo libre de heladas (meses)	8	5	5	7	4	0	4	0
Horas de frio anuales	754,00	884,00	1.407,00	794,00	1.301,00	2.347,00	1.394,00	6.288,00
Dias grado base 10°C	1.224,00	1.302,00	1.436,00	1.691,00	1.234,25	477,80	512,75	342,80
Radiación solar (calxcm²xdia)	9.434,50	8.955,00	8.864,89	8.587,85	8.409,49	8.544,00	8.042,59	7.615,16
Promedio h de sol	12,17	12,10	12,18	12,19	12,19	12,20	12,20	12,23

1 Según la Nch 2039 of. 98, las varas que no cumplan con los requisitos para el grado 3, se deben clasificar y rotular como subestándares.

Ensayo	Salamanca	Chimbarongo	Parral	Coelemu	Yumbel	Temuco	P. Montt	P. Aysén
Variables edáficas								
Textura	Arenosa	Franco arenosa	Franco arcillosa	Fr. areno arcillosa	Franco arenoso	Franco limosa	Fr. arcillo limosa	Franco limosa
Estructura	Grano simple	Masiva	Granular	Granular	Granular	Granular	Granular	Granular
Nivel de materia orgánica	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Moderado	Alto	Moderado
Cap. agua aprovechable	Baja	Alta	Moderada	Moderada	Moderada	Alta	Alta	Alta
Drenaje	Bueno	Medio	Medio	Medio	Bueno	Bueno	Malo	Bueno
Densidad aparente	Media	Baja	Media	Media -alta	Media	Media -baja	Baja -media	Media -baja
pH (al agua)	7,88	5,22	5,85	5,47	6,02	5,65	5,30	5,04
Nivel de nutrientes								
N%	0,11	0,19	0,11	0,16	0,77	1,18	0,38	0,36
P ppm	5,00	1,00	12,00	1,00	35,08	26,00	4,00	1,00
K ppm	143,00	93,00	163,00	178,00	284,00	448,00	54,00	98,00
B pmm	1,20	0,70	0,60	0,60	1,20	0,80	0,0	0,70
S ppm	19,00	7,00	1,00	10,00	1,00	1,00	13,00	32,00
Suma de bases meq/100g.	14,21	7,28	17,49	10,19	17,43	10,62	5,98	1,50
Saturación de aluminio %	0,16	5,21	0,16	0,22	0,00	0,08	13,91	27,76
Aluminio extractable ppm	30	246	58	51	184	503	2.092	1.950

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Los análisis estadísticos para comparar los rendimientos productivos para las variables TVHA, BVHA y BSHA, sólo pudieron ser realizados para las localidades de Salamanca, San Fernando, Parral, Coelemu, Yumbel y Temuco. Los ensayos de las localidades de Puerto Montt y Puerto Aysén no fueron analizados estadísticamente puesto que ambos sitios resultaron inadecuados para el crecimiento de *Salix*, obteniéndose antecedentes insuficientes en las mediciones de cosecha que justificaran su análisis.

El modelo causal desarrollado permitió identificar las variables que afectaron los resultados, sirviendo de base para seleccionar los sitios más adecuados para la producción de *Salix* spp.

A continuación se entregan los resultados para cada una de las variables analizadas, según año, localidad y especie, primeramente a nivel general, y posteriormente para cada una de las localidades. Finalmente, se entregan los resultados del modelo causal.

Cabe señalar que las variables BVHA y BSHA se presentan en toneladas, sin embargo dado que una medida tradicional utilizada para medir los rendimientos de cosecha de mimbre, son los «atados» (de 1 m de perímetro en la base), el anexo 1 entrega los rendimientos por especie para esta unidad de medida, y el peso promedio de cada uno de estos atados.

Total de varas por hectárea

El análisis de los resultados de comparación de medias para la variable TVHA para el conjunto de especies y localidades (cuadro 8), señala diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre cada una de las temporadas, lo cual se asocia al mayor vigor alcanzado por las plantas.

Cuadro 8. Total de varas según año

Año	Media	± D.E
1998	123.286[c]	55.272
1999	302.699[b]	132.386
2000	465.481[a]	200.103

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p≤ 0,05).

Según localidades, se detectan diferencias significativas entre Yumbel (cuadro 9), con el mayor número de varas/ha/año, y las localidades restantes. Temuco se presenta como la de menor cantidad de varas. No obstante, en esta última sólo se analiza la temporada 1999 y 2000, en tanto que en el resto se incluyen las tres temporadas. Es probable que considerando igual número de años su comportamiento siga la del resto de localidades.

Cuadro 9. Total de varas según localidad

Localidad	Media	± D.E
Yumbel	346.833[a]	196.821
Chimbarongo	324.296[ba]	176.392
Parral	309.297[ba]	258.174
Coelemu	299.500[ba]	210.646
Salamanca	277.631[ba]	180.989
Temuco	262.601[b]	128.937

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p≤ 0,05).

Los resultados del análisis de la variable TVHA según especie (cuadro 10), indica que la especie 9 (*S. caprea*, Valdivia), es la que entrega mayor número de varas como promedio anual, en tanto que las especies del grupo de los *S. viminalis* (especies 3, 4 y 5) no presentan diferencias significativas entre sí, entregando resultados un poco inferiores a los de *S. caprea*. La especie 10 aunque corresponde también a *S. viminalis*, presenta diferencias significativas con las primeras. Las especies *S. humboldtiana* (7 y 8) se encuentran en el rango inferior, siendo menor el número de varas en cerca de un 56 a 72%, respectivamente, en relación con la especie de mejores resultados. Llama la atención que la especie 6, que corresponde también a un *Salix caprea* (Longaví) se encuentre significativamente distanciada de su par de Valdivia, lo que se explica por corresponder en su mayoría a replantes establecidos en 1998, luego que en la temporada anterior se detectará alta mortalidad en esta especie, producto de un deficiente establecimiento (plantación tardía, deficiente calidad de estacas); es probable que en los años siguientes esta especie se equipare en producción de varas a la especie 9.

Cuadro 10. Total de varas según especie

Especie	Media	± D.E
9	414.757[a]	259.404
2	390.311[ba]	220.017
4	376.791[bac]	187.834
3	361.668[bac]	200.885
1	353.797[bac]	204.185
5	348.139[bac]	188.162
10	337.718[bdac]	188.049
11	273.870[bdec]	199.759
12	263.875[dec]	172.452
6	223.499[fdc]	145.758
8	181.060[fe]	72.155
7	113.259[f]	53.252

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p≤ 0,05).

Biomasa verde por hectárea

De acuerdo a lo señalado en la literatura, era de esperar incrementos en rendimientos de cosecha, expresados en toneladas verde/ha, entre una temporada y otra. Sin embargo, los resultados estadísticos según año (cuadro 11) para el conjunto de especies *Salix* analizadas, indican que existen diferencias significativas (p≤ 0,05) sólo entre la temporada 1998 y las dos siguientes (1999/2000); no discriminando entre las dos últimas temporadas. Entre las explicaciones del caso, puede estar el que no se realizara una fertilización oportuna de los ensayos (excepto en el año de establecimiento), la cual hubiera permitido expresar el máximo potencial de crecimiento de las especies.

Cuadro 11. Biomasa verde (t/ha) según año

Año	Media	± D.E
1998	10,9[b]	11,0
1999	25,1[a]	20,8
2000	22,4[a]	16,8

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p≤ 0,05).

La comparación de la variable BVHA entre localidades (cuadro 12), indica a Chimbarongo y Yumbel como las mejores, con resultados comparables de cerca de 30 t verde/ha/año ± 21,6, para el conjunto de especies ensayadas y como promedio de las tres temporadas analizadas.

El resultado anterior es similar a los descritos por TSANOV (1968, 1974), de 25 a 30 t verde/ha/año, obtenidos para un conjunto de sauces productores de mimbre.

Temuco sigue en importancia, con cerca de 20 t verde/ha/año y Coelemu con 15 t verde/ha/año. En el extremo inferior se encuentran Salamanca y Parral con rendimientos de entre 11 y 13 t verde/ha/año, comparables estadísticamente entre sí.

Cabe señalar que como en Temuco se analizan sólo dos temporadas, los resultados obtenidos pueden mejorar sustancialmente, para ubicarse entre el grupo de localidades con mejor rendimiento.

En cualquier caso Chimbarongo, actualmente el centro más importante en la producción de mimbre, se destaca como la mejor localidad del país para el crecimiento y desarrollo de este tipo de especies, lo que sin embargo no impide que surjan otras como Yumbel que alcanzan rendimientos importantes. Del mismo modo, tanto localidades más septentrionales (Salamanca) como del sur del país (Coelemu, Yumbel y Temuco) demuestran aptitudes para la producción de mimbre, aún cuando los rendimientos de cosecha sean inferiores a los obtenidos en Chimbarongo.

Cuadro 12. Biomasa verde (t/ha/año) según localidad

Localidad	Media	± D.E
Chimbarongo	30,4^{a}	21,6
Yumbel	29,1^{a}	20,2
Temuco	21,1^{b}	16,3
Coelemu	15,2^{cb}	12,8
Salamanca	13,1^{c}	12,4
Parral	11,3^{c}	11,7

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Según especies (cuadro 13), la 4 (*Salix viminalis*, Angol), destaca como la de mejor rendimiento productivo, alcanzando un promedio de 35 t verde/ha/año para el conjunto de localidades. El resto de los *S. viminalis* (especies 5, 3 y10) aún cuando se encuentran entre los primeros lugares del ranking, presentan diferencias significativas con la primera, con rendimientos de 22 a 29 t verde/ha/año.

La especie 12 (*S. rubens*) presenta un rendimiento comparable al de la especie 5 (*S. viminalis*), alcanzando cerca de las 30 t verde/ha/año, sin embargo presenta una calidad de varas deficiente (ganchos y nudos) (cuadro 20), que la hacen inadecuada para la producción de mimbre. No obstante, los rendimientos alcanzados, justifican su estudio para otro tipo de usos (biocombustible, fibra, otros).

Las especies *S. caprea* (9 y 6), se encuentran distanciadas entre sí, alcanzando valores de 18 y 10 t verde/ha/año, respectivamente, encontrándose, este resultado probablemente influenciado por las menores temporadas analizadas en la especie 6.

Las especies *Salix alba* (1 y 11) se encuentran también distanciadas entre sí, con rendimientos de cosecha de 16 y 10 t verde/ha/año, respectivamente. Las diferencias en este caso son debidas a que la especie 11 es una variedad, lo que implica parámetros genéticos diferentes.

El grupo *Salix humboldtiana* (especies 7 y 8), se encuentra en una posición media del ranking, sin presentar diferencias significativas entre sí, alcanzando niveles de rendimiento de alrededor de 15 t verde/ha/año.

Finalmente, en último lugar del ranking de rendimientos de cosecha se encuentra la especie 2 (*S. purpurea*), con valores cerca de un 80% inferiores a los obtenidos por la especie de mejores resultados (*S. viminalis*, Angol), alcanzando sólo 8 t verde/ha/año, como valor medio para los tres años en estudio.

Cuadro 13. Biomasa verde (t /ha/año) según especie

Especie	Media	± D.E
4	35,5^{a}	22,2
5	29,2^{ba}	19,0
1	228,5^{ba}	24,5
3	27,9^{bac}	20,4
10	22,4^{bdc}	16,6
9	18,9^{bedc}	16,4
11	6,6^{edc}	11,5
7	15,1^{ed}	14,3
8	14,8^{ed}	10,0
6	10,5^{e}	13,0
11	10,2^{e}	8,3
2	8,1^{e}	5,4

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Biomasa seca por hectárea

A pesar que la biomasa verde es útil para comparar rendimientos entre especies, mejor aún es la biomasa expresada en materia seca, puesto que independiza los valores del contenido de humedad de la madera, el que es función de las condiciones climáticas, cuidados culturales, edad de la plantación, entre otros.

De acuerdo a los análisis efectuados por GARAY (2000) para las especies ensayadas, y de acuerdo a lo determinado en la metodología, los rendimientos de cosecha en toneladas verdes por hectárea fueron transformados a materia seca, según los contenidos de humedad señalados en el cuadro 14.

Cuadro 14. Contenidos de humedad estimados según especie y localidad

Especie	Contenido de humedad (%)					
	Salamanca	Chimbarongo	Parral	Coelemu	Yumbel	Temuco
1	142,8	138,8	135,6	141,2	144,9	144,3
2	101,3	112,2	91,2	103,2	105,1	103,2
3	108,7	104,9	103,2	117,1	124,5	131,0
4	139,5	105,5	105,5	142,8	142,8	142,8
5	147,7	109,2	109,2	137,6	137,6	137,6
6	150,3	125,0	106,9	135,6	150,3	125,9
7	99,4	145,6	145,6	142,8	142,8	142,8
8	95,4	141,1	141,1	120,2	120,2	120,2
9	113,8	113,6	95,4	110,4	137,6	123,1
10	144,3	130,0	130,0	137,6	137,6	137,6
11	128,5	120,6	120,6	128,5	128,5	128,5
12	144,9	140,1	145,6	137,6	136,6	147,7

Del cuadro 15 y figura 2, que entregan los rendimientos anuales en t seca/ha se desprende que el rendimiento del primer año, es superado en el segundo y tercero, no existiendo diferencias significativas entre las dos últimas temporadas. Dichos valores equivalen a un 44% de los rendimientos en biomasa verde, lo que indica un contenido de humedad promedio de las varas recién cosechadas de 56%; valor aproximado a los entregados por TSANOV (1968).

Cuadro 15. Biomasa seca (t seca/ha) según año

Año	Media	± D.E
1998	4,8[b]	4,8
1999	11,0[a]	9,1
2000	9,9[a]	7,5

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Por localidad (cuadro 16 y figura 2), los resultados se comportan en forma similar a los descritos para los rendimientos en biomasa verde (cuadro 12), es así como Chimbarongo sigue siendo la localidad más productiva, con 13,6 t seca/ha/año, y Parral la de menor productividad, con 5,3 t seca/ha/año. Sin embargo, en este caso Chimbarongo presenta diferencias significativas con Yumbel, que le sigue en rendimiento, al mismo tiempo que Salamanca se distancia significativamente de Parral. Estas diferencias respecto a los rendimientos en biomasa verde, indican que el contenido de humedad de las varas presenta variaciones por localidad, influenciado por las condiciones climáticas de los diversos lugares.

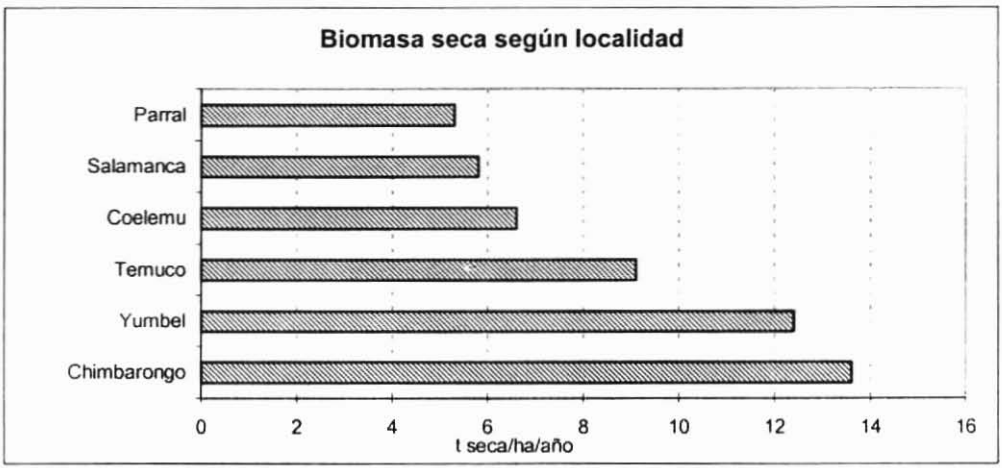
El mejor resultado obtenido, de 13,6 ± 9,9 t seca/ha es comparable a los citados en la literatura (MOSSELER *et al.*,1968; ANDERSON *et al.*, 1983; CHRISTERSSON, 1993), aún cuando los objetivos de producción de sauce mimbre en Chile difieren de los planteados en estos estudios.

Cuadro 16. Biomasa seca (t/ha/año) según localidad

Localidad	Media	± D.E
Chimbarongo	13,6[a]	9,9
Yumbel	12,4[ba]	8,5
Temuco	9,1[b]	7,0
Coelemu	6,6[dc]	6,5
Salamanca	5,8[dc]	5,5
Parral	5,3[d]	5,6

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Biomasa seca según localidad



Los resultados para la variable BSHA según especie (cuadro 17 y figura 3), difieren de los presentados para BVHA, sin embargo se mantiene la posición de las especies de mayor y menor rendimiento (especies 4 y 2), es decir, se corrobora que la especie de mayor productividad es *S. viminalis* (Angol) y la de menor productividad *S. purpurea*. El resto de los *Salix* spp. varía su posición de acuerdo al contenido de humedad presente en la madera, lo que depende de la densidad de la misma; de esta forma, las especies de menor densidad poseen un contenido mayor de humedad, y por ende, menor biomasa seca. Tal es el caso de la especie 3 (*S. viminalis*, Chimbarongo), que por poseer una densidad similar a la de la especie 4, se ubica luego de ésta, en tanto que la especie 12 (*S. rubens*), de menor densidad, se ubica más a bajo de la especie 3, a pesar que en el cuadro 13 se encontraban en posición inversa.

Con todo, el grupo de los *S. viminalis* encabeza el ranking, con rendimientos de materia seca de 13 a 15,7 t secas/ha/año (especies 4, 3, 5), y un poco más abajo *S. viminalis*,

Coyhaique (especie 10). Cabe señalar en todo caso que la especie 4 difiere significativamente del resto de este grupo, lo que implica la obtención de mejores resultados al utilizar este clon que el tradicional empleado hasta ahora en el país, correspondiente a la especie 3 (*S. viminalis*, Chimbarongo).

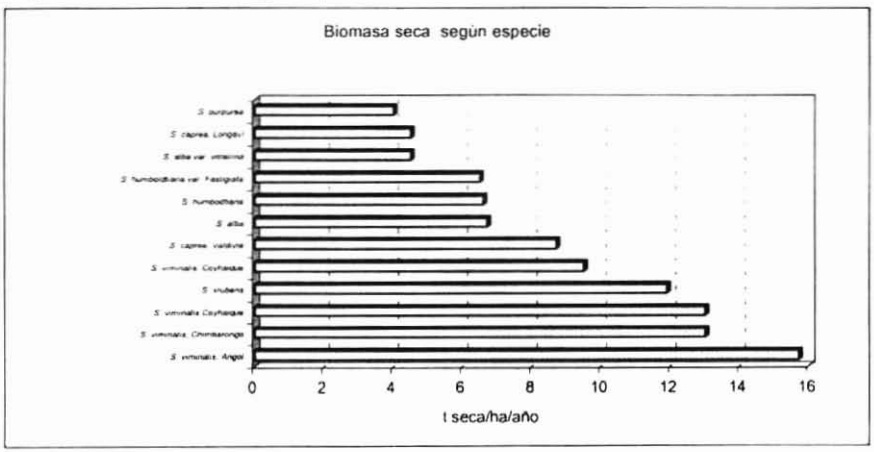
Los análisis moleculares realizados a estas especies por CAMPOS (2000), validan los resultados anteriores, al encontrar leves diferencias a nivel genético entre el par *S. viminalis*, Angol y *S. viminalis*, Chimbarongo, las cuales se expresan a través de un Índice de Similitud de Nei & Li, de 0,71[1] Este mismo estudio indica la mayor similitud entre las especies 3 y 5 con un índice de 0,87; y por el contrario la mayor diversidad entre las especies 4 y 10 con un índice de 0,33.

Cuadro 17. Biomasa seca (t/ha/año) según especie

Especie	Media	± D.E
4	$15,7^{a}$	10,2
3	$13,0^{ba}$	9,3
5	$13,0^{ba}$	8,6
12	$11,9^{bac}$	10,3
10	$9,5^{bdc}$	7,1
9	$8,7^{bcdc}$	7,5
1	$6,7^{edc}$	4,7
8	$6,6^{edc}$	4,3
7	$6,5^{ed}$	6,3
11	$4,5^{ed}$	3,7
6	$4,5^{ed}$	5,6
2	$4,0^{e}$	2,6

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Biomasa seca según especie



1 El Indice de Similitud de Nei & Li varía entre 1y 0 , donde 1 indica que no existe diversidad genética.

Calidad de la materia prima

El análisis estadístico para evaluar la calidad de las varas cosechadas, realizado mediante la prueba de X^2 de Mantel-Haenszel utilizando variables discretas (cuadro 18), indica que existen diferencias significativas entre años ($p \leq 0,05$). Con ello se deduce que la calidad difiere positivamente, aumentando en el año 2000 la proporción de varas que cumplen el requisito de excelente, esto es, varas rectas, sin ganchos, nudos y daños (grado de calidad 1-2), alcanzando un 74,3% del total de varas cosechadas para el conjunto de especies y localidades; en tanto que las varas en la categoría de "malas", es decir, que no alcanzan el grado de calidad mínimo exigido por la Nch 2039, disminuye a un 10%.

Cuadro 18. Calidad de varas según año

Año	Calidad (% de las varas)			
	Excelente	Bueno	Regular	Mala
1998	66,1	3,4	11,9	18,6
1999	58,6	4,3	4,3	32,8
2000	74,3	10,0	5,7	10,0

Por localidad, aún cuando la prueba de X^2 de Mantel-Haenszel, no entrega diferencias significativas ($p > 0,05$) debido a la gran cantidad de celdas con menos de cinco datos, las proporciones según categorías de calidad señaladas en el cuadro 19 son indicativas. Así, las localidades de Parral, Chimbarongo y Coelemu, presentan una gran proporción de varas de excelente calidad, con valores de entre 72 y 75%; en tanto que Yumbel y Temuco, por el contrario, entregan la mayor proporción de varas de rechazo (categoría de "malas"), alcanzando cifras de 30,6% y 40%, respectivamente. Esta condición negativa en Yumbel y Temuco está asociada, según se ha podido observar, a una excesiva fertilidad del suelo (alto contenido de N), lo que ha influenciado la producción de ramillas secundarias (ganchos) en algunas especies (3, 4, 6 y 12); a lo que se suma en Temuco, la helada de primavera que dañó los brotes apicales, incentivando la producción de ramas secundarias.

Con todo, exceptuando Yumbel y Temuco, las localidades restantes presentan una proporción alta de varas que clasifican en los grados de calidad definidas por la Nch 2039, existiendo, en el peor de los casos, una porcentaje de desclasificación de un 17%, considerado aceptable, dado el gran volumen de varas que se generan en una hectárea (sobre 300.000).

Cuadro 19. Calidad de varas según localidad

Localidad	Calidad (% de las varas)			
	Excelente	Bueno	Regular	Mala
Salamanca	60,0	8,6	14,3	17,1
Chimbarongo	72,2	0,0	11,1	16,7
Parral	75,0	5,6	8,3	11,1
Coelemu	72,2	8,3	2,8	16,7
Yumbel	58,3	8,3	2,8	30,6
Temuco	55,0	5,0	0,0	40,0

Al igual que en el caso anterior, la prueba de X^2 de Mantel-Haenszel, no indica diferencias significativas entre especies($p=0,870$). Sin embargo los antecedentes entregados en el cuadro 20, permiten señalar que el grupo de especies *Salix viminalis* (especies, 3, 4, 5 y 10) presenta una alta proporción de varas de excelente calidad (valores entre 82 y 88%); la misma situación presenta *Salix purpurea* (especie 2), que alcanza una proporción similar (88%) de varas de alta calidad. Destaca también dentro del grupo de mejor calidad, la especie 11 (*Salix alba* var. *vitellina*) con la mayor proporción de varas en la categoría de excelente (94,1%); no así la 1, que siendo una variedad de la primera, sólo presenta un 17,7% de varas en esta categoría, lo cual se debe a una gran cantidad de ramillas secundarias que la inhabilita para trabajos de cestería.

Las especies 6 y 9 (*S. caprea*), presentan también buenas características, en cambio las especies 7 y 8 (*S. humboldtiana*) y 12 (*S. x rubens*), poseen una proporción de entre 40 y 50% de varas con ganchos y nudos (categoría «mala»), lo que determina su baja aptitud para trabajos de cestería.

Cuadro 20. Calidad de varas según especie

Especie	Calidad (% de las varas)			
	Excelente	Bueno	Regular	Mala
1	17,7	11,8	23,5	47,0
2	88,2	0,0	5,9	5,9
3	88,2	5,9	0,0	5,9
4	82,4	5,9	0,0	11,7
5	82,4	5,9	6,3	6,3
6	87,4	0,0	6,3	6,3
7	33,3	13,3	0,0	53,4
8	33,3	0,0	13,3	53,4
9	70,5	11,8	11,8	5,9
10	82,3	5,9	5,9	5,9
11	94,1	0,0	0,0	5,9
12	29,4	11,8	17,6	41,2

Los cuadros 21 y 22 individualizan los defectos presentados por las varas de mimbre. De ellos se desprende que la presencia de ganchos es el defecto más preponderante, que influencia el menor grado de calidad de la materia prima. La falta de rectitud y la presencia de nudos y daños es poco evidente.

La presencia de ganchos, según se muestra en el cuadro 21, se diferencia significativamente entre las temporadas 1998/2000 y 1999, indicando que este hecho puede estar influenciado por las condiciones de clima y/o manejo. En efecto, según lo observado, los daños producidos a los brotes apicales ya sea por una helada, insectos, daños mecánicos, granizo, aplicación de productos químicos (herbicidas o insecticidas) y stress hídrico, fomentan la proliferación de brotes que darán origen a ramillas secundarias. Dependiendo del momento en que esto ocurra, el daño económico será más o menos importante. Si se produce al inicio de la estación de crecimiento, la vara secundaria logra su desarrollo; en cambio, si se produce a mediados o finales de la estación, tanto la vara principal como la secundaria son inservibles.

Cuadro 21. Defectos presentados por las varas según año

	% de las varas							
	No rectas		Con ganchos		Con nudos		Con daños	
Año	Media	± D.E	Media	± D.E	Media	± D.E	Media	± D.E
1998	4,6[a]	11,2	11,7[b]	20,9	1,5[b]	0,7	0,08[b]	0,6
1999	0,2[b]	0,6	21,6[a]	27,7	3,8[a]	13,1	4,2[a]	11,3
2000	0,1[b]	2,5	9,2[b]	15,2	2,2[b]	1,2	1,7[a]	3,9

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

La comparación entre localidades (cuadro 22), indica que Parral es la localidad con menor proporción de varas con defectos, diferenciándose en términos estadísticos del resto. Chimbarongo, aun cuando no siempre se diferencia significativamente de otras localidades, resalta por ocupar posiciones bajas en el ranking, indicando un bajo nivel de defectos.

En cuanto a la presencia de ganchos, defecto principal dada su importancia relativa con niveles de 9 a 10% del total de varas (cuadro 22.b), es más evidente en la localidad de Temuco y Yumbel, lo cual, como se señaló anteriormente, se debe probablemente a los altos contenidos de N del suelo y al efecto helada ocurrido en Temuco en 1999.

Cuadro 22. Defectos presentados por las varas según localidad

22.a.

Localidad	Varas No rectas (%)	
	Media	± D.E
Yumbel	5,9[a]	13,6
Chimbarongo	2,8[ba]	4,7
Salamanca	0,9[bc]	2,0
Coelemu	0,1[c]	0,5
Temuco	0,1[c]	0,5
Parral	0,03[c]	0,1

22.b.

Localidad	Con Ganchos (%)	
	Media	± D.E
Temuco	19,0[a]	19,6
Yumbel	15,7[b]	26,0
Salamanca l	6,5[ba]	24,8
Coelemu l	4,0[ba]	24,8
Chimbarongo	13,3[ba]	23,0
Parral	9,4[b]	13,6

22.c.

Localidad	Con Nudos (%)	
	Media	± D.E
Salamanca	4,7[a]	15,7
Temuco	2,4[a]	10,2
Yumbel	1,5[a]	6,6
Coelemu	0,4[a]	1,7
Parral	0,2[a]	0,6
Chimbarongo	0,0[a]	0,0

22.d.

Localidad	Con daños (%)	
	Media	± D.E
Coelemu	3,2[a]	9,8
Salamanca	3,2[ba]	10,4
Yumbel	2,2[ba]	6,3
Chimbarongo	1,6[ba]	5,6
Temuco	1,3[ba]	2,5
Parral	0,7[b]	3,7

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Excepto para el caso de ganchos y daños, los demás defectos (rectitud y nudos) tienen una baja importancia relativa a nivel de especies, no superando el 5% del total de varas.

La presencia de ganchos es destacable en las especies 7 y 8 (*S. humboldtiana*), con valores de 36 y 45%, respectivamente. Estos valores no son de extrañar, dado que se trata de una especie de hábito arbóreo, que aunque se maneje como monte bajo, no presenta cualidades para ser utilizada en la industria del mimbre, dada su menor flexibilidad (GARAY, 2000). Situación similar ocurre con la especie 12, *S. x rubens*, que también presenta un hábito arbóreo. Sin embargo esta especie es utilizada en Brasil como mimbre dada su flexibilidad, a pesar que los nudos dejados por esos ganchos generan una calidad deficiente de productos. Observaciones en este país, permiten presumir que un manejo silvicultural apropiado y en condiciones de suelo adecuadas (alta densidad y suelos con bajo contenido de materia orgánica), podrían dar origen a varas de menores diámetros y poca cantidad de ramillas secundarias. Finalmente, la especie 1, al igual que las anteriores, presenta una alta cantidad de ganchos que la hacen poco adecuada para cestería.

Contrariamente a los casos anteriores, las especies 2 y 11 (*S. alba* var. *vitellina* y *S. purpurea*) destacan por la baja presencia de ganchos, lo mismo ocurre con el grupo de *S. viminalis*, no superando el 6% de varas con este defecto.

Con respecto a los daños, variable muy importante a la hora de seleccionar una especie para cultivo, es relevante la baja proporción en que éstos se presentan, siendo en la

mayor parte de los *Salix* inferior al 1%; en tanto que en la especie *S. humboldtiana* (especie 7) los daños alcanzan a un 14%.

El principal agente de daño en estos casos es el hongo *Melampsora humboldtiana* (PARRA *et al.*, 2000), que como su nombre lo indica, tiene como hospedante principal a la especie *Salix humboldtiana*, de allí el mayor efecto detectado, aunque no es un agente exclusivo de esta especie. En cualquier caso, al parecer, resulta más susceptible la especie 7 *S. humboldtiana* var. *fastigiata* (Cogotí) que la especie 8, *S. humboldtiana* (Quirihue), dado que la primera es una variedad septentrional, por lo cual fuera de su rango de distribución natural es más susceptible a los agentes de daño.

Cuadro 23. Defectos presentados por las varas según especie

23.a.

Especie	No rectas (%) Media	± D.E
5	4,6[a]	12,9
10	3,5[ba]	10,0
3	3,2[ba]	9,7
4	3,1[ba]	8,2
12	1,8[ba]	5,3
8	1,4[ba]	3,5
9	1,2[ba]	4,6
1	1,0[ba]	1,4
11	0,6[ba]	1,4
6	0,2[ba]	0,6
2	0,2[ba]	0,4
7	0,0[b]	0,0

23.b.

Especie	Con ganchos (%) Media	± D.E
8	44,8[a]	37,4
7	36,0[a]	35,5
1	30,7[a]	22,8
12	24,0[ba]	23,5
4	6,4[bc]	7,8
10	5,9[bc]	6,1
6	6,2[c]	9,2
9	5,8[c]	8,1
5	5,1[c]	6,3
3	4,3[c]	4,1
2	4,3[c]	7,9
1	13,5[c]	8,1

23.c.

Especie	Con nudos (%) Media	± D.E
12	7,8[a]	17,4
8	4,8[ba]	13,0
7	4,4[ba]	16,9
1	0,5[ba]	1,1
10	0,2[ba]	0,4
2	0,2[ba]	0,7
11	0,1[ba]	0,6
4	0,08[ba]	0,2
5	0,0[b]	0,0
9	0,0[b]	0,0
3	0,0[b]	0,0
6	0,0[b]	0,0

23.d.

Especie	Con daños (%) Media	± D.E
7	14,1[a]	21,3
8	5,0[ba]	7,2
12	2,7[bc]	4,5
6	1,5[bc]	2,9
11	0,8[bc]	1,5
4	0,6[c]	1,7
10	0,6[c]	1,8
3	0,5[c]	1,3
1	0,4[c]	1,3
5	0,3[c]	1,0
9	0,2[c]	0,5
2	0,1[c]	0,5

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El cuadro 24 indica el tipo de varas obtenido por hectárea para el conjunto de especies y para el promedio de años estudiados. De el se desprende que la mayor parte (57,4%) del material corresponde a varas gruesas (> de 12 mm en la base), y una proporción cercana (42%) a varas medianas (5 a 12 mm). Las varas finas (< 5 mm) sólo se obtienen en una muy baja proporción (< 1%).

Cuadro 24. Tipo de varas

Tipo	% biomasa/ha/año
Gruesas	57,4
Medianas	42,0
Finas	0,6

Por especie (cuadro 25), las proporciones relativas entre varas finas, medianas y gruesas se mantiene, correspondiendo la mayor parte a las dos últimas. La obtención de una mayor proporción entre unas y otras será importante en aquellos casos en que el precio de la materia prima varíe en función del tipo de material. Actualmente existe un mercado muy específico para el mimbre fino (Brasil), lo que está asociado al tipo de productos elaborados en ese país (cestos). En los mercados en que esta materia prima se utiliza para la elaboración de muebles se privilegia una buena relación largo/diámetro, pues los costos de preparación de la materia prima están muy asociados a esta variable. Mientras mayor es el diámetro, mayor es la proporción de médula (la que es necesario eliminar), por otro lado, mientras mayor es el largo de la vara, mejor es su aplicación en el manto tejido de manufacturas tales como muebles.

Cuadro 25. Tipo de varas según especie

Especie	Tipo de varas (% biomasa/ha)		
	Finas	Medianas	Gruesas
1	0,8	41,3	57,9
2	1,1	20,2	78,7
3	0,6	4,2	5,2
4	0,7	4,3	54,0
5	0,6	5,2	48,2
6	0,1	65,3	34,6
7	0,07	87,0	12,8
8	0,2	75,6	24,2
9	0,1	65,2	34,7
10	0,8	50,6	48,6
11	0,2	58,2	41,6
12	0,1	72,5	27,4

Resultados por localidad

Salamanca

El análisis estadístico mediante la prueba de Tukey, que compara las medias ($p \leq 0.05$) para las variables TVHA, BVHA y BSHA, permite discriminar entre las mejores especies, para esta localidad.

En el cuadro 26 destaca la alta proporción de varas generadas por el grupo *S. viminalis* (especies 3, 5, 4); un poco más abajo se ubica la especie 10 del mismo grupo, junto a *S. purpurea* (especie 2), y *S. alba* (especies 1 y 11). Las especies 9 y 6 se distancian entre sí, hecho que también se verifica en esta localidad entre las especies 7 y 8.

Cuadro 26. Total varas/ha/año según especies

Especie	Media	± D.E
3	435.581[a]	262.759
5	406.852[a]	246.958
4	390.265[a]	187.959
9	371.666[ba]	239.558
10	330.078[bac]	201.608
2	277.694[bac]	120.147
1	269.320[bac]	92.397
12	258.993[bac]	172.378
11	182.696[bac]	105.464
8	179.629[bac]	73.677
6	83.586[bc]	8.842
7	80.535[c]	28.935

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En términos de BVHA y BSHA (cuadro 27), la producción aumenta casi al doble entre el primer y segundo año, sustentada por el desarrollo radicular que permite un máximo aprovechamiento del potencial del suelo. En la tercera temporada, se aprecia una disminución de los rendimientos seco y verde, producto del efecto de un factor limitante, probablemente la fertilidad del suelo, puesto que los demás factores (riego, control de malezas y control fitosanitario), se mantuvieron constantes en las tres temporadas.

La biomasa seca, representa en promedio entre un 43 y 46% de la biomasa verde, alcanzando un nivel de 9,1 t seca/ha en el mejor año; valor que es posible de mantener a través de una fertilización adecuada, que permita disponer del nivel de nutrientes requerido para alcanzar el rendimiento esperado.

Cabe indicar que el rendimiento de 9 t seca/ha obtenidos en esta localidad en 1999 se encuentra por debajo de lo alcanzado en la mejor zona de crecimiento (Chimbarongo),

sin embargo, permite generar una producción rentable para pequeños agricultores de esta localidad.

Cuadro 27. Biomasa verde y seca (t/ha) según año

Año	Biomasa verde		Biomasa seca	
	Media	± D.E	Media	± D.E
1998	9,6[b]	10,7	4,4[ba]	5,3
1999	20,8[a]	14,7	9,1[a]	6,1
2000	8,7[b]	7,6	3,8[b]	3,4

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas (p≤ 0,05).

Si bien el test de Tukey no permite discriminar entre especies (cuadro 28), debido a la alta desviación estándar en torno a los valores medios, se pueden distinguir tendencias. Así, las mejores especies para la producción de mimbre son la 3 y la 4, es decir, *S. viminalis*, Chimbarongo y Angol, respectivamente; alcanzando ambas un rendimiento promedio para las tres temporadas, de cerca de 10 t seca/ha/año.

La especie 12 (*S. x rubens*) entrega un rendimiento de cosecha similar a las anteriores, pero por sus características (presencia de ganchos y mayores diámetros), no sería adecuado para la producción de mimbre.

Por su parte, la especie 2 (*S. purpurea*), de excelentes cualidades para la industria del mimbre, debido a su bajo rendimiento (2,5 t seca/ha/año), no sería comparable en términos de rentabilidad a *S. viminalis*.

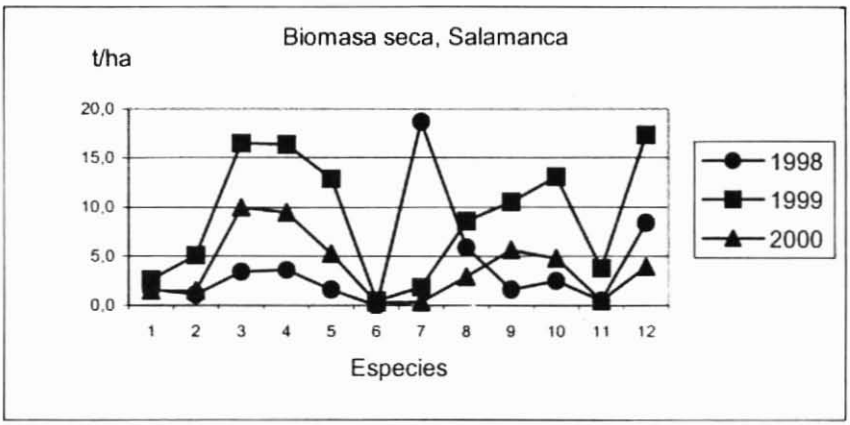
Cuadro 28. Biomasa verde y seca (t/ha/año) según especie

Biomasa verde			Biomasa seca		
Especie	Media	± D.E	Especie	Media	± D.E
12	24,1	16,7	3	9,9	6,8
4	23,5	15,3	12	9,9	6,4
3	20,7	13,6	4	9,8	6,5
10	16,6	13,6	7	7,0	5,6
5	16,3	14,3	10	6,8	5,8
7	14,0	20,3	5	6,6	10,2
9	12,6	9,6	9	5,9	4,5
8	11,3	5,6	8	5,8	2,8
2	5,1	4,4	2	2,5	2,2
1	4,6	1,6	1	1,9	0,6
11	3,7	4,4	11	1,6	1,9
6	1,0	0,4	6	0,4	0,2

No existen diferencias significativas entre especies (p> 0,05).

La figura 4 gráfica los rendimientos en t seca/ha alcanzados cada año por las especies ensayadas. Según se desprende, la producción del año 2000 no logra superar la de la temporada anterior. Las especies 3 y 4 señaladas como más adecuadas para esta zona, logran alcanzar 16 t seca/ha en la mejor temporada (1999), nivel que puede ser mantenido bajo condiciones de manejo adecuadas (fertilización, riegos, control de malezas y fitosanitario). La especie 2, no supera las 5 t seca/ha en el mejor año (1999).

Figura 4. Biomasa seca según año y especie



En cuanto al tipo de varas (cuadro 29), éstas corresponden en su mayoría, en relación a la biomasa/ha (verde o seca), a los tipos gruesas (50%) y medianas (49,4%).

Cuadro 29. Tipo de varas

Tipo	% biomasa/ha/año
Gruesas	50,0
Medianas	49,4
Finas	0,6

Chimbarongo

El test estadístico permite establecer diferencias significativas entre especies. Entre las con más aptitud para la producción de mimbre (cuadro 30) destaca nuevamente *S. viminalis*, Angol (especie 4). También en el mismo grupo se puede apreciar la especie 11 (*S. alba* var. *vitellina*), con una cantidad de varas semejante a *S. viminalis*, sin embargo, del cuadro 32 se desprende que el rendimiento no es muy interesante, siendo prácticamente del orden de la cuarta parte de la primera.

Las especies 7 y 8, aunque diferentes entre sí en la variable TVHA, se encuentran en el tramo más bajo del rango, validando su baja aptitud como productoras de mimbre.

La especie 2 (*S. purpurea*), presenta un nivel no despreciable de varas, lo que unido a sus características (baja presencia de ganchos, nudos y daños), representa un atractivo especial, que permitiría aumentar la diversidad genética y con ello minimizar los riesgos del monocultivo de *S. viminalis*.

Cuadro 30. Total varas/ha/año según especie

Especie	Media	± D.E
4	415.192[a]	221.924
9	408.781[a]	136.594
11	402.667[a]	301.993
3	392.889[ba]	199.097
1	384.000[ba]	188.486
10	367.438[ba]	212.972
2	363.578[ba]	75.926
5	352.568[b]	206.487
12	246.345[ba]	192.759
6	228.821[ba]	143.288
8	184.386[ba]	43.721
7	144.889[b]	73.579

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

El comportamiento de la variable BVHA y BSHA para el conjunto de especies y años (cuadro 31), muestra una tendencia creciente entre el primer y el segundo año, sin embargo entre el segundo y el tercero no existen diferencias significativas. En esta situación podría estar influyendo algún factor limitante, o bien, se estaría en la meseta de la curva de crecimiento. Un mayor seguimiento en tiempo permitirá dilucidar este hecho.

Cuadro 31. Biomasa verde y seca (t/ha) según año

	Biomasa verde		Biomasa seca	
Año	Media	± D.E	Media	± D.E
1998	16,4[b]	10,3	7,3[b]	4,3
1999	43,7[a]	23,6	19,7[a]	10,8
2000	31,0[a]	20,3	14,0[a]	9,7

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Del cuadro 32 se desprende que la especie 4 (*S. viminalis*, Angol) es la de mayor producción, con diferencias significativas respecto a las restantes, alcanzando 26,9 t seca/ha/año, como valor medio para las tres temporadas; un poco más abajo, con 16,5 t seca/ha/año, se encuentra la especie 3 (*S. viminalis*, Chimbarongo), la cual tradicionalmente ha sido utilizada para la producción de mimbre en esta localidad y en el país.

Dado lo anterior, y porque existen diferencias genéticas entre ambos clones (CAMPOS, 2000), se valida la recomendación de utilizar este clon en el establecimiento de nuevos cultivos, aportando con ello a la diversificación productiva.

La especie 12 (*S.x rubens*) destaca también por su alta productividad (23 t seca/ha/año), sin embargo su menor aptitud para la industria del mimbre, hacen aconsejable investigar nuevos usos. Lo mismo sucede con las especies 7 y 8 (*S. humboldtiana*), las cuales debido a que crecen en forma natural en el país, pueden mejorar sus características a través de programas de mejoramiento genético.

Cuadro 32. Biomasa verde y seca (t/ha/año) según especie

Biomasa verde			Biomasa seca		
Especie	**Media**	**± D.E**	**Especie**	**Media**	**± D.E**
12	55,6^{a}	32,5	4	26,9^{a}	13,5
4	55,2^{a}	29,2	12	23,2^{ba}	14,2
5	37,9^{ba}	20,3	5	18,1^{bac}	9,7
9	34,9^{ba}	24,7	3	16,5^{bac}	11,6
10	34,6^{ba}	18,9	9	16,3^{ba}	8,2
3	33,9^{ba}	20,3	10	15,1^{bac}	9,9
7	31,4^{ba}	13,6	7	12,8^{bac}	5,6
8	27,7^{ba}	9,0	8	11,5^{bac}	3,7
1	23,0^{ba}	6,7	1	9,6^{bac}	2,8
11	14,2^{b}	6,1	11	6,5^{bc}	2,8
2	8,7^{b}	4,7	2	4,1^{c}	2,2
6	7,2^{b}	5,8	6	3,2^{c}	2,6

Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).