



0007912

CULTIVO *in vitro* DE LENGA

(*Nothofagus pumilio*)

INFOR
450
c.1

SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO
INNOVA CHILE 02C8FT-05:
"MASIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE INTERÉS COMERCIAL
DEL LENGA EN LA XI REGIÓN"

Editor:
Braulio Gutiérrez C.



CULTIVO *in vitro* DE LENGA (*Nothofagus pumilio*)

SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO INNOVA
CHILE 02C8FT-05:
"MASIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE INTERÉS COMERCIAL
DE LENGA EN LA XI REGIÓN"

Editor:
Braulio Gutiérrez C.



La información contenida en este documento fue obtenida durante el desarrollo del proyecto INNOVA CHILE (ex FDI) 02C8FT-05 “Masificación de Genotipos de Interés Comercial de Lenga en la XI Región”, ejecutado por el Instituto Forestal entre los años 2003 y 2006, con la colaboración de la Corporación Nacional Forestal, Forestal Aysén y el Centro Austral de Investigaciones Científicas CADIC de Argentina. El proyecto así como la publicación de este texto fueron financiados por el Fondo de Desarrollo e Innovación de la Corporación de Fomento a la Producción (CORFO).

Copyright © 2006 Instituto Forestal
Derechos Reservados. Prohibida su reproducción total o parcial sin la autorización del Instituto Forestal.

Primera edición 2006.

Cultivo *in vitro* de lenga (*Nothofagus pumilio*): Síntesis de los resultados del proyecto “Masificación de Genotipos de Interés Comercial de Lenga en la XI región”.

Editor: Braulio Gutiérrez C.

ISBN. 956-8274-84-7

Registro de Propiedad Intelectual N° 159954. Diciembre 2006.

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
I ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO MASIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE INTERÉS COMERCIAL DE LENGA EN LA XI REGIÓN. <i>Braulio Gutiérrez C.</i>	7
II LA ESPECIE FORESTAL LENGA. <i>Braulio Gutiérrez C. y María Paz Molina B.</i>	11
III CULTIVO <i>in vitro</i> DE ESPECIES FORESTALES. <i>Braulio Gutiérrez C. y Oriana Ortiz N.</i>	31
IV SELECCIÓN DE MATERIAL A PROPAGAR <i>Braulio Gutiérrez C.</i>	41
V PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE LENGA. <i>Oriana Ortiz N.; Ana María Sabja G. y Laura Koch Z.</i>	55



PRÓLOGO

El bosque de lenga ha representado históricamente un potencial forestal de gran relevancia para las economías de las regiones australes de Chile, correspondiendo a un recurso monoespecífico, de estructura regular, excelente calidad, y con buena acogida en mercados internacionales. Dentro de los bosques nativos constituye al segundo tipo forestal más abundante en el país, después del siempreverde, totalizando una superficie cercana a los 3,4 millones de hectáreas, que se distribuyen desde la VII hasta la XII región, pero concentrándose y presentando su mayor valor comercial en las regiones australes XI y XII.

Los bosques de lenga han estado históricamente sometidos a fuertes procesos de degradación, particularmente extensos incendios para habilitación de terrenos para agricultura y especialmente ganadería durante los procesos de colonización austral. Por otra parte, las interesantes características de su madera determinaron una fuerte presión sobre el recurso, la que materializada en la práctica del floreo, aplicado en forma histórica a los bosques nativos, implicó una pérdida selectiva de los mejores individuos del bosque, acentuando la pérdida de genotipos valiosos en sus poblaciones. Así, la carencia de criterios racionales de aprovechamiento del recurso ha incidido en la degradación del mismo, situación que recién en los últimos años comienza a revertirse como consecuencia de la mayor difusión y adopción de los postulados del manejo forestal sustentable.

A pesar de la severidad de estas pérdidas, a juicio de diversos especialistas los bosques de lenga continúan siendo los que presenta las mejores condiciones de conservación y las mayores perspectivas para ser transformado en un bosque manejado de producción. No obstante lo anterior, ha surgido la preocupación por otro aspecto tanto o más delicado que los anteriores, el cual dice relación con la merma del acervo genético de la especie, la pérdida de poblaciones enteras que habían evolucionado y conseguido una preciada adaptación a las severas condiciones ambientales imperantes en su área de distribución.

La actividad forestal que se realiza en los bosques de lenga hace uso de su regeneración natural, a partir de los árboles remanentes, para restituir las áreas cosechadas. En este escenario es válido preguntarse ¿qué ocurre en los bosques degradados donde el material progenitor es de mala calidad? Probablemente la heterocigosidad de estos

individuos permitirá reconstituir una nueva población con suficiente variabilidad, donde no todos los árboles serán de la misma mala calidad que sus progenitores, pero también es probable que los individuos de mayor valor estén menos representados que el resto y que la nueva población presente un valor maderero menor que la población original.

*En este sentido, actividades propias del mejoramiento genético tradicional resultan básicas para recuperar el potencial productivo de la especie. Afortunadamente ellas ya han sido recientemente iniciadas, correspondiendo ahora aprovechar estos esfuerzos iniciales para brindarle un mayor dinamismo e impacto en las actividades productivas propiamente tales. Al respecto, el proyecto "Masificación de genotipos de interés comercial de lenga en la XI región" ha propuesto la utilización de esquemas clonales, mediante la propagación *in vitro* de individuos de alto valor productivo, para maximizar las ganancias genéticas asociadas a la utilización de este material, permitiendo así combinar impactos positivos en la conservación del recurso, la recuperación de su potencial productivo y su utilización bajo esquemas que combinen la sustentabilidad del recurso, la preservación de su variabilidad y el aprovechamiento económico.*

En consecuencia, los resultados de tal proyecto, que se resumen en este documento, constituyen un enfoque alternativo para la regeneración lenga, aportando una herramienta técnica de propagación compatible con actividades de plantación y enriquecimiento de bosques, contribuyendo de esta manera a mejorar la productividad del recurso forestal lenga.

Braulio Gutiérrez C.
Diciembre de 2006

I

ANTECEDENTES GENERALES DEL PROYECTO: MASIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE INTERÉS COMERCIAL DE LENGA EN LA XI REGIÓN

Braulio Gutiérrez C.

INTRODUCCIÓN

Las severas condiciones de sitio (clima y suelo) imperantes en la XI región del país restringen las alternativas forestales de interés económico, resultando la lenga uno de los recursos más valiosos para su utilización comercial e industrial.

No obstante lo anterior, los esquemas de utilización tradicionalmente empleados con este recurso concentran la extracción en los individuos más atractivos desde el punto de vista de la producción maderera, regenerando el bosque en forma natural a partir de los individuos remanentes menos interesantes. Esta situación conduce necesariamente a una reducción en la frecuencia de individuos deseables, los cuales por lo mismo se hacen cada vez más escasos, representando una reducción de la variabilidad del recurso, concentrada precisamente en el segmento de los árboles de mayor valor productivo.

Aun cuando a comienzos de los años 2000 se desarrolló un programa de mejoramiento genético para lenga (FONDEF D97I2003), éste no permite en la actualidad, traspasar toda la ganancia genética a los esquemas operacionales de producción. Aún así, fue un meritorio esfuerzo que permitió identificar individuos superiores (árboles plus); establecer fuentes de semilla mejorada representadas por un Área Productora de Semilla (APS) y un Huerto Semillero Clonal (HSC); e instalar una extensa prueba de progenies donde se representa a los hijos de los árboles plus seleccionados.

Respecto a las fuentes semilleras mencionadas, las APS tendrán un importante impacto en la generación de semilla en el corto plazo y el huerto clonal en un plazo mayor. No obstante, ambas situaciones corresponden a esquemas de propagación sexual donde sólo se puede traspasar a la descendencia una proporción de la superioridad de los progenitores, correspondiente a la varianza genética aditiva. Por el contrario no se han implementado esquemas de utilización clonal, los cuales al generar réplicas idénticas de los individuos seleccionados, permiten traspasar tanto la varianza genética aditiva como la no aditiva, con lo cual las ganancias genéticas pueden duplicarse.

Como una medida para acelerar la utilización de las ganancias genéticas asociadas a los árboles plus de lenga, se ha desarrollado un nuevo proyecto

de investigación denominado **“Masificación de Genotipos de Interés Comercial de Lenga en la XI Región”**. Esta iniciativa, presentada por el Instituto Forestal en el marco del Concurso Nacional de Proyectos de Innovación e Interés Público FDI 2002 (actualmente Comité Innova Chile de CORFO), viene a continuar y complementar los anteriores esfuerzos ejecutados en el mejoramiento de la productividad de lenga, concentrando sus actividades en el desarrollo de protocolos de micropropagación para individuos selectos de esta especie.

El enfoque propuesto en este nuevo proyecto aprovecha las oportunidades y ventajas que representan los avances de investigación en el cultivo *in vitro* de especies forestales, así como el gran potencial que ofrece lenga como recurso forestal de gran abundancia y gravitante importancia en la actividad forestal de las regiones australes del país.

La finalización de este proyecto, en diciembre del año 2006, ha dado origen a la publicación de este texto, en el cual se compilan algunos de los antecedentes más relevantes derivados de su ejecución. Particularmente, en este primer capítulo se describen los aspectos generales del referido programa de investigación, mientras que en los capítulos siguientes se presenta una síntesis de sus principales resultados técnicos.

EL PROYECTO: “PROPAGACIÓN DE GENOTIPOS DE INTERÉS COMERCIAL DE PINO OREGÓN”

Objetivos e impactos perseguidos

Esta iniciativa tuvo por objetivo general masificar genotipos superiores para conservar la variabilidad genética y aumentar la productividad de los bosques de lenga en la XI región. Sus objetivos específicos fueron: (i) Masificar a través de micropropagación a genotipos selectos de lenga, y (ii) Promover el uso del material seleccionado para restituir la variabilidad en bosques degradados y evaluar alternativas de desarrollo clonal en lenga.

Los enfoques de masificación clonal propuestos en este proyecto evidencian importantes ventajas para salvaguardar genotipos de interés, contribuyendo a la conservación de la variabilidad del recurso y a su uso sustentable bajo esquemas más productivos, representados estos últimos por bosques enriquecidos o en casos específicos por plantaciones clonales. Estas últimas entendidas como un elemento que puede mejorar la productividad y reducir la presión sobre los bosques naturales

En tal contexto, el proyecto propuesto desarrolla una herramienta técnica de propagación que contribuye a:

- Conservar recursos genéticos de lenga.
- Propender a la restauración de la variabilidad de bosques degradados o cosechados.
- Brindar posibilidades de aumentar la productividad sobre la base del aprovechamiento clonal de lenga.
- Fortalecer los procesos de mejoramiento genético de lenga, a través de la micropropagación que permite amplificar las ganancias genéticas obtenidas mediante los sistemas de mejora tradicional.

Metodología

Para cumplir con sus objetivos el proyecto se estructuró en dos etapas:

- Habilitación de infraestructura de micropropagación

Esta consistió en la habilitación de un laboratorio de micropropagación para llevar a cabo las actividades demandadas por el proyecto. Durante esta fase se diseñó una unidad de cultivo *in vitro* basada en instalaciones preexistentes en las dependencias de la sede Bio Bio del Instituto Forestal. Efectuado el diseño, se procedió a la remodelación y construcción del nuevo laboratorio, el cual permitió efectuar las labores de micropropagación de lenga y dotó a INFOR de una unidad de investigación operativa para la propagación mediante técnicas de cultivo *in vitro* de especies forestales.

- Micropropagación y difusión de material genético selecto

Esta etapa involucra las actividades necesarias para obtener réplicas micropropagadas de un conjunto de árboles superiores de lenga previamente seleccionados, así como también de aquellas actividades de difusión y transferencia para promover el uso de este material.

Las actividades de esta etapa se iniciaron con la colecta de material micropropagable, correspondiente a segmentos de ramas, con yemas latentes a punto de brotar, y provenientes de individuos selectos de lenga. Esta acción tuvo por objetivo establecer *in vitro* yemas provenientes de los árboles selectos y a partir de ellas obtener réplicas vegetativas de los mismos.

Como técnica de cultivo se utilizó la inducción de brotes axilares, que constituye un método fácilmente aplicable y de mayor estabilidad genética que otras técnicas de micropropagación. En el desarrollo del proceso de obtención de plantas micropropagadas se siguieron las siguientes sub-etapas, las cuales son posteriormente descritas en detalle en el capítulo respectivo de este mismo documento.

- Colecta del material vegetal.
- Inducción de brotación.
- Establecimiento *in vitro*.
- Multiplicación de brotes.
- Enraizamiento.
- Aclimatación y endurecimiento.

En cuanto a la difusión de sus resultados, esta se implementó mediante la organización de seminarios, la edición de un documento técnico de amplia distribución y la suscripción de un convenio con una empresa privada, para la utilización del material genético seleccionado y propagado por el proyecto.

Instituciones asociadas

- Corporación Nacional Forestal (CONAF, XI Región)
- Forestal Aysén Ltda.
- Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC, Argentina)

Equipo de trabajo

- Braulio Gutiérrez C. (Director)
- Paulo Moreno M. (Director alterno)
- Oriana Ortiz N. (Micropropagación)
- Luigi Solis U. (Técnico de terreno)
- Laura Koch Z. (laboratorista)
- Ana María Sabja G. (Asesora micropropagación material juvenil)
- Guillermo Martínez P. (Asesor micropropagación material adulto)

Resultados Obtenidos

Coincidiendo con sus objetivos y formulación, el principal resultado técnico obtenido por el proyecto fue el desarrollo de un protocolo operativo de micropropagación para individuos selectos de lengua. Este constituye una importante herramienta de masificación para los genotipos de mayor valor, siendo sus detalles técnicos descritos en el capítulo V de este documento.

II

LA ESPECIE FORESTAL LENGUA

Braulio Gutiérrez C.
María Paz Molina B.

INTRODUCCIÓN

Los bosques de lenga constituyen uno de los principales recursos forestales nativos de Chile. La superficie que ellos representan corresponde a más del 25% de la existencia de bosques naturales, presentando algunas características que los hacen especialmente interesantes para sustentar una actividad productiva económicamente rentable.

Entre otras características de interés, estos bosques se encuentran fuertemente concentrados en las regiones australes del país, donde las severas condiciones ambientales restringen el cultivo de otras especies forestales. Por otra parte, presentan una estructura relativamente simple, donde abundan las formaciones puras y coetáneas que facilitan su manejo. Adicionalmente su madera es de reconocida calidad, constituyendo uno de los principales productos de exportación generados en el bosque nativo.

A pesar de lo anterior, han debido soportar severas presiones por habilitación de terrenos ganaderos, incendios y explotación indiscriminada mediante extracción selectiva de los mejores individuos de sus bosques. En la actualidad, la aplicación de técnicas silvícolas, principalmente cortas de protección, permiten un aprovechamiento racional del recurso, subsistiendo eso sí, extensas superficies fuertemente degradadas en el pasado.

Atendiendo a las potencialidades que ofrece este recurso y que justifican las labores de investigación que en torno a él se han implementado, en el presente capítulo se entrega una síntesis de antecedentes bibliográficos que da cuenta de sus principales características.

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser) es una especie nativa de Chile y Argentina.

De acuerdo con antecedentes resumidos por Neira (2005) y Emhart *et al.* (1999) Lenga es un árbol de tamaño mediano, que en la región de Magallanes alcanza una altura máxima de 30m. El tronco es recto y relativamente cilíndrico de hasta 1,5m de DAP. Es una especie monoica, de follaje caduco. Las hojas son simples, alternas, de 2 a 3,5cm de largo y 1 a 3cm de ancho;

lámina elíptica, subglabra, ápice obtuso, base oblicua o cuneada, el margen tiene dos dientes entre cada par de nervios y estípulas caedizas. Las flores masculinas son solitarias, pedúnculo corto de 7 a 8mm. de largo con 10 a 20 estambres con filamentos largos y antera glabra, perigonio infundibuliforme, vellosa, las flores femeninas son solitarias, se ubican en las axilas de las hojas, sésiles, poseen un solo ovario y están provistas de pequeñas escamas en la base. El fruto corresponde a una cúpula de 2 valvas lineares llevando un solo aquenio trialado, posee un tamaño de 7 a 10mm de largo por 5 a 7mm de ancho. Maduran de enero a febrero y poseen una dispersión anemócora.

Distribución

Lenga es la especie de más amplia distribución, abarcando una amplitud de aproximadamente 2.200Km, concentrándose fundamentalmente en las regiones XI y XII. Por la Cordillera de los Andes, Lenga crece como especie desde la Provincia de Talca, VII Región (35°36' S), hacia el Sur; y como tipo forestal, a partir de la Provincia Ñuble, VIII Región (36°56' S) hasta las proximidades del Cabo de Hornos en la XII Región (56° S).

En la Cordillera de la Costa, se le encuentra en las partes altas de la Cordillera de Nahuelbuta (1.400msnm), donde puede asociarse con *Araucaria araucana*; y en la Cordillera Pelada de la provincia de Valdivia (1.000msnm) como constituyente de los bosques de Alerce (*Fitzroya cupressoides*). En ambas localidades de la Cordillera de la Costa la especie forma parte de tipos forestales distintos al de lenga (Troncoso, 2004).

Según Bastías (2005) y Garfías (2006) al norte de la provincia de Llanquihue (45°S), se encuentra siempre en el límite altitudinal de la vegetación arbórea, por sobre los 1.000msnm, sin embargo, en zonas más australes se encuentra a menor altitud, llegando incluso al nivel del mar en la región de Magallanes. Según Veblen y Schlegel (1982), en la región Norpatagónica y Magallánica, los bosques se encuentran desde el nivel del mar hasta los 700msnm, formando extensos bosques puros o asociados a *N. betuloides* (Donoso, 1981).

Requerimientos ecológicos

Lenga posee un rango de distribución de más de 2.000Km en el sentido norte sur, siendo esta gran extensión un indicativo de su gran amplitud ecológica o rango de tolerancia. Dentro de los variados ambientes que enfrenta en su distribución, en general se desarrolla en condiciones donde predominan las bajas temperaturas y suelos de poca calidad. Requiere de una abundante pluviosidad, y tolera la nieve en épocas invernales. Adicionalmente, esta especie ha desarrollado adaptaciones estructurales para resistir los fuertes vientos cordilleranos y magallánicos, de modo que cuando se acerca a los límites altitudinales de la vegetación, tiende a adoptar una forma achaparrada (Bastías, 2005).

De acuerdo con Premoli (2004), a lo largo y ancho de su distribución los bosques de lenga enfrentan dos grandes gradientes ambientales, uno latitudinal y otro longitudinal. En el primero, el clima varía considerablemente de norte a sur en cuanto a la estacionalidad y distribución de las precipitaciones, de modo que lenga enfrenta condiciones donde estas se concentran en más de un 60% en los meses invernales a otras donde su distribución es homogénea y no existe déficit hídrico durante el año.

El segundo gradiente es el longitudinal (sentido este - oeste), en el cual en distancias inferiores a los 100Km se encuentran diferencias de precipitación de más de 4.000mm. Efectivamente, en el centro de su distribución, en los 41°S, lenga se desarrolla con precipitaciones que van desde los 5.600mm en la ladera oeste de la Cordillera de los Andes (Antillanca), hasta menos de 800mm en sus poblaciones más orientales del territorio argentino.

En toda su distribución, ya sea en el límite altitudinal de la vegetación de las cordilleras de Los Andes o de La Costa, así como en las zonas australes del continente sudamericano, lenga enfrenta condiciones de baja temperatura y precipitación en forma de nieve, ocupando sitios más fríos y secos que otras especies emparentadas como *N. dombeyi* y *N. betuloides*. Aún así, lenga tendría limitaciones ante las temperaturas extremadamente bajas, evitando los bolsones de frío donde es reemplazada por Ñirre (*N. Antarctica*).

En cuanto a suelos, *N. pumilio* ocupa una variedad de ellos. En la Cordillera de Los Andes estos son de origen volcánico, desarrollados sobre rocas andesíticas y basálticas cubiertas por capas delgadas de ceniza volcánica o material más grueso de escoria, gravas o arenas. En la región de Aysén los suelos se han desarrollado sobre material volcánico grueso en la cordillera y sobre cenizas volcánicas a menor altitud. En Magallanes y Tierra del Fuego los suelos se desarrollan fundamentalmente sobre materiales glaciares. En la zona más austral la podzolización es un proceso característico, los suelos son delgados y de reacción ácida, con valores de pH que fluctúan entre 3 y 5,2. En Tierra del Fuego son de escasa profundidad, con altos volúmenes de pedregosidad, baja capacidad de agua aprovechable, drenaje interno restringido, alta acidez, baja disponibilidad de elementos nutritivos y altos niveles de aluminio, características todas que limitan la fertilidad del suelo (Premoli, 2004).

Los terrenos donde crece lenga son generalmente de topografía ondulada, aunque también crece en sectores cordilleranos interiores (Donoso, 1981). En los límites del Bosque Caducifolio Magallánico con la estepa patagónica es común encontrar una zona de transición ecológica, donde lenga se asocia con *N. antarctica* en forma de matorral dando paso a formaciones puras de esta última especie y luego a una pradera de gramíneas (Veblen y Schlegel, 1982; Araya, 1990).

Guerra y Correa (1973), consideran a la lenga como una especie intolerante a la sombra. Sin embargo, autores como Donoso (1978) y Rodríguez *et al.* (1983) reconocen que esta especie es medianamente tolerante, ya que se desarrolla frecuentemente bajo el dosel de *Araucaria araucana*. Además, en varios sectores de su distribución, crece mezclada con *N. dombeyi* y *N. alpina* (Bastías, 2005).

Antecedentes reproductivos

El ciclo reproductivo comprende la secuencia de eventos entre la iniciación o formación de los primordios florales y la caída de las semillas maduras desde el fruto.

La iniciación de las yemas florales se produce en el otoño del año 1; después de 3 meses aproximadamente surgen las flores masculinas y más tarde, las femeninas en las axilas de las hojas; en ese período, durante la primavera del año 1 se produce la polinización y a fines de primavera, la fecundación. Durante el resto de la primavera y resto del verano tiene lugar el desarrollo de las cúpulas, frutos y semillas, las que una vez maduras son dispersadas a fines de verano y principios del otoño; el proceso completo involucra un año de duración (Donoso, 1993; cit. por Emhart *et al.*, 1999).

Lenga, puede florecer desde agosto hasta fines de noviembre, dependiendo de las condiciones ambientales en que se desarrolla. La floración es más tardía en el extremo sur y a mayor altitud. En un estudio realizado por Rusch (1993), en Argentina, en el sector de Nahuel Huapi, la floración se da entre septiembre y octubre y es retrasada por la altura.

El período de formación de los frutos (cúpula de dos valvas lineares que porta una nuez o aquenio trígono) comienza cuando finaliza la floración y finaliza cuando comienza la dispersión de la semilla. La maduración de los frutos se produce entre enero y febrero (Donoso y Cabello, 1978; Muñoz, 1980). Otros antecedentes aportados por Muñoz (1993) indican que en la XI Región, los frutos de lenga maduran entre febrero y abril, produciéndose la dispersión del 68% de la semilla durante el mes de abril.

Experiencias acumuladas entre temporadas de los años 1998 y 1999, por personal de la oficina regional de Infor XII región, indican que la maduración de los frutos se produce entre el mes de Marzo y la primera semana de Mayo, siendo más temprana en el sector continental que en la Isla de Tierra del Fuego (Emhart *et al.*, 1999).

La producción de semillas, al igual que el crecimiento, es una función de la altitud, latitud, temperatura y precipitaciones.

En general, el número de semillas por kilo puede variar entre 40.000 y 50.000

dependiendo de la procedencia de la misma. Muñoz (1993) y Uriarte y Grosse (1991) señalan valores entre 49 y 50 mil semillas por kilo, mientras que Mascareño (1988) registra un promedio de 98.000 semillas por kilogramo en tres rodales de la XI Región.

Al igual que en otros *Nothofagus*, la producción de semillas de lenga parece estar sujeta a un fenómeno de añerismo, observándose considerables fluctuaciones anuales de fructificación, pero siendo frecuentes los años en que esta es abundante y sugiriéndose que cada 2 a 4 años se presenta una temporada de buena semillación. Sin embargo, en la XI Región, tras un período de observación de más de 10 años, no se observó que la especie estuviera sometida a una marcada estacionalidad o añerismo en la producción de semillas, postulándose que tal estacionalidad podría presentarse a intervalos mayores de 10 años (Muñoz, 1993).

Generalmente la viabilidad esta relacionada con la producción. Los años de buena semillación tienen alta viabilidad y los malos baja viabilidad

Los niveles de producción de semilla de lenga son bajos en relación a los alcanzados por otras especies del género *Nothofagus* en años de alta producción. En la XI Región los niveles de producción fluctúan entre 0,5 y 10 millones de semillas por hectárea (Uriarte y Grosse, 1991) en circunstancias que para raulí se han informado valores superiores a los 20 millones. Como cifras referenciales Mascareño (1988) indica que en raulí la producción de semillas fluctúa entre 0,17 a 20,5 millones de semillas por hectárea, en tanto que coigüe produce entre 8,8 y 168,6 millones, de las cuales una importante proporción resulta vana. Por otra parte, en los *Nothofagus* de Nueva Zelanda la producción de semillas varía entre 0,46 y 74,3 millones por hectárea. Para el caso de lenga, en años de alta producción, se han encontrado 1,4 millones de semillas/ha y en años de baja producción, se han encontrado 230 mil semillas/ha (Emhart *et al.*, 1999).

Entre 1981 y 1996, se registró anualmente la producción de semillas en un ensayo de regeneración en Skyring, XII región, bajo bosques sometidos a cortas de protección. Los resultados indican que entre 1990 y 1995 existió escasa semilla, no así el año 1996 el cual presentó una abundante semillación, alcanzando en algunos casos los 16 millones de semillas por hectárea. Se indica además que esta cantidad es la más alta en un período de observación de 15 años (Schmidt *et al.*, 1996).

En Penitente, XII región, Schmidt *et al.* (1997), señalan a partir de un bosque intervenido comercialmente el año 1992, que la producción de semillas para el año 1997, asociándolas a tres calidades de sitio, bueno, malo y regular, es de 58.000, 66.000 y 0 semillas por hectárea, respectivamente.

Para un mismo año de registro de producción de semillas en la XII región, las

cifras son bastante superiores en Tierra del Fuego a los registros de semilla en ensayos ubicados en la zona continental, lo que indica variaciones locales importantes (Schmidt *et al.*, 1997).

Crecimiento

Los árboles de lengua tienen un buen crecimiento juvenil en altura, mientras crecen bajo dosel o protegidos por el relieve y la posición topográfica. A su vez, el crecimiento en altura se limita en el momento en que los individuos del dosel superior se ven expuestos a la acción mecánica y al efecto secante del viento (Bastías, 2005; Labarthe, 2005).

El crecimiento en altura y diámetro de renovales de lengua está influenciado por la luz que reciben los árboles, obteniendo los mejores crecimientos en áreas de menor cobertura, demostrándose la baja tolerancia de la especie. En general, se puede indicar que la especie alcanza una altura media de 25 a 27m, llegando hasta los 30m en sectores protegidos de la XI Región (Uriarte y Grosse, 1991). En Magallanes, los árboles maduros de lengua alcanzan generalmente alturas entre 15 y 20m, llegando excepcionalmente a los 27m (Dollenz, 1995, cit. por Troncoso, 2004).

Durante los primeros 70 años lengua que presente un crecimiento en altura de 25 a 35 cm/año. Posteriormente, este crecimiento disminuye a 10cm/año entre los 90 y 100 años, a 4cm/año entre los 140 y 150 años y a 1cm/año entre los 190 y 200 años (Manosalva, 1995). Larson (2000; cit. por Labarthe, 2005), agrega que en la XII región, a los 90 años de edad el incremento anual medio en altura es de 20cm/año.

Respecto al diámetro, Schmidt y Urzúa (1982) señalan que en condiciones naturales lengua presenta un incremento diametral muy bajo, alcanzando en promedio un valor de 1,7mm/año; sin embargo encontraron árboles cuyos incrementos diametrales promedio son superiores a los 4mm/año. Para el caso de los renovales sometidos a raleo el incremento diametral medio va desde 2,1 hasta 4,9mm/año (Larson, 2000). Para un bosque natural en Aysén, Sievert (1995, cit. por Troncoso, 2004) señala que los árboles individuales de lengua presentaban valores de incremento diametral anual promedio de 1,91mm/año, variando desde un mínimo de 0,5mm/año hasta un máximo de 5mm/año.

En las mediciones de crecimiento en bosques intervenidos se han detectado incrementos diametrales de hasta cuatro veces superiores al promedio natural, lo que sugiere que mediante tratamientos silviculturales es posible mejorar sustancialmente el crecimiento de los árboles en estos bosques (Troncoso, 2004).

Efectivamente, en rodales de Magallanes continental, luego de una corta de

regeneración, se observaron crecimientos diametrales de entre 2,8 a 3,1mm/año en árboles juveniles y maduros, superando en más del doble a los 1,7mm/año registrados antes de la intervención. Incluso los árboles sobremaduros experimentaron un aumento en sus incrementos diametrales. La misma corta de regeneración aplicada en rodales de Tierra del Fuego, también generó un aumento del crecimiento en diámetro en todas las categorías de árboles considerados. En individuos juveniles el incremento fue de 1,1 a 2,1mm/año; en maduros de 1,0 a 1,4mm/año y en sobremaduros de 1,0 a 1,3mm/año (Troncoso, 2004).

De igual forma, se observa una respuesta positiva del incremento en diámetro ante intervenciones de raleo efectuadas en un bosque primario con árboles juveniles en fase de crecimiento óptimo final. En este caso el incremento diametral anual después de la intervención (1,9mm/año) es un 25% superior al registrado antes de la misma. Análogamente, ante raleos por lo bajo aplicados en bosques de 90 años, el incremento diametral (2,5mm/año) supera en un 20% al calculado antes de la intervención (Troncoso, 2004). Las respuestas obtenidas ante mayores intensidades de raleo son aún mejores (Schmidt *et al.*, 2001).

Características de la madera

De acuerdo con Labarthe (2005), desde el punto de vista macroscópico, la madera de lenga presenta una albura de color blanquecino-rosado y un duramen de tonalidad amarillo-rosado. Los anillos de crecimiento son visibles y presenta en sus caras longitudinales un brillo suave que se va perdiendo en la medida que la madera se oscurece al estar expuesta a la intemperie. El veteado es demarcado y la textura fina y homogénea, con un grano derecho.

Microscópicamente, en un corte transversal, los vasos son extremadamente numerosos (300 – 400 por mm²) y pequeños, con un diámetro que no excede de 45 µ, están, dispuestos irregularmente en el tejido, alineados a lo largo de los radios leñosos.

Los vasos tienen una longitud de 300 a 800µ, presentando apéndices de 40 a 60 µ de largo; tienen placas de perforación simple, inclinada, con perforaciones simples, laterales o terminales; puntuaciones escaleriformes bien visibles, habiendo también puntuaciones oblongas. En el interior de los vasos existe principio de tilosis.

Las fibrotraqueidas tienen una longitud de 600 a 900µ, con puntuaciones lenticulares apenas areoladas. Los radios leñosos son muy numerosos (11 a 15 por mm), uniseriados y dispuestos irregularmente. Su altura máxima es de 650µ, mientras que el ancho alcanza apenas los 7 a 10µ.

- **Propiedades físicas**

El secado artificial de la madera de lenga presenta una mediana dificultad, la temperatura promedio recomendable no debe ser superior a los 65°C. Los principales defectos corresponden a deformaciones y colapsos. Una vez seca es muy estable dimensionalmente.

La madera es moderadamente durable, con una vida útil de entre 5 y 15 años en el exterior, sin tratamiento de preservación y en contacto con el suelo. Como elemento interior, sin contacto con el suelo orgánico, esta duración es mayor.

Frente al ataque de hongos se le clasifica como resistente. En la preservación mediante tratamientos de inmersión, la especie presenta una absorción muy escasa, con una irregular penetración de los preservantes.

- **Propiedades mecánicas**

Su densidad básica promedio es de 464Kg/m³. Su capacidad para resistir sollicitaciones mecánicas es considerada como medianamente alta. Su dureza se clasifica como intermedia, alcanzando en estado seco valores de 369 y 556Kg en dirección normal y paralela a las fibras respectivamente.

DESCRIPCIÓN DE SUS BOSQUES

De acuerdo a la legislación vigente, el Tipo Forestal Lenga corresponde a aquellos bosques en que al menos un 50% de sus individuos pertenecen a esta especie. Para efectos de su clasificación, este tipo forestal se divide en los tres subtipos siguientes: (Donoso, 1998; Troncoso, 2004; Silva 2005; Garfias, 2006).

- **Bosques Achaparrados y Krummholz de Lenga:** Corresponde a un matorral puro, caracterizado por el crecimiento achaparrado o bien arrastrado. Esta forma de crecimiento se presenta en el límite altitudinal del tipo forestal y es consecuencia de las restrictivas condiciones ambientales, derivadas de las bajas temperaturas, fuertes vientos, nieve y poco desarrollo del suelo. Este subtipo limita hacia menores altitudes con el bosque de Lenga normal.
- **Bosques de Lenga Puro:** Este subtipo se desarrolla en la cordillera inmediatamente por debajo del krummholz, y en gran parte de las regiones de Aysén y Magallanes. Los bosques de este subtipo presentan una estructura multietánea, pero están constituidos por rodales que son generalmente coetáneos.
- **Bosques Mixtos de Lenga - Coihue:** En general, este subtipo presenta una estructura de tipo multietánea, existiendo bosques mixtos de dos

clases: (i) Lengua y Coihue común, que se desarrolla en la cordillera de los Andes, hasta aproximadamente el paralelo 40° 30' S, y (ii) Lengua y Coihue de Magallanes, que se desarrollan en la cordillera por debajo del subtipo Lengua puro, y al sur del paralelo 40° 30' y en Magallanes en las zonas transicionales entre el Tipo Forestal Lengua y el Tipo Forestal Coihue de Magallanes.

La estructura del bosque puede presentarse desde un bosque coetáneo de un estrato, hasta un bosque multietáneo pie a pie y multiestratificado (Schmidt y Urzúa, 1982).

De acuerdo con los documentados antecedentes aportados por Garfias (2006), el bosque puro de Lengua se presenta en forma de mosaico de bosquetes de estructura coetánea de tamaño variable, producto de una combinación de factores como son los distintos sitios y fases de desarrollo. Esta diversidad natural puede alterarse más a través de intervenciones humanas. La estructura aparentemente coetánea de muchos bosques de *N. pumilio* es generalmente atribuida a caídas de dosel de rodales completos por efecto de tormentas de viento, las cuales son importantes perturbaciones en estos bosques, debido a sus sistemas radiculares superficiales (Veblen *et al.*, 1997). Las tormentas también provocan caídas de árboles individuales, las que juegan un papel relevante en la dinámica.

En áreas con condiciones ecológicas más favorables, el bosque está constituido por árboles pertenecientes a tres o cuatro grupos de edades, que ocupan simultáneamente el estrato superior y por sectores surge la regeneración, formando un segundo estrato. Estos bosques tienen un carácter multietáneo por bosquetes. Las distribuciones diamétricas en los distintos bosquetes son similares, lo que dificulta la separación de bosquetes y el reconocimiento de las fases de desarrollo.

En condiciones ecológicas menos favorables, se simplifica la estructura, el bosque se presenta constituido también por bosquetes, pero solo con uno o dos estratos de árboles, claramente coetáneos cada uno. Los árboles en cada estrato corresponden a una generación de árboles con edades y estado de desarrollo similar (Schmidt y Urzúa, 1982).

Con respecto a los bosques mixtos de Lengua y Coihue de Magallanes, Uriarte y Grosse (1991) sostienen que son bosques multietáneos formados por bosquetes coetáneos, donde la participación relativa de Coihue dependerá del grado de transición hacia el Tipo Forestal Coihue de Magallanes.

La densidad, en términos de número de árboles por hectárea, para bosques no intervenidos, de lengua es variable en función de la fase de desarrollo en que se encuentra el bosque. Para el sector de Skyring, en el tipo Lengua multietáneo, los valores de densidad promedio a partir de 10cm de diámetro,

corresponden a 510árb/ha, variando entre 280 y 919arb/ha. El área basal promedio corresponde a 68,5m²/ha, con un mínimo de 48,4 y un máximo de 103,3m²/ha. El volumen bruto varía entre 270 a 622,3m³/ha, con un promedio de 406,6m³/ha (Troncoso, 2004; Garfias, 2005). En la Provincia de Última Esperanza, Silva (2005) señala una densidad de 860árb/ha en bosque virgen de lenga, con un área basal de 72 m²/ha y un volumen de 681m³/ha.

En bosques mixtos de Lenga y Coihue de Magallanes en la XII Región, Pesutic (1978) señala que la densidad varía de 465,5 a 562,5árb/ha, con áreas basales de 59 a 78,9m²/ha (90% correspondiente a lenga) y un volumen de 360 a 469m³/ha (94% correspondiente a Lenga). En este mismo tipo de bosque, Schmidt *et al.* (2004, *cit. por* Garfias, 2006), determinaron valores de densidad de 764árb/ha, un área basal de 63m²/ha y un volumen de 612m³/ha. Los mismos autores (*op. cit*) en otra condición del mismo bosque mixto de lenga y coigüe de Magallanes encontraron una densidad de 592árb/ha, un área basal de 58m²/ha y un volumen de 525m³/ha.

Dinámica y fases de desarrollo

En términos de estructura y de dinámica, se pueden encontrar bosques multietáneos multiestratificados y bosques de estructuras coetáneas, que pasan por distintas fases de desarrollo de duración variable (Neira, 2004; Bastías, 2005; Silva, 2005; Garfias, 2006). El ciclo natural de desarrollo dura del orden de 200 a 250 años, repitiéndose las distintas fases en forma similar a través del tiempo. Estas fases se pueden diferenciar por la estructura y edad de los árboles que las componen, y según Schmidt y Urzúa (1982) corresponden a las siguientes:

- Desmoronamiento con regeneración: En esta fase se produce una disminución gradual de los árboles sobremaduros, lo que permite el establecimiento de la regeneración. Esta etapa puede durar 50 a 70 años y culmina en un monte bravo del orden de 2 a 5 m de altura.
- Desmoronamiento con crecimiento óptimo: Aún subsisten algunos árboles sobrevivientes de la primera generación y la segunda generación está constituida por un latizal de árboles juveniles que penetran vigorosamente en el estrato superior. La edad de los árboles juveniles de esta fase llega a los 140 años.
- Envejecimiento: Fase formada por un sólo estrato superior en estado de fustal, en la que los árboles alcanzan edades del orden de los 200 años.
- Desmoronamiento: La estructura sigue siendo un fustal, pero ahora con árboles sobremaduros. La muerte de estos árboles inicia la abertura del dosel superior, lo que permite el establecimiento de regeneración y el desarrollo de una nueva generación.

Las fases de envejecimiento y desmoronamiento de los bosques, representan del 50 al 66% del ciclo total, por lo que en superficie las condiciones de bosque sobremaduro son las más frecuentes.

Composición del sotobosque de lenga

De acuerdo con los antecedentes aportados por Bastías (2005) las especies características encontradas en los bosques de lenga por Boelcke *et al.* (1985) son: *Maytenus disticha*, *Acaena ovalifolia*, *Ribes magellanicum*, *Rubus geoides*, *Adenocaulon chilense*, *Codonorchis lessonii*, *Macrachaenium gracile*, *Viola reichei*, *Ranunculus peduncularis*, *Vicia magellanica*, *Osmorhiza chilensis*, *Calceolaria palenae*, *Galium fueguianum*, *Geum magellanicum*, *Cardamine glacialis*, *Poa scaberula*, *Chloraea magellanica*, *Gavilea lutea*, *Cystopteris fragilis*, entre otras.

Según Araya (1990) en los Parques Nacionales y Reservas Nacionales de la XI Región, cuando el estrato superior está formado por *Nothofagus pumilio*, el dosel medio se desarrolla en los claros y bordes del bosque y se compone de *Berberis darwinii*, *Maytenus disticha*, *Chiliodendron diffusum*, *Berberis serrato-dentata*, *Myoschilos oblongum*, *Ribes magellanica* y *Ribes cucullatum*. En el estrato inferior se encuentran especies herbáceas, siempre en sitios con mayor abertura de la cubierta. Algunas de las hierbas son: *Acaena ovalifolia*, *Viola reichei*, *Adenocaulon chilense*, *Osmorhiza chilensis*, *Galium* sp., *Macrachaenium gracile*, *Stellaria* sp., *Leucheria thermarum*, *Dactylis glomerata*, algunas especies de la familia Orchidaceae, *Chloraea magellanica*, *Codonorchis lessonii*, *Taraxacum officinale*, *Valeriana* sp. y *Ranunculus* sp.

Utilización y Manejo

En la XII región, la utilización de los bosques se inicia a mediados del siglo XIX con los primeros asentamientos chilenos. Los bosques de Lenga y Coihue de Magallanes fueron empleados para la obtención de leña, madera y como materia prima en los astilleros. Durante este período el uso maderero propiamente tal fue de baja intensidad. Surgen aserraderos rústicos de bajos rendimientos, con producciones que cubren las necesidades locales y algunas exportaciones hacia sectores argentinos carentes de madera (Garfias, 2006).

Posteriormente, la extracción de leña se va reduciendo significativamente, en tanto que la madera aserrada mantiene sus niveles de producción, mejorando el nivel tecnológico de los principales aserraderos. Hasta 1980, el uso maderero estuvo caracterizado por una explotación selectiva de los bosques, donde se extraían los árboles de mayor valor comercial (floreo).

Como consecuencia del floreo, quedan bosques remanente de densidad incompleta y con estructura más irregular (Schmidt y Urzúa, 1982). En esta condición se producen claros que favorecen la regeneración solo en ciertos lugares, lo que da lugar a la formación de pequeños bosquetes, transformando el bosque que era relativamente homogéneo y de estructura simple, en otro

que a futuro será más heterogéneo (Schmidt et al., 1996).

En esta forma de intervención los árboles que permanecen en pie son principalmente aquellos sin valor maderero, ya sea por su calidad, forma, tamaño o sanidad. En consecuencia, el potencial productivo, que por naturaleza es bajo en los bosques vírgenes, disminuye aún más en los bosques floreados, los que en el futuro serán de peor calidad que los bosques originales (Schmidt y Urzúa, 1982).

Reconociendo la situación anterior, y con el objetivo de reintegrar al manejo sustentable las superficies degradadas, es posible recuperar los bosques floreados mediante intervenciones silvícolas como las comprendidas en el método de cortas de protección. Esta permite convertir la estructura irregular de los bosques intervenidos en otra de monte alto regular (Concha, 2002, *cit. por* Garfias, 2006).

Coincidentemente, Troncoso (2004) afirma que la estructura más conveniente para el manejo de los bosques de lenga, con fines de producción, es la de monte alto regular; debido a la intolerancia de la especie, su tendencia natural a desarrollarse en rodales coetáneos, la mayor incidencia de pudrición natural que se presenta en las estructuras multietáneas y, por último, a la mayor facilidad con que se pueden realizar las intervenciones silvícolas y de extracción.

El sistema silvicultural más aplicado en los bosques de lenga, es el de cortas de protección con regeneración bajo dosel, lo que conduce a la creación de bosques con estructura de monte alto regular. Consiste en la explotación del rodal maduro en una serie de cortas parciales durante un período de rotación. La duración de la rotación corresponde aproximadamente a la mitad del ciclo de desarrollo natural, permitiendo restablecer el bosque antes de que se desmorone naturalmente, manteniendo siempre árboles vigorosos y sanos. El método abre el bosque a través de cosechas parciales para dar paso a la regeneración natural, que se instala bajo la protección del antiguo rodal, el cual es cosechado definitivamente cuando el repoblado está completo y capaz de soportar la exposición total.

El sistema de cortas de protección se ha impuesto porque permite incrementar los niveles de cosecha. En la primera corta de regeneración en el bosque natural, la extracción de trozas aserrables es un 20% mayor que en el floreo. A este volumen de trozas aserrables se agrega el volumen utilizable para leña o astillas (Troncoso, 2004).

En lo que se refiere a crecimiento, con estas intervenciones silvícolas es posible reducir a menos de la mitad el tiempo necesario para alcanzar las mismas dimensiones de los árboles que en el bosque natural.

IMPORTANCIA FORESTAL Y REGIONAL

El bosque de lenga, es uno de los recursos forestales nativos de mayor importancia en Chile. Esto se debe, en gran medida, a la existencia de una importante superficie en buen estado de conservación, cuya mayor concentración se encuentra en las regiones más australes del país; a la calidad de su madera, cuya aceptación le permite acceder con facilidad al mercado externo; y por otra parte, a la relativa facilidad con que se le pueden aplicar tratamientos silviculturales para promover su aprovechamiento racional.

Respecto a la situación general de existencia de bosques en Chile, INFOR (2005) establece que el país cuenta con una superficie total de 15,5 millones de hectáreas. De ellas 2,1 corresponden a bosques plantados y 13,4 a bosques naturales. Dentro de estos últimos, el segundo tipo forestal más abundante es el de lenga con 3,4 millones de hectáreas, que representan más del 25% de la existencia total de bosques nativos. De estas 3,4 millones de hectáreas del tipo forestal lenga, 1,8 millones corresponden al subtipo lenga puro que se concentra principalmente entre la XI y XII regiones.

La mayor proporción de los bosques de lenga está constituida por árboles con pudrición, mala forma o bajo diámetro que, parcialmente, son utilizables para la producción de leña o astillas, mientras que sólo un escaso 10 a 20% del volumen total es de calidad maderable (Schmidt y Urzúa, 1982). Aún así, la gran abundancia de estos bosques y su positiva respuesta a intervenciones silvícolas, lo constituyen de todas formas en un importante recurso maderero de las regiones australes.

Efectivamente, la madera de lenga se caracteriza por ser fácilmente trabajable, de buena calidad, compacta, elástica y moderadamente pesada. En las regiones australes del país se utiliza en todas clases de construcciones, muebles, toneles, etc., siendo sin duda la principal especie forestal de esas latitudes (Garfías, 2006). De acuerdo con Neira (2004) el destino tradicional más importante de la madera de lenga ha sido para la industria del aserrío. Además, se utiliza la astilla para la producción de pulpa y tableros y existen otros productos de menor grado de industrialización, como los tacos y rajones para leña y los postes (Uriarte y Grosse, 1991).

En las estadísticas de producción de madera aserrada a partir de especies nativas, lenga exhibe una participación muy relevante, representando más del 40% del total producido, y siendo la materia prima que sustenta a una importante industria maderera de las regiones australes (**cuadro 1**). De igual forma, las exportaciones de productos forestales confeccionados con maderas nativas también muestran la importante participación de lenga en este rubro, donde su participación es lejos la mayor de todas las especies nativas exportadas (**figura 1**).

CUADRO 1
PRODUCCION DE MADERA ASERRADA DE ESPECIES NATIVAS
(AÑO 2004)

Especie	Volumen producido	
	(m ³)	(%)
Maño	3.682	2,17
Ulmo	5.932	3,49
Canelo	6.778	3,99
Raulí	14.300	8,42
Tepa	16.017	9,43
Coigüe	20.834	12,26
Roble	32.066	18,87
Lenga	70.282	41,37
Total	169.891	100,00

(Fuente: Tirado, 2006)

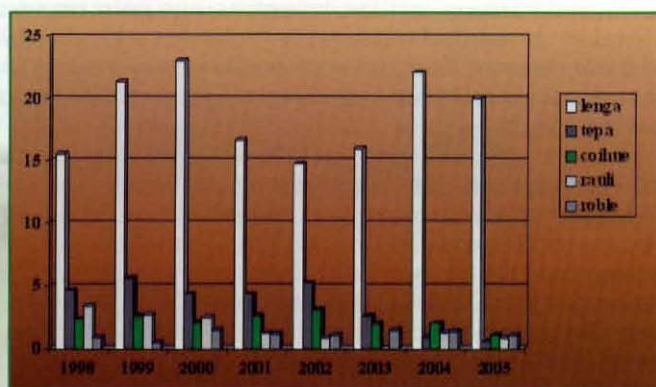


Figura 1: Exportaciones especies nativas. Ventas FOB en millones de dólares. (Fuente: Tirado, 2006)

La lenga tiene una alta demanda en nichos específicos de mercado en Europa, producto de sus excelentes características técnicas para ser trabajada, siendo utilizada mayoritariamente para la fabricación de muebles finos, puertas de casa, decorado de carpintería y pisos. Su principal competencia son las maderas finas de frondosas de Estados Unidos y Canadá (Diario Pyme, 2006).

MEJORAMIENTO GENÉTICO EN LENGA

Para obtener las mejores ganancias posibles mediante el mejoramiento genético forestal, es necesario entender la naturaleza de las poblaciones silvestres y como aprovechar su variabilidad. En este sentido, la ciencia reconoce desde hace algún tiempo que la variabilidad entre y dentro de las poblaciones de árboles forestales, como en cualquier organismo, ha surgido en forma natural por efectos de la evolución y especiación durante el transcurso de miles de años. Sin embargo, identificando las fuentes de variación y utilizando intensidades de selección y sistemas de mejoramiento adecuados, se pueden producir relativamente rápido los cambios deseados en las frecuencias de individuos dentro de una población.

Recién a partir del año 1998 se inicia un programa de mejoramiento genético formal, el cual se desarrolla bajo el financiamiento de FONDEF, a través del proyecto *"Establecimiento y Mejoramiento Genético de Lenga en las Regiones Australes XI y XII"* (FONDEF D97I2003).

Este programa realiza un zonificación preliminar de grandes áreas de procedencias en las regiones XI y XII, situación que constituye una primera aproximación a la caracterización de la variabilidad genética de lenga, pero que carece del nivel de detalle que se desea para establecer una política más efectiva de conservación. Por otra parte no considera la extensa distribución de lenga al norte de la XI región.

También permitió establecer un área productora de semillas y seleccionar árboles (plus), los cuales después de ser injertados, fueron representados en un huerto semillero clonal.

Este proyecto (FONDEF D97I2003) corresponde a la primera iniciativa formal para desarrollar un programa de mejoramiento genético en lenga. Propone una estrategia que utiliza la aptitud combinatoria general en un esquema de propagación sexual (por semillas) y que por lo mismo es especialmente apropiado para complementarlo con enfoques clonales, como el propuesto en este nuevo proyecto, *"Masificación de genotipos de interés comercial de lenga en la XI región"*, para duplicar las ganancias y masificar el material selecto identificado durante su ejecución.

El beneficio potencial del uso de plantaciones clonales en programas de reforestación ha sido largamente reconocido. Se ha determinado que al menos un 10% de ganancia genética puede esperarse en plantaciones clonales seleccionadas que respecto a plantaciones con semillas de familias seleccionadas. La ganancia genética en un programa de mejora es mayor cuando se aplican la reproducción sexual y asexual. La producción sexual permite la recombinación genética, y se logran ganancias en características controladas por genes aditivos. La propagación asexual o vegetativa por

otra parte, permite la multiplicación de familias, individuos de una familia que exhiben una ganancia significativa debido a los efectos de genes no aditivos (Thorpe *et al.*, 1991).

La propagación vegetativa, aplicada a través de la macro y micropropagación, es considerada una componente esencial en muchos programas de mejora genética de empresas forestales en diversos países y ha sido utilizada con el propósito de optimizar la captura y operativización de las ganancias genéticas (aditivas y no aditivas) desde los programas de mejoramiento genético a las plantaciones y por sobretodo, agregar valor a la madera (Menziez, 1992, MacRae y Cotteril, 1997). Esta técnica, se emplea extensivamente para generar propágulos de semillas o secciones de tejidos vegetales y de este modo, hacer un mejor uso de las semillas valiosas obtenidas en los programas de mejora genética, las que generalmente se producen en cantidad reducida. Los métodos de propagación vegetativa más utilizados para la producción de plantas de especies forestales para macropropagación son las estacas enraizadas, fascículos o braquiblastos (pino) y en micropropagación corresponde a la organogénesis y embriogénesis somática.

Para el caso particular de lenga, los procedimientos que permiten multiplicarla mediante técnicas de cultivo *in vitro* han sido depurados en el transcurso de este proyecto y sus detalles se especifican en el capítulo V de este mismo documento.



BIBLIOGRAFÍA

- Araya, P. 1990. La vegetación de los Parques Nacionales y de las Reservas Nacionales de Aysén y Magallanes. CONAF. Documento de Trabajo N° 134. 155 p.
- Bastías, M. 2005. Composición de especies y cobertura del sotobosque en bosques vírgenes de Lengua (*Nothofagus Pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser) en Monte Alto, XII Región. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 83 p.
- Boelcke, O; Moore, D. y Roig, F. 1985. Transecta botánica de la Patagonia Austral. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Argentina). Instituto de la Patagonia (Chile). Royal Society (Gran Bretaña). Buenos Aires, Argentina. 733 p.
- Concha, R. 2002. Recuperación silvícola de un bosque floreado de Lengua (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Krasser)) en la Provincia de Tierra de fuego, XII Región. Memoria Ing. Forestal. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales. Santiago. 47 p.
- Diario Pyme. 2006. Se consolida exportación de madera de lenga aysenina. <http://www.diariopyme.cl/newtenberg/1878/article-75288.html>. Consulta: 12.12.2006.
- Dollenz, O. 1995. Los Árboles y Bosques de Magallanes. Editorial de la Universidad de Magallanes. Punta Arenas, Chile. 123p.
- Donoso, C. 1981. Tipos Forestales de los Bosques Nativos de Chile. Documento de Trabajo N° 83. Investigación y Desarrollo Forestal (CONAF, PNUD-FAO). Publicación FAO Chile. 78 p.
- Donoso, C. 1978. Dendrología. Árboles y arbustos chilenos. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Manual N° 2. 142 p.
- Donoso, C. y Cabello, A. 1978. Antecedentes fenológicos y de germinación de especies leñosas chilenas. Ciencias Forestales. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile 1 (2): 31-41.
- Emhart, V.; Gutiérrez, B. y Olave, R. 1999. Ciclo reproductivo de lenga: A dilucidar incógnitas. Chile Forestal N° 274. Pp: 52-55.
- Garfias, C. 2006. Desarrollo de un bosque floreado de Lengua y Coihue de Magallanes en la provincia de Última Esperanza, XII región. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 47 p.
- Guerra, G. y Correa, J. 1973. Tolerancia de las principales especies nativas chilenas. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Boletín Técnico N° 27. 50 p.
- INFOR. 2005. El sector forestal chileno en un mirada. Instituto Forestal. Concepción, Chile. 64 p.
- Labarthe, F. 2005. Efecto de la tasa de crecimiento en las propiedades mecánicas de lenga en un renoval en Tierra del Fuego. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 84 p.

Larson, J. 2000. Crecimiento de la Lengua *Nothofagus pumilio* (Poepp et Endl.) Krasser en un bosque secundario de la XII Región. Memoria de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. 56 p.

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

Manosalva, L., 1995. Antecedentes Dendrométricos Básicos de un Rodal de Lengua (*Nothofagus pumilio* (Poepp et Endl. Krasser), en el Sector Cerro la Virgen, XI Región. Memoria de Ingeniería Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Austral de Chile. 69 p.

Mascareño, A. 1988. Evaluación de ensayos de semillación y regeneración de lenga bajo diferentes tratamientos a la cama de semillas en la Reserva Forestal Trapananda, Coyhaique, XI Región. Tesis Facultad de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 95 p.

Menzies, M. 1992. Management of stock plants for the production of cutting material. Mass Production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Actes Proceeding of IUFRO Symposium, Bordeaux. France. Pp: 257-270

Muñoz, M. 1980. Flora del Parque Nacional Puyehue. Ed. Universitaria. Santiago. 557 p.

Muñoz, M. 1993. Algunos antecedentes sobre propagación de *Nothofagus*. Ciencia e Investigación Forestal 7(2): 377-389.

Neira, J. 2004. Desarrollo de un bosque de Lengua (*Nothofagus Pumilio*) después de la corta de regeneración y rendimiento de trozas en la corta final, en la XII región. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 39 p.

Pesutic, S. 1978. Análisis de estructura y estado sanitario en un bosque de Lengua. Tesis Ing. Forestal. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Santiago. 63 p.

Premoli, A. 2004. Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Ende.) Krasser (Lengua). En: Donoso, C.; Premoli, A.; Gallo, L. e Ipinza, R. (editores). Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. 1ra edición. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. Pp: 145-171.

Rodríguez, R.; Matthei, S. y Quezada, M. 1983. Flora arbórea de Chile. Editorial de la Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 355 p.

Rusch, V. 1993. Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. Revista Chilena de Historia Natural 66: 131-141.

Schmidt, H. y Urzúa, A. 1982. Transformación y manejo de los bosques de Lengua en Magallanes. Ciencias Agrícolas N° 11. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Santiago. 62 p.

Schmidt, H.; Caldente, J.; Donoso, S. y Peña, K. 1996. Informe. Seguimiento forestal y ambiental del uso de los bosques de Lengua - XII Región. Universidad de Chile/ CONAF. Punta Arenas. Chile. 37 p.

Schmidt, H.; Caldente, J. y Peña, K. 1997. Seguimiento Ambiental del Uso de los Bosques de Lengua. XII región. Informe Anual.

Schmidt, H.; Cruz, G.; Bown, H. y Promis, A. 2001 Cuarto Curso de Especialización de Silvicultura Ordenación Bosques de Lengua. Apuntes de Silvicultura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. Monte Alto 2-9 Nov. 2001. Proyecto Fondef D991103. 24 p.

Schmidt, H., Promis, A. y Caprile, R. 2004. Evaluación del desarrollo de los bosques de Lengua después de la corta de regeneración en Magallanes. Proyecto FONDEF D 99 1 1035. Desarrollo de sistemas silvícolas y de ordenación para optimizar la producción de los bosques de Lengua en la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena. (Borrador) 93 p.

Sievert, H., 1995. Estudio de Crecimiento para un Bosque Multietáneo de Lengua (*Nothofagus pumilio*) en Aysén, XI Región. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 60 p.

Silva, C. 2005. Evolución de las existencias y desarrollo de la regeneración en bosques de Lengua (*Nothofagus pumilio*) después de la corta de regeneración. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 35 p.

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

Tirado, R. 2006. El mercado internacional de lenga. Presentación en seminario "Genética y gestión forestal: herramientas para mejorar el negocio de la lenga en las regiones australes". Coyhaique, 24 de agosto de 2006.

Troncoso, O. 2004. Desarrollo de un bosque de Lengua (*Nothofagus Pumilio*) después de la corta de protección en la XII región. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 55 p.

Uriarte, A. y Grosse, H. 1991. Los bosques de Lengua. Una orientación para su uso y manejo. Recopilación bibliográfica. Informe Técnico N° 126. Instituto Forestal. 92 p.

Veblen, T., Kitzberger, T., Burns, B. y Rebertus, A. 1997. Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del sur de Chile y Argentina. En: Armesto, J.; Villagrán, C. y Arroyo, M. (Editores). Monografías: Ecología de los bosques nativos de Chile. Vicerrectoría Académica Universidad de Chile. Ed. Universitaria. Santiago. Chile. 169-198.

Veblen, T. y Schlegel, F. 1982. Reseña ecológica de los bosques del sur de Chile. Bosque 4 (2): 73 - 116.



III

CULTIVO *in vitro* DE ESPECIES FORESTALES

Oriana Ortiz N.
Braulio Gutiérrez C.

INTRODUCCIÓN

La propagación vegetativa es la generación de nuevos individuos a partir de células, tejidos u órganos, sin mediar el proceso fecundación que implica la fusión de los gametos o células sexuales. Esta forma de multiplicación se basa en el concepto de totipotencialidad de las células, se presenta en forma natural en algunos organismos inferiores y plantas, y ha sido utilizada por el hombre desde la antigüedad como una forma de producción de plantas, constituyendo en algunos casos la forma tradicional de multiplicar a algunas especies arbóreas (Gutiérrez *et al.*, 2005).

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

En la actualidad, la propagación vegetativa, aplicada a través de la macropropagación y micropropagación, es considerada un componente esencial en muchos programas de mejora genética de empresas forestales en diversos países y ha sido utilizada con el propósito de optimizar la captura y el envío de las ganancias genéticas (aditivas y no aditivas) desde los programas de mejoramiento genético a las plantaciones y, por sobretodo, agregar valor a la madera. Esta tendencia se ve fuertemente potenciada por los modernos avances de la biotecnología. Así, las tecnologías de micropropagación o cultivo *in vitro*, cada vez más difundidas, ofrecen la posibilidad de multiplicar enormemente el número de copias de un determinado clon y facilitan la adopción de esquemas clonales para el establecimiento de las plantaciones de producción.

Considerando la importancia que ha adquirido el cultivo *in vitro* como una forma de multiplicar material genético selecto, en este capítulo se resumen algunos antecedentes generales de su aplicación en la propagación de especies forestales. Al respecto, los contenidos que se entregan no pretenden, ni siquiera remotamente, abarcar toda la información ni experiencias existentes,

las cuales por su magnitud darían lugar a una publicación específica de gran envergadura, aspecto que escapa al interés de divulgación de este documento.

ANTECEDENTES GENERALES

La micropropagación es una técnica de multiplicación vegetativa, realizada *in vitro* bajo condiciones de asepsia en un laboratorio. Sus principales beneficios se encuentran en el campo del mejoramiento genético donde la alta tasa de multiplicación que es posible obtener en un corto período, ofrece una importante ventaja para masificar material mejorado.

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

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

Por lo mismo y reconociendo la veracidad del último enunciado del párrafo anterior, el uso y prescripción de un determinado clon para fines operacionales solo puede efectuarse después de haber confirmado su desempeño en ensayos clonales rigurosamente establecidos y evaluados. Sólo de esta forma se podrán implementar esquemas de silvicultura clonal que minimicen los riesgos de pérdidas y permitan obtener con certeza los resultados esperados.

MICROPROPAGACIÓN EN ESPECIES FORESTALES

La micropropagación es una técnica de propagación vegetativa *in vitro* que ha sido exitosamente utilizada en innumerables especies vegetales. En especies forestales, existen del orden de 70 angiospermas y 30 gimnospermas

propagadas exitosamente por medio de cultivo de tejidos (Sabja, 1998).

No obstante, no todas las especies forestales pueden multiplicarse por esta vía, y tampoco existen procedimientos únicos que resulten exitosos en todas las plantas. La definición de un procedimiento de multiplicación para una especie en particular, e incluso para individuos de esa especie, demanda necesariamente una serie de pruebas, ajustes y depuraciones del proceso antes de identificar el protocolo definitivo para su multiplicación operacional (Gutiérrez *et al.*, 2005). Por otra parte, Sabja (1998) agrega que existe un control genotípico de la organogénesis y que también la maduración restringe la diferenciación *in vitro*.

Efectivamente, el material proveniente de árboles adultos suele ser difícil de micropropagar, situación que ha motivado el uso de distintos tipos de propágulos en estado juvenil para lograr este objetivo. Entre ellos, el uso de cotiledones, embriones, brotes apicales y secciones nodales ha sido difundido en la propagación de especies forestales (Nairn, 1993).

De acuerdo con Sabja (*op. cit.*), las técnicas de micropropagación usadas en especies forestales corresponden a la organogénesis, mediante brotes axilares o adventicios, y a la embriogénesis somática. Ambas se deben realizar bajo condiciones de laboratorio en un ambiente y medio de cultivo aséptico.

Organogénesis somática

El proceso de organogénesis consiste en la diferenciación monopolar de un órgano (brotes o raíces) para formar sus estructuras complementarias (raíces o brotes adventicios) y generar así una planta completa. Su implementación involucra el establecimiento de un explante o porción de tejido vegetal en un medio de cultivo suplementado con hormonas vegetales, vitaminas y sales minerales, en el cual se induce la formación de órganos adventicios bajo condiciones de ambiente controlado en cámaras de cultivo de laboratorio.

Ante esta técnica, la respuesta organogénica de las plantas forestales suele tener una marcada dependencia clonal, existiendo individuos que responden fácilmente a este procedimiento, mientras que otros son claramente recalcitrantes. En el caso de *Pinus radiata* la organogénesis es exitosa en un 60% de los genotipos, mientras que en lenga el efecto clonal ha demostrado ser aún mucho más acentuado.

El método más difundido de organogénesis aplicado a la producción comercial de plantas forestales, incluidas *Pinus radiata* y *Eucalyptus spp.*, utiliza brotes axilares de propágulos juveniles, vale decir brotes desarrollados a partir de yemas pre-existentes. También ha sido utilizado, aunque con menor éxito, en material adulto, lográndose en algunos casos un cierto grado de rejuvenecimiento en especies como *Sequoia*, *Quercus* y *Eucalyptus*. Como desventaja, esta forma de organogénesis exhibe tasas de multiplicación

relativamente bajas, que fluctúan entre 5 a 10 propágulos por subcultivo en las operaciones comerciales (MacRae y Cotterill, 1997, cit. por Sabja, 1998).

Una segunda forma de organogénesis es aquella que hace uso de brotes adventicios, es decir de aquellos que se diferencian a partir de un tejido de callo o meristema y no de una yema preformada. En aquellas especies con buenas respuestas de multiplicación, la producción de brotes es mayor que utilizando la vía de inducción de brotes axilares. En pino radiata por ejemplo, se ha estimado que a partir de un embrión, los mejores clones pueden producir 260.000 plantas listas para plantación en 2,5 años (Aitken-Christie *et al.*, 1994, cit por Sabja, 1998).

En ambos casos, usando brotes axilares y adventicios, las plantas micropropagadas de angiospermas se comportan satisfactoriamente en plantaciones. En coníferas, el comportamiento también es adecuado, pero existen especies como pino oregón que han exhibido tempranamente características de madurez morfológica (Haines, 1994).

Embriogénesis somática

La embriogénesis consiste en inducir la desdiferenciación, o reversión de células somáticas a un estado indiferenciado y su posterior diferenciación en células embriogénicas. Es decir, células con potencial de desarrollo determinado o restringido a la ruta embriogénica. En general, la inducción requiere la aplicación de dosis elevadas de auxina, y la presencia de una fuente de nitrógeno reducido (amonio). Los embriones pueden formarse directamente sobre el explanto o, lo que es más frecuente, indirectamente a partir de un callo característico que se disgrega fácilmente en pequeños fragmentos subcultivables. En su desarrollo posterior, los embriones pasan por los estados globular, torpedo y cotiledonar, típico de la embriogénesis zigótica, para finalmente alcanzar la madurez y germinar.

Este sistema resulta de utilidad para producir semillas artificiales y se considera como el más avanzado método de propagación. No obstante, a pesar de los avances evidenciados en los últimos años, los cultivos embriogénicos aún son difíciles de establecer y mantener, razón por la cual aún debe dedicarse esfuerzos y recursos al desarrollo de procedimientos que permitan desarrollarla a gran escala y adaptarla a los requerimientos específicos de distintas especies de interés (Teasdale, 1995).

La técnica de la embriogénesis somática se perfila como un mecanismo para asegurar la propagación de genotipos selectos en programas de mejoramiento genético forestal. Sus grandes potencialidades son el uso de semillas artificiales, la crioconservación de germoplasma y la regeneración de plantas transformadas genéticamente.

Uno de los aspectos característicos de la embriogénesis, al menos en algunas

especies, es que la competencia embriogénica (aptitud) está controlada genéticamente. En pino radiata aparentemente menos del 5% de los genotipos (incluso quizás menos del 1%) son embriogénicamente compatibles. Aún así, el potencial de la técnica es tan alto que se han invertido importantes esfuerzos para operativizar su aplicación en esta especie.

El cultivo de células y tejidos de eucalipto se constituye en una opción apropiada para la propagación de genotipos selectos y también en una herramienta muy importante para la regeneración de plantas transgénicas.

La embriogénesis somática, especialmente en las suspensiones de células, puede posibilitar la producción de un gran número de plantas. Tales embriones pueden usarse directamente para la multiplicación a gran escala, y también encapsularse para formar las llamadas semillas artificiales, las cuales pueden ser almacenadas hasta el momento de su uso.

En especies forestales los principales avances se registran en pino radiata y especies del género *Picea* (*P. sitchensis*, *P. abies*). Aún así existen numerosas otras especies en las que la técnica ha sido ensayada con distintos grados de éxito.

En el caso de gimnospermas se ha inducido la formación de callo embriogénico en *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Pinus taeda*, *Pinus serotina* y *Pinus strobus*, *Pinus radiata*, *Pinus lambertiana*, *Larix decidua*, *Picea rubens*, *Araucaria angustifolia*.

En angiospermas se ha inducido embriogénesis somática en especies de los géneros *Camellia*, *Thea*, *Vitis*, *Prunus*, *Actinidia*; *Castanea*, *Albizia*, *Fraxinus*, *Juglans*, *Eucalyptus*, *Liquidambar*, *Liriodendron*, *Populus*, *Quercus*, *Corylus*, entre otras.

En eucalipto existen relativamente pocos informes respecto a embriogénesis somática, siendo aún más escasos los que señalan una frecuencia alta de regeneración de plantas.

MICROPROPAGACIÓN DE NOTHOFAGUS

Existen diversos estudios de micropropagación en especies de *Nothofagus*, los cuales se resumen a continuación a partir de los antecedentes recopilados en la formulación de los proyectos "Silvicultura clonal en raulí para aumentar la productividad de sitios forestales de la IX y X regiones" y "Masificación de genotipos de interés comercial de lenga en la XI región", así como de fuentes de información complementarias.

De acuerdo con Castellanos *et al.* (2005), la micropropagación por vía organogénica ha sido aplicada a especies de *Nothofagus* con diferentes

resultados. Ensayos realizados especialmente con material juvenil de roble (Martínez-Pastur y Arena, 1995; Muñoz, 1999), raulí (Martínez-Pastur y Arena, 1996; Sánchez-Olate *et al.*, 2004), ñirre (Martínez-Pastur *et al.*, 1997) y lenga (Martínez-Pastur y Arena, 1997) dan cuenta de la posibilidad de regenerar *in vitro* crecimiento adventicio de nuevos brotes y raíces, aunque las tasas de proliferación caulinar y niveles de enraizamiento varían considerablemente entre especies e incluso entre procedencias. No obstante, en estudios realizados con raulí, Sánchez-Olate *et al.*, (2004) lograron establecer los protocolos de micropropagación de esta especie, logrando la multiplicación y producción de microtallos viables para la fase de enraizamiento *in vitro*. También se desarrollaron los protocolos para la micropropagación de raulí en el marco del proyecto FDI "Silvicultura Clonal en Raulí para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales de la IX y X Regiones del país", ejecutado por el Instituto Forestal y la Universidad Austral de Chile. En este caso, se trabajó con árboles plus de raulí, generando copias vegetativas para el establecimiento de ensayos clonales (Sabja *et al.*, 2005).

En general la organogénesis de *Nothofagus* ha hecho uso de medios nutritivos con bajas concentraciones salinas como es el Broadleaved Tree Medium (BTM), Woody Plant Medium (WPM), y Murashige y Skoog (MS), que han sido modificados en las concentraciones de los macronutrientes, adición de aminoácidos, sustancias hormonales y vitaminas (Jordán *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arenas, 1995; Martínez *et al.*, 1995).

Para la proliferación y elongación de explantes de yemas de diferentes especies de *Nothofagus* se han utilizado las citocininas BAP y 2 ip combinadas o complementadas con las auxinas NAA o IBA y la giberelina AG3; por su parte, en explantes provenientes de embriones, el uso BAP en combinación con kinetina y AG3 también ha demostrado ser efectivo (Seemann y Zurita, 1995; Jordán y Velozo, 1992; Jordán *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1995).

El estadio óptimo de los brotes y yemas a propagar corresponde, de acuerdo a Martínez y Arenas (1995), a brotes en sus primeros estadios de brotación y colectados durante otoño y primavera; en el caso de explantes obtenidos desde semillas, estos se colectan después de 2-3 semanas de iniciada la germinación. También se ha inducido en forma exitosa material proveniente de renovales de 10 a 15 años y de árboles adultos de 200 años, de *Nothofagus pumilio* (Martínez y Arena, 1996), aunque estos resultados no han podido replicarse en otros laboratorios que han usado el mismo procedimiento sobre árboles adultos de la misma especie.

En *N. alpina* se ha observado que el número de brotes que se obtiene en cultivo *in vitro* tiene directa relación con el tipo de explante empleado, siendo los más adecuados las yemas apicales y los explantes provenientes de semilla (Hermosilla 1998). Por su parte, Sabja *et al.* (2005) obtienen exitosos resultados en esta especie utilizando yemas desprovistas de las brácteas protectoras para iniciar los cultivos.

La etapa de enraizamiento en especies de *Nothofagus*, se ha realizado con éxito utilizando brotes de alrededor de 2 a 3cm de largo, en tratamientos de oscuridad y distintos tipos y concentraciones de auxinas y medios de cultivos gelificados con agar (Martínez y Arena, 1996, Jordán *et al.*, 1996). El mismo procedimiento resultó igualmente exitoso en el enraizamiento de *N. alpina* (Sabja *et al.*, 2005)

Las plantas micropropagadas de *Nothofagus*, al igual que la de la mayoría de las especies, requieren de un periodo de aclimatación y endurecimiento para acondicionarlas a las condiciones de vida *ex vitro*. Para estos efectos, se ha utilizado el enriquecimiento de la atmósfera de cultivo con CO₂ durante el proceso de enraizamiento y aclimatación *in vitro*, actividad que ha permitido obtener plantas autotróficas y con un buen desarrollo cuticular y estomático (Kosai 1991). Otra alternativa que ha demostrado ser efectiva es la aclimatación gradual de las plantas en un invernadero (Martínez y Arenas, 1996). Al respecto, para evitar las condiciones de estrés que experimentan las plantas micropropagadas al transferirlas a invernadero Sabja *et al.* (2005) desarrollaron para *N. alpina* un sistema de aclimatación progresivo en laboratorio e invernadero.

Tal sistema de aclimatación consiste de una etapa de laboratorio, donde las plantas se mantienen en contenedor con un sustrato compuesto de turba y perlita al que se adiciona el medio de cultivo BTM, reducido a la mitad y sin sacarosa. Las plantas se mantienen en esta condición durante 2 a 3 semanas para posteriormente trasladarlas a invernadero, donde son repicadas a contenedores con el mismo sustrato, pero sin medio de cultivo y enriquecido con fertilizantes de liberación controlada. Las plantas se mantienen inicialmente con una alta humedad relativa, la que se reduce gradualmente en un periodo de tres semanas. Este sistema permite mantener una alta sobrevivencia de las plantas micropropagadas (cercano al 95%) y mantener su crecimiento sin interrupción desde la condición *in vitro* hasta su total aclimatación.

Además de los trabajos efectuados en organogénesis de *Nothofagus*, Castellanos *et al.* (2005) sintetizan otras experiencias relacionadas con embriogénesis somática de *Fagaceae*. Al respecto señalan que en *Quercus* y *Castanea* se ha logrado inducir embriogénesis somática y caracterizar masas callogénicas de tipo proembriogénico, que dan lugar a la formación de diferentes estados de desarrollo de embriones vegetativos, desde estados globulares a embrioides plenamente diferenciados, los cuales, luego de completar el proceso de maduración y en ocasiones, tratamientos pregerminativos como la deshidratación o almacenamiento en frío, logran germinar e incluso ser transferidos a condiciones *in vivo* en donde crecen satisfactoriamente.

Los autores (*op. cit*) afirman que las técnicas de cultivo *in vitro* mediante la embriogénesis somática proporcionan una valiosa herramienta para la

multiplicación de las especies de *Nothofagus*, confirmando esta aseveración con estudios experimentales en los cuales logran obtener embriones somáticos de *N. alpina* a partir de cotiledones aislados del eje embrionario, y desde ellos generar plantas que crecen *in vitro* sin inconvenientes. Agregan que la generación de embriones resulta abundante, y que de no mediar tratamientos de maduración, estos continúan proliferando por embriogénesis secundaria, permitiendo así la regeneración en masa de líneas embriogénicas.

CONCLUSIONES

Las ventajas evidenciadas por el cultivo *in vitro* como herramienta de multiplicación de material vegetal selecto y escaso la convierten en un método de gran valor para complementar los avances de un programa de mejoramiento genético forestal.

El avance experimentado por esta tecnología ha generado suficientes antecedentes para orientar el desarrollo de protocolos específico para la multiplicación de las especies forestales que se consideren de interés.

La implementación de un programa de cultivo *in vitro* para especies forestales demanda infraestructura y personal especializado, tanto para desarrollar o depurar los procedimientos como para aplicarlos masivamente.

La respuesta organogénica de las plantas es muy variada y normalmente sujeta a un fuerte control genotípico, por lo mismo se deben iniciar muchos cultivos para finalmente multiplicar masivamente sólo a algunos de los individuos considerados.

La embriogénesis somática tiene un desarrollo menor que la organogénesis, pero el potencial que presenta, especialmente en cuanto a su tasa de multiplicación y posibilidad de generar semilla sintética, hace de ella una herramienta de gran interés, que justifica mayor investigación y aplicación a un número mayor de especies forestales.

En resumen, la micropropagación ha demostrado ser una herramienta técnica de indudable valor, situación que permite presumir una utilización creciente en futuros programas de producción de plantas.

BIBLIOGRAFÍA

Aitken-Cristie J.; Maddocks, D.; Sigley, M.; Odre, V; Burger, F. y Carter, P. 1994. Embryogenesis of Radiata Pine. International Wood Biotechnology Symposium. August 31-September 1, 1994. Hokutopia, Tokio, Japan. Pp: 91 - 98.

Castellanos, H.; Sánchez-Olate, M. y Rios, D. 2005. La embriogénesis somática como alternativa para la regeneración *in vitro* de raulí y roble. En: Gutiérrez, B.; Ortiz, O. y Molina, M. (editores). Clonación de raulí: Estado actual y perspectivas. CEFOR-INFOR-UACH. Concepción, Chile. Pp: 59-74.

Gutiérrez, B.; Ortiz, O.; Molina, M.; Chung, P.; Koch, L.; González, M.; Casanova, K. y Soto, H. 2005. Protocolo de clonación para *Eucalyptus camaldulensis*: Macro y micropropagación. Documento de divulgación del proyecto FIA BID-PI-C-2001-Í-F-050: "Masificación clonal de genotipos forestales de interés comercial para la zona árida y semiárida del país". Instituto Forestal. Concepción, Chile. 61 p.

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

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

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

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

Kosai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. En: Debergh, P. y Zimmerman, R. (editors). Micropropagation: Technology and application. Kluwer Academic Publishers. Pp 447-470.

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

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

Martínez-Pastur, G.; Arena, M. y Caso, O. 1995. *In vitro* propagation of *Nothofagus obliqua* (Fagaceae). Australian Journal Botanic N° 43: 601-607.

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

Martínez-Pastur, G.; Arena, M. y Caso, O. 1996. *In Vitro* propagation of *Nothofagus antartica* a partir de yemas de renovales y esferoblastos de árboles adultos. Jornadas

Forestales. Mendoza. Argentina. 2 p.

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

Muñoz, C. 1999. Alternativas biotecnológicas para la propagación de fagáceas chilenas. El caso del Roble. Memoria de Título. Universidad de Concepción. Facultad Ciencias Forestales. Concepción. Chile.

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

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

Sabja, A.M.; Ortiz, O. y Triviño, C. 2005. Micropropagación de árboles plus de raulí. En: Gutiérrez, B.; Ortiz, O. y Molina, M. (editores). Clonación de raulí: Estado actual y perspectivas. CEFOR-INFOR-UACH. Concepción, Chile. Pp: 41-58.

Sánchez-Olate, M.; Ríos, D.; Pedraza, M.; Pereira, G.; Castellanos, H. y Escobar, R. 2004. Propagación *in vitro* de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a partir de embriones aislados. Bosque 25(1):123-128.

Seeman, P. y Zurita, A. 1995. Advances in Micropropagation of *Nothofagus alessandrii* Espinosa, a chilean endangered species. Combined Proceedings International plant Propagators Society. 45:367-370

Teasdale, R. 1995. Optimising the application of Biotechnology to forest plantations. En: Eucalypt Plantations: Improving Fibre Yield and Quality. CRC THF-IUFRO Conference. Hobart, Australia. 19-24 February, 1995. Pp: 427-429.

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

IV

SELECCIÓN DE MATERIAL A PROPAGAR

Braulio Gutiérrez C.

INTRODUCCIÓN

La implementación de un programa de micropropagación de árboles forestales es particularmente valiosa en la medida que la calidad de los árboles a multiplicar justifique este esfuerzo. Esta situación motiva la realización de una adecuada y rigurosa selección de los individuos que serán propagados, para conciliar así una apropiada combinación de características deseables, con una respuesta organogénica efectiva. Sólo de esta manera, el esfuerzo de desarrollar protocolos de micropropagación se puede transformar en una herramienta que contribuye efectivamente a mejorar la productividad del recurso.

Aún cuando existen protocolos publicados para micropropagar árboles adultos de lenga (Martínez-Pastur y Arena, 1995; 1997), las dificultades y en la práctica la imposibilidad de adaptar y aplicar estos procedimientos en forma efectiva, motivó que en el marco del proyecto "Masificación de genotipos de interés comercial de lenga en la XI región" se hiciera uso de árboles en estado juvenil par desarrollar la metodología de cultivo *in vitro*.

En este escenario, la selección de los árboles a considerar debe basarse en criterios técnicos y objetivos que garanticen que los individuos escogidos poseen características deseables que justifiquen su micropropagación. Por lo mismo, la selección de los individuos a considerar se efectuó mediante la evaluación genética de una prueba de progenies de lenga, construyéndose un índice de selección que permitió identificar a los mejores árboles del ensayo. Posteriormente, se implementó una campaña de colecta de brotes desde los árboles selectos, se obtuvieron los propágulos, se embalaron y despacharon al laboratorio de micropropagación en Concepción para iniciar su cultivo *in vitro*.

Consecuentemente, en este capítulo se detallan los resultados correspondientes a la selección de los individuos juveniles, el origen genético de los mismos, la fuente de selección y el mecanismo empleado para efectuarla. Posteriormente los detalles de su proceso de micropropagación se especifican en el capítulo V de este documento.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El objetivo de las actividades de selección es identificar a árboles de características superiores que ameriten ser micropropagados, de modo que a partir de ellos se obtengan segmentos de ramas con yemas cerradas, las cuales una vez enviadas a laboratorio se les induzca la brotación para disponer de material vegetal idóneo para iniciar y establecer su cultivo *in vitro*.

Las ventajas de usar propágulos de árboles jóvenes radican en que al ser menos diferenciados manifiestan mayor totipotencia, son más reactivos a organogénesis adventicia y poseen menores contenidos de fenoles, cuya oxidación en material adulto es una de las principales dificultades enfrentadas en la propagación *in vitro*.

Los individuos específicos a utilizar para establecer los protocolos de micropropagación corresponden a las progenies (hijos), obtenidos a partir de la semilla de árboles plus adultos de lengua, rigurosamente seleccionados en forma previa en función de la manifiesta superioridad exhibida en caracteres de interés general (volumen y rectitud de fuste). Estas progenies están representadas en un ensayo genético (prueba de progenies), cuya evaluación permite identificar a los individuos más apropiados para incluirlos en el programa de micropropagación.

De acuerdo con el principio general de la selección y mejoramiento genético, estos árboles jóvenes, al ser descendientes de los individuos selectos reciben de sus padres alguna proporción de su superioridad, la cual está determinada por el diferencial de selección de sus padres y las heredabilidades de los distintos caracteres de interés (figura 1).

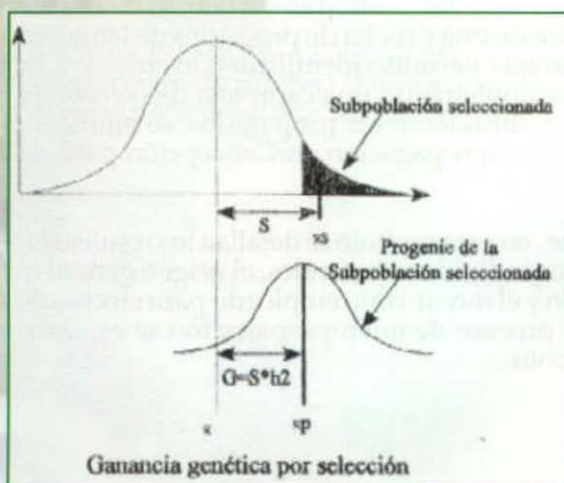


Figura 1: Esquema de la ganancia genética asociada al proceso de selección.

Como se observa en la figura anterior, como consecuencia de la recombinación genética asociada al proceso de formación de los gametos y posterior polinización, los individuos de la progenie a pesar de ser medios hermanos y compartir material genético superior, reconstituyen una curva normal de distribución de sus características. Aún así, esta nueva curva, por representar a material genéticamente más homogéneo (emparentados) es más estrecha que la original y por otra parte por ser de hijos de un árbol superior tiene un grado de desplazamiento de las frecuencias hacia los valores del padre.

Lo expresado en los párrafos y figura anterior, es el principio básico en que se han basado los programas de mejoramiento genético animal y vegetal. Esto consiste en seleccionar progenitores deseables y posteriormente seleccionar en sus progenies a los individuos que mejor expresan las características deseadas.

En consecuencia, el material a utilizar en la operación del proyecto presenta un grado de superioridad, el cual se verá amplificado al utilizar a los mejores individuos de cada progenie. La selección dentro de la población de hijos es una forma de moverse hacia la derecha en la curva de la progenie de la población seleccionada. Mientras mas rigurosa sea la selección en esta nueva población mayor es el grado de ganancia.

MATERIAL Y METODO

La selección de los árboles a micropropagar se efectuó sobre una prueba de progenies de lenga, establecida en el año 2000 en la Reserva Forestal Coyhaique.

El ensayo se midió a comienzos de agosto del año 2005 y se realizó una evaluación genética de los datos. Con los resultados de esta evaluación se seleccionaron los individuos juveniles a los cuales se les cosechó ramas para realizar las labores de micropropagación.

Descripción de la Prueba de Progenies de Lenga

La prueba de progenies utilizada para seleccionar los árboles a propagar fue establecida el año 2000 en el marco de una iniciativa anterior de investigación de INFOR. La prueba fue establecida en la reserva Forestal Coyhaique, en fajas habilitadas en una plantación de coníferas pre-existente (figura 2). Se utilizó un diseño estadístico de bloques al azar, en cada uno de los cuales cada progenie fue representada por una parcela de un árbol (single tree plot).

En este ensayo se representaron las progenies (hijos) de árboles selectos en función de la superioridad de sus características productivas, identificados en 3 regiones de procedencias definidas para la XI región.



Figura 2: Vista aérea de las fajas de la prueba de progenies de lenga

Las regiones de procedencia consideradas en el ensayo corresponden a Cerro Catedral, Mallín Grande y Río Cajón (**cuadro 1**). En ellas fueron seleccionados 4 categorías de árboles (plus, banco, fundador y conservación), a los cuales se les extrajo semillas, se produjeron plantas y se estableció el ensayo de progenies que ahora se utilizó para seleccionar los individuos que se consideran en este proyecto de micropropagación (**cuadro 2**).

CUADRO 1
REGIONES DE PROCEDENCIA REPRESENTADAS EN ENSAYO DE
PROGENIES DE LENGA

Región de procedencia	Descripción
Cerro Catedral	Ubicado a 150Km. al noreste de la ciudad de Coyhaique, presenta un clima Trasandino con Degeneración Esteparia de acuerdo a la clasificación Köppen. Las precipitaciones del sector varían entre 900 y 1.300mm al año. La topografía del lugar es montañosa, caracterizada por pendientes escarpadas, de muy difícil acceso, llegando el vehículo a unos 4Km. de inicio de montaña.
Río Cajón	Esta ubicado a unos 140Km. Al suroeste de la ciudad de Coyhaique. Estos sectores se encuentran bajo la influencia del clima Marítimo Frío Lluvioso de la Costa Occidental, según Köppen, caracterizándose por la alta pluviometría del sector entre los 2.500 y 3.000mm al año. Al igual que el caso anterior, la topografía del sector es montañosa con pendientes escarpadas, aun así es la procedencia más accesible en cuanto a logística.

(continuación cuadro 1)

Región de procedencia	Descripción
Mallín Grande	Está ubicado a unos 280Km. al sur de Coyhaique, el clima de esta área se encuentra influenciado por el Lago General Carrera, ya que corresponde teóricamente a un clima Estepario Frío, según Köppen, pero modificado por grandes espejos de agua, al igual que los anteriores la topografía es montañosa con pendientes escarpadas, siendo esta la procedencia más alejada e inaccesible.

CUADRO 2
CÓDIGO DE PROGENIES Y CATEGORÍAS DE LOS ÁRBOLES
REPRESENTADOS EN PRUEBA DE PROGENIES DE LENGUA

Código de Progenie	Categoría	Región de procedencia
1 al 4	plus	Cerro Catedral
5 al 8	banco	Cerro Catedral
9 al 89	fundador	Cerro Catedral
90 al 92	plus	Río Cajón
93 al 95	banco	Río Cajón
96	conservación	Río Cajón
97 al 149	fundador	Río Cajón
150	plus	Río Cajón
151	banco	Río Cajón
152 al 199	fundador	Río Cajón
200 al 213	plus	Mallín Grande
214 al 224	banco	Mallín Grande
225 al 226	conservación	Mallín Grande
227 al 307	fundador	Mallín Grande

Las categorías representadas en el ensayo de progenies corresponden a:

- **Plus:** En selección masal es un árbol de características claramente superiores al resto y que se recomienda representarlo en un huerto semillero clonal para producir semilla mejorada y en una prueba de progenies para validar su calidad genética.
- **Banco:** Árbol de características superiores similares a las de un individuo plus, pero sobre el cual existen dudas del origen genético

de su superioridad. Se recomienda validar sus características en una prueba de progenies antes de representarlo en un huerto semillero. En el intertanto se recomienda mantenerlo en un banco clonal

- **Conservación:** Árbol que exhibe algunas características sobresalientes, sin presentar una combinación óptima de todas ellas. Es un árbol que se justifica conservarlo debido a su valor productivo
- **Fundador:** Es un árbol de menor intensidad de selección que se escoge por ser de características superiores al promedio de los individuos de su región de procedencia, pero sin constituir un árbol sobresaliente como los plus o banco.

El esquema general con la distribución de los bloques y fajas que componen el ensayo se presenta en la **figura 3**. Un detalle de la distribución de las progenies en los bloques de una de las regiones de procedencia se presenta en la **figura 4**.

En total la prueba considera 2.466 árboles pertenecientes a 111 progenies distribuidas de acuerdo al detalle del **cuadro 3**.

CUADRO 3
TOTAL DE ÁRBOLES CONSIDERADOS EN PRUEBA DE PROGENIES DE LENGA

Región de Procedencia	Nº de Bloques	Nº de Progenies	Nº de Árboles
Mallín Grande	26	39	1.014
Río Cajón	18	33	594
Cerro Catedral	22	39	858
TOTAL	66	111	2.466

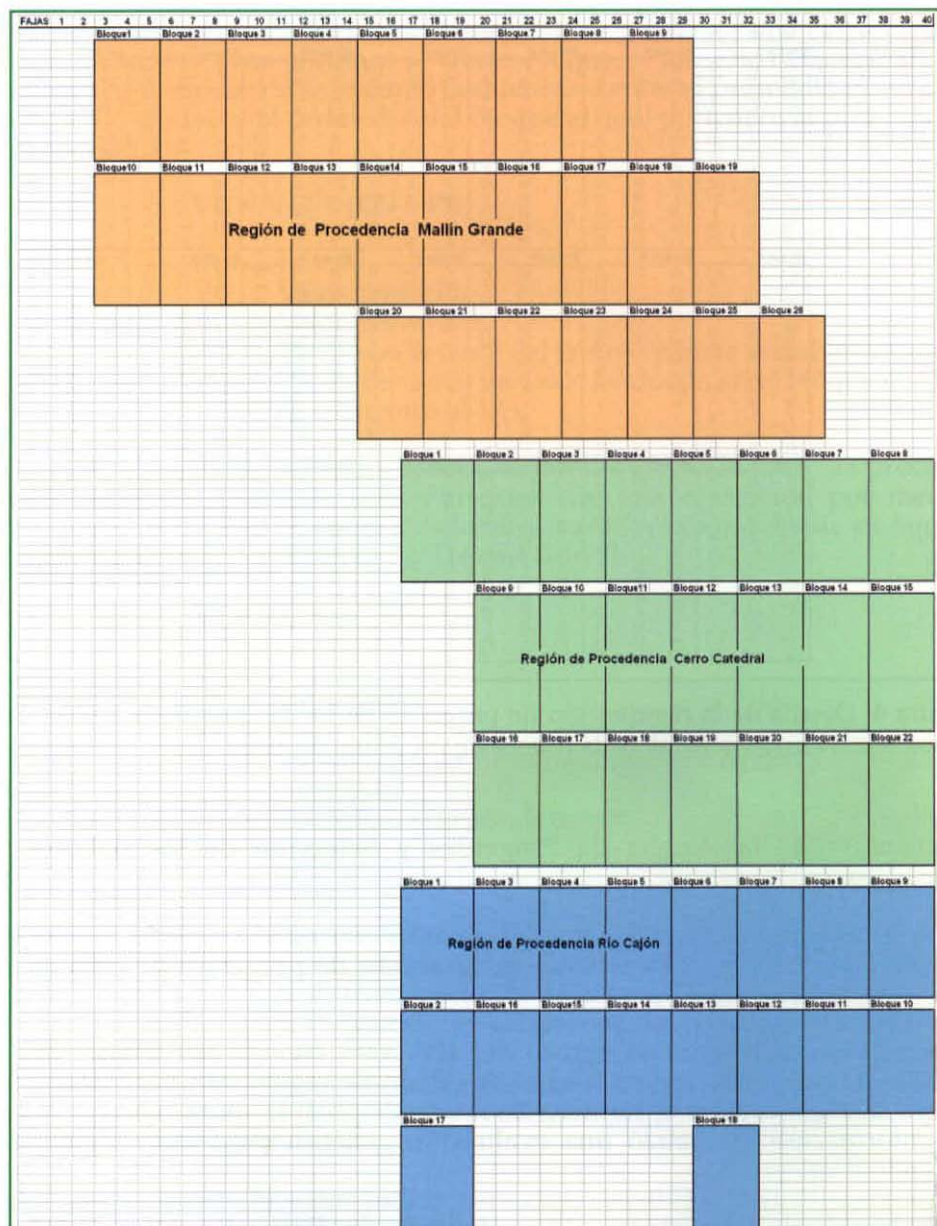


Figura 3: Esquema general de la prueba de progenies de lengua (la zona verde, correspondiente a la región de procedencia Cerro Catedral, se detalla en la figura siguiente)

Fajas	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40							
Bloque 1				Bloque 2				Bloque 3				Bloque 4				Bloque 5				Bloque 6				Bloque 7				Bloque 8			
T1	201	218	19	90	23	90	T3	28	217	51	17	22	T6	217	23	32	28	31	8	19	T6	19	54								
T4	15	31	80	28	T3	54	31	8	3	28	95	T6	51	28	18	34	8	8	T2	217	27	5	90								
51	8	22	60	25	16	T5	3	51	45	36	23	31	16	18	22	27	75	45	28	17	8	34	28								
T2	5	15	5	24	17	19	7	95	28	15	24	T2	24	201	218	25	90	60	90	28	217	17	23								
6	54	29	218	29	51	32	27	217	218	34	27	34	17	6	T4	95	6	T1	32	90	16	45	218								
60	16	201	7	8	T2	201	18	25	25	24	8	23	6	60	45	60	60	60	95	22	24	T1	T3								
90	45	95	18	217	T1	16	T1	5	5	20	60	6	218	45	T3	16	44	20	T5	16	60	95	15								
T8	32	21	T5	32	28	31	60	T4	T5	60	6	5	7	31	15	17	3	54	201	34	51	18	60								
17	T3	60	34	95	22	60	34	T8	T3	T6	45	15	3	27	201	36	51	15	18	5	45	31	25								
45	28	27	45	31	201	6	45	15	16	90	7	54	25	28	24	T2	31	24	T6	27	32	28	T5								
217	34	20	90	20	8	29	20	28	201	22	T4	T1	T5	60	T6	20	7	T3	23	7	T2	8	T4								
18	24	23	T6	15	T4	24	23	218	T1	32	31	T4	T5	90	217	54	5	218	28	T4	90	201	7								
7	25	28	54	31	27	17	T2	22	T2	18	54	32	20	95	T6	45	T1	31	25	51	22	28	20								
Bloque 9				Bloque 10				Bloque 11				Bloque 12				Bloque 13				Bloque 14				Bloque 15				Bloque 16			
201	60	217	45	21	22	28	90	27	45	94	T5	28	T1	90	28	T2	6	25	18	17											
T3	8	T5	34	T3	54	28	218	5	T6	218	201	13	31	T3	60	31	T6	5	218	20											
19	218	31	31	217	90	45	T4	T5	T1	54	23	17	20	T4	T5	17	25	T1	34	45											
6	17	T6	20	27	T1	28	201	17	95	27	17	28	217	24	T1	28	T4	25	T4	201											
90	90	34	18	6	80	7	32	18	24	6	18	22	25	32	18	95	218	31	95	28											
15	22	28	25	5	15	90	60	T6	16	217	8	T5	15	7	54	51	90	22	T2	16											
28	18	16	T4	23	16	54	95	6	18	T2	28	28	51	60	27	201	8	7	51	T6											
31	32	7	28	8	T6	T2	20	T3	28	90	60	95	54	16	5	60	22	8	31	90											
T4	24	60	201	60	T5	25	6	24	5	45	T4	45	18	27	24	7	22	T3	28	5											
95	25	T1	32	T2	3	31	217	15	7	31	22	34	18	T6	20	15	23	15	60	201											
27	T2	28	7	218	17	22	18	51	20	51	18	218	T2	60	22	T3	31	27	T5	217											
54	20	45	51	26	31	23	34	31	5	201	25	6	201	5	28	16	34	60	28	28											
51	5	23	26	18	95	19	T1	8	5	32	15	6	T6	16	217	45	32	32	24	54											
Bloque 16				Bloque 17				Bloque 18				Bloque 19				Bloque 20				Bloque 21				Bloque 22				Bloque 23			
8	31	54	21	90	T1	25	217	28	7	60	217	8	16	24	27	T3	25	18	T4	18											
T6	T2	34	7	T4	27	5	22	24	23	24	8	17	5	23	6	28	T1	8	60	7											
27	6	23	T2	20	45	T6	201	23	17	T1	31	217	T3	218	34	60	24	51	T1	15											
20	28	5	15	60	218	95	8	218	20	T6	18	23	T5	54	31	T5	51	18	19	45											
T5	25	24	95	T3	51	T2	60	T1	32	34	T4	25	95	T6	17	32	60	60	54	22											
45	32	51	24	31	60	18	T3	32	5	6	8	28	18	22	31	T6	201	32	218	5											
24	15	60	23	22	6	28	7	45	28	24	45	20	90	201	23	8	45	51	28	201											
201	16	95	T5	T6	16	90	18	T5	60	90	22	60	32	27	16	217	201	90	24	20											
T1	7	22	217	31	T6	27	90	15	54	15	16	51	T4	T2	15	T2	90	T6	28	27											
17	18	T3	34	5	25	T4	54	28	218	28	T5	34	T1	7	18	7	95	T3	90	6											
90	218	8	8	28	18	16	28	17	51	27	25	60	18	28	20	T4	28	95	217	T5											
T4	28	217	90	17	54	34	8	51	95	T2	31	201	5	31	28	T6	5	26	17	34											
25	60	31	201	32	28	31	20	16	201	T3	19	15	45	28	218	54	22	23	25	T2											

Figura 4: Detalle de la distribución de progenies en los bloques de la región de procedencia Cerro Catedral, de la prueba de progenies de lengua.

Evaluación de la Prueba de Progenies y Selección de los Árboles a considerar

La selección de los árboles juveniles a considerar en el proyecto involucró la medición y evaluación genética de la prueba de progenies descrita en el punto anterior.

La medición se efectuó en agosto del año 2005, cuando los árboles de la prueba de progenies tenían 5 años de edad. Se registraron los valores de altura de cada árbol y el número de ramas disponibles para cosecha. Con tal información se realizó una evaluación genética para cada región de procedencias.

La metodología de evaluación fue adaptada de Cotterill y Dean (1990) y consistió en lo siguiente:

Se digitaron los datos de la medición para conformar una base de datos, la que fue depurada eliminando a los árboles muertos.

Se corrigió la información registrada en la base mediante una corrección de carácter aditivo para eliminar el efecto bloque. Para estos efectos, a cada observación registrada se le sumó la diferencia entre el promedio general de altura del ensayo y el promedio del bloque al cual pertenece la observación (**expresión 1**).

$$(1) \quad VC = VO + (PG - PB)$$

Donde;

VC = Valor corregido

VO = Valor observado

PG = Promedio general del ensayo para la variable evaluada

PB = Promedio de la variable evaluada en el bloque en que se encuentra el VO.

Una vez obtenida la base con la depuración del efecto bloque, se procedió a generar un índice de selección mediante una corrección por medias familiares. Para esto se sumó a cada observación el promedio de su familia ponderado por un coeficiente "b" (**expresión 2**).

$$(2) \quad VI = VC + b * PF$$

Donde;

VI = Valor índice

VC = Valor corregido de la expresión (1)

PF = Media familiar de la familia a que pertenece el valor corregido

b = Coeficiente de ponderación

$$b = r(1-h^2)n/((1-r)(1+(n-1)rh^2))$$

Donde;

r = Coeficiente de parentesco

h² = Heredabilidad de la variable evaluada

n = Número de halfsibs (medios hermanos) considerados

Para efectos de la construcción del valor índice se utilizó una heredabilidad para la variable altura de 0,08 y un coeficiente de parentesco estándar para familias de medios hermanos de 0,25.

Una vez estimado el valor índice para cada árbol del ensayo se procedió a "rankear" a los individuos en función de este índice. Los individuos que exhibieron los valores más altos y que disponían de suficientes ramas para ser colectadas fueron seleccionados para cosecharles brotes y micropropagarlos.

Cosecha de Brotes

La cosecha se realizó sobre los mejores individuos del ensayo de progenies, identificados en la evaluación recién descrita. Para este efecto, usando tijeras de podar se extrajeron ramas con abundantes yemas latentes, en un estado previo al de brotación, las cuales se agruparon en manojos identificados con un código correspondiente al árbol cosechado. Los manojos fueron desinfectados en forma preliminar con aspersiones de soluciones fungicidas y bactericidas. Posteriormente fueron embalados en cajas térmicas de plumavit, junto a esponjas humedecidas y abundante nieve para mantener una temperatura baja, y despachados por vía aérea al laboratorio de micropropagación en Concepción. En el árbol cosechado se sellaron las heridas ocasionadas por el corte de las ramas, con un látex fungicida (figura 5).



Figura 5: Colecta de ramas y aplicación de sellante en las heridas de poda.

RESULTADOS Y DISCUSION

La evaluación de la variable altura de la prueba de progenies de lenga permitió confeccionar un índice de selección para esta variable.

El comportamiento del índice de altura se presenta en el **cuadro 4** y **figura 6**. En ellos se observa que el comportamiento de la variable es relativamente homogéneo entre las tres regiones de procedencias consideradas en el ensayo, las cuales exhiben valores promedios, desviaciones estándar y distribución de frecuencias muy similares. Sin embargo existe una significativa variación al interior de cada región, observándose que el índice varía considerablemente y encontrándose valores extremos que fluctuaron entre 8,4 y 262,2.¹

¹ Los valores utilizados corresponden a un índice de altura y no a la altura propiamente tal, este se usa para hacer comparaciones objetivas que eliminan efectos ambientales y ponderan información genética, por lo mismo se expresa sin unidades de longitud (m, cm, etc.)

CUADRO 4
DISTRIBUCIÓN Y PARÁMETROS DESCRIPTIVOS DEL ÍNDICE DE
ALTURA EN LA PRUEBA DE PROGENIES DE LENGA

Índice de Altura					
Valor clase	Rango	Frecuencia relativa (% de árboles por clase)			
		Mallín Grande	Cerro Catedral	Río Cajón	Total
25	0-50	1,7	0,7	1,2	1,2
75	50-100	37,8	20,2	25,9	29,5
125	100-150	43,9	44,7	56,8	44,8
175	150-200	16,5	32,7	14,8	23,6
225	200-250	0,2	1,5	0,0	0,8
275	250-300	0,0	0,1	1,2	0,1
Total		100,0	100,0	100,0	100,0
Parámetros descriptivos		Indice de Altura			
Promedio		113,5	132,8	119,2	122,2
Desviación estándar.		34,3	36,3	34,9	36,4
Valor máximo		209,8	262,2	255,7	262,2
Valor Mínimo		8,4	20,3	48,8	8,4

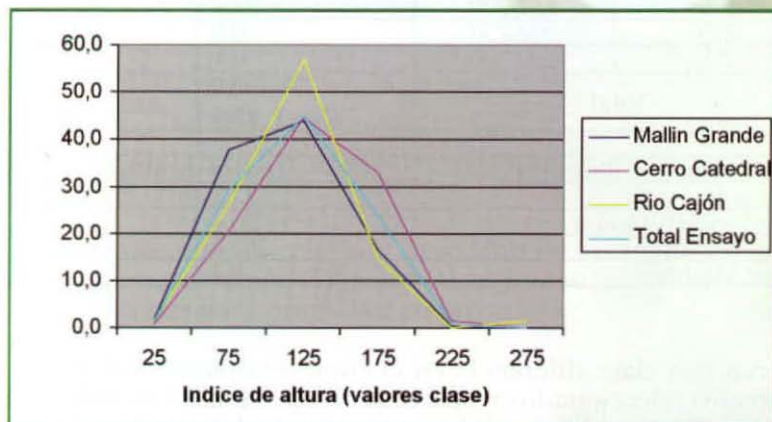


Figura 6: Distribución de frecuencias relativas del índice de altura en la prueba de progenies de lenga.

Con la información procesada se seleccionaron 165 árboles, desde los cuales obtener ramas para propagación. Ellos corresponden a los individuos que exhiben el mejor índice de altura y que a la vez exhiben suficientes ramas disponibles para cosecha.

La superioridad en altura de los árboles seleccionados respecto al total de los individuos de la prueba de progenie se hace evidente al comparar los parámetros y distribución del índice de altura de cada grupo. En el **cuadro 5** y la **figura 7** se resumen la comparación del índice de altura entre el ensayo total (agrupando las tres regiones de procedencia) y la subpoblación de árboles seleccionados.

CUADRO 5
COMPARACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y PARÁMETROS DESCRIPTIVOS
DEL ÍNDICE DE ALTURA EN LA PRUEBA DE PROGENIES DE LENGA Y EN
EL GRUPO DE ÁRBOLES SELECCIONADOS

Índice de altura			
Valor clase	Rango	Frecuencia relativa (% de árboles por clase)	
		Ensayo Total	Arboles Seleccionados
25	0-50	1,2	0,0
75	50-100	29,5	0,0
125	100-150	44,8	2,4
175	150-200	23,6	90,3
225	200-250	0,8	6,7
275	250-300	0,1	0,6
Total		100,0 (N= 1.936)	100,0 (N= 165)
Parámetros descriptivos		Índice de altura	
Promedio		122,2	178,5
Desviación estándar		36,4	17,0
Valor Máximo		262,2	262,2
Valor Mínimo		8,4	130,0

Se observa una clara diferencia en el comportamiento del índice de altura en los árboles seleccionados respecto al ensayo total. Los valores promedios del índice son mayores y exhiben una menor desviación. La distribución de los datos también es claramente diferente, concentrándose los valores en las clases de altura superiores. Estos aspectos confirman que los árboles escogidos para micropropagarlos efectivamente exhiben un desempeño superior al resto.

Desde los árboles identificados se extrajeron y despacharon a laboratorio propágulos vegetativos, usando los procedimientos descritos en la metodología. Estos resultaron apropiados para posteriormente inducir su brotación y establecer los explantes en medios de cultivo *in vitro*.

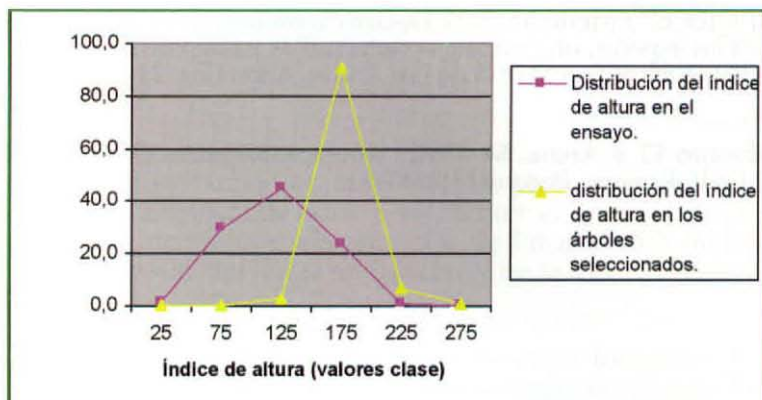


Figura 7: Distribución de frecuencia absoluta en ensayo de progenies de lenga y en subpoblación de árboles seleccionados.

CONCLUSIONES

El procedimiento de selección empleado permitió identificar a los mejores árboles de la prueba de progenies de lenga en función de un índice de crecimiento en altura.

Desde los árboles identificados se obtuvieron propágulos vegetativos para iniciar su cultivo *in vitro*.

El procedimiento descrito de colecta y despacho de los propágulos resultó apropiado para la conservación del material, el cual se recibió en laboratorio en óptimas condiciones para promover su brotación.

BIBLIOGRAFÍA

Coterill, P. y Dean, C. 1990. Successful tree breeding with index selection. CSIRO. Division of Forestry and Forest Products. Melbourne, Australia. 80 p.

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

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

V

PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE LENGA

Oriana Ortiz N.
Ana María Sabja G.
Laura Koch Z.

INTRODUCCIÓN

Lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser) es la especie de más amplio rango de distribución en la Patagonia, abarcando una amplitud de aproximadamente 2.000Km de norte a sur. Si bien el límite norte de distribución de la especie corresponde a la provincia de Talca, el 85 % de la superficie ocupada por el tipo forestal lenga se distribuye en la XI y XII región (CONAF *et al.*, 1999).

El tipo forestal lenga constituye uno de los recursos forestales más importante de las regiones australes del país. Sin embargo, en el pasado fue severamente afectado por intensos procesos de quemados con el fin de disponer de terrenos para la agricultura y la ganadería. Se suma a lo anterior, la utilización de la práctica silvícola de extracción selectiva de los mejores árboles como método de cosecha del bosque, el cual altera negativamente la calidad de la regeneración que conformará el futuro bosque.

Hoy en día el recurso se encuentra con distintos niveles de degradación, por este motivo se han desarrollado diversos estudios y acciones tendientes a restaurar su potencial productivo y promover su uso sustentable (Arroyo *et al.*, 1995; Bartsch y Rapp, 1995; Cuevas, 2000; Heinemann, *et al.*, 2000; Mascareño, 1987; Premoli, *et al.*, 1997; Rebertus y Veblen, 1993; Rebertus *et al.*, 1997, Rusch, 1992; Schmidt *et al.*, 1997; Veblen *et al.*, 1996). Un aporte sustancial en este sentido, lo constituye el programa de mejoramiento genético iniciado en el año 1998, a través de un proyecto FONDEF: "Establecimiento y Mejoramiento Genético de Lenga en las Regiones Australes XI y XII".

En este proyecto, se implementaron las primeras estructuras para iniciar un programa de mejoramiento genético para la especie, entre las más importantes se encuentra la instalación de ensayos de progenies y procedencias, selección de árboles plus y establecimiento de un huerto semillero clonal.

En los programas de mejoramiento genético, la micropropagación es una técnica de propagación vegetativa, que potencialmente puede ser utilizada para transferir y masificar las ganancias genéticas obtenidas en los ciclos de mejora a plantaciones comerciales (Kleinschmit *et al.*, 1993). En este sentido, la propagación asexual, permite transferir toda la varianza genética a los descendientes, duplicando la ganancia genética asociada a los esquemas

sexuales de propagación, ya que aprovecha toda la variación genética existente (Ikemori *et al.*, 1994; Kleinschmit *et al.*, 1993; Talbert *et al.*, 1993).

Los beneficios potenciales de la aplicación de las técnicas de micropropagación a un programa de mejoramiento se refieren a la alta tasa de multiplicación que es posible obtener en un corto período, ofreciendo ventajas comparativas respecto al incremento de las ganancias genéticas obtenido por macropropagación (Carson *et al.*, 1992 y Haines, 1992) y la reducción del período para iniciar ensayos de progenies de cruzamientos controlados, donde la producción de semillas es escasa y el éxito de su aplicación depende de disponibilidad inmediata de plantas (Cheliak, 1991).

Las técnicas de micropropagación que usualmente han sido aplicadas en especies forestales, son la organogénesis y embriogénesis somática, (Ahuja, 1997, Haines, 1992; Thorpe *et al.*, 1991). Estas técnicas se han utilizado también en la manipulación de estados de maduración, conservación de germoplasma e ingeniería genética de plantas (Libby y Ahuja, 1993).

La organogénesis, implica la diferenciación monopolar de un órgano (brotes o raíces) para dar origen a una planta bajo condiciones estériles de laboratorio. Usualmente esta diferenciación monopolar ocurre al colocar un explante (brote) en un medio nutritivo enriquecido con sustancias hormonales (citoquininas/auxinas). Los cultivos son mantenidos durante todo el proceso de multiplicación en ambientes controlados con iluminación artificial, fotoperíodo, y temperatura. Cuando los brotes alcanzan un tamaño adecuado se colocan en un medio con auxinas para inducir enraizamiento. El proceso es influenciado por el genotipo, estado fisiológico del explante, edad y condiciones *in vitro* de luz, temperatura y constitución del medio nutritivo en especial de las concentraciones hormonales (Ahuja, 1983).

En diversos *Nothofagus*, se han desarrollado técnicas de organogénesis utilizando trozos de tejidos, yemas, secciones nodales y axilares estériles obtenidos de plantas juveniles, adultas y yemas de esferoblastos (Jordan *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995; Seemann y Zurita, 1995).

En general, medios nutritivos de baja concentración salina han sido adecuados para el cultivo de especies de *Nothofagus*, los que han sido utilizados con modificaciones en su composición de macronutrientes y suplementados con vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento. (Jordán *et al.*, 1996; Hermosilla, 1998; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995). El medio nutritivo Broadleaved Tree Medium (BTM) ha sido particularmente efectivo para promover la proliferación y elongación de brotes, tanto en especies de *Quercus* como de *Nothofagus* (Chalupa, 1983; Martínez y Arena, 1995; Martínez *et al.*, 1995; 1996a; 1996b). Se ha identificado que los reguladores de crecimiento son fundamentales para el cultivo *in vitro* de *Nothofagus*, variando considerablemente los requerimientos de acuerdo al tipo de explantes

y contenido endógeno de fitohormonas naturales, de esta manera para la proliferación y elongación de brotes se han utilizado las citocininas 6 benzil aminopurina (BAP) e isopentenyl adenina (2 iP), solas o en combinación con las auxinas ácido naftalenacético (ANA) o ácido indolbutírico (IBA) y/o giberelinas (Seemann y Zurita, 1995; Jordán y Velozo, 1991; Jordán *et al.*, 1996; Martínez y Arena, 1995).

Específicamente en la especie lenga, Martínez y Arena (1997) iniciaron cultivos a partir de material de un árbol adulto y de renovales de 10 a 15 años de edad, señalando que los principales factores a tener en cuenta son la intensa oxidación y pardeamiento de los brotes durante el establecimiento de los cultivos y la baja tasa de multiplicación que presenta la especie, de no más de 1:4,7 brotes a los 63 días de cultivo.

En el marco del proyecto FDI-CORFO 02C8FT-05: "Masificación de Genotipos de Interés Comercial de Lenga en la XI Región", se desarrolló este trabajo con el fin de obtener plantas micropropagadas de árboles de alto valor genético, seleccionados en el programa de mejoramiento implementado para lenga. En el documento se describen las metodologías desarrolladas, se identifican las principales variables que influyen en el proceso de propagación *in vitro* y se entrega un protocolo para la micropropagación de clones selectos de lenga.

METODOLOGÍA

Etapas de selección del material vegetal y establecimiento

Tal como se señaló en el capítulo IV de este documento, el material vegetal correspondió a árboles juveniles seleccionados desde un ensayo de progenies y procedencias establecido el año 2000 en la Reserva Nacional Coyhaique. En tal ensayo las progenies consideradas corresponden a los descendientes por semillas de árboles plus adultos de lenga, rigurosamente seleccionados en función de su superioridad en volumen y forma.

A fines de la temporada invernal (agosto), cuando las yemas aún se encontraban en dormancia, se colectaron ramas de los 160 individuos seleccionados. El material fue desinfectado en terreno con una mezcla de los fungicidas Captan® y Polyben® al 0,1% (p/v), para su transporte al laboratorio se utilizó una caja de poliestireno previamente desinfectada con alcohol.

En base a experiencias previas con la especie, se definieron procedimientos para la desinfección de yemas del material colectado en terreno, inducción de la brotación en ambiente controlado, esterilización de explantes y selección de medios de cultivo para el establecimiento *in vitro* de los clones. Adicionalmente se evaluaron algunas características físicas del material colectado y su secuencia de brotación en laboratorio.

- Desinfección de yemas.

Luego de la recepción e identificación del material, se lavaron las ramas y yemas con detergente líquido (Quix®), se enjuagaron con agua corriente por una vez y luego se remojaron durante 30 minutos en una solución de los productos Captan (0,1% p/v), Polyben (0,1%, p/v) y Python (0,3 % v/v). Finalmente el material fue enjuagado con agua corriente.

- Inducción de la brotación

En experiencias previas se determinó que el uso de una solución nutritiva adicionada con giberelina mejoraba la calidad y la cantidad de brotes producidos durante el período de brotación, sin embargo no existía certeza del efecto que podría tener el regulador de crecimiento sobre los explantes cultivados *in vitro*; por esta razón se utilizaron dos composiciones diferentes, una con giberelina en una dosis de 10mg/l y otra sin este compuesto, ambas formulaciones contenían agua estéril, suplementada con sacarosa (10g/l) y ácido cítrico (500ppm).

La renovación de la solución nutritiva se realizó cada dos días en la primera formulación y en forma diaria en la segunda. Con el fin de mejorar la absorción de la solución, las bases de las ramas fueron cortadas cada dos días, durante todo el período de brotación.

El material permaneció en una sala climatizada, previamente desinfectada, las condiciones ambientales en la sala fueron 22°C de temperatura, 16 horas luz de fotoperíodo y sobre 80% de humedad relativa.

- Desinfección de brotes y establecimiento de cultivos

Para el establecimiento de los cultivos, se seleccionaron brotes que tuvieran un tamaño superior a 1cm y al menos dos pares de hojas expandidas, como los que se muestran en la **figura 1**.



Figura 1: Brotes de lenga utilizados para el establecimiento de cultivos *in vitro*

Las pérulas de los brotes fueron removidas antes de realizar la desinfección de los explantes, la cual fue llevada a cabo en cámara de flujo laminar.

La mitad de los brotes fue desinfectada durante 10 minutos con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% adicionado con un surfactante (Tween®, 10 gotas/l), la otra mitad, fue tratada con un segundo procedimiento, que consideró la realización de un remojo durante cuatro horas en el fungicida Polyben (300ppm) y luego la desinfección con hipoclorito de sodio.

A continuación de los tratamientos de desinfección, los brotes fueron enjuagados cuatro veces con agua destilada estéril, cada enjuague tuvo una duración de 10 minutos.

Los brotes (explantes) fueron cultivados en el medio L&D (Lainé y David, 1994) suplementado con 30g/l de sacarosa, 6g/l de agar, 0,22mg/l de BAP, 0,002mg/l de ANA, 80mg/l de putrescina y 800mg/l de PVP. Conjuntamente, se utilizó el medio BTM (Chalupa, 1983) según la formulación empleada por Martínez y Arena (1997).

En ambos casos los cultivos fueron traspasados a medio nutritivo fresco cada 21 días.

El pH de los medios de cultivo fue ajustado a 5,7 con KOH 0,1 N, antes de autoclavarlos, lo cual se llevó a cabo por 20 minutos a 0,1Mpa. Los cultivos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ de temperatura y un fotoperíodo de 16 horas luz.

Multiplicación de brotes

En la etapa de multiplicación se usó como medio base, el medio nutritivo BTM, suplementado con 20g/l de sacarosa, 7g/l de agar, 0,22mg/l de BAP, 0,002mg/l de ANA y 20mg/l de putrescina. Una segunda formulación correspondió a este mismo medio, pero adicionado con 250mg/l de caseína hidrolizada.

El cultivo se realizó, alternando ambos medios nutritivos cada 21 días. Durante esta etapa los explantes fueron cultivados en frascos de vidrio de 500cc de volumen.

Enraizamiento de brotes

Para esta etapa se utilizó un procedimiento conocido como “enraizamiento sucesivo”, donde se utiliza un medio para la fase de inducción de rizogénesis y otro para la fase siguiente de expresión y elongación de raíces.

En la fase de inducción se usó el medio BTM, con los macronutrientes redu-

cidos a la mitad y suplementado con 15g/l de sacarosa, 2,5g/l de Gelrite® y 0,2mg/l de la auxina AIB. Para la fase de expresión de raíces se utilizó la misma formulación basal del medio anterior, pero sin reguladores de crecimiento y adicionada con 7g/l de agar y 2mg/l de pantetonato de calcio.

Para el enraizamiento, se seccionaron brotes sanos y vigorosos de al menos 3cm de longitud (**figura 2**) de los 10 clones que habían presentado las mejores tasas de multiplicación. Estas secciones se dispusieron en el medio de inducción donde permanecieron durante 10 días en oscuridad, al cabo de este período fueron trasplantados al medio de expresión de raíces y colocados bajo condiciones de fotoperíodo normal (16 horas).



Figura 2: Explantes seccionados para enraizamiento de brotes.

Aclimatación de plantas

Cuando las raíces presentaban un tamaño de al menos cuatro centímetros y se observaba crecimiento apical activo, las plantas fueron repicadas a cajas de aclimatación, según el procedimiento señalado por Sabja *et al.* (2005).

Las cajas contenían un sustrato compuesto por perlita y turba en una relación 3:1, adicionada con el medio nutritivo BTM con los macronutrientes reducidos a la mitad, en forma líquida y sin sacarosa. Las cajas fueron esterilizadas en autoclave durante 30 minutos.

Las plantas permanecieron durante dos a tres semanas en las cajas de aclimatación, luego se llevaron a condiciones de invernadero, donde fueron transplantadas a tubetes circulares de 120cc, el sustrato utilizado estaba compuesto por perlita y turba en la misma proporción utilizada anteriormente, suplementado con un fertilizante de lenta entrega (Osmocote 15-9-12) en una relación de 5Kg/m³.

Durante las primeras semanas las plantas permanecieron en una condición

de alta humedad, proporcionada por riegos frecuentes en forma de aspersión. Cuando las plantas exhibían una altura de 10cm fueron colocadas en condiciones ambientales normales, para su crecimiento y posterior endurecimiento en vivero, con el fin de producir plantas que presenten una condición de tamaño y lignificación adecuados para su plantación en terreno.

RESULTADOS

Establecimiento de cultivos

El material vegetal colectado en terreno desde los árboles seleccionados en la prueba de progenies de lenga de la reserva nacional Coyhaique, fue recepcionado en el laboratorio de micropropagación de INFOR Concepción en buenas condiciones de sanidad, observándose que un alto porcentaje de ramas exhibía internudos largos y yemas grandes, aspectos que son indicadores de un crecimiento vegetativo vigoroso, propiedad deseable en micropropagación pues aumentan las probabilidades de establecer cultivos viables.

De acuerdo a una evaluación física realizada en el material colectado (**cuadro 1**) cada rama presentaba 32 yemas en promedio. Al realizar una proyección considerando el número de clones, se estimó que potencialmente podrían producirse 12.000 brotes para las actividades de establecimiento de cultivos.

CUADRO 1.
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DEL MATERIAL VEGETAL COLECTADO
PARA INICIAR CULTIVOS *IN VITRO*.

Nº clones	151
Tamaño promedio de ramas (cm)	38
• Mínimo	15
• Máximo	60
Nº promedio de yemas/rama.	32

Un monitoreo de la secuencia de brotación bajo condiciones de laboratorio se presenta en forma gráfica en la **figura 3**, en ésta se muestra que las yemas comienzan a activarse rápidamente, presentando a los 11 días brotes elongados y con un estado de desarrollo adecuado para el cultivo *in vitro*. Transcurridos 19 días, el vigor de los brotes comienza a decaer, iniciándose

un proceso generalizado de necrosis y deshidratación que provoca la muerte de los brotes.



Figura 3: Secuencia de brotación de Lengua, bajo condiciones ambientales controladas.

Según lo observado, la brotación es un proceso que se desarrolla rápidamente. Desde el punto de vista del cultivo, no se disponen de más de 8-10 días para realizar las labores de desinfección y establecimiento *in vitro* de los brotes. Este es un factor relevante a tener en cuenta, ya que la cantidad de explantes establecidos y su viabilidad dependerán en gran medida de una adecuada planificación y ejecución de las labores iniciales de cultivo. Lo anterior cobra mayor importancia, si se considera que la actividad por su naturaleza estacional es posible realizarla solamente una vez en el año.

El procedimiento llevado a cabo, permitió obtener brotes en 133 clones, con un promedio de 17 explantes por clon y un total de 2.700 explantes cultivados (**figura 4**).



Figura 4: Establecimiento de cultivos *in vitro* de Lengua.

Un 20% del conjunto de yemas colectadas llegó a producir brotes cultivables, en circunstancia que en experiencias anteriores esta cifra no sobrepasaba el 10%. Probablemente, las yemas latentes de lengua presenten algún grado de deficiencia en las reservas de carbohidratos, entonces la sacarosa contenida en la solución nutritiva utilizada durante el período de brotación, pudo haber constituido una fuente de energía adicional que mejoró el crecimiento inicial y posterior elongación de los brotes. Esta situación posiblemente sea resultado de las severas condiciones de sitio donde lengua se desarrolla; en otras especies que crecen en climas más benignos como raulí y castaño, la producción de brotes bajo similares condiciones es abundante y ocurre sin mayores dificultades (Sabja *et al.*, 2005 y González *et al.*, 2006).

- Desinfección de brotes

La contaminación de los cultivos fue de 30% en promedio, siendo más alta que la obtenida por Martínez y Arena (1997). La utilización de sacarosa durante la actividad de brotación, seguramente contribuyó a aumentar la contaminación, debido a que es una sustancia que facilita el desarrollo de agentes de infección. No obstante ello, los buenos resultados obtenidos en cuanto a producción y elongación de brotes, justifican su uso.

Los dos procedimientos de desinfección utilizados mostraron diferencias importantes (**figura 5**), siendo el tratamiento con fungida el de mejor desempeño, especialmente en el control de contaminación por hongos. Sin embargo, es posible que este producto tenga algún efecto sobre la viabilidad de los brotes en las etapas siguientes, por lo que sería aconsejable utilizar ambos procedimientos, mientras no se tenga claridad del efecto de este químico.

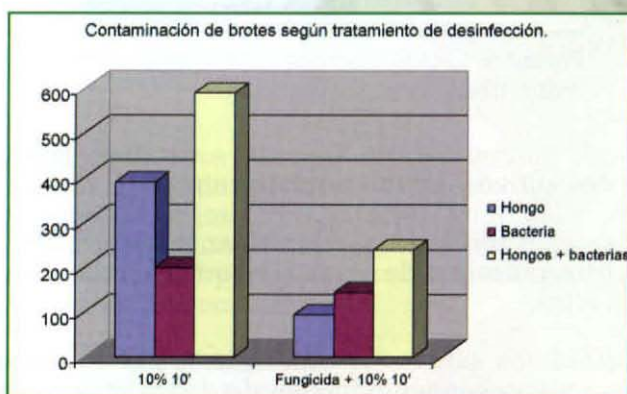


Figura 5: Resultado tratamientos de desinfección de explantes.

La contaminación del tipo bacterial generalmente se produce por la presencia endógena de microorganismos, por lo mismo no es posible eliminarla a través de desinfectantes pues éstos actúan sólo en la superficie de los tejidos. Como en ambos procedimientos no se observaron diferencias significativas en cuanto a la contaminación por bacterias, significa que ésta estaba contenida en los brotes, por lo tanto el nivel de infestación alcanzado no dependió de los tratamientos de desinfección.

Con el procedimiento aplicado, se establecieron cultivos libres de contaminación en 129 clones, con un número variable de explantes en cada uno de ellos. Aún cuando el genotipo es un factor determinante en la capacidad de regeneración, la probabilidad de proliferación *in vitro* de un clon aumenta mientras mayor sea la cantidad de material inicial. En la **figura 6** se muestra una clasificación de los clones según su número de brotes. De acuerdo a la gráfica, 70 clones contaban con 10 o más brotes, siendo éste el grupo con mayor potencial de respuesta a las condiciones de cultivo.



Figura 6: Clasificación de clones según número de brotes libres de contaminación.

- Medio de Cultivo y establecimiento *in vitro*

Tal como había sido señalado por Martínez y Arena (1997), lenga mostró severos y rápidos procesos de oxidación, que hicieron muy difícil su establecimiento *in vitro*.

En el medio BTM, los cultivos inicialmente se mantuvieron en buen estado, con necrosis y pardeamiento moderado de los brotes, sin embargo no se produjo activación de yemas, como tampoco generación de brotes axilares, procesos necesarios para la proliferación de brotes en la etapa de multiplicación. Con el tiempo los explantes iniciales comenzaron a debilitarse y fueron incapaces de sobrevivir en el medio nutritivo. El proceso se caracterizó por

un intenso exudado de color negro en la parte basal del brote en contacto con el medio de cultivo y sin formación de callo. Posteriormente, los tejidos inferiores adquirieron una coloración café, indicadora de necrosis, que gradualmente avanzó hacia el ápice, cubriendo finalmente todo el brote. Aún cuando se practicaron cortes para eliminar las partes necrosadas, los tejidos sanos continuaron necrosándose hasta la muerte del explante.

En el medio BTM, no se logró iniciar cultivos *in vitro* en ninguno de los clones de este estudio, este resultado contrapuesto al obtenido por Martínez y Arena (1997), podría explicarse por diferencias a nivel genético de los clones evaluados en ambos estudios.

En el medio de cultivo L&D, en general, los brotes iniciales se mantuvieron verdes, se formó un pequeño callo en la base del explante y la exudación de fenoles fue mucho menor que la observada en medio BTM. Transcurridos 1 a 2 meses de cultivo se observó activación de yemas *in vitro*, como se muestra en la **figura 7**, lo que finalmente permitió el inicio de los cultivos de lengua.

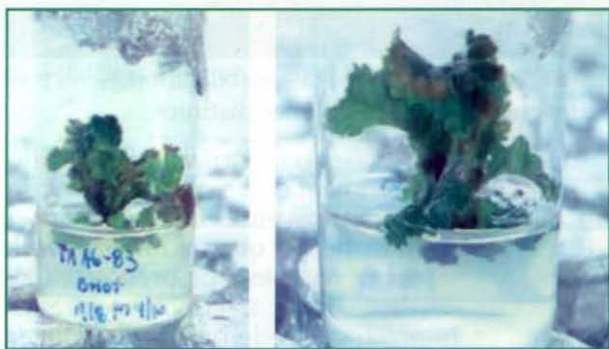


Figura 7: Activación de yemas *in vitro* de Lengua en el medio Lainé&David, adicionado con poliaminas.

Entre los innumerables factores que pudieron influenciar el proceso de formación y crecimiento *in vitro* de nuevos brotes, se identificaron dos como relevantes para la especie. El primero fue la formulación del medio L&D, cuya concentración salina relativamente baja ayuda a disminuir el exudado de fenoles, además la caseína hidrolizada contenida en su composición, ayuda a promover la activación de yemas *in vitro*.

Un segundo factor fue la utilización de putrescina en el medio de cultivo. Esta es una hormona de reciente desarrollo, del grupo de las poliaminas y respecto de la cual aún no existe claridad de su acción sobre los tejidos, pero que se le reconoce incidencia en un amplio rango de procesos: división celular, síntesis de proteínas, replicación del ADN y formación de brotes, entre otros (Bais y Ravishankar, 2002). Bais *et al.* (2002) y Taig *et al.* (2004) repor-

taron que la aplicación exógena de poliaminas en plantas leñosas, ayudó a controlar los procesos de necrosis y estimuló el crecimiento y elongación de nuevos brotes *in vitro*, efectos que igualmente fueron observados en el caso de lenga.

Mediante la utilización de esta formulación, se logró iniciar y estabilizar cultivos en 40 clones de lenga, 35 del grupo que presentaba más de 10 explantes iniciales y 5 del grupo con menor cantidad (menos de 10). El proceso tuvo una duración aproximada de cuatro a cinco meses, en la **figura 8** se muestran explantes estabilizados con brotes axilares elongados y de apariencia vigorosa.



Figura 8: Explantes de lenga estabilizados y con brotes axilares pertenecientes a clones distintos.

Durante la inducción de brotación en yemas latentes, se observó que los brotes producidos en la solución nutritiva que incluía giberelina, eran de muy buena calidad, pero que presentaban severos problemas de necrosis en los subcultivos posteriores. Por lo mismo, se concluye que no es apropiado el uso de esta hormona en la producción de brotes de *Nothofagus* para cultivo *in vitro*.

Multiplicación de brotes

Como ya fue mencionado, el uso del medio L&D permitió el inicio de los cultivos *in vitro*, sin embargo a medida que transcurrían los subcultivos, se observó que los yemas de los brotes adventicios no se activaban o bien su tasa de proliferación era muy baja, aún cuando los explantes se mantenían verdes y en buenas condiciones. La baja concentración de macronutrientes de este medio, si bien inicialmente fue favorable para mitigar los procesos de oxidación, en una etapa más avanzada pudo haber causado deficiencias nutricionales que impidieron una adecuada proliferación de los explantes.

Por esta razón, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio BTM, cuya formulación es más abundante en elementos nutritivos. Se mantuvo la composición de hormonas utilizadas en el medio L&D y además se le suplementó con caseína hidrolizada.

Con esta nueva formulación las yemas mostraron una rápida activación y formación de brotes axilares. Sin embargo, la exposición prolongada a este medio de cultivo, llevó a una sobreestimulación de la brotación que provocó necrosis y muerte de explantes. Esta reacción, se evitó al utilizar el medio nutritivo sin caseína hidrolizada, en forma alternada con el primer medio entre cada subcultivo. De esta manera, en el medio con caseína hidrolizada se induce la activación de yemas *in vitro* y en el medio carente de este elemento, se produce el crecimiento y elongación de los brotes. En la **figura 9** se muestra la calidad del cultivo obtenido.



Figura 9: Clones de lenga en etapa de multiplicación.

La tasa de multiplicación fue variable dependiendo del clon, al principio es lenta, ya que es necesario esperar que los brotes se elonguen para ser separados del explante inicial, pero una vez que se avanza en los subcultivos, ésta puede llegar a ser tan alta como 1:15 cada 21 días. Para obtener tasas de proliferación aceptables, se requiere de al menos un período de 12 meses de cultivo.

El medio utilizado por Martínez y Arena (1997), cuya formulación incluía una combinación de las hormonas 2 iP y giberelina, produjo en esta etapa un efecto de elongación de brotes en algunos clones (**figura 10**), sin embargo en otros clones el medio provocó necrosis apical.

La forma de seccionar y cultivar los explantes incide en su sobrevivencia y capacidad de generar nuevos brotes, los mejores resultados se obtuvieron cuando se cortaron brotes apicales que tuvieran al menos 4cm de longitud y se cultivaron en forma individual. Cuando se colocaron dos o más explantes en un mismo frasco, uno de ellos creció en forma más vigorosa, suprimiendo a los demás.

A diferencia de otras especies, donde la vitrificación o hiperhidricidad de los explantes puede ser revertida, en lenga el proceso es seguido por necrosis de tejidos que ocasionan la muerte de los brotes afectados. La vitrificación ocurre fácilmente cuando las condiciones de cultivo no son apropiadas.



Figura 10: Elongación de brotes, producido por la combinación de hormona 2iP/giberelina en el clon N° 37

Durante la etapa de multiplicación, concentraciones de BAP superiores a 0,22mg/l provocaron vitrificación y necrosis severa de los explantes. En general, lenga se mostró extremadamente sensible e intolerante ante cualquier estímulo negativo que la afectara, reaccionando violentamente mediante intensos procesos de oxidación y necrosis, situación que dificultó su cultivo cuando aún no se identificaban las condiciones adecuadas para su micropropagación. Esta reacción, puede ser resultado de adaptaciones fisiológicas al medio ambiente donde lenga se desarrolla, caracterizado por condiciones de suelos ácidos, relativamente delgados y pobres, temperaturas extremadamente bajas y extrema sequedad (Schlatter, 1992; Donoso, 1995; Donoso *et al.*, 2004).

La especie también puede desarrollar un hábito de crecimiento conocido como crecimiento en roseta, donde si bien los brotes, se multiplican éstos no logran elongarse (**figura 11**). Esta situación ocurrió en cinco clones y fue irreversible, debiéndose probablemente a una adaptación natural de lenga, especie que suele crecer en forma achaparrada cuando se encuentra sometida a condiciones ambientales extremas (Donoso, 1981; Hueck, 1978).



Figura 11: Crecimiento en roseta de brotes *in vitro* del clon N° 50

Enraizamiento de brotes

El procedimiento implementado permitió obtener tasas de enraizamiento sobre 75% en todos los clones, presentando en promedio 2,3 raíces de un tamaño de 3 cm, al cabo de 25 días de iniciado el tratamiento de enraizamiento. No se observaron diferencias entre clones en cuanto a éstos parámetros.

Lenga es una especie que no presenta dificultades para el enraizamiento de brotes *in vitro*, los altos porcentajes de enraizamiento obtenidos demuestran su buena aptitud para la rizogénesis. En la **figura 12**, se muestran explantes enraizados de lenga.



Figura 12: Explantes enraizados de lenga, a los 25 días de iniciado el tratamiento de enraizamiento.

En ensayos preliminares anteriores, se observó que concentraciones de IBA superiores a 0,5mg/l provocaron una excesiva formación de callo en la base del explante y una menor tasa de enraizamiento. Además, la exposición por más de 15 días a la auxina, detuvo el crecimiento apical y la elongación de raíces, afectando posteriormente el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas durante la fase de aclimatación.

Por otro lado, en un medio sin hormona los brotes no lograron generar raíces, por lo tanto lenga es una especie que necesita de la aplicación exógena de auxinas para que ocurra la formación de raíces *in vitro*.

Aclimatación de plantas

En general los brotes enraizados exhibieron una buena respuesta a las condiciones proporcionadas durante su permanencia en la caja de aclimatación, siendo la mantención de un alta humedad, un factor que puede afectar la sobrevivencia. Al colocar brotes no enraizados en cajas de aclimatación no se produjo enraizamiento espontáneo de ellos, como ocurrió en el caso de raulí (Sabja *et al*, 2005).

Durante este período la sobrevivencia fue cercana al 100%, aún cuando las

plantas no mostraron un crecimiento importante en altura, se observó formación y elongación de raíces secundarias, lo que facilitó su crecimiento posterior en invernadero.

En condiciones de invernadero se obtuvo 70-80% de sobrevivencia, siendo importante mantener la temperatura mínima sobre 22° C, ya que en caso contrario las plantas entran en receso vegetativo, produciendo un retardo importante del crecimiento. En la **figura 13**, se muestran plantas aclimatadas de 10-15cm de altura, que se encuentran en proceso de crecimiento y acondicionamiento en vivero para su posterior plantación en terreno.



Figura 13: Plantas aclimatadas de lenga de 10 a 15cm de altura.

CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado permite la micropropagación operacional de clones selectos de lenga, situación que posibilita la utilización de esta técnica para transferir y masificar las ganancias genéticas obtenidas en el programa de mejoramiento genético de la especie, a plantaciones comerciales.

Lenga es una especie extremadamente sensible a cualquier estímulo negativo que la afecte, reaccionando mediante intensos procesos de oxidación y necrosis cuando las condiciones de cultivo no son apropiadas.

En la etapa de establecimiento de brotes *in vitro*, los factores que posibilitaron el inicio de los cultivos fueron la producción de brotes iniciales elongados y vigorosos, y su cultivo en el medio nutritivo L&D suplementado con poliaminas.

La adición de caseína hidrolizada al medio nutritivo BTM en la etapa de multiplicación, es muy efectiva para activar los procesos fisiológicos involucrados en la formación de brotes axilares múltiples, sin embargo la exposición prolongada a este compuesto lleva a una sobreestimulación de la brotación provocando necrosis y muerte de explantes. Esta reacción, se evita al alternar su uso entre subcultivos. De esta manera, en el medio con caseína

hidrolizada se induce la activación de yemas *in vitro* y en el medio carente de este compuesto, se produce el crecimiento y elongación de los brotes.

La tasa de multiplicación fue variable dependiendo del clon, inicialmente es lenta, pero a medida que transcurren los subcultivos ésta puede llegar a ser tan alta como 1:15 brotes cada 21 días. Para obtener tasas de proliferación aceptables, se requiere de al menos un período de 12 meses de cultivo.

Lenga es una especie que no presenta mayores dificultades en el enraizamiento *in vitro* de brotes y en la aclimatación de plantas micropropagadas.



BIBLIOGRAFÍA

- Ahuja, M. 1983. Micropropagation à la carte In: Micropropagation of woody plants, Forestry Science. v.41. Ahuja M.R. (ed). Kluwer Academic Publishers. Pp: 3 - 9.
- Ahuja, M. 1993. Biotechnology and Clonal Forestry. In: Ahuja M. and Libby, W. (Editors) Clonal Forestry I. Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag. Berlín. Pp:135-144.
- Arroyo, M.; Donoso, C.; Murúa, R.; Pisano, E.; Schlatter, R. y Serey, Y. 1995. Hacia un proyecto forestal ecológicamente sustentable. Conceptos, análisis y recomendaciones. Departamento de Investigación y desarrollo. Universidad de Chile. 253 Pp.
- Bais, H.; Sudha G. y Ravishankar, G. 2000. Putrescine and silver nitrate influence shoot multiplication, *in vitro* flowering and endogenous titers of polyamines in *Cichorium intybus* L. cv. Lucknow local. J. Plant Growth Regul. 19:238-248.
- Bais, H. y G. Ravishankar. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. Plant Cell. Tiss. and Org. Cult. 69: 1-34.
- Bartsch, N. y C. Rapp. 1995. Regeneración de Lenga (*Nothofagus pumilio*) en una tala rasa en hueco. En: Regeneración natural de la Lenga. Factores ecológicos. CIEFAP. Publicación Técnica N° 21. Esquel Pp: 49-73.
- Carson M.; Vincent T. y A. Firth. 1992. Control pollinated and meadow seed orchards of Radiata Pine. Mass Production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Synthesis IUFRO Symposium, Bordeaux. France. Pp: 100-109.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Communications Instituti Forestalis Cechosloveniae 13:7-39.
- Cheliak, W. 1991. Impact of biotechnology on forest genetic and physiology. International Symposium on Applications of Biotechnology to Tree Cell Culture, protection and Utilization. General Technical Report EN-152. US Forest Service. Pp: 3-4.
- CONAF; CONAMA; BIRF; Universidad Austral de Chile; Pontificia Universidad Católica de Chile y Universidad Católica de Temuco. 1999. Catastro y evaluación de los Recursos Vegetacionales Nativos de Chile. Informe Nacional con Variables Ambientales, Santiago, Chile.
- Cuevas, J. 2000. Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. J. Ecology 88: 840-855.
- Donoso, C. 1981. Tipos forestales de los bosques nativos de Chile. Documento de trabajo N° 38. Investigación y Desarrollo Forestal (CONAF, PNUD-FAO), Publicación FAO Chile.
- Donoso, C. 1995. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Ed. Universitaria, Santiago, Chile.
- Donoso, C.; Premoli, A.; Gallo, L. y R. Ipinza. 2004. Variación Intraespecífica en las

- especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Ed. Universitaria, Santiago, Chile. 420 p.
- González, M.; Ortiz, O. y S. Benedetti. 2006. Avances Biotecnológicos en Castaño: Multiplicación *in vitro* de Árboles Superiores. Actas II Congreso Latinoamericano IUFRO Bosques: la creciente importancia de sus funciones ambientales, sociales y económicas. La Serena, Chile, 23 al 27 de octubre de 2006.
- Haines, R. 1992. Mass propagation by cuttings biotechnologies and the capture of genetic gain. Mass Production technology for genetically improved fast growing forest tree species. Synthesis IUFRO Symposium, Bordeaux. France. Pp: 128-144.
- Heinemann, K.; Kitzberger T. y T. Veblen. 2000. Influences of gap microheterogeneity on the regeneration of *Nothofagus pumilio* in a xeric old-growth forest of north-western Patagonia, Argentina. Can. J. For. Res. 30: 25-31.
- Hermosilla, J. 1998. Desarrollo preliminar de protocolos para clonar in vitro la especie *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. 83p.
- Hueck, K. 1978. Los bosques de Sudamérica. Ecología, composición e importancia económica. GTZ Eschborn, BRD. 476 p.
- Ikemori, Y.; Penchel, R. y F. Bertolucci. 1994. Integrating Biotechnology into Eucalyptus Breeding. International Wood Biotechnology Symposium. August 31th- September 1st. Tokyo, Japan. Pp: 77-84.
- Ipinza, R.; Emhart V. y R. Morales. 2000. Ensayo de Progenie y Procedencia de Lengua en la Reserva Nacional Coyhaique. Informe final proyecto FONDEF D9712003: Establecimiento y Mejoramiento Genético de Lengua en las regiones Australes XI y XII.
- Jordán, M. y J. Veloso. 1991. Micropropagación de Raulí (*Nothofagus alpina*). Actas del Segundo Taller Silvícola. Concepción, Chile. nov, 5. Pp: 57-64.
- Jordán, M.; Veloso, J. y A. Sabja. 1996 Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P.et E.) Oerst., Fagaceae. Plant Cell Report 15: 795-798.
- Kleinschmit, J.; Khunara D.; Gerhold, H. y W. Libby. 1993. Past, Present and Anticipated Applications of Clonal Forestry. In: Ahuja, M. and W. Libby. (Editors). Clonal Forestry II. Conservation and Aplicación. Springer-Verlag. Berlin. Pp: 9-41.
- Lainé, E. y A. David. 1994. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. Plant Cell Reports, V13: 473-476.
- Libby, W. y M. Ahuja. 1993. Micropropagation and clonal options in forestry. In: Micropropagation of woody plants, Forestry Science. v41. Ahuja M.R. (ed). Kluwer Academic Publishers. Pp: 425 - 440.
- Mascareño, A. 1987. Evaluación de ensayos de semillación y regeneración de lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. Et Endl.) Krasser) bajo diferentes tratamientos a la cama de semillas en la reserva forestal Trapananda, Coyhaique, XI región. Tesis, Fac. Cs.

Forestales, U. Austral de Chile.

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

Martínez Pastur, G.; Arena M., y O. Caso. 1995. *In vitro* propagation of *Nothofagus obliqua* (Fagaceae). Australian Journal Botanic. 43:601-607

Martínez Pastur, G.; Arena M. y Caso, O. 1996 a. *In Vitro* propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil) Dim. Et Mil. Phytom. 58 (1) 1-7.

Martínez Pastur, G.; Arena M. y Caso, O. 1996 b. *In Vitro* propagation of *Nothofagus antarctica* a partir de yemas de renovales y esferoblastos de árboles adultos. Jornadas Forestales. Mendoza. Argentina. 2 p.

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

Premoli, A. 1997. Genetic variation in two widespread and a geographically restricted species of *Nothofagus*. Journal of Biogeography 24: 883-892.

Rebertus, A. y Veblen, T. 1993. Structure and tree-fall gap dynamics of old-growth *Nothofagus* forest in Tierra del Fuego, Argentina. Journal of Vegetation Science 4: 641-654.

Rebertus, A.; Kitberger T.; Veblen T., y Roovers, L. 1997. Blowdown history and landscape patterns in the Andes of Tierra del Fuego, Argentina. Ecology 78: 678-692.

Rusch, V. 1992. Principales limitantes para la regeneración de la Lenga en la zona NE de su área de distribución: variables ambientales en claros del bosque. CIEFAP, Publicación técnica N° 8. Pp: 61-73.

Sabja, A.; Ortiz, O. y Triviño, C. 2005. Micropropagación de árboles plus de raulí. En: Clonación de raulí, estado actual y perspectivas. Editado por Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR, INFOR, UACH. Pp: 41-58.

Schlatter, J. 1992. Requerimiento de sitio de Lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser). Seminario manejo forestal de la lenga y aspectos ecológicos relacionados. CIEFAP Publ. Téc. 8: 3-14.

Schmidt, H.; Caldente, J. y Peña, K. 1997. Seguimiento forestal ambiental del uso de bosque de lenga XII Región. CONAF, Intendencia de la XII Región de Magallanes y Antártida Chilena.

Seeman, P. y Zurita, A. 1995. Advances in Micropropagation of *Nothofagus alessandrii* Espinosa, a chilean endangered species. Combined Proceedings International plant Propagators Society. v 45:367-370.

Talbert, G.; Ritchie, G. y Gupta, P. 1993. Conifer Vegetative Propagation: An Overview from Commercialization Perspective. In: Ahuja M. and Libby, W. (Editors) Clonal Forestry I. Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin. Pp:145-181.

Tang, W.; Newton, R. y Outhavong, V. 2004. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiologia Plantarum*. 169 (3): 386-395.

Thorpe, T.; Harry, I. y Kumar, P. 1991. Application of Micropropagation to Forestry. In: *Micropropagation: technology and application*. Debergh P.C. & P.H. Zimmerman (eds.) Kluwer Academic Publisher. Pp: 311-336.

Veblen, T.; Donoso, C.; Kitzberger T. y Rebertus, A. 1996. Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forest. In: *Ecology and Biogeography of Nothofagus Forest*, Veblen, T., Hill R. y J. Read (eds). Yale University Press.





Este libro se terminó de imprimir
en el mes de marzo de 2007,
en los talleres de
Trama Impresores S.A.
Avda. Colón 7845,
Hualpén
Chile

Tiraje 500 ejemplares



INFOR

Instituto Forestal

CONCEPCIÓN

Camino a Coronel Km 7,5

San Pedro de la Paz

Casilla: 109-C

Fono: (56 - 41) 274 90 90

Fax: (56 - 41) 274 90 74

LA SERENA

Pedro Pablo Muñoz 234

Fono: (56 - 51) 21 61 34

Fax: (56 - 51) 21 31 46

SANTIAGO

Huérfanos 554

Casilla 3085

Fono: (56 - 2) 639 07 00

Fax: (56 - 2) 638 12 86

VALDIVIA

Fundo Teja Norte S/Nº

Casilla: 385

Fono: (56 - 63) 21 14 76

Fax: (56 - 63) 21 89 68

COYHAIQUE

Riquelme 147

Fono: (56 - 67) 23 35 85

Fax: (56 - 67) 23 35 85