# DESARROLLO DE UNA RAZA LOCAL DE *Eucalyptus globulus* TOLERANTE AL FRIO EN CHILE

Braulio Gutiérrez C.[1]; María Paz Molina B.[2]; Claudio Balocchi L.[3] ;Fernando Droppelmann F.[4]

## RESUMEN

La baja resistencia al frío de *Eucalyptus globulus* es el principal factor que restringe su desarrollo y limita su crecimiento y área de cultivo. Las especies alternativas sugeridas para plantar en aquellas áreas donde esta especie presenta limitaciones han evidenciado otras restricciones que las limitan como sustitutas de *E. globulus* en la industria de la celulosa.

Existen opciones tecnológicas para sobrellevar este problema. Entre ellas el mejoramiento genético tradicional, basado en la selección, evaluación y posterior masificación de individuos con mayor tolerancia, se perfila como una opción de gran interés.

En este contexto, el presente documento entrega una revisión de las distintas opciones tecnológicas para abordar el problema de la tolerancia al frío de E. globulus, y presenta la propuesta que está desarrollando INFOR, junto a la Cooperativa de Mejoramiento Genético, BIOFOREST y empresas forestales, a través del proyecto FONDEF "Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *E. globulus* Tolerante al Frío".

**Palabras Clave**: *Eucalyptus globulus*, Mejoramiento genético, Tolerancia al frío.

## ABSTRACT

The low cold resistance of *Eucalyptus globulus* is the main factor that affects its growth and restricts the cultivation areas. Alternative species suggested for cold zones have limitations for the Pulp Industry.

There are some options to face this problem. One of the most interesting is the traditional breeding and genetic improvement, based on selection, evaluation and finally mass production of the most resistant trees.

According to the above-mentioned reasons this paper reviews different options to face the problem of E. globulus cold tolerance, and shows a proposal wich is developing by INFOR, CMGF, Bioforest S.A. and chilean forestry enterprises, trought the FONDEF project "Genotypes Capture to Develop a Eucalyptus globulus cold-resistant line"

**Keywords:** Eucalyptus globulus, genetic Improvement, cold-resistance

[1] Instituto Forestal. Casilla 109 C, Concepción. bgutierr@infor.cl
[2] Instituto Forestal. Casilla 109 C, Concepción. mmolina@infor.cl
[3] BIOFOREST S.A. Camino a Coronel Km 15, Coronel. cbalocch@arauco.cl
[4] Coop. de Mejoramiento Genético. Casilla 567, Valdivia. fdroppel@uach.cl

## INTRODUCCIÓN

En Chile, *Eucalyptus globulus* es una de las especies forestales de mayor importancia económica, situación que obedece principalmente a su rápido crecimiento y a la calidad de su madera, especialmente para la fabricación de pulpa. En la actualidad representa la segunda especie más plantada en el país, totalizando en conjunto con otros eucaliptos, la cantidad de 350.000 hectáreas aproximadamente. Aún así, la competencia mundial a la cual está sometido el sector forestal chileno hace necesario desarrollar la mejor tecnología que maximice la productividad de estas plantaciones, siendo el mejoramiento genético una herramienta que permanentemente agrega crecimiento y valor a este recurso.

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

Reconociendo esta limitación de *E. globulus*, así como la necesidad de contar con material genético adaptado a condiciones de frío y capaz de exhibir rendimientos productivos rentables bajo tal restricción de sitio, se han identificado distintas alternativas reales y potenciales para mejorar la productividad de los cultivos de eucalipto en zonas con esta limitación de bajas temperaturas.

En el presente artículo se analizan algunas de tales opciones y posteriormente se presentan detalles de la alternativa propuesta por el Instituto Forestal, en conjunto con la Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal, Bioforest S.A. y Empresas e Instituciones asociadas a esa Cooperativa[5], para desarrollar una raza local de *E. globulus* tolerante al frío en Chile.

La opción que se detalla corresponde al proyecto “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *Eucalyptus globulus* Tolerante al Frío”, el cual se ha iniciado recientemente y es financiado por aportes de FONDEF y de las empresas e Instituciones responsables de su formulación y ejecución.

[5] Las empresas e instituciones que participan en este proyecto son: Bosques Cautín S.A.; Bosques Arauco S.A, Bioforest S.A.; CONAF; Forestal CELCO S.A.; Forestal Los Lagos S.A.; Forestal Tornagaleones S.A.; y Forestal Valdivia S.A.

## ANTECEDENTES GENERALES

El comportamiento de los eucaliptos ante las temperaturas bajas ha sido estudiado por diversos investigadores, tanto en condiciones de campo (Wilcox et al., 1980; Tibbits y Reid, 1987) como en condiciones controladas de laboratorio (Hallam y Tibbits, 1988; Bara et al., 1994; Prado et al., 1993). Por otra parte, las implicaciones fisiológicas de la resistencia al frío han sido estudiadas por Paton (1983).

Eldrige et al (1983) desarrollan un método no destructivo para analizar la resistencia al frío de los eucaliptos. Este se basa en mediciones de la conductividad eléctrica de discos foliares expuestos a temperatura de congelamiento. Técnicas bioeléctricas similares, relacionadas con evaluaciones de conductividad (Glerum, 1980; Serrano y Pardos, 1994) o potencial hídrico (Yelenosky y Guy, 1989) se han utilizado para estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta de las plantas ante las bajas temperaturas. También se ha efectuado investigación sobre la capacidad de aclimatación o endurecimiento de varias especies de eucalipto (Scarascia-Mugnoza et al., 1989) y algunas aproximaciones a índices de selección precoz (Marien, 1979; Pardos y Pita, 1989).

En el ámbito del análisis de proteínas, se han efectuado estudios para relacionar la resistencia al frío de clones de eucalipto con fenotipos isoenzimáticos (Kuzminsky y Malvoti, 1994) y se ha incursionado en la búsqueda de modificaciones bioquímicas durante el endurecimiento al frío de clones de eucalipto (Scarascia-Mugnosa y Kuzminsky, 1994).

Estudios conducidos sobre la mayoría de las especies más comunes de *Eucalyptus* coinciden en señalar que la capacidad de estas plantas para resistir el frío está relacionada con la exposición gradual a temperaturas moderadamente bajas (Harwood, 1980; Scarascia-Mugnozza y Kuzminski, 1994). Debido a su inmovilidad ellas deben efectuar ajustes estructurales o metabólicos para sobrellevar los factores de estrés. Así, la expresión de la constitución genética puede alterarse por factores ambientales que inducen o suprimen la producción de proteínas o enzimas específicas las cuales influyen en determinadas rutas o procesos metabólicos. Estudios efectuados por Guy (1990) determinan que las enzimas de plantas sometidas a bajas temperaturas evidencian cambios en su actividad cuando se comparan con plantas mantenidas en condiciones cálidas.

A pesar de la abundante literatura existente con relación al proceso de adaptación o aclimatación al frío de las plantas, aún no se conocen a cabalidad los mecanismos involucrados en tal proceso. Por lo mismo, importantes esfuerzos y recursos se han orientado a objetivos más prácticos, relacionados con la selección y masificación de individuos tolerantes al frío y su posterior incorporación en estrategias de mejoramiento genético por vía clonal o sexual.

Estudios para la masificación a través de micropropagación de individuos seleccionados por su resistencia al frío han sido efectuados por Boulay y Franclet (1983) y Franclet (1983). Mientras que estrategias de mejoramiento genético basados en este tipo de material u otras selecciones individuales han sido descritas por Van Wyk (1983) y Brune (1983).

## TECNOLOGÍAS ALTERNATIVAS

Reconociendo la vulnerabilidad de *E. globulus* a las bajas temperaturas, y atendiendo a las demandas de las empresas de pulpa, se han buscado alternativas de producción que permitan superar esta limitante. Al respecto, existen diferentes opciones para desarrollar soluciones a esta limitación. Estas abarcan desde el cambio de especie hasta el uso de organismos trangénicos, pasando por procesos de aclimatación gradual de las plantas al frío y soluciones derivadas de la aplicación de tecnologías tradicionales de mejoramiento genético. Entre estas últimas se destacan la selección y clonación de genotipos tolerantes y la hibridación de *E. globulus* con otras especies tolerantes al frío, como por ejemplo *E. gunnii.* o *E. nitens*

### Especies alternativas

*E. nitens es una* especie ampliamente reconocida por presentar una de las mejores combinaciones de resistencia al frío y vigor de crecimiento (Marquestaut et al, 1977; Lembke, 1977; Mc Kimm y Flinn, 1979; FAO, 1981; Darrow, 1984; Schönau y Purnell, 1987; Jhonson y Wilcox, 1989).

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

Aún así, si bien se han establecido cerca de 50.000 ha con esta especie, en la práctica se ha observado que la menor densidad de su madera y menores rendimientos pulpables, no la hacen muy atractiva como sustituto para *E. globulus* en la industria de la celulosa. Esta situación ha repercutido fuertemente en su precio y en el interés de empresas y propietarios por utilizarla en sus programas de forestación. En la actualidad se concentran esfuerzos importantes en desarrollar nuevos productos o aplicaciones, alternativas a la pulpa, a los cuales destinar las existencias de madera de *E. nitens.*

### Mejoramiento Genético Tradicional

En cuanto a las tecnologías tradicionales del mejoramiento genético, la hibridación constituye un enfoque adoptado para desarrollar resistencia al frío, al igual que la masificación de genotipos tolerantes mediante clonación. Ambos enfoques son complementarios.

Abundantes estudios se han efectuado en el área de la hibridación de especies de *Eucalyptus* (Cauvin *et al*., 1987; Tibbits *et al*., 1991; Dungey *et al.,* 1993; Martin, 1989; Volker, 1995). En Chile, Espejo *et al.* (1993, 1995) informan los resultados de hibridación entre *E. globulus* y *E. nitens*, mientras que en la actualidad Bioforest S.A. desarrolla un proyecto FONTEC CORFO para depurar procedimientos de hibridación y obtener progenies híbridas de *E. globulus* con especies tolerantes al frío.

La hibridación propone mezclar las características favorables de dos especies distintas en un descendiente común (híbrido). De esta forma, los cruzamientos híbridos de *E. globulus* con especies resistentes al frío (e.o. *E. gunnii*, *E. nitens*), teóricamente pueden generar una progenie que combine las características pulpables de *E. globulus* y la resistencia al frío de la especie complementaria.

En la práctica se observa que el desempeño de las progenies híbridas es muy variable, presentando una tendencia a expresar características intermedias entre las de las especies progenitoras puras. Esta situación ha sido confirmada para la resistencia al frío de híbridos F1 de *E. globulus* y *E. gunnii (*Manson y Potts, 1995), así como para la capacidad de enraizamiento de híbridos de *E. camaldulensis* X *E. globulus (*Awad y Gutiérrez, 1997*)*.
Las situaciones extremas en el comportamiento de los individuos híbridos, correspondientes en el mejor caso a heterosis (vigor híbrido) o en el peor de ellos a características anómalas o aberraciones, las cuales son mucho menos frecuentes. Aún así, como consecuencia del comportamiento intermedio del híbrido, este generalmente conlleva un sacrificio de las características deseables de cada padre.

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

Por otra parte, se reconoce que mejorar las características de las especies puras es, en primera instancia, una forma más directa que la hibridación, para mejorar una característica de interés en una especie determinada, asumiendo que la especie pura presenta la combinación de características de interés, por ejemplo los niveles de tolerancia al frío que se desea obtener. En este sentido, la masificación de genotipos seleccionados por combinar tolerancia al frío con otras características productivas de interés, a través de mecanismos de clonación, parece una forma más directa de sobrellevar las limitaciones que le imponen las bajas temperaturas a *E. globulus*. Este enfoque se basa en la presencia de individuos de muy buen desarrollo en plantaciones que crecen en zonas con alta incidencia de heladas.

Este enfoque resulta complementario al de hibridación, por cuanto es aplicable para masificar a los híbridos de interés. Además el mejoramiento de la tolerancia al frío de *E. globulus* es un aporte positivo para los programas de hibridación, ya que el mejoramiento de las especies puras tiene un impacto directo en el resultado del híbrido, permitiendo disminuir la participación de la especie complementaria en los híbridos resultantes. De esta forma, usando árboles resistentes al frío como padres se puede aumentar la participación genética de *E.globulus* en el híbrido, cruzando los F1 (híbridos) con el padre más deseable (*E. globulus).*

Se afirma que todos los métodos de clonación son aplicables en alguna medida a los eucaliptos, pero el que concentra la mayor atención es el enraizamiento de estacas, debido fundamentalmente al gran número de copias que se puede obtener a partir de un ortet o árbol seleccionado, a su menor costo con relación a otras técnicas (micropropagación) y por requerir menos laboriosidad y

evitar los problemas de incompatibilidad de los injertos (Ipinza y Gutiérrez, 1992; Gutiérrez et al., 1994).

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

Este enfoque ha sido empleado con notorio éxito en la empresa española ENCE. En este caso la selección se ha basado en la tolerancia a la sequía de *E. globulus*, pero el procedimiento también resulta aplicable a la tolerancia al frío.

## Transformación genética

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

A pesar del claro potencial de la ingeniería genética para contribuir al mejoramiento genético de los árboles forestales, el avance en la incorporación de genes de importancia comercial en los árboles ha sido lento. Esta tecnología ofrece un gran potencial para el mejoramiento genético, pero aún requiere de mayor desarrollo y claridad legal para su masificación operacional.

En las listas de caracteres apropiados para efectuar ingeniería genética se destacan la resistencia a herbicidas, a insectos, capacidad de enraizamiento, concentraciones de lignina y celulosa, y resistencia al frío (Griffin, 1995).

Avances relativamente recientes en el conocimiento de los mecanismos de resistencia al frío, particularmente el rol de las proteínas anticongelantes que se producen en las especies tolerantes a bajas temperaturas, sugieren que la incorporación en especies poco resistentes del gen que codifica para la síntesis de estas proteínas, puede conferirles resistencia adicional a la baja temperatura (Griffith *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1995). Evidencias observadas en otras especies sugieren que este es un enfoque posible.

Particularmente, estudios efectuados con *Deschampsia antartica* indican que esta planta es capaz de producir una alta cantidad de azucares, principalmente sacarosa y polímeros de fructosa, que ayudan a disminuir la temperatura de congelamiento de las plantas, de modo que aunque la temperatura sea muy baja, el tejido no se congela. Al respecto si se identifican los genes involucrados en este proceso, se podrían transferir a especies de interés económico que sean susceptibles al frío (Zuñiga, 2000)

## DESARROLLO DE TOLERANCIA AL FRIO DE *E. globulus* EN CHILE

Reconociendo las limitaciones que evidencia *E. globulus* ante las bajas temperaturas, el Instituto Forestal en conjunto con la Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal (CMGF), Bioforest S.A. e importantes empresas forestales del ámbito nacional, han desarrollado una propuesta de acción denominada “Captura de Genotipos para el Desarrollo de una Raza de *E. globulus* Tolerante al Frío”, la cual ha sido seleccionada por FONDEF para concurrir a su financiamiento.

El proyecto propuesto pretende incrementar la base genética de los programas de mejoramiento genético de las empresas e instituciones forestales asociadas a la CMGF, mediante la selección de árboles superiores identificados en plantaciones forestales de las empresas y pequeños propietarios en zonas con incidencia de heladas.

Operacionalmente se implementará un programa de selección de árboles plus para identificar individuos superiores de *Eucalyptus globulus* en las zonas de frío definidas por el proyecto. El sistema propuesto corresponde a una selección de baja intensidad (1 árbol cada 5 hectáreas) en plantaciones localizadas en áreas de baja temperatura, buscando individuos fenotípicamente superiores y que por estar en zonas de frío se presume presentan tolerancia a estas condiciones.

Los árboles identificados en las campañas de selección constituirán una base común, representada por un banco clonal, el que estará a disposición de los requerimientos de las empresas asociadas al proyecto.

Para efectos de operación, la metodología se divide en los tres módulos que se describen a continuación (selección, evaluación de enraizamiento y ensayos clonales).

### Selección

La identificación de los individuos superiores en cuanto a tolerancia al frío, se realiza anualmente durante la temporada de verano. En cada ocasión se individualizan del orden de 400 árboles en plantaciones con superficies superiores a 5 ha. Las plantaciones deben tener una edad mínima de 5 años y estar ubicadas en comunas (zonas) definidas como comunas de frío.

La selección corresponde a la búsqueda de individuos fenotípicamente superiores, "Plus", los que se comparan con los mejores 5 árboles presentes en un radio de aproximadamente 20 metros, con la finalidad de determinar la superioridad del árbol candidato. En este caso la captura del carácter tolerancia al frío corresponde a una selección indirecta, dado que los árboles se seleccionan sobre la base de su superioridad volumétrica, pero en zonas con alta incidencia de heladas.

Asociado a las labores de selección se efectúa la sanción o aprobación de los árboles seleccionados como candidatos para incorporarse al programa. En esta etapa se evalúa objetivamente la superioridad del individuo selecto y la conveniencia de integrarlo al programa.

Una vez aprobados los individuos selectos, a fines de invierno se habilitan para convertirlos en la fuente inicial de material para la confección de estacas enraizables. Para estos efectos se procede al volteo de

los árboles que se incluirán en el programa, con el objeto de inducir la formación de rebrotes de tocón que se utilizarán para movilizar al individuo selecto hasta el área de multiplicación clonal.

La etapa de habilitación culmina con la cosecha de los brotes, a comienzos del verano siguiente, y su despacho a invernadero, donde se realiza la evaluación de la capacidad rizogénica.

## Evaluación de capacidad rizogénica

Una vez producida la brotación, 3 a 4 meses después del volteo del árbol, se cosechan los retoños del tocón y se transportan a los invernaderos, donde son rigurosamente seleccionados. Posteriormente, y manteniendo un estricto control de la identificación del material genético, se procede a confeccionar las estacas e instalarlas en invernadero para la evaluación de enraizamiento.

Para la evaluación de enraizamiento de los clones en invernadero, se instalan 50 estacas por clon en 2 repeticiones (25 estacas x 2 repeticiones). Los clones (estacas) se evalúan parcialmente a los 45 días de su instalación. La evaluación definitiva se efectúa a los tres meses.

Se considera a un clon como “enraizable” cuando presente un enraizamiento superior al 50%, en este caso se le habilita como seto y pasa a formar parte del banco de clones para la generación de plantas para los ensayos clonales.

Los clones que presenten un enraizamiento de entre 30 y 50% se prueban nuevamente en una segunda fase. Esta vez las estacas no se cosechan en terreno, si no que de setos formados con las estacas enraizadas de la fase anterior. Esta segunda fase de evaluación se efectúa para eliminar la posibilidad de que no se hallan generado ramas adecuadas en el tocón o que halla existido un problema de transporte del material que hubiese afectado el enraizamiento del clon.

Con los clones enraizables de cada año, se forman setos para la producción de plantas para los ensayos clonales en la temporada siguiente. En este caso se deben instalar suficientes estacas para generar plantas homogéneas para todos los sitios donde se instalaran los ensayos clonales.

## Establecimiento de ensayos clonales.

Los clones que superen el 50% de enraizamiento en la primera o segunda fase de la evaluación de su capacidad rizogénica, serán dispuestos en ensayos clonales en terreno.

El diseño de los ensayos considera que cerca del 5% de los árboles seleccionados anualmente, llegarán a la etapa de ensayo clonal. Estos se establecerán en bloques al azar (12 a 15 bloques) con parcelas de un árbol (diseño STP). Junto con los rametos de cada clon se utilizarán tres lotes testigos representados por 30 plantas cada uno. Cada ensayo se repite en dos localidades de frío y 8 localidades de crecimiento patrimonial normal. De esta forma se establecen 10 ensayos por cada grupo de árboles seleccionados anualmente, dos de los cuales serán para medir la capacidad de tolerar frío extremo y 8 para medir crecimiento y calidad de los clones.

Los ensayos serán evaluados a la edad de 1, 2, 3, 5, 7 y 10 años. La evaluación realizada a los 5 años será la base para iniciar la propagación operacional destinada al establecimiento de plantaciones clonales pilotos con los clones seleccionados.

## RESULTADOS ESPERADOS

Como consecuencia de implementar el programa esbozado en el apartado anterior, se desarrollará un paquete tecnológico denominado "clones de *E. globulus* tolerantes al frío". Tales clones podrán ser incorporados directamente por las empresas en sus programas de forestación. Opcionalmente, podrán utilizarlos como una población de infusión que aporte tolerancia la frío en sus respectivos programas de mejoramiento. Los protocolos de propagación y de evaluación de tolerancia al frío conformarán elementos adicionales, complementarios, que en el caso de ser demandado por los usuarios podrán ser transferidos bajo acuerdo comercial entre las partes.

La utilización del material desarrollado en esta propuesta permitirá aumentar los rendimientos del proceso de producción forestal, permitiendo la incorporación de áreas de cultivo actualmente subutilizadas debido a las restricciones de temperatura. Se estima una superficie de 500.000 ha adicionales que pudieran incorporarse como superficie susceptible de plantar con este nuevo material. Al mismo tiempo se espera una disminución de los daños por heladas y un mejoramiento en la productividad en la distribución actual de plantaciones. En la precordillera de Los Andes existen suelos de extraordinaria calidad para la producción de *E. globulus*, pero actualmente no están disponibles por una limitante de frío, cuestión que podría solucionarse con los resultados de este proyecto.

En resumen, el programa expuesto permitirá complementar y fortalecer los programas de mejoramiento genético de *E. globulus* en curso, ofreciendo una mayor diversidad y amplitud a la base genética que los sustenta. Acrecentará los rendimientos del proceso de producción forestal, permitiendo la incorporación de áreas de cultivo actualmente subutilizadas debido a las restricciones de temperatura y disminuirá las pérdidas de crecimiento y mortalidad por heladas, en la zona de distribución actual de las plantaciones de *E. globulus*.

## BIBLIOGRAFÍA


Awad, G. y Gutiérrez, B. 1997. Evaluación de la capacidad rizogénica de progenies híbridas F1 de *Eucalyptus camaldulensis X E. globulus*. Chile Forestal nº 247, Marzo 1997.

Balocchi, C. 1991. Principios de Genética Forestal. U. Austral de Chile. Valdivia 180 p.

Balocchi, C; Jayawickrama, K. y Pérez, E. 1992. Octavo informe anual (1989; 1991). Cooperativa de Mejoramiento Genético. Uach-Conaf-Empresas forestales. 56 p.

Bara, S.; Español, E.; Vega, G. y Rodriguez, E. 1994. Test of Frost Resistance of Eucalyptus. En: Eucalyptus for Biomass Production. Editores Pereira, J. y Pereira, H. Lisboa, Portugal. Pp: 155-167

Boulay, M. y Franclet, A. 1983. Micropropagation de clones ages d'eucalyptus selectionnes pour leur resistance au froid. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 587-601.

Brune, A. 1983. Strategie de l´amelioration des eucalypts spp. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 483-490.

Cauvin, B.; Potts, B. y Potts, W. 1987. Eucalyptus: hybridation artificielle-barriers et heredite des caracteres. Annales de la Receherche Silvicoles, 1986. AFOCEL, Paris. Pp: 255-303.

Chandler, S. 1995. Comercialisation of genetically engineered trees. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield and quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 381-385.

Darrow, K. 1984. Provenance estudies of frost resistant eucalypts in South Africa. South African Forestry Journal 129: 31-39.

Dungey, H.; Volker, P; Potts, B. y Owen, J. 1993. Interespecific hibridisation between *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*: Preliminary analysis of early growth and frost resistance. En: Proceedings of the 12° Meeting of Research Working Group 1 (Forest Genetic) of the Australian Forestry Council. Canberra, 15-18 february, 1993. Pp:104-106.

Edwards, G.; Fish, N.; Fuell,M.; Keil, J.; Purse, J, y Wignall, T. 1995. Genetic Modifications of Eucalypts. Objectives Strategies and Progress. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield andquality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 389-391.

Eldrige, K.; Owen, J.; Griffin, A. y Harwood, C. 1983. Development of a method for assessing frost resistance of eucalyptus. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 145-152.

Ellis, D.; McCabe, D.; McInnis, S.;Ramachandram, R.; Rusell, D.; Wallace, K.; Martinelle, B.; Roberts, D.; Raffia, K. y McCown, B. 1993. Stable transformation of Picea glauca by particle acceleration. Bio technology 11: 84-89.

FAO. 1981. Eucalypts for planting. FAO Forestry series N° 11. Rome, Italy. 677 p.

Franclet, A. 1983. Perspective pour la micropropagation des eucalyptus résistan au froid. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 625-636.

Gardiner, Craig Y D. Crawford. 1988. Seed Collection of *Eucalyptus globulus* ssp *globulus* Labill. for Tree Improvement Purposes. Australian Tree Seed Centre CSIRO Division of Forestry and Forest Products, Canberra, Australia.

Glerum, C. 1980. Electrical impedance Techniques in physiological studies. N.Z. For. Sci. 10(1):196-207.

Griffin, A. 1995. Genetic modification in Eucalyptus breeding. Bridging the gap between tha laboratory and plantation. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield andquality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 398-402.

Griffith, M.; Ala, P.; Yang, D.; Hon, W. y Moffatt, B. 1992. Antifreeze proteins produced endogenously in winter rye leaves. Plant Physiol. 100:593-596.

Gutiérrez, B.; Ipinza, R. Y Chung, P. 1994. Propagación vegetativa y silvicultura clonal en eucalipto. Ciencia e Investigación Forestal Vol 8 (1):139-175.

Gutiérrez, B. 1995. Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. Ciencia e Investigación Forestal. Vol 9(2): 261-277

Hallam, P. y Tibbits, W. 1988. Determination of frost hardiness of Eucalyptus usin the electrical conductivity of diffusate in conjunction with a freezing chamber. Cann. Jour. For. Res. 18: 595-600.

Harwood, C. 1980. Fost resistance of subalpine Eucalyptus species . I. Experiments using a radiation frost room. Aust. Jour. Bot. 28: 587-599

Infante, P.; Ipinza, R. y Prado, J. 1991. Bases para la mejora genética de las especies del género Eucalyptus en Chile. Ciencia e Investigación Forestal, Junio, 1991.

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

Johnson, G. y Wilcox, M. 1989. Eucalypt species trials on pumiceland. New Zealand Forestry 34(1):24-27.

Kirkmann, P. 1994. Short course on tree breeding techniques. Forestek, Nelspruit. Division of Forest Science and Technology. Volumen I. 22 p.

Kuzminsky, E. y Malvoti, M. 1994. Isoenzimatic Phenotypes related to cold hardening in Eucalyptus clones. En: Eucalyptus for Biomass Production. Editores Pereira, J. y Pereira, H. Lisboa, Portugal. Pp: 181-190

Lembke, C. 1977. N.Z. Forest Products Ltd. turns to eucalypts. Aust. For. Ind. Jour. 43(7): 26-31.

Martin, B. 1989. The benefits of hibridisation: How do we breed for them?. En: Proceeding of the IUFRO Conference: “Breeding Tropical Trees: Population Structure and Genetic Improvement Strategies in Clonal and Seedling Forestry”. Pp: 79-92.

Marien, J. 1979. La selectione juvenile des eucalyptus pour leur resistence au froid. Annales de la Recherches Sylvicoles. AFOCEL, France. Pp: 224-253

Manson, A. y Potts, B. 1995. Inheritance of frost resistance in F1 and advanced generations hybrids of Eucalyptus globulus and E. gunnii. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield andquality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 249-250.

Marquestaut, J.; Thibout, H. y Cauvin, B. 1977. Essai d'introduction d´eucalyptus dans le midi de la France. Annales de la Recherche Sylvicole, AFOCEL. 1977.

Mc Kimm, R. y Flinn, D. 1979. Eucalypt species, site preparation and fertilizer requirements for reforestation of the Toorongo Plateaux in Central Victoria. Aust. For, 42(2):117-124.

Paton, D. 1983. Physiology of frost resistance in eucalyptus. Colloque International Sur les Eucalyptus Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 107-125.

Pardos, J. y Pita, P. 1988. Resistence aus geles de plants d'Eucalyptus globulus: evaluation avec des techniques bioelectriques. En: Les Estrategies de selection face aux technologies modernes. Versailles, France. 57 p.

Prado, J.A.; Parra, P.; Molina, M.; Ipinza, R. y Löewe, V. 1993. Antecedentes sobre la resistencia al frío de procedencias y familias de *Eucalyptus globulus*. En: Actas del Simposio: Los eucaliptos en el Desarrollo Forestal de Chile. Pucón, Chile. 24-26 de noviembre de 1993. Pp: 439-452.

Scarascia-Mugnozza, G.; Valentiny, R. Kuzminski, E. y Giordano, E. 1989. Freezing mechanism, aclimation processes and cold injury in eucalyptus species planted in the mediterranean region. Forest Ecology and Management 29: 81-94

Scarascia-Mugnozza, G. y Kuzminski, E. 1994. Biochemicals modifications in cold hardening of *Eucalyptus* spp. clones. En: *Eucalyptus* for Biomass Production. Editores Pereira, J. y Pereira, H. Lisboa, Portugal. Pp: 143-154.

Schönau, A. y Purnell, R. 1987. A different approach to site evaluation and some preliminary results. South African Forestry Journal 114: 19-25.

Serrano, L. y Pardos, J. 1994. Hardening and cold resistance in *Eucalyptus globulus*: Water Relations and bioelectrical tests of frost injury. En: *Eucalyptus* for Biomass Production. Editores Pereira, J. y Pereira, H. Lisboa, Portugal. Pp: 134-142.

Shelbourne, C. 1969. Provenance seed stands and provenance conservation stands. DANIDA. Technical Note nº 14. 42 p.

Shimizu, J. 1988. Propagación Vegetativa en el Mejoramiento Genético de Plantaciones Industriales. Ciencia e Investigación Forestal. 2(2): 27-33.

Singh, J. y Laroche, A. 1988. Freezing tolerance in plants: a biochemicals overview. Biochem. Cell Biol. 66:650-657.

Tibbits, W. y Reid, J. 1987. Frost resistance in *Eucalyptus nitens*: genetic and seasonal aspects of variation. Aust. For. Res. 17: 29-47.

Tibbits, W.; Potts, B. y Savva, M. 1991. Inheritance of freezing resistance in interespecific F1 hybrid of *Eucalyptus*. Theor. and Appl. Gen. 83: 126-135.

Van Wyk, G. 1983. Progress with the breeding of frost tolerant eucalypts in the Republic of South Africa. Colloque International Sur les *Eucalyptus* Resistants au Froid. Bordeaux, France. 26-30 septembre 1983. Pp: 523-532.

Volker, P. 1995. Evaluation of *Eucalyptus nitens x globulus* for commercial forestry. En: Conference CRCTHF-IUFRO, Eucalypt plantations: Improving fibre yield and quality. Hobart, Australia, 19-24 de febrero. Pp: 222-225.

Wilcox, M.; Faulds, T. ; Vincent, T. y Poole, B. 1980. Genetic variation in frost tolerance among open pollinated families of *E. regnans*. Aust. For. Res. 10: 169-184.

Yelenosky, G. y Guy, C. 1989. Freezing tolerance of citrus, spinach and petunia leaf tissue. Plant Physiol. 89: 444-451.

Zobel, b. y Talbert, J. 1988. Técnicas de Mejoramiento Genético de Arboles Forestales. Ed. Limusa S.A., México. 545 p.

Zuñiga, G. 2000. *Deschampsia antartica*: La planta que viene del frío. Bioplanet 1(5):30-32