
ENSAYOS DE HIBRIDACIÓN ARTIFICIAL OSP en *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* CON ESPECIES TOLERANTES AL DÉFICIT HÍDRICO

Patricio Rojas¹, Sandra Perret¹ y María Paz Molina²

RESÚMEN

La especie más importante para la producción de pulpa y celulosa de fibra corta en Chile es *Eucalyptus globulus* debido a sus excelentes propiedades físicas, químicas y mecánicas de la madera y su rápido crecimiento. En los mejores sitios la productividad puede alcanzar 40 m³/ha/año considerando material genéticamente mejorado, como clones o familias de hermanos completos (*full-sib families*). Sin embargo, la presencia de heladas en la zona centro sur del país y el extenso período seco de la zona centro norte son factores limitantes de importancia para el establecimiento de plantaciones con la especie, o la extensión de su cultivo en otros ambientes forestales. INFOR ha desarrollado un largo y extenso programa de investigación desde la década de los sesenta, incluyendo la selección de especies, procedencias, familias y clones en diferentes unidades edafoclimáticas del país. Como consecuencia, en la zona árida de Chile, donde las precipitaciones anuales varían entre 100 y 250 mm, *E. camaldulensis*, *E. cladocalyx* y *E. sideroxylon* han sido seleccionadas para la repoblación forestal de sitios considerados marginales en las zonas áridas con tendencia mediterránea, las que son denominadas como especies "bases".

Estas especies presentan una comprobada tolerancia al déficit hídrico, pero naturalmente, debido a las condiciones climáticas en las que son establecidas, los árboles presentan una o varias características restrictivas para su uso industrial, como lento crecimiento (4 - 7 m³/ha/año), forma de los árboles, o las propiedades tecnológicas de la madera. El diseño y establecimiento de una matriz de cruzamientos híbridos entre las especies bases y aquellas como *E. globulus*, denominadas como especies "mejoradoras", forma parte de una estrategia de selección genética con fines de mejoramiento de características múltiples. *E. camaldulensis* es una especie que ha presentado comprobada tolerancia a climas semiáridos, cuando ha sido comparada con otras especies del género, posee una alta variabilidad genética por lo cual ha sido plantada extensivamente en diferentes partes del mundo. Su madera es de alto poder calorífico (4.800 kcal/kg), pero la alta concentración de extraíbles de la madera (lignina) limita su uso industrial como materia prima para la industria de la celulosa y el papel.

Aunque existen herramientas biotecnológicas para la recombinación genética entre especies, de alta tecnología, como fusión de protoplastos, transferencia de genes y otras, éstas son de elevado costo y requieren de equipamiento altamente tecnológico, entre otros aspectos. Por ello, se ha propuesto una tecnología de hibridación artificial más apropiada a los recursos existentes en la zona semiárida de Chile, por su bajo costo y factibilidad de implementación.

¹ Sede Diaguitas, La Serena IV Región. parojas@cl, sperret@infor.cl

² Unidad de Biotecnología, Concepción, VIII Región mmolina@infor.cl

Investigación financiada por FDI/CORFO. Proyecto tecnológico "Desarrollo de plantaciones forestales económicamente rentables con individuos resistentes al déficit hídrico y de alta productividad en la zona semiárida de la IV Región".

El presente trabajo resume los resultados obtenidos con la aplicación de la polinización en una sola visita (*one stop pollination*) en madres de *E. globulus* y *E. camaldulensis* para la generación de semillas híbridadas. La semilla obtenida de los cruzamientos será probada en ensayos de progenies híbridadas y también empleada como plantas madres para su propagación clonal y posterior uso en programas operacionales de plantación.

Palabras claves: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus*, hibridación, zonas semiáridas.

POLLINATION TRIALS USING OSP TECHNIQUE ON *Eucalyptus globulus* AND *E. camaldulensis* WITH DROUGHT RESISTANT *Eucalyptus* SPECIES

SUMMARY

One of the most important exotic species for pulp and paper production in Chile is *Eucalyptus globulus* due to exceptional chemical and physical wood properties and tree fast growing. In the best sites (costal and mild temperate zones of the south of Chile) with the right silviculture technology and improved genetic material (controlled crosses seed, elites clones propagated by cuttings) the species can achieve more than 40 m³/ha/year.

Nevertheless, there are some limitations to extend commercial plantations for other zones in Chile. Frost damage is the main problem for planting in the south and a long dry season in the north and interior valleys (called "secano"). INFOR which is the forest research branch of the Chilean state has been developing a large tree breeding program that included species / provenance / progeny trials, o.p. family's selections and elite clones for different soil and climatic conditions.

INFOR has selected three species denominated "base species": *Eucalyptus camaldulensis*, *E. cladocalyx* and *E. sideroxyton* for the semiarid zone with an annual rainfall less than 100 mm which show good adaptation to drought and soil conditions, but have one or more restrictions for industrial and commercial uses like slow growth (4 - 7 m³/ha/year), deficient form of the trees and low quality of wood properties.

Based on genetic strategies to improve drought tolerance of genotypes, a controlled cross matrix was designed with bases species and those like considered as "improved species" using OSP technique. Reciprocal crosses considered *E. camaldulensis* which is well adapted to drought and has a high genetic variability. The species has been widely planted in the world for bioenergy due to high calorific wood properties, nevertheless a high wood lignin content limits the use for pulp and paper industry.

Considering the high cost of emergent technological tools, like protoplast fusion and genetic transformation for gene recombination of selected material between species, the proposed technique for artificial hybridization is closer of social reality of the semiarid zone of Chile due to low cost and feasibility of implementation.

This paper shows preliminary results of hybrid seedlings and clones obtained by using OSP technique on *E. globulus* and *E. camaldulensis* females that will be planted on progeny and clonal trials for operational production using mother plants.

Key Words: *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus*, hybridization, semiarid zones

INTRODUCCIÓN

El programa de hibridación de *Eucalyptus* de INFOR tiene como objetivo generar semillas de cruzamientos interespecíficos por polinización artificial entre especies con algún potencial económico para las zonas semiáridas de Chile. La semilla de cruzamientos será probada en ensayos de progenies híbridas y también empleada como plantas madres para su propagación por estacas.

Para ello, INFOR ha seleccionado especies que han demostrado buena adaptación a zonas que presentan déficit hídrico y que además su madera presenta propiedades tecnológicas de interés comercial. Entre las especies potenciales para las zonas semiáridas se ha seleccionado especies bases y mejoradoras¹ de acuerdo a los resultados de ensayos de progenies/procedencias de INFOR como: a) *Eucalyptus camaldulensis*, especie de gran resistencia a climas semiáridos y de alta variabilidad genética en su distribución natural. La madera es de alto poder calorífico (4.800 Kcal/kg), pero su alta concentración de extraíbles (lignina) dificulta su uso industrial para la producción de pulpa. La especie se propaga fácilmente por estacas y su hibridación artificial con otras especies también ha resultado exitosa. La especie es muy afín con *Eucalyptus tereticornis* según su taxonomía. La mejor procedencia probada en Chile y otras latitudes de climas templados es Lake Albakutya, material sobre el que se ha concentrado los cruzamientos híbridos del presente programa. b) *Eucalyptus sideroxylon*, ha demostrado buenos resultados de adaptación a sitios con déficit hídrico, sin embargo la forma y el crecimiento evaluado en parcelas experimentales ha sido menor que otras especies forestales probadas en ambientes áridos. La corteza es rica en taninos y su madera es muy densa, llegando a valores cercanos a los 1.000 g/cm³, y c) *Eucalyptus cladocalyx* que constituye la especie de mayor potencial para la zona semiárida de Chile, debido a la forma, crecimiento de los árboles y propiedades tecnológicas de su madera. La especie, sin embargo, presenta incompatibilidades genéticas asociadas al número y forma de los cromosomas para el cruzamiento con otras especies del mismo género (Ruggeri, 1961; citado por Eldridge *et al.*, 1993)

Entre las especies consideradas "mejoradoras" de las características de crecimiento y de las propiedades tecnológicas de la madera se encuentra

Eucalyptus globulus, de gran adaptación en Chile en zonas con precipitación anual superior a los 500 mm y sin presencia de heladas. Esta especie es de gran importancia industrial debido a las excelentes propiedades de su madera para la producción de pulpa. La especie presenta incompatibilidades unilaterales para el cruzamiento con especies de flores pequeñas, por lo cual es necesario efectuar diversos tratamientos al estilo de la flor para asegurar la fecundación de los óvulos de las especies receptoras (Potts, 2003). El objetivo de la estrategia de mejoramiento es generar semilla híbrida de *Eucalyptus* a través del sistema de polinización en una sola visita (OSP) (Harbard, 1999), ya sea en flores de *E. globulus* o *E. camaldulensis* como madres. El objetivo de la hibridación en flores de *E. camaldulensis* es mejorar sus características de crecimiento y propiedades de la madera. La hibridación basada en *E.*

¹ Especies bases: de gran adaptación a condiciones de secano, pero con limitaciones de crecimiento y/o propiedades tecnológicas de la madera, por ej. *E. camaldulensis*. Especies mejoradoras: buen crecimiento, propiedades tecnológicas de la madera, pero con poca tolerancia a la sequía, por ej. *E. globulus*

camaldulensis es una estrategia válida para las zonas semiáridas, debe sin embargo notarse que las experiencias de híbridos F_1 (dependiendo de los genotipos usados como polen) pueden ser en algunos casos menos resistentes a la sequía que las especies puras, lo cual debe ser comprobado en los ensayos de progenies híbridas.

Algunas investigaciones realizadas en Australia señalan que la resistencia al *stress* hídrico es intermedia entre los padres. Por ejemplo el híbrido F_1 , *E. camaldulensis* x *E. grandis* puede ser de mejor forma que *E. camaldulensis*, pero sucumbir a un *stress* hídrico más rápidamente. Según Bush (Comunicación personal, 2004)², la estrategia más razonable es la propagación clonal o el cruzamiento controlado entre los mejores individuos (CP) de las mejores familias. Según otros autores una forma de fijar características deseables en los genotipos híbridos es efectuar "retrocruzamientos" o "backcrossing". De esta forma el polen colectado en las progenies híbridas es cruzado con el progenitor de mayor valor comercial, por ejemplo cruzar el polen híbrido *E. camaldulensis* x *E. globulus* sobre madres de *E. globulus* en una segunda generación (F_2). El nivel de inversión económica en un programa de hibridación debe ser ponderado en función de los sitios potenciales de plantación.

OBJETIVOS

El objetivo de la investigación es explorar la factibilidad de producir semilla híbrida de *E. globulus* y *E. camaldulensis* a través del sistema de polinización en una sola visita. Para este propósito se evalúa en las madres de *E. globulus* el efecto de la madre (clon), el genotipo del polen, el tipo de yema floral, diferentes tipos de cortes en el estilo/estigma de la flor y el efecto del aislante. En el caso de los cruzamientos en *E. camaldulensis* se evalúa el efecto del estadio floral y del aislante usado.

MATERIAL Y MÉTODO

El Sistema de Polinización Artificial de una sola Visita OSP (*One Stop Pollination*)

Los sistemas tradicionalmente usados en la polinización artificial demandaban al menos tres visitas al árbol, la primera para determinar la receptividad del estigma para efectuar la polinización, la segunda para emascular, polinizar y aislar la flor y la tercera para retirar los aislantes de la flor para evitar la contaminación. El desarrollo de una nueva tecnología, iniciada en Chile y simultáneamente en Australia en la década de los noventa (Harbard *et al*, 1999; Williams *et al*, 1999), permitió reducir a una sola visita estas tres operaciones, reducir drásticamente los costos de las polinizaciones artificiales y permitir la producción de semillas híbridas (intraespecíficas) a gran escala. De esta forma las principales empresas forestales del país producen semillas de cruzamientos controlados "*full sib*" de los clones de mayor ranking genético de los huertos, constituyendo una alternativa a la plantación de clones.

² David Bush, CALM, Australia. Visit Report to Chile, INFOR. 28th-7th May, 2004.



Trabajo Polinización OSP



Flor en Ántesis *E. globulus*



Flor Polinizada OSP

Figura N° 1 POLINIZACIÓN ARTIFICIAL

La tecnología OSP se sustenta en lo siguiente : a) no es necesario esperar el proceso natural de maduración del estigma para su receptividad del grano de polen y asegurar el éxito de la fertilización de los óvulos y b) el uso de bolsas aislantes no es la única forma de proteger las flores de la contaminación por los insectos. Debido a que *E. globulus* presenta incompatibilidades unilaterales para el cruzamiento con especies de flores pequeñas, fue necesario efectuar diversos tratamientos al estilo de la flor para asegurar la fecundación de los óvulos de las especies receptoras (Potts, 2004).

Ensayo de Polinización en *E. globulus*. Huerto Clonal Anilehue (IX Región)

Las polinizaciones fueron efectuadas en el Huerto Semillero Clonal Anilehue, perteneciente a Forestal y Agrícola Monteaguila (FAMASA) y ubicado en las proximidades de Angol (IX Región). El huerto tiene una superficie de 6 hectáreas y tiene en la actualidad 22 clones, cuya ganancia genética estimada en volumen varía entre 7 y 29.7%. Se seleccionaron cuatro clones de acuerdo a su ranking genético, disponibilidad y acceso a las flores con escalas de 3 metros y baja tasa de abortos. El polen fue proporcionado por CSIRO/ALRTIG³ desde Australia, incluyendo 3 genotipos: de *E. camaldulensis* (C1,C2,C3), 1 genotipo

de *E. tereticornis* y 1 genotipo de *E. benthamii*. La empresa FAMASA colaboró con el polen mix 751 de *E. globulus*, que fue empleado en los cruzamientos OSP que sirvieron de control a los cruzamientos híbridos. El diseño consideró 7 tratamientos OSP más 2 controles; uno de polinización artificial OSP con polen mix de *E. globulus* y otro de polinización abierta. Los tratamientos de polinización fueron asignados al azar dentro del árbol, siendo la unidad experimental de 20 polinizaciones por rama. El número de réplicas (ramas/árbol) fue desigual entre clones.

Cuadro N° 1
DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO DE POLINIZACIÓN ARTIFICIAL EN *E. globulus*

Tratamiento	Descripción protocolo de polinización
1	Testigo, yemas florales de polinización abierta
2	Yemas florales no dehiscentes, corte transversal de 1/3 del estilo, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón.
3	Yemas florales no dehiscentes, corte oblicuo de 1/3 del estilo, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón.
4	Yemas florales no dehiscentes, corte longitudinal 1/3 del estilo, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón.
5	Yemas florales dehiscentes, emasculación con bisturí curvo, corte transversal de 1/3 del estilo, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón
6	Yemas florales dehiscentes, emasculación con bisturí curvo, corte oblicuo de 1/3 del estilo con tijeras quirúrgicas, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón.
7	Yemas florales dehiscentes, emasculación con bisturí curvo, corte longitudinal 1/3 del estilo, polinización y aislación con Tygon sellado con algodón.
8	Yemas florales no dehiscentes, emasculación con bisturí curvo, corte transversal de 1/3 del estilo, polinización y sin aislante.
9	Control OSP Forestal Monteagulla. Polinización corte del estigma en forma longitudinal, hasta del largo del estilo y aplicación de polen mix con mondadientes, sin aislante

Ensayo de Polinización en *E. camaldulensis*. Predio El Tangué (IV Región)

Las polinizaciones fueron efectuadas en El Tangué (Tongoy, IV región), con personal de la misma Comunidad Agrícola que fue capacitado para efectuar los diferentes tratamientos de polinización. Para esto se aisló flores cercanas al estadio de ántesis, se las emasculó y aisló con bolsas. Al segundo día, una vez receptivo el estigma se aplicó la polinización en las flores.

³ Commonwealth Scientific Research Research Organization. Australian Low Rainfall Tree Improvement Group



Yemas en Ántesis.



Emasculación con Bisturi



Aislamiento con Bolsa

Figura N° 2
PROCESO DE POLINIZACIÓN ARTIFICIAL

Se usaron 4 madres y 6 genotipos de polen de diferentes especies, 2 de *E. camaldulensis* (C2, C24), 2 de *E. globulus* (EGG, G00066), 1 de *E. grandis* y 1 de *E. tereticornis*. Los árboles corresponden a una plantación de la Hacienda El Tangué, que fueron seleccionados por el estadio de floración predominante (yemas en ántesis y pre-ántesis) y por la accesibilidad de las flores desde el suelo o con escala de 3 metros.

Los tratamientos de polinización fueron asignados al azar dentro del árbol, siendo la unidad experimental de 25 polinizaciones por rama. El número de réplicas (ramas/árbol) fue desigual entre clones.

Cuadro N° 2
DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO DE POLINIZACIÓN ARTIFICIAL EN *E. camaldulensis*

Tratamiento	Protocolo de polinización
1	Testigo de polinización abierta
2	Técnica OSP. Yemas florales en ántesis, dehiscentes. Corte 1 mm del estilo, polinización, sin aislante.
3	Yemas en ántesis. Emasculación con bisturí curvo. Aislación de la flor con bolsa con ventana. 2 días después retiro de la bolsa y polinización sin corte del estilo. Aislación con bolsa. Retiro de la bolsa 10 días después.
4	Selección de yemas florales pre-ántesis, no dehiscentes. Corte 1 mm del estilo, polinización, sin aislante. Identificación de la cruz.
5	Operacional. Selección de yemas florales ántesis, dehiscentes, no dehiscentes. Corte 1 mm del estilo, polinización, sin aislante.

Colecta de las Cápsulas y Procesamiento de las Semillas

Las cápsulas de los cruzamientos híbridos efectuados en Anilehue (Angol, IX Región) y de El Tangué (Tongoy, IV Región) fueron colectadas en bolsas de papel individual, manteniendo la identificación de las cruzas para el secado y procesamiento de las cápsulas. En el caso de ambos tipos de cápsulas se efectuó un secado a 25° C en estufa por un período de 24 horas.



Secado de las Cápsulas



Limpieza Bajo Lupa



Semillas Híbridas

Figura N° 3
PROCESO DE EXTRACCIÓN DE SEMILLAS

Las cápsulas fueron mantenidas en placas Petri o envases de vidrio, manteniendo la identificación de la combinatoria híbrida específica. Para la limpieza de las semillas se usó una lupa electrónica, de forma de separar con un pincel paráfisis (óvulos no fertilizados). En el caso de los cruzamientos en *E. globulus* esto resultó sencillo, por cuanto las semillas son de color más oscuro y de forma y tamaños diferentes. En el caso de los cruzamientos en *E. camaldulensis* la separación se efectuó en base a la forma de las potenciales semillas, ya que el color y el tamaño de la paráfisis son similares a las semillas, lo cual no permite su separación a simple vista.

Análisis Estadístico

Para la evaluación estadística considero un modelo ANOVA para un diseño completamente aleatorizado en la cual la variable respuesta a los tratamientos de polinización híbrida fue la cantidad de semillas obtenida por polinización efectuada, según la siguiente fórmula :

$$\text{Semilla híbrida / flor polinizada} = (\text{n}^\circ \text{ de polinizaciones} * \% \text{ supervivencia} * \text{n}^\circ \text{ semillas/cápsula})$$

Cuando hubo diferencias significativas entre los tratamientos éstos se compararon a través del Test de Duncan.

RESULTADOS

Se resume en los siguientes cuadros las polinizaciones efectuadas por madre y genotipo de polen y la cantidad de semillas híbridas obtenidas por cruzamiento específico en *E. globulus* (Cuadro N° 3) y *E. camaldulensis* (Cuadro N° 4). En las Figuras N°s 4 y 5 son indicadas las diferencias estadísticas entre tratamientos de polinización y los híbridos obtenidos para *E. globulus*. En las Figuras N°s 6 y 7 aparecen las diferencias estadísticas entre tratamientos para *E. camaldulensis*. Los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí ($p <= 0,05$).

Cuadro N° 3
MATRIZ DE CRUZAMIENTOS EN *E. globulus*. ANILEHUE (IX REGIÓN)

MADRES <i>E. globulus</i>	Variable	POLEN / GENOTIPOS POR ESPECIE								
		<i>E. benthamii</i> s/i	<i>E. camaldulensis</i>			<i>E. tereticornis</i> s/i	<i>E. globulus</i>		Total	
			C1	C2	C24		C3	mix 751		Pol. abierta
7011	flores polinizadas		140	138	139		140	66	59	682
	cápsulas		9	4	16		8	66	39	142
	semillas		57	36	151		86	2133	498	2961
	sem/cápsula		6,3	9,0	9,4		10,8	32,3	12,8	20,9
7095	flores polinizadas	128	139	134	136		139	65	53	796
	cápsulas	3	9	2	33		2	65	13	127
	semillas	31	118	32	294		0	1733	165	2373
	sem/cápsula	10,3	13,1	16,0	8,9		0,0	26,7	12,7	18,7
7135	flores polinizadas		140	139	138		140	56	41	654
	cápsulas		30	1	5		1	16	21	74
	semillas		12	47	28		0	304	411	802
	sem/cápsula		0,4	47	5,6		0	19	19,6	10,8
7143	flores polinizadas		137	136	148		138	67	38	664
	cápsulas		1	2	101			47	38	189
	semillas		0	6	0			1890	61	1957
	sem/cápsula		0	3	0			40,2	1,6	19,8
Total flores polinizadas		128	279	549	552	286	557	254	191	2.796
Total cápsulas		3	18	37	52	106	11	194	111	532
Total semillas		31	175	80	498	28	86	6060	1135	8.093
Total sem/cápsula		10,3	9,7	2,2	9,6	1,8	7,8	31,2	10,2	18,3
Porcentaje de supervivencia		2	6	7	9	37	2	76	58	19
Semillas híbridas/flor polinizada		0,2	0,6	0,1	0,9	0,1	0,2	23,9	5,9	2,89

Cuadro N° 4
MATRIZ DE CRUZAMIENTOS EN *E. camaldulensis*. EL TANGUE (IV REGIÓN)

MADRES <i>E. camaldulensis</i>	Variable	POLEN / GENOTIPOS POR ESPECIE						Total	
		<i>E. camaldulensis</i>			<i>E. grandis</i>		<i>E. globulus</i>		
		C2	CA24	PA	<i>E. s/l</i>	<i>E. terebinthifolius</i>	EGG	G00066	
1	Flores polinizadas	70	100	1860	950	75	50	3105	
	cápsulas	5	82	518	182	7		794	
	semillas	14	72	392	123	32		633	
	sem/cápsulas	1,8	1,0	1,7	2,3	9,3		2,1	
2	Flores polinizadas	50	50	125	200	81	75	581	
	cápsulas			73	45	25	23	166	
	semillas			155	165	77	41	438	
	sem/cápsulas			2,3	4,2	3,7	4,0	3,6	
3	Flores polinizadas	50	75	125	125	75	75	525	
	cápsulas		14	66	38		5	123	
	semillas		33	362	313		21	729	
	sem/cápsulas		2,4	5,7	5,8		3,5	5,0	
4	Flores polinizadas	50		125	168	159	50	154	706
	cápsulas			100	37	29	1	187	
	semillas			523	313	360	12	1208	
	sem/cápsulas			5,2	11,5	13,0	12	9,8	
5	Flores polinizadas	50		125	100	100	75	50	500
	cápsulas			89	22	2	2	115	
	semillas			478	188	43	11	720	
	sem/cápsulas			5,4	8,5	21,5	5,5	9,4	
Total flores polinizadas		200	195	600	2453	1365	350	254	5.417
Total cápsulas			19	410	660	238	38		1.365
Total semillas			47	1590	1371	693	117		3.728
Total sem/cápsula			2,0	4,0	3,8	7,6	5,9		4,7
Porcentaje de supervivencia		0	9,7	68,3	26,9	17,4	10,9	0,0	25,2
Semillas híbridas/flor polinizada		0	0,2	2,7	0,6	0,4	0,3	0,0	0,7

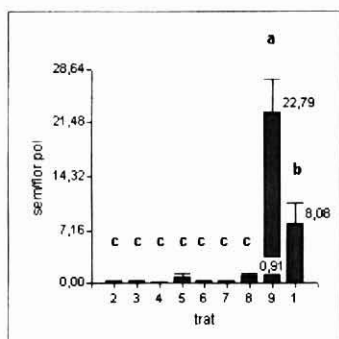


Figura N° 4
Tratamientos *E. globulus*

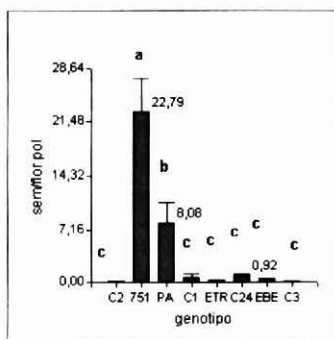


Figura N° 5
Híbridos *E. globulus*

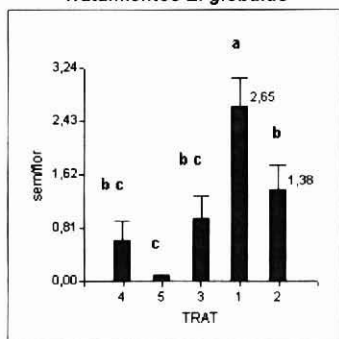


Figura N° 6
Tratamientos *E. camaldulensis*

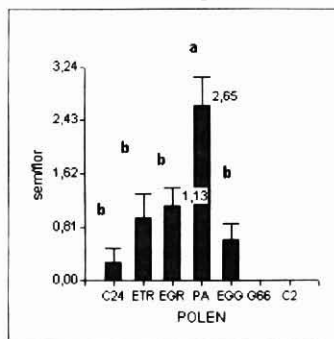


Figura N° 7
Híbridos *E. camaldulensis*

DISCUSIÓN

Polinizaciones Híbridas en *E. globulus*

Considerando como variable respuesta de las polinizaciones la cantidad de semillas híbridas obtenidas por flor polinizada, es decir considerando la eficiencia de las polinizaciones, se puede apreciar en la Figura N° 4 que el mejor resultado del ensayo correspondió al tratamiento 9 de las cruzas intraespecíficas de *E. globulus* usando la técnica OSP operacional (22,8 semillas/flor polinizada). Este tratamiento de polinización presenta diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) con respecto a la polinización abierta (8,08 semillas/flor polinizada) y al resto de los tratamientos de polinización OSP interespecífica. La polinización asistida OSP efectivamente mejoró la cantidad de semillas obtenidos en relación a la polinización abierta. Esto se explica por la polinización asistida y en parte por efecto de la técnica, ya que según diferentes autores aumentaría la cantidad de óvulos fertilizados exitosamente (Borralho, 2001).

En relación al resto de los tratamientos OSP donde se efectuó cruzamientos híbridos, el mejor protocolo de polinización correspondió al Tratamiento 8 (0,91 semillas/flor polinizada) que consideró la aplicación de polen en yemas florales no dehiscentes, el corte transversal 1/3 del estilo y sin aislamiento de la flor. Esto es coherente con las siguientes hipótesis: a) Corte de estilo permitiría romper la incompatibilidad unilateral de *E. globulus* (Rojas et al, 2003), b) Los mecanismos de incompatibilidad fisiológicos asociados al estilo no están activos cuando la flor se encuentra inmadura ("no dehiscente"), lo cual permitiría el crecimiento del tubo polínico de otra especie hacia el ovario de la flor, c) El efecto del corte del estilo con la técnica OSP podría hacer receptiva la flor y d) La sonda Tygon podría tener un efecto negativo en el desarrollo de las cápsulas y de las semillas al generar un ambiente indeseable para la flor.

En relación a las combinatorias híbridas probadas, se concluye la importancia de la especificidad de los cruzamientos. De esta forma entre los genotipos de polen probados el mejor resultado se obtuvo con el polen de *E. camaldulensis* C24 en todas las cruzas con *E. globulus* (0,92 semillas/flor polinizada) (Figura N° 5), siendo óptima la crusa específica *E. globulus* Clon 7095 x *E. camaldulensis* C24 (Cuadro N° 3).

Polinizaciones Híbridas en *E. camaldulensis*

Al igual que en *E. globulus*, si se considera como variable respuesta la cantidad de semillas híbridas obtenidas por flor polinizada, se puede apreciar en la Figura N° 6 que el mejor resultado del ensayo correspondió a la polinización abierta (2,65 semillas/flor polinizada), siendo estadísticamente significativa su diferencia respecto al resto de las cruzas interespecíficas con polen de otras especies.

En relación al resto de los tratamientos OSP donde se efectuó cruzamientos híbridos, el mejor protocolo de polinización correspondió al Tratamiento 2 (1,38 semillas/flor polinizada) que consideró la aplicación de polen en yemas florales dehiscentes, el corte del estigma en 1 mm y sin aislamiento de la flor. Esto es coherente con las siguientes hipótesis: a) El corte

del estigma podría hacer receptiva la flor y b) Los aislantes tradicionales en *E. camaldulensis* como las bolsas de aislación podrían tener un efecto negativo en el desarrollo de las cápsulas y de las semillas al generar un ambiente indeseable para la flor (mayor temperatura, radiación, falta de intercambio gaseoso adecuado). En relación a las combinaciones híbridas probadas, el mejor resultado se obtuvo con *E. grandis* (1,13 semillas/flor polinizada) (Figura N° 7).

Aunque algunos trabajos señalan que la contaminación de polen en *E. globulus* es de 4% y de 5.5% en *E. grandis* (Harbard, 2000) cuando no se aísla las flores polinizadas y que sería viable la producción comercial de semillas híbridas con el sistema OSP sin aislante, resulta esencial confirmar la identidad genética de las cruas híbridas con marcadores genéticos (SSR, isoenzimas).

CONCLUSIONES

Es factible la producción de semillas híbridas, tanto en *E. globulus* como en *E. camaldulensis*, con el sistema OSP

El protocolo de polinización híbrida OSP en *E. globulus* consideraría yemas florales no dehiscentes, emasculación con bisturí curvo, corte transversal de 1/3 del estilo, polinización y sin aislante.

El protocolo de polinización híbrida OSP en *E. camaldulensis* consideraría yemas florales en ántesis, dehiscentes, corte 1 mm del estilo, polinización, sin aislante.

Existe una alta especificidad entre madre (clon) x polen (genotipo).

Aunque la contaminación es pequeña sin uso de aislante, es importante confirmar la identidad genética de las cruas híbridas con marcadores genéticos (SSR, isoenzimas).

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a FDI/CORFO por el financiamiento de la investigación desarrollada en el proyecto tecnológico "Desarrollo de Plantaciones Forestales Económicamente Rentables con Individuos Resistentes al Déficit Hídrico en la Zona Semiárida de la IV Región".

También desean agradecer al CSIRO/ALRTIG (Australia) por proporcionar el polen, a la empresa Forestal Mininco, por facilitar el polen y las instalaciones del huerto semillero de Anilehue para efectuar las polinizaciones y a la Comunidad Agrícola y Ganadera El Tanque de la IV Región por poner a disposición las plantaciones y el personal para efectuar las polinizaciones.



REFERENCIAS

- Borralho, 2001.** Successful Fertilization and Seed Set from Pollination on Immature Non-dehisced Flowers of *Eucalyptus globulus*. *Annals of Botany*. 87(4):469-475.
- Dungey, H. and Nikles D., 2000.** An international survey of interspecific hybrids in forestry. Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. QFRI/CRC-SPF Symposium Noosa, Queensland, Australia. 9-14 April
- Eldridge, K., Davidson J., Harwood C. and Van Vik, G. 2000.** *Eucalypt Domestication and Breeding*. Oxford Science Publication
- Harbard J. L., Griffin A.R. and Espejo J.E. 2000.** One Stop Pollination, a New Technology Developed by Shell Forestry Technology Unit. Hybrid Breeding and Genetics of Forest Trees. QFRI/CRC-SPF Symposium Noosa, Queensland, Australia. 9-14 April.
- Harbard, J. L., Griffin A.R. and Espejo J. 1999.** Mass Controlled Pollination of *Eucalyptus globulus*: a Practical Reality. *Can. J. For. Res.* 29(10):1457-1463†
- Potts, B. M. and Williams D., 2004.** Advances in Pollination Technique for Large-scale Production of *Eucalyptus globulus* seed. *Australian Journal of Botany*, 52(6), pgs. 781-788
- Rojas, P. M., Potts. B. M and Ramirez P., 2003.** The Development of a Methodology for Large-Scale Production of Interspecific Hybrid Seed in a *Eucalyptus globulus* Clonal Seed Orchard . IUFRO Meeting. Desarrollando el Eucalipto del Futuro. Valdivia, Chile.
- Williams, D. and Potts B. M., 1999.** Testing Single Visit Pollination Procedures for *Eucalyptus globulus* and *E. nitens*. *Australian Forestry* 62:346-352