

---

# **MASIFICACIÓN CLONAL DE GENOTIPOS FORESTALES.** Oriana Ortiz N, y Laura Koch Z. Investigadoras Instituto Forestal, Sede Bio Bio, Casilla 109 C, Concepción Chile. oortiz@infor.cl. lkoch@infor.cl.

---

## **RESUMEN**

Los esquemas de propagación clonal utilizados en forma integrada con programas de mejoramiento genético, hacen posible amplificar las ganancias genéticas al propagar masivamente el mejor material generado en el programa. De esta manera, el uso de clones permite aumentar la productividad de las plantaciones forestales, mejorar la calidad y uniformidad del producto final y reducir la edad de cosecha.

Debido el enorme interés que concitan las ventajas productivas asociadas a la silvicultura clonal, las tecnologías de propagación vegetativa han experimentado un intenso desarrollo, tanto en el ámbito de las técnicas convencionales de propagación por estacas como de la biotecnología.

En este artículo se revisan y analizan los alcances y limitaciones de estos desarrollos, con énfasis en especies exóticas y nativas de interés económico para Chile.

**Palabras clave:** Propagación vegetativa, silvicultura clonal, biotecnología, mejoramiento genético.

## **SUMMARY**

The clonal propagation schemes used in integrated form with improving breeding genetic programs make it possible to amplify the genetic gains to massively propagate the best material generated in the program. In this way, the use of clones lets increase the forest plantations productivity, improves the quality and uniformity of the final product, and reduces the crop age.

Due to the big interest that attracts the productivity benefits associated with clonal forestry, the vegetative propagation technologies have experimented an intense development, as much in the conventional techniques of propagation by cuttings as the biotechnology.

In this paper, are checked and analyzed the scope and limitations of these developments, with emphasis in exotics and native species of economical importance for the country.

**Keywords:** Vegetative propagation, clonal forestry, biotechnology, genetic improvement.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas tienen dos formas de reproducción, sexual por medio de semillas o asexualmente mediante tejidos vegetales. Ambas formas ocurren normalmente en la naturaleza; algunas plantas se reproducen principalmente en forma vegetativa mientras que otras sólo se reproducen a través de semillas. Ambas formas de reproducción conllevan diferencias genéticas, las semillas contienen genes recombinados del padre y de la madre, mientras que los propágulos vegetativos son genéticamente idénticos a la planta madre, desde donde fueron colectados (Schmidt, 1993).

La propagación vegetativa es posible gracias a una propiedad de los vegetales llamada totipotencialidad de las células, las cuales en su núcleo contienen toda la información genética, necesaria para regenerar al organismo completo del cual forman parte (Hartmann *et al.*, 1990; Cassells and Gahan, 2006).

Un clon se define como una población de individuos genéticamente idénticos, los cuales se han obtenido por medio de propagación vegetativa (Schmidt, 1993). La duplicación puede ser potencialmente infinita y el proceso permite la multiplicación a gran escala, a partir de un solo individuo; si éste es de características sobresalientes, su plantación también será de un valor superior.

Entonces, las ventajas productivas asociadas a la propagación vegetativa se asocian estrechamente a la calidad de los individuos que se están multiplicando. Por esta razón, actualmente, el uso de esta técnica es un componente esencial, de los programas de mejoramiento genético forestales (Zobel y Talbert, 1988). Debido al extenso ciclo de vida de los árboles, un programa clásico de mejora requiere de mucho tiempo para ser desarrollado, en este contexto la propagación vegetativa se convierte en una herramienta muy útil para el mejorador, pues permite capturar y transferir rápidamente las ganancias genéticas, obtenidas en cualquier etapa de los programas de mejoramiento a las plantaciones comerciales (Kleinschmit *et al.*, 1993; Mac Rae y Cotteril, 1997). Además, esta habilidad para capturar las ganancias genéticas (aditivas y no aditivas), permite la multiplicación a gran escala de plantas que exhiben combinaciones específicas de genes o plantas híbridas, las cuales es prácticamente imposible de reproducir mediante semillas (Potts *et al.*, 1992). Por esta razón, es posible obtener altas ganancias en aquellas características deseables, que por su baja heredabilidad, no se traspan eficientemente a la descendencia por vía sexual, como normalmente lo son el crecimiento, peso seco, contenido de celulosa y otros caracteres de interés forestal (Gutiérrez, 2005).

Desde el punto de vista de las plantaciones operacionales, se puede utilizar la especificidad de un clon para potenciar los rendimientos en un sitio específico o bien emplear clones de gran capacidad de adaptación a variadas condiciones de sitio. De esta manera, la silvicultura clonal permite aumentar la productividad de los sitios forestales, mejorar la calidad y uniformidad del producto final y reducir la edad de cosecha (Carpineti, 2005; Libby y Rauter, 1984).

No obstante, la tecnología no se encuentra exenta de riesgos, ya que el uso de clones implica una menor variabilidad genética, que ante condiciones climáticas

inesperadas (heladas, secas) o el ataque de plagas y enfermedades, puede resultar en pérdidas catastróficas, si no se utilizan estrategias adecuadas de silvicultura clonal y una retroalimentación de nuevas fuentes de variación, en el contexto de programas de mejoramiento genético (Carpinetti, 2005; Ahuja y Libby, 1993).

Durante las últimas décadas, las tecnologías de propagación vegetativa han experimentado un intenso desarrollo, haciendo realidad la silvicultura clonal en especies de importancia comercial como pinos y eucaliptos, además de numerosos híbridos (Bettinger *et al.*, 2009; Assis, 2011). No obstante, aún persisten barreras biológicas que inciden sobre los procesos de clonación, la más seria se relaciona con la maduración de los tejidos vegetales en árboles adultos y su propagación vegetativa, la cual es muy difícil para algunas especies y prácticamente imposible en otras (Rodríguez *et al.*, 2005). Este constituye un gran problema para los programas de mejoramiento, ya que a la edad en que los árboles son seleccionados, en base a las características que se pretenden mejorar o perpetuar, estos ya han perdido su capacidad de enraizamiento (Gutiérrez, 1995). En consecuencia, es muy importante prestar especial atención a las distintas alternativas que se han desarrollado para superar este problema, ya que de su eficacia dependerá la obtención de los beneficios esperados de la propagación vegetativa.

Otra limitante que restringe la aplicación operacional de la propagación clonal, es el mayor costo de las plantas clonadas en relación a las producidas mediante semillas, por efecto de la mayor manipulación e infraestructura requerida por las técnicas de propagación vegetativa hasta hoy desarrolladas. Dependiendo del grado de complejidad, éstas se agrupan en dos categorías, la primera comprende los métodos convencionales también llamados de macropropagación y la segunda comprende a tecnologías biotecnológicas de organogénesis y embriogénesis somática, a las cuales se les denomina genéricamente como micropropagación. El gran interés que concitan las ventajas productivas asociadas a la clonación ha conducido a un continuo perfeccionamiento de las diversas técnicas de propagación vegetativa, haciéndolas cada día más eficaces y competitivas, de manera de hacer factible su adopción y aplicación comercial, por parte del sector productivo.

## **JUVENILIDAD, ENVEJECIMIENTO Y PROPAGACIÓN VEGETATIVA**

Los árboles, durante su etapa juvenil exhiben una gran facilidad de propagación y manipulación, por las técnicas de clonación hasta ahora conocidas. Sin embargo, esta aptitud se pierde progresivamente a medida que se produce el crecimiento del árbol y la consecuente maduración de sus tejidos vegetales. Este fenómeno se produce en la mayoría de las especies forestales, a excepción de especies como álamos y sauces, en cuya evolución han desarrollado estructuras especiales que les permiten un fácil arraigamiento de segmentos de ramas o tallos.

La eficacia de los esquemas de propagación clonal, se encuentra estrechamente ligada a la calidad de los árboles que se están utilizando, sin embargo esta calidad puede ser evaluada inequívocamente sólo cuando el árbol ha crecido y demostrado su superioridad en condiciones de campo. Entonces, ante esta situación surge el desafío de propagar vegetativamente a genotipos, cuyos tejidos maduros han perdido su capacidad de enraizamiento.

El cambio de fase del estado juvenil al adulto y el envejecimiento en especies forestales ha sido objeto de estudio desde hace muchos años, sin embargo el conocimiento de los mecanismos implicados es aún muy limitado (Rodríguez *et al.*, 2005).

Varias hipótesis han sido propuestas para explicar las diferencias que se producen entre las distintas fases del desarrollo de los árboles, según Hartmann *et al.* (1990) éstas se basarían en aspectos relacionados con el crecimiento celular del árbol, el control hormonal y la aislación celular. La primera se refiere a la forma en que las plantas crecen; a diferencia de los animales cuyas células se renuevan continuamente, en los vegetales las células formadas por las divisiones mitóticas de los meristemas, se van acumulando sobre las anteriores, formando y expandiendo de esta manera la arquitectura del árbol. Entonces, los tejidos localizados en la periferia del árbol, han experimentado un mayor número de divisiones celulares y por lo tanto son fisiológicamente más maduros y serían epigenéticamente diferentes. Esto explica la paradoja en la cual los tejidos ubicados próximos a la base del árbol, que cronológicamente son los tejidos de mayor edad, en realidad son los más juveniles en términos de edad fisiológica; por el contrario los tejidos cercanos a los extremos apicales de las ramas, que cronológicamente son los de menor edad, fisiológicamente son los más maduros (Bonga, 1982). Esta propiedad, ha sido ampliamente utilizada para iniciar programas de propagación clonal a través del enraizamiento de estacas obtenidas de rebrotes de tocón, particularmente en *Eucalyptus*, o bien para mantener la juvenilidad por medio de podas frecuentes de setos o plantas madres donadoras de propágulos, en programas de estaquillado (Chaperon, 1983).

Por otro lado, es ampliamente aceptado que las hormonas vegetales cumplen un rol fundamental en los procesos de maduración y su reversión. Se ha observado que la injertación de material adulto sobre plantas juveniles generalmente induce un aumento del vigor vegetativo de la púa (sección superior del injerto), el cual puede ser incrementado gradualmente con la realización de injertos sucesivos sobre el material inmediatamente anterior (Greenwood, 1987). Este efecto se produciría por la translocación de sustancias hormonales desde las hojas juveniles del portainjerto o patrón hacia la púa, además de cierta influencia por parte de las raíces, que contribuirían a retener las características de la fase juvenil de los árboles (Hartmann *et al.*, 1990). Se ha determinado también que reguladores del crecimiento, como el ácido abscísico, giberelinas y citoquininas, pueden ser utilizados para manipular procesos de revigorización y rejuvenecimiento. Se considera a la citoquinina benciladenina (BA), como una de las moléculas antienvjecimiento más importantes, la cual puede ser aplicada tanto en procedimientos de aplicación externa como en cultivos *in vitro* para promover revigorización; en éstos últimos induce desarrollo de yemas axilares y, dependiendo de su concentración en los medios de cultivo, puede inducir la formación de yemas adventicias que a menudo demuestran "rejuvenecimiento total" (Rodríguez *et al.*, 2005). Por esta razón, se identifica a las técnicas de micropropagación, particularmente la organogénesis somática, como una de las vías más eficaces para la reversión y mantención de la juvenilidad fisiológica en árboles adultos (McComb y Bennet, 1986; Francllet *et al.*, 1987).

Un tercer enfoque, sugiere que las células de los meristemas apicales se encuentran influenciados por las células diferenciadas que se encuentran inmediatamente a su alrededor, entonces cuando la célula es desconectada y aislada de éstas últimas,

es posible inducir su reversión a un estado juvenil (Hartmann *et al.*, 1990; Gahan, 2007). Se ha demostrado que es posible obtener embriones somáticos a partir de una célula que ha sido regenerada a partir del cultivo *in vitro* de callos, suspensiones celulares o protoplastos y de células aisladas mecánicamente (Gahan y George, 2008). El cultivo de meristemas (miniaturización) de árboles adultos, de igual forma elude el efecto de la madurez de los tejidos, y puede regenerar plantas que presentan características juveniles (Meynier, 1985; Monteuis, 1991; Beck *et al.*, 2000). Aún cuando ambos procedimientos han sido identificados como altamente eficaces para inducir rejuvenecimiento, en el caso de la embriogénesis somática e inducción de brotes adventicios, particularmente en árboles adultos de especies leñosas, no se conocen con profundidad los mecanismos de control de los procesos involucrados y, por tanto, su aplicación con fines prácticos es aún muy limitada. Por otro lado, la dificultad que presenta la manipulación de meristemas de árboles adultos, es un serio inconveniente para su aplicación en forma extensiva (Rodríguez *et al.*, 2005).

El mismo autor señala, que los estados de madurez y rejuvenecimiento no han podido ser caracterizados y se conoce muy poco de las bases moleculares de estos procesos; tampoco ha sido posible establecer marcadores generales que identifiquen fases juveniles y adultas. No obstante, la falla en lograr adecuados procesos de revigorización o rejuvenecimiento conlleva la ocurrencia de los fenómenos de topótesis y ciclótesis, que implican el crecimiento del individuo según la posición que ocupaba en la planta madre (forma de rama) o de la de edad esta al tomar el propágulo; además de crecimiento plagiotrópico (crecimiento horizontal), (Kleinschmit, 1977; Roulund y Olesen, 1992).

Un aspecto fundamental a tener en cuenta, para asegurar el éxito de un programa de propagación clonal, es disponer de alternativas para hacer frente al problema de la pérdida de la capacidad de enraizamiento de los genotipos de interés, mientras se evalúa su valor productivo en ensayos de campo (Pâques *et al.*, 2002). De otra manera, el programa deberá contemplar sólo a individuos juveniles, aceptando los riesgos asociados a la selección temprana, la cual si bien puede ser apropiada para aquellas características que no manifiestan gran variación en su expresión durante el desarrollo del árbol, resulta totalmente ineficiente para aquellas que exhiben cambios importantes. Entre estas últimas se encuentran características fundamentales, como la tasa de crecimiento, propiedades mecánicas de la madera y algunas variables morfológicas, las cuales se expresan en distinta forma cuando el individuo pasa de la etapa juvenil a la fase adulta (Gutiérrez, 1995).

Actualmente, existen variadas alternativas que ayudan a resolver el problema de la maduración de los tejidos, la elección de una u otra dependerá de la especie, nivel de riesgo a tomar y capital de inversión. Estas básicamente, contemplan el manejo de setos en bancos clonales o sistemas hidróponicos, técnicas de rejuvenecimiento de árboles adultos y utilización de preservación de germoplasma en condiciones *in vitro*. Las técnicas de rejuvenecimiento, más utilizadas en los programas de propagación clonal, corresponden al enraizamiento de rebrotes de tocón y organogénesis somática. En el primer caso, surge el inconveniente que no todas las especies manifiestan esta característica, además no siempre es posible inducir la retoñación de los tocones, como tampoco volver a obtener las tasas de enraizamiento originales del estado juvenil; lo

cual puede conducir a la pérdida de genotipos valiosos del programa. La organogénesis somática, es una de las mejores técnicas para lograr este objetivo, su principal inconveniente es el extenso período de tiempo requerido, ya que es necesario al menos un año de subcultivos sucesivos, para que se produzca rejuvenecimiento en tejidos maduros. Adicionalmente, factores relacionados con la contaminación endógena y características fisiológicas inherentes al clon, limitan la eficacia de esta técnica (Le Roux y Van Staden, 1991). Ante esta situación, y para evitar las dificultades señaladas, la situación ideal es utilizar técnicas que efectivamente, preserven la juvenilidad de los clones de interés.

El manejo de setos, ya sea en bancos clonales o en sistemas de hidroponía bajo condiciones de invernadero, si bien constituye hoy en día un componente esencial de muchas de las estrategias de mejoramiento genético y propagación comercial, resulta ser de alto costo debido a la intensa manipulación a la que se debe someter el material vegetal. Además, la técnica no se encuentra exenta de riesgos, ya que factores como el ataque de agentes patógenos o el cambio repentino de las condiciones ambientales, pueden provocar pérdidas catastróficas (Watt *et al.*, 2000). Adicionalmente, los setos también sufren de procesos de envejecimiento, los cuales son controlados a través de una adecuada reposición de las plantas.

Al respecto, diversos autores señalan que las técnicas de conservación *in vitro*, particularmente la crio preservación resultan ser muy apropiadas para minimizar tales riesgos y que deben ser consideradas en este tipo de programas (Engelmann, 1997; Watt *et al.*, 1997, 2000; Rao, 2004). La mantención de germoplasma *in vitro* involucra su almacenamiento bajo condiciones de mínimo crecimiento, asegurando su viabilidad y estabilidad genética.

Básicamente, existen dos métodos de almacenamiento *in vitro*, mediante la aplicación de técnicas de crecimiento retardado o bien mediante el almacenamiento en nitrógeno líquido (crio preservación). La primera se refiere a procedimientos orientados a reducir el crecimiento de los cultivos *in vitro*, de esta manera se aumenta el período de tiempo entre subcultivos, sin provocar efectos adversos en el material vegetal conservado. El segundo método corresponde a la crio preservación, la cual involucra la mantención del material vegetal a temperaturas sub cero (usualmente  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A esta temperatura, la actividad metabólica es efectivamente detenida, permitiendo teóricamente el almacenamiento por períodos ilimitados de tiempo.

La ciencia de la crio preservación ha progresado significativamente durante las últimas tres décadas, contando hoy en día con numerosas especies agrícolas y silvestres, que son conservadas de esta manera (Engelmann, 1997; Benson y Bremer, 2004; y Dixit *et al.*, 2004). También, se han desarrollado numerosos protocolos para varias de las especies forestales de interés comercial, como *Pinus* (Häggman *et al.*, 1998; Marum *et al.*, 2005; Hargreaves y Menzies, 2007) y *Populus* (Lambardi *et al.*, 2000 y Jokipii *et al.*, 2004).

La crio preservación ofrece varias ventajas, es un método rápido, relativamente sencillo, no altera la estabilidad genética del material, reduce los costos (menor manipulación), requiere poco espacio y evita los riesgos fitopatológicos y fisiológicos

que se presentan en los bancos de germoplasma vegetales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Engelmann, 2000; Rao 2004; Padayachee *et al.*, 2009).

Pâques *et al.*, (2002) señalan que esta técnica, es particularmente adecuada para mantener los tejidos de especies leñosas en un estado juvenil, de otra manera ellas pierden rápidamente su capacidad de enraizamiento con la edad. De esta manera, los genotipos selectos de un programa de mejoramiento pueden ser almacenados en su estado juvenil en nitrógeno líquido, tanto tiempo como sea necesario, para evaluar su valor productivo en ensayos de campo.

Generalmente, la crio preservación de tejidos vegetales es más fácil en cultivos de células no organizadas y más difícil en estructuras altamente organizadas (Wang *et al.*, 1993). Watt *et al.* (2000) indican que mientras no se desarrollen protocolos efectivos de embriogénesis somática, los cultivos derivados de organogénesis serán necesariamente los más apropiados para la crio preservación.

En general, especies de climas templados exhiben una mejor respuesta a la crio preservación que especies de climas tropicales, lo cual se explicaría por mecanismos fisiológicos de adaptación al frío desarrollados por las primeras (Reed *et al.*, 2000). En esta misma categoría, existen diferencias entre especies e incluso entre genotipos de la misma especie; esta variación en la habilidad de sobrevivir a la congelación implica que no hay un método universal para la crio preservación. Por esta razón, es necesario desarrollar y optimizar varios métodos de preparación del material vegetal, basados en su tolerancia natural a la desecación y congelamiento (Padayachee *et al.* 2009).

Actualmente, existen varios métodos bien establecidos que pueden ser aplicados en la preparación del material a crio preservar, los cuales se basan en el principio que el contenido de agua debe ser reducido a niveles tales, que la formación de cristales de hielo sea minimizada (Engelmann, 2000). Entre ellos, se puede distinguir los métodos llamados de "encapsulación-deshidratación", "vitrificación", "vitrificación-encapsulación", "congelación rápida", "congelación lenta" y un sinnúmero de variantes y diversas combinaciones de ellos.

En base a lo anteriormente analizado, es claro que la crio preservación se configura como una de las mejores técnicas para asegurar, la mantención del estado de juvenilidad de los genotipos de interés, mientras se evalúa su desempeño en los ensayos de campo, por lo tanto es una técnica que debiera contemplarse en programas de propagación clonal, de envergadura comercial.

## **AVANCES EN MACROPROPAGACIÓN**

La regeneración de plantas a partir de bulbos, rizomas, acodos, tubérculos, estolones, esquejes o estaquillas e injertos, entre las más comunes, se les conoce como técnicas convencionales de propagación vegetativa. En el caso de las especies forestales, el enraizamiento de estacas es la técnica más utilizada a nivel mundial, para la producción masiva de plantas clonadas. Las características biológicas propias de las plantas leñosas, la gran cantidad de descendientes que se puede obtener de un árbol individual, la facilidad de manipulación y el menor costo en relación a los sistemas de

micropropagación, explican la amplia preferencia por esta técnica (Gutiérrez *et al.*, 1994; Gutiérrez, 1998).

A excepción de álamos y sauces, en las demás especies el estaquillado funciona sólo en plantas juveniles o material que exhiba un alto grado de rejuvenecimiento (revigorización). La técnica es muy simple y consiste básicamente en cortar segmentos de tallos y colocarlos a enraizar en un sustrato que provea condiciones adecuadas de humedad y aireación; dependiendo de la especie se requiere de la aplicación exógena de auxina en la base de la estaca, comúnmente IBA (Ácido Indolbutírico) y completar el proceso de rizogénesis en condiciones de invernadero, donde las variables ambientales, como temperatura, humedad relativa e inclusive el fotoperíodo puedan ser controladas. En algunos casos se utilizan camas calientes, ya que el gradiente de temperatura que se produce en la estaquilla, favorece el enraizamiento, especialmente en los meses de invierno. Un adecuado manejo fitosanitario, es esencial, ya que los cortes efectuados en las estacas y las condiciones ambientales durante el enraizamiento, favorecen el desarrollo de patógenos.

En los programas de propagación a gran escala, es necesario disponer de un área de cultivo de plantas productoras de propágulos, ya sea en condiciones de campo o invernadero, de un tamaño tal que satisfaga los requerimientos de las operaciones de estaquillado. A estas plantas se les denomina comúnmente setos o plantas madres; durante el último tiempo y especialmente en *Eucalyptus*, se a puesto especial atención a su manejo, sobre todo el mantener un fuerte control sobre las condiciones de crecimiento; ya que de ello depende el disponer de estacas cuyo estado nutricional y condiciones fisiológicas, sean óptimas para enfrentar los delicados procesos de enraizamiento (Assis *et al.*, 2004).

A pesar del enorme esfuerzo dedicado para entender y manipular los mecanismos involucrados en el enraizamiento, aún se conoce muy poco acerca de cómo se producen exactamente los procesos internos, que conducen a la formación de un nuevo sistema radicular. Se reconoce que la rizogénesis adventicia en estacas de tallo es un proceso único y complejo, que involucra respuestas al estrés asociado a las heridas provocadas por los cortes, cambios en las relaciones hídricas de la planta y pérdida de la influencia sobre los procesos bioquímicos del sistema radicular original (Haissig, 1986). El enraizamiento, probablemente se encuentra regulado por la interacción de múltiples factores, relacionados con las hormonas vegetales, carbohidratos, compuestos fenólicos, estado de la planta madre (condiciones nutricionales, agua y luz) y características genéticas del clon. En esta área del conocimiento, se han registrado avances significativos en el campo de la fisiología y el estudio de mutantes, más recientemente el desarrollo de la genómica funcional ha permitido detectar ciertos genes involucrados en los procesos de enraizamiento y síntesis de las auxinas (Assis *et al.*, 2004). Estos avances, abren nuevas y prometedoras posibilidades de aplicación para mejorar los procesos y superar las limitaciones, que imponen los actuales sistemas de enraizamiento, de numerosas especies forestales de interés económico.

En el país, actualmente existen programas de propagación y silvicultura clonal en pino radiata, eucaliptos y álamos, además se han registrado progresos significativos en la

desarrollo de estas tecnologías para *Eucalyptus camaldulensis*, *Acacia* spp. y *Nothofagus alpina*, las cuales cuentan con programas de mejoramiento genético en un distinto grado de desarrollo, dependiendo de la especie.

Las estrategias de propagación de *Pinus radiata*, debido a que es una especie que no rebrota por tocón y el rejuvenecimiento de tejidos maduros es muy difícil si no imposible, se han basado en la preservación del estado juvenil ya sea mediante setos o aplicaciones biotecnológicas, durante el tiempo necesario para evaluar la calidad de los genotipos (Hargreaves y Menzies, 2007). Una vez establecido este parámetro, se procede a propagar masivamente los genotipos mediante enraizamiento de estacas, también denominadas *cuttings*. En esta especie particularmente, el estaquillado ha resultado ser una técnica simple y muy eficiente que obtiene elevadas tasas de enraizamiento (Sánchez *et al.*, 2008). La producción de *cuttings* puede ser efectuada tanto en contenedores como a raíz desnuda, sin necesidad de contar con una sofisticada infraestructura. Actualmente, las grandes empresas forestales, cuentan con avanzados programas de mejoramiento en esta especie, que abastecen de material mejorado a las unidades de producción de plantas, las cuales en una muy alta proporción se producen en base a *cuttings*. Esta tecnología, en forma incipiente pero progresiva, ha sido adoptada por viveros forestales, que abastecen de plantas a pequeños y medianos propietarios<sup>1</sup>.

En la especie *Eucalyptus globulus*, si bien es posible rejuvenecer tejidos adultos mediante el enraizamiento de rebrotes de tocón u organogénesis somática, su principal limitante se relaciona con la baja proporción de clones que exhiben porcentajes de enraizamiento compatibles con programas de propagación operacional, cuyo límite inferior se sitúa alrededor del 40-70 % de enraizamiento, dependiendo de la calidad genética del genotipo. En general, el estaquillado de las especies de *Eucalyptus*, requiere de un mayor nivel de infraestructura y desarrollo tecnológico para producir *cuttings* en una relación costos/beneficio competitiva. Una innovación que mejoró sustancialmente la propagación de *Eucalyptus*, fue el uso de miniestacas obtenidas de plantas madres, que son intensivamente manejadas en sistemas de hidroponía o camas de arena y mantenidas en invernaderos bajo un fuerte control de las variables de crecimiento y producción de brotes.

En el país los programas de mejoramiento genético para *Eucalyptus globulus* y *E. nitens*, se encuentran radicados en las grandes empresas forestales y en el Instituto Forestal, la utilización de propagación vegetativa en la producción de plantas de *E. globulus* es importante pero no ha llegado a competir con el uso de semillas, en parte por las ventajas que ofrece la semilla obtenida de cruzamientos controlados (silvicultura familiar) (Li *et al.*, 2007) y porque es necesario mejorar y depurar aún más las técnicas de propagación de tal manera que sea factible multiplicar los clones más productivos. La técnica de enraizamiento de estacas no ha sido utilizada extensivamente para *E. nitens*, debido a la escasa proporción de individuos, que presentan una buena aptitud para el enraizamiento en esta especie (Gutiérrez *et al.*, 2004).

El cultivo de álamos, si bien no es extensivo en el país debido a los exigentes

---

1 Leopoldo Quezada, Gerente vivero forestal Proplantas Ltda.

requerimientos de sitio de esta especie, resulta ser muy interesante por los altos rendimientos volumétricos, edad de rotación y excelente aptitud para integrar sistemas agroforestales. El álamo, manejado bajo esquemas de silvicultura clonal, registra rendimientos volumétricos cercanos a los 300 m<sup>3</sup>/ha, a los 14 años de edad. La Compañía Agrícola y Forestal el Álamo, mantiene una base genética de aproximadamente 50 clones, utilizando ocho de ellos a nivel operacional, uno para cada tipo de producto que se fabrica, en sus instalaciones<sup>2</sup>.

*Eucalyptus camaldulensis*, es una especie que se adapta bien a climas áridos y semiáridos del norte de Chile, por esta razón el Instituto Forestal mantiene un programa de mejoramiento genético y ha desarrollado estrategias de propagación clonal, con el objetivo de masificar a los mejores genotipos del programa (Gutiérrez, 2005). En general, esta especie es relativamente fácil de reproducir por estacas, por esta razón resulta muy atractiva para los programas de hibridación, dada la posibilidad de traspasar esta cualidad a otras especies o clones de difícil enraizamiento. Actualmente, se evalúan ensayos clonales con el objetivo de determinar el desempeño de los árboles plus, en diferentes condiciones de sitios (Molina *et al.*, 2010).

En el caso de acacias, el Instituto Forestal se encuentra desarrollando un programa para promover su utilización en el país. En este contexto se han seleccionado árboles superiores y se han probado técnicas de propagación vegetativa para su propagación, utilizando inicialmente material rejuvenecido de rebrotes de tocón o bien plantas micropropagadas. La especie *Acacia melanoxylon*, mostró los mejores resultados de enraizamiento empleando estacas obtenidas de plantas madres y aunque en menor magnitud las especies *A. mearnsii* y *A. dealbata* también demostraron aptitud para su propagación clonal (Pinilla *et al.*, 2010).

En el marco del escalamiento del programa de mejoramiento genético de la especie nativa raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. *et* Endl.), se evaluó el enraizamiento de estacas confeccionadas a partir de material rejuvenecido por micropropagación (Ortiz y Gutiérrez, 2005). Se observó, que la respuesta rizogénica no es influenciada significativamente por la dosis de IBA aplicada, como tampoco un efecto clonal importante. En estacas apicales no lignificadas, se lograron los mejores resultados de enraizamiento (70-90 %). Las características de las estacas, que deben ser de tejido blando, limita la aplicación de esta técnica debido a que los tallos de las plantas madres de esta especie suelen lignificarse muy rápidamente.

## AVANCES EN MICROPROPAGACIÓN

Micropropagación es un término usado para referirse a la propagación vegetativa realizada en condiciones *in vitro*, usando técnicas de organogénesis y/o embriogénesis somática.

La organogénesis somática, implica la diferenciación monopolar de un órgano

---

<sup>2</sup> Comunicación personal, Fernando Stevens, Gerente Administrador Complejo Copihue, Compañía Agrícola y Forestal el Álamo.

para dar origen a una planta bajo condiciones estériles de laboratorio. Usualmente, la diferenciación monopolar ocurre al colocar un explante (segmento nodal o apical y meristemas) 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 y posteriormente se realiza la aclimatación de las vitroplantas, a condiciones *ex vitro*. 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).

La organogénesis somática es una alternativa muy útil cuando no se obtienen buenos resultados mediante enraizamiento de estacas, se requiere aumentar la tasa de multiplicación, y en el caso de árboles adultos para revertir y mantener su juvenilidad fisiológica (McComb y Bennet, 1986). También, es adecuada para la conservación en un estado juvenil de genotipos forestales, mediante la utilización de técnicas de crecimiento retardado.

Uno de los aspectos más difíciles de abordar, en la organogénesis de árboles adultos, es la introducción de material aséptico, a condiciones *in vitro*. En general, la desinfección de brotes colectados directamente en terreno es difícil, debido a la gran cantidad de contaminación tanto exógena como endógena presente en este material (De Fossard *et al.*, 1977). Según, Le Roux y Van Staden (1991) es virtualmente imposible esterilizar este material sin dañar severamente el tejido de los explantes iniciales. La edad del material es un factor importante que condiciona el establecimiento de cultivos asépticos (Grewal *et al.*, 1980), idealmente éste debiera tener muchas de las cualidades encontradas en brotes juveniles, por esta razón es común emplear técnicas de pretratamiento del material adulto, con el fin de obtener explantes iniciales adecuados para el cultivo *in vitro*. Se han establecido cultivos asépticos de árboles adultos, a partir de rebrotes de tocón (Furze y Cresswell, 1985), brotes de injertos (Franclét y Boulay, 1982; Durand-Cresswell *et al.*, 1982; Goncalves, 1980), brotes epicórmicos (Oller *et al.* 2004, Ikemori, 1987), brotes de estacas enraizadas y brotes de ramas pretratadas, en especies caducifolias (Sabja *et al.*, 2005; Ortiz *et al.*, 2006a).

La embriogénesis somática, consiste en la formación de un embrión somático, a partir de una o varias células, a diferencia de la organogénesis, origina embriones bipolares, es decir genera en forma simultánea la parte aérea y radicular de una plántula, a través de una serie de etapas similares a la formación de embriones zigóticos (Thorpe *et al.*, 1991). Potencialmente las ventajas de esta técnica son sus altos coeficientes de multiplicación, la posibilidad de automatización del proceso en bioreactores y la generación de semilla artificial mediante la encapsulación de los embriones. Un aspecto particularmente interesante, es la gran aptitud de los embriones para su almacenamiento en nitrógeno líquido (Wang *et al.*, 1993). En base a estas potencialidades, se ha identificado a la embriogénesis somática como una de las técnicas que presenta las mejores opciones para reducir el costo de producción de las planta regeneradas vegetativamente. Sin embargo, especialmente en árboles adultos, aún no se domina suficientemente los mecanismos que regulan estos procesos, lo cual incide en la baja eficiencia de los protocolos desarrollados,

consecuentemente su utilización con fines productivos es aún muy limitada y se requiere de mucha más investigación para hacer realidad las ventajas que esta técnica ofrece (Yeung *et al.*, 1996).

En el campo de la ingeniería genética la micropropagación, particularmente la embriogénesis somática, constituye la plataforma de propagación de las plantas transformadas; esto significa que el desarrollo de árboles modificados genéticamente depende de la disponibilidad de sistemas eficientes y reproducibles de micropropagación (Campbell *et al.*, 2003).

En el país, se han desarrollado protocolos de micropropagación para muchas de las especies forestales de interés económico, sin embargo su utilización comercial se ve impedida por el alto costo de producción de las plantas. Una alternativa que se ha planteado es la utilización de bioreactores, como el sistema denominado RITA (Recipientes de Inmersión Temporal Automáticos), el cual ha permitido aumentar considerablemente las tasas de multiplicación y reducir los costos de producción en varias especies (Aitken-Christie *et al.*, 1995), aunque en el país no se han reportado aplicaciones de carácter comercial, en especies forestales.

Actualmente, la micropropagación en el área forestal del país, es utilizada principalmente para conservar genotipos en estado juvenil, producir plantas madres para los programas de estaquillado y dependiendo de la especie, rejuvenecer tejidos de árboles adultos selectos.

En pino radiata, se utiliza la embriogénesis somática de tejidos inmaduros para crio preservar líneas embriogénicas; una vez probada la superioridad de los genotipos, estos se reproducen mediante micropropagación, para generar vitroplantas que serán multiplicadas masivamente en los programas de estaquillado. En el caso de *Eucalyptus globulus*, la baja eficiencia de los protocolos de embriogénesis somática y las limitaciones impuestas por la reducida capacidad rizogénica de gran parte de los genotipos de esta especie, determinan que la micropropagación sea utilizada casi exclusivamente para la producción de plantas madres, con el propósito de abastecer los programas de estaquillado. En esta especie, el enraizamiento de rebrotes de tocón, es el sistema comúnmente utilizado para rejuvenecer árboles adultos, aunque también ha sido posible regenerar plantas rejuvenecidas mediante organogénesis, empleando brotes epicórmicos como material de inicio de los cultivos *in vitro* (Ortiz y Koch, 2010).

La especie nativa raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. *et* Endl.), ha mostrado una capacidad de regeneración extraordinaria en la organogénesis de brotes apicales de árboles adultos (Sabja *et al.*, 2005 y 2008) y embriogénesis somática de cotiledones aislados del eje embrionario (Castellanos *et al.*, 2005). En el cultivo *in vitro* mediante organogénesis, la especie se caracteriza por presentar altas tasas de multiplicación, facilidad de enraizamiento y elevadas tasas de sobrevivencia al proceso de aclimatación, cualidades que la hacen especialmente apropiada para su propagación mediante bioreactores. Actualmente, se preservan 39 clones de árboles *plus* de alto valor genético y de conservación, en un Banco de Germoplasma *in vitro* que mantiene el Instituto Forestal. Este material, se mantiene utilizando técnicas de crecimiento retardado, que ha permitido

que, luego de 6 años de permanecer en condiciones *in vitro*, los clones mantengan su estado juvenil, sin registrar declinación de su tasa de proliferación ni de su potencial de enraizamiento (Ortiz *et al.*, 2010).

La lenga (*Nothofagus pumilio* (Poepp. *et* Endl.) Krasser), es una de las especies nativas más importantes del país, cuenta hoy en día con un programa de mejoramiento y conservación genética que se encuentra en desarrollo, como una medida para acelerar la utilización de las ganancias genéticas asociadas a los árboles *plus* de lenga se desarrollaron protocolos de micropropagación de individuos selectos de esta especie (Ortiz *et al.*, 2006a).

En la especie *Acacia melanoxylon* R. BR., se propagaron *in vitro* arboles superiores, utilizando brotes epicórmicos como material de inicio de cultivos que, a diferencia del empleo de rebrotes de tocón, es un método no destructivo del árbol original y, además, técnicamente es menos complejo que el cultivo de meristemas. Los resultados obtenidos en cuanto a tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plantas hacen viable la utilización del protocolo desarrollado para la producción de plantas de alto valor genético (Ortiz *et al.*, 2006 b).

Árboles superiores de la especie castaño (*Castanea sativa* Miller), fueron regenerados mediante organogénesis, a partir de brotes apicales pretratados, recolectados en el mes de agosto cuando las yemas aún se encontraban cerradas. Estos clones fueron seleccionados con fines de producción de madera, en base a sus características fenotípicas de crecimiento en volumen y rectitud de fuste (Delard *et al.*, 2007).

*Eucalyptus camaldulensis* mostró una alta aptitud para regenerar plántulas por medio de procesos de organogénesis, cualidad que permitió establecer un protocolo de micropropagación de árboles adultos para esta especie, la cual muestra un gran potencial de proliferación, buena elongación de brotes y procesos sencillos de enraizamiento y aclimatación. No se observó un efecto de tipo clonal, en cuanto a la capacidad de enraizamiento, de los distintos clones regenerados. Las vitroplantas producidas fueron utilizadas como plantas madres para la multiplicación de los genotipos mediante técnicas de estaquillado convencional (Gutiérrez *et al.*, 2005). Los clones micropropagados se mantienen bajo un sistema de crecimiento retardado *in vitro*, para mantener su juvenilidad en el mediano plazo.

## CONCLUSIONES

La maduración de los tejidos de árboles adultos, constituye una seria limitante para alcanzar los beneficios que promete la propagación vegetativa, utilizada como elemento de transferencia de las ganancias genéticas de los programas de mejoramiento forestal.

No obstante y haciendo usos de las características biológicas y de regeneración propias de las plantas, en conjunto con técnicas de micropropagación, particularmente la organogénesis somática, es factible técnicamente superar esta limitación, aunque la mejor opción sigue siendo la preservación del estado juvenil de los genotipos, idealmente mediante crio preservación.

La combinación de las técnicas de macro y micropropagación ha permitidos desarrollar eficientes sistemas de propagación vegetativa, a un costo que ha hecho factible su utilización comercial, en varias de las especies forestales de interés económico del país, no obstante se prevén significativos desarrollos tecnológicos, especialmente en micropropagación, que con seguridad incrementaran su competitividad y aplicación extensiva, en los sistemas de producción de plantas forestales del futuro.

## REFERENCIAS

- 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. R. and Libby, W. J., 1993.** Clonal Forestry 1: Genetics and Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, 240 p.
- Aitken-Christie, J., Kosal, T. and Takayama, S., 1995.** Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. p. 1-18. In: Automation and environmental control in plant tissue culture. Aitken-Christie, J.; Kozai T. and M.A.L. Smith (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Assis T. F. 2011.** Hybrids and mini-cutting: a powerful combination that has revolutionized the *Eucalyptus* clonal forestry. From IUFRO Tree Biotechnology Conference 2011: From Genomes to Integration and Delivery Arraial d'Ajuda, Bahia, Brazil. 26 june - 2 july, 2011.
- Assis, T. F., Fett-Neto, A. G. and Alferas . A. C., 2004.** Current techniques and prospects for the clonal propagation of hardwoods with emphasis on *Eucalyptus*. In: Proceedings of Plantation Forest Biotechnology for the 21<sup>st</sup> century. Fort P. O.; Carson M. and C. Walter (Eds). Research Signpost 37/661 (2), Kerala, India. Pp.: 303-333.
- Beck, S., Dunlop, R. y Staden, J., 2000.** Meristem culture of *Acacia mearnsii*. Plant Growth Regulation, 32: 49-58.
- Benson, E. E. and Bremner, D., 2004.** Oxidatives stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: Life in the frozen state. Fuller B. J. Lane N. and E.E. Benson (Eds.). Boca Raton: CRC Press. Pp.: 205-242.
- Bettinger, P., Clutter, M., Siry, J., Kane, N. and Pait. J., 2009.** Broad Implications of Southern United States Pine Clonal Forestry on Planning and Management of Forests. International Forestry Review 11(3):331-345.
- Bonga, J., 1982.** Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. In: Tissue Culture in Forestry. Bonga, J. y D. Durzan (Eds.). Boston, Lomdon. Nijhoff M. and W. Junk Publisher. Pp.: 387 - 412.
- Campbell, M. M., Brunner, A. M., Jones, H. M. and Strauss, S. H., 2003.** Forestry's Fertile Crescent: the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotechnology Journal, 1: 141–154.

---

**Carpineti, L., 2005.** Importancia de la silvicultura clonal. INTA, Buenos Aires, Argentina. IDIA XXI N° 8. Pp.: 153-156.

**Castellanos H., Sánchez-Olate, M. y Rios, D., 2005.** La embriogénesis somática como alternativa para la regeneración *in vitro* de raulí y roble. En: Clonación de raulí, estado actual y perspectivas. Editado por Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR, INFOR, UACH. Pp.: 19-40.

**Cassells, A. C. and Gahan, P. B., 2006.** Dictionary of Plant Tissue Culture. New York: Food Products Press.

**Chaperon, H., 1983.** Clonal Propagation of *Eucalypt* by cuttings in France. En: Proceeding of a Workshop on *Eucalyptus* in California. Sacramento, California. June, 14-16. Pp.: 107-109.

**Dixit, S., Ahuja, S., Narula, A. and Srivastava, P.S., 2004.** Cryopreservation: a potential tool for long-term conservation of medicinal plants. In: Plant Biotechnology and molecular markers. Srivastava P.S., Narula A. and S. Srivastava (Eds.). New Delhi: Anamaya Publishers. Pp.: 278-288.

**De Fossard A., Broker, P. and Bourne, R., 1977.** The organ culture of nodes of four species de *Eucalyptus*. Acta Hort. 78: 157-165.

**Delard, C., González, M., Ortiz, O., Molina, M. y López, C., 2007.** Producción de plantas forestales de castaño. En: Castaño, Madera de Alto Valor para Chile. Benedetti S.; Loewe V.; López C. y M. Gonzalez (Editoras). INFOR. Chile. Pp.: 157-188.

**Durand-Cresswell, R., Boulay, M. and Franclet, A., 1982.** Vegetative propagation of *Eucalyptus*. In: Tissue culture in forestry. Bonga J. and D. Dursan (Eds.). Martinus Nijhoff, The Hague, 99: 150-181.

**Engelmann, F., 1997.** *In vitro* conservation methods. In: Biotechnology and plant genetic resources. Callow JA, Ford Lloyd BV and HJ Newbury, Eds. Wallingford: CAB International. Pp 119-162.

**Engelmann, F., 2000.** Importance of criopreservación for the conservation of plant genetic resources. In: Criopreservación of tropical plant germplasm: Current research progress and applications. Engelmann F. and H. Takagi (Eds.) Tsukuba: International Research Centre for Agricultural Sciences, and Rome: International Plant Genetic Resources Institute. Pp.: 8-20.

**Francllet, A., Boulay, M., Bekkaoui, F., Fouret, Y., Verschoore-Martouzet, B. and Walker, W., 1987.** Rejuvenation. En: Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol I. General Principles and Biotechnology. Bonga J. M. y D.J. Durzan (Eds.). Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht. Pp.: 232-248.

**Francllet, A. and Boulay, M., 1982.** Micropropagation of frost resistant eucalypt clones.

Aust. For. Res. 13: 83-89.

**Furze, M. and Cresswell, C., 1985.** Micropropagation of *Eucalyptus grandis* and *E. nitens* using tissue culture techniques. S. Afr. For. J. 135:20-23.

**Gahan, P. B., 2007.** Totipotency and the cell cycle. In: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Jain S.M. and H. Häggman (Eds.). New York: Springer. Pp.: 3–14.

**Gahan, P. B. and George, E. F., 2008.** Adventitious regeneration. In: Plant Propagation by Tissue Culture, 3ª Ed. George, E.F., Hall, M.A., de Klerk, G.J. (eds.). Springer, Dordrecht. Pp.: 355-401.

**Grewal, S., Ahuja, A. and Atal, C., 1980.** In vitro proliferation of shoot apices of *Eucalyptus citriodora* Hook. Ind. J. Exp. Biol. 18:775-777.

**Greenwodd, M. S., 1987.** Rejuvenation of forest trees. Plant Growth Regulation. Vol. 6 (1):1-12.

**Goncalves, A., 1980.** Reversion to juvenility and cloning of *Eucalyptus urophylla* S.T. Blake in cell and tissue culture systems. IUFRO Symposium and Workshop on Genetic Improvement and Productivity of Fast Growing Tree Species. Sao Paulo, Brazil. Pp 786-787.

**Gutiérrez, B., 2005.** Propagación vegetativa y silvicultura clonal: Antecedentes generales. En: Clonación de raulí, estado actual y perspectivas. Editado por Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR, INFOR, UACH. Pp.: 19-40.

**Gutiérrez, B., Ortiz, O., Molin, M., Chung, P., Koch, L., González, M., Casanova, K. y Soto, H., 2005.** Protocolos de clonación para *Eucalyptus camaldulensis*: macro y micropropagación. Instituto Forestal. 62 p.

**Gutiérrez, B., Molina, M. y Alzugaray, P., 2004.** *Eucalyptus nitens* en Chile. Primera Monografía. Informe Técnico N° 165, INFOR-CORFO. Pp.: 27-40.

**Gutiérrez, B., 1998.** La multiplicación clonal en el mejoramiento genético forestal. En: Curso Mejora Genética Forestal Operativa. Editado por: Ipinza R.; Gutiérrez B. y V. Emhart. UACH, INFOR, CONAF. Valdivia 16 al 21 de noviembre de 1998. Pp.: 201-218.

**Gutiérrez, B., 1995.** Consideraciones sobre la fisiología y el estado de madurez en el enraizamiento de estacas de especies forestales. Ciencia e Investigación Forestal 9(2): 261-276.

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

**Haissig, B. E., 1986.** Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. New root

formation in plants and cuttings. In: M.B. Jackson (Ed.). Martinus Nijhoff, Boston. Pp.: 141-189.

**Häggman, H. M., Rynänen, L. A.; Aronen, T. S and Krajnakova, J., 1998.** Criopreservation of embryogenic cultures of Scots Pine. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 45-53.

**Hargreaves, C. and Menzies, M., 2007.** Organogenesis and cryopreservation of juvenile Radiata Pine. In: *Protocols for the micropropagation of woody trees and fruit*. Jain S.M. and H. Häggman (Eds.) Dordrecht: Springer. Pp 51-65.

**Hartmann, H. T., Kester, D. E. and Davis Jr., F.T., 1990.** *Plant Propagation, Principles and Practices*. Fifth Edition. Prentice Hall, Englewood cliffs, New Jersey, USA. 647 p.

**Ikemori, Y., 1987.** Epicormic shoots from the branches of *Eucalyptus grandis* as an explant source for *in vitro* culture. *Comm. For. Rev.* 66: 351-355.

**Jokipii, S., Rynänen, L., Kallio, P., Aronen, T. and Häggman, H., 2004.** A cryopreservation method maintaining the genetic fidelity of a model forest tree, *Populus tremula* L. X *Populus tremuloides* Michx. *Plant Science* 166: 799-806.

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

**Kleinschmit, J., 1977.** Problems of vegetative propagation. Third world consultation on Forest Tree Breeding. Canberra, Australia. 21-26 march 1977. 13 p.

**Lambardi, M., Fabbri, A. and Caccavale, A., 2000.** Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of *in vitro* grown shoot tips. *Plant Cell Reports* 19: 213-218.

**Le Roux, J. and Van Staden, J., 1991.** Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus* – a review. *Tree Physiology* 9: 435-477.

**Li, Y., Dutkowski, G. W., Apiolaza, L. A., Pilbeam, D. J., Costa e Silva, J. and Potts, B. M., 2007.** The genetic architecture of a *Eucalyptus globulus* full-sib breeding population in Australia. *Forest Genetics* 12: 167-179

**Libby, W. J. and Rauter, R. M., 1984.** Advantages of Clonal Forestry. *The Forestry Chronicle*. Volume 60 (3): 145-149

**Mc Comb, J. and Bennett, I., 1986.** *Eucalyptus* (*Eucalyptus* spp). In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Volume 1: *Trees* 1. Y.P.S. Bajaj (Ed.). Springer-Verlag, Berlin. Pp.: 340-362.

**Mac Rae, S. and Coterrill, 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 y 29. Pp.: 102-110.

**Marum, L., Estêvão, C., Oliveira, M. M., Amancio, S., Rodriguez, L. and Miguel, C., 2005.** Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of Maritime Pine – effect of cryoprotectant and suspension density. *Cryoletters* 25: 263-274.

**Meynier, V., 1985.** Mise en culture *in vitro* de meristmes de noyers hybrides. *C R Acad. Sci. Paris Ser.* 301(5): 261-264.

**Monteuuis, O., 1991.** Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through in vitro meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. *Physiologia Plantarum*. Vol 8(1): 257-263.

**Molina, M. P., Gutiérrez, B. y Pinilla, J. C., 2010.** Desempeño en terreno de clones de alta productividad de *Eucalyptus camaldulensis* seleccionados para reforestar las zonas áridas y semiáridas de Chile. En: Libro de resúmenes del V Congreso Chileno de Ciencias Forestales, Diálogos entre la ciencia y la sociedad. Temuco, Chile. Octubre, 2010.

**Oller, J., Toribio, M., Celestino, C. y Toval, G., 2004.** The culture of elite adult trees in a genetic improvement programme through *Eucalyptus globulus* Labill., clonal micropropagation. *Eucalyptus in a Changing World*. Proc.of IUFRO Conf., Aveiro 11-15 October 2004.

**Ortiz, O. y Koch, L., 2010.** Micropropagación de árboles superiores de *E. globulus*, seleccionados en zonas de estrés hídrico. Informe técnico, proyecto INNOVACHILE “Generación y Producción de plantas de *E. globulus* tolerantes a la sequía”, INFOR. 25 p.

**Ortiz, O., Sabja, A. y Koch, L., 2010.** Banco de germoplasma *in vitro* de árboles plus de raulí *Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst. En: Libro de resúmenes del V Congreso Chileno de Ciencias Forestales, Diálogos entre la ciencia y la sociedad. Temuco, Chile. Octubre, 2010.

**Ortiz, O.; Sabja, A. y Koch, L., 2006a.** Protocolo de micropropagación de lenga. En: Cultivo *in vitro* de Lenga (*Nothofagus pumilio*). Editado por Braulio Gutiérrez. INFOR. CHILE. 76 p.

**Ortiz, O., González, M E. y Koch, L., 2006b.** Micropropagación de Árboles Superiores de *Acacia melanoxylon* R. BR. En: Actas del 2do Congreso IUFRO Latinoamericano. Bosques: La creciente importancia de sus funciones ambientales, sociales y económicas. La Serena, Chile, 23 a 27 de octubre de 2006.

**Ortiz, O y Gutiérrez, B., 2005.** Macropropagación vegetativa de raulí: injertación y enraizamiento de estacas. En: Clonación de raulí, estado actual y perspectivas. Editado por Braulio Gutiérrez, Oriana Ortiz y María Paz Molina. CEFOR, INFOR, UACH. pp 19-39.

**Padayachee, K., Watt, M. P., Edwards, N. y Mycock, D.J., 2009.** Cryopreservation as a tool for the conservation of *Eucalyptus* genetic variability: concepts and challenges. Southern Forests: a Journal of Forest Science. Volume 71 (2): 165-170.

**Pâques, M., Monod, V., Poissonnier, M. y Dereuddre, J., 2002.** Cryopreservation of *Eucalyptus* spp. Shoot Tips by the Encapsulation-Dehydration Procedure. Cryopreservation of plant germplasm II. Towill, L. E. y Bajaj, Y. P. S. (Eds.). 396 p.

**Pinilla, J. C., Molina, M., Hernández, G., Barros, S., Ortiz, O. y Navarrete, M., 2010.** Avances de la investigación con especies del género *Acacia* en Chile. Informe Técnico N° 179, Instituto Forestal. 82 p.

**Potts, B., Volker, P. y Dungey, H., 1992.** Barriers to the production of hybrids in *Eucalyptus*. In: Mass Production for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species. AFOCEL-IUFRO Symposium 1992. Bordeaux. Association Foret Cellulose. Nangis, France. Pp.: 193-204.

**Rao, N. K., 2004.** Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3:136-145.

**Reed, B. M., De Noma, J. and Chang, Y., 2000.** Application of cryopreservation protocols at a clonal genebank. In: Cryopreservation of tropical plant germplasm – current research progress and applications 246–249. Engelmann F.; Takagi H. and Tsukuba (Eds). JIRCAS. Rome: IPGRI.

**Rodríguez, R., Fernández, M., Pacheco, J. y Cañal, M.J., 2005.** Envejecimiento vegetal, una barrera a la propagación, alternativas. En: Biotecnología vegetal en especies leñosas de interés forestal. Editado por Sánchez M. y D. Ríos. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. Pp.: 29-48.

**Roulund, H. y Olesen, K., 1992.** Mass propagation of improved material. Lecture Note D-7. Danida Forest Seed Centre. Denmark. 13 p.

**Sabja, A. M., Ortiz, O. y Triviño, C., 2008.** Avances de Clonación *in vitro* de árboles adultos de raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst. para propagación comercial. Agrociencia 42: 595-603.

**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.

**Sánchez, J., Ortega, U., Majada, J. y Txarterina, K., 2008.** Optimización de la propagación vegetativa por estaquillado de genotipos de interés comercial de *Pinus radiata*. Actas de la IV Reunión sobre Repoblaciones Forestales. Cuad. Soc. Esp. Cienc. For. 28: 201-205.

**Schmidt, L., 1993.** Vegetative Propagation: Guidelines on Grafting, Air Layering and

Cuttings. Food and Agriculture Organization of the United Nations (Eds). UNDP/FAO Regional Project on Improved Productivity of Man Made Forests Through Application of Technological Advances in Tree Breeding and Propagation. Field Manual N° 5. 23 p.

**Thorpe, T, Harry, I. and Kumar, P., 1991.** Application of micropropagation to forestry. In: Micropropagation: technology and application Debergh P. and P. Zimmerman. (Eds.) Kluwer Academic Publisher. Pp: 311-336.

**Watt, M. P., Blakeway, F .C., Herman, B. and Denison, N., 1997.** Biotechnology developments in tree improvement programmes in commercial forestry in South Africa. South African Journal of Science 93: 100-102.

**Watt, M. P., Mycock, D. J., Blakeway, F. C. y Berjak, P., 2000.** Applications of *in vitro* methods to *Eucalyptus* germplasm conservation. Southern African Forestry Journal. Volume 187 (1).

**Wang, B. S. P., Charest, P.J. y Downie, B., 1993.** *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. Food & Agriculture Org. 83 p.

**Yeung, E., Rahman, H. y Thorpe, T., 1996.** Comparative Development of zygotic and microspore-derived embryos in *Brassica napus* L. cv Topas. I. Histodifferentiation Int. J. Plant Sci. 157(1). Pp.: 27-39.

**Zobel, B. y Talbert, J., 1988.** Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Trad. por Manuel Guzmán Ortiz, Limusa, México, 545 p.