
MICROPROPAGACIÓN DE ÁRBOLES SUPERIORES DE *Acacia melanoxylon* R. BR.

Oriana Ortiz¹; María Elisa González²; Laura Koch³

RESUMEN

Acacia melanoxylon R. Br. es una especie forestal cuya madera exhibe interesantes características para su utilización industrial. Sumado a lo anterior, presenta también adecuadas tasas de crecimiento, que la posicionan como una alternativa de cultivo de gran valor para diversificar la producción forestal nacional.

La situación anterior ha motivado que se la considere como objeto de investigaciones tendientes a maximizar su potencial productivo. Entre tales investigaciones, en el marco del proyecto FDI-CORFO—“Masificación y Desarrollo de Opciones Productivas en Base a Especies de Acacia Probadas en Chile”, se desarrolló procedimientos para posibilitar su reproducción vegetativa mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

En el documento se describe el procedimiento desarrollado para clonar árboles plus adultos de *Acacia melanoxylon*, el cual permitió establecer cultivos *in vitro* en el 50% de los genotipos utilizados. Se discute los resultados obtenidos en las fases de inducción, multiplicación y enraizamiento de material vegetal adulto, concluyéndose que las técnicas de micropropagación constituyen una valiosa herramienta para multiplicar y masificar árboles selectos de esta especie.

Palabras claves: *Acacia melanoxylon*, propagación vegetativa, cultivo *in vitro*.

¹ Instituto Forestal. Chile. E-mail: oortiz@infor.cl

² Instituto Forestal. Chile. E-mail: mgonzalez@infor.cl

³ Instituto Forestal. Chile. E-Mail. lkoch@infor.cl



MICROPROPAGATION IN SUPERIOR *Acacia melanoxylon* R.BR. TREES

SUMMARY

Acacia melanoxylon R.Br. is a forest species whose wood exhibits interesting characteristics to industrial use. It also presents suitable growth rates that position it as an alternative forest culture of great value to diversify the national forest production.

The previous statement has motivated that acacia is considered an interesting species for research to maximize its productive potential. Among such studies, within the framework of project FDI-CORFO «Massive Propagation and Development of Productive Options on the basis of Proven Species of Acacia in Chile», procedures were developed to make possible their vegetative propagation through *in vitro* techniques.

In this document, is described the developed procedure to micropropagate adult trees of *Acacia melanoxylon*, which allowed to establish *in vitro* cultures in 50% of the tested genotypes. The results obtained in the induction, multiplication and rooting phases of adult vegetal material are discussed, concluding that the micropropagation techniques are a valuable tool to multiply and to propagate selected trees of this species.

Keywords: *Acacia melanoxylon*, vegetative propagation, *in vitro*-culture.

INTRODUCCIÓN

En Chile, se ha introducido diversas especies de acacias, las que se han destacado por mostrar una gran adaptabilidad a diferentes condiciones de sitio, exhibiendo altas tasas de crecimiento y variados usos para su madera.

Acacia melanoxylon R. Br., particularmente, presenta una madera de muy buena calidad, apropiada para ser usada en la elaboración de productos de alto valor, lo que sumado a sus adecuadas tasas de crecimiento, la posicionan como una alternativa de gran interés económico en la industria forestal nacional (Pinilla *et al.*, 2005).

En atención a estas características, *A. melanoxylon* fue una de las especies consideradas en el proyecto FDI-CORFO "Masificación y Desarrollo de Opciones Productivas en Base a Especies de Acacia Probadas en Chile", donde se ha desarrollado diversas investigaciones tendientes a maximizar su potencial productivo. Una línea de investigación relevante, es la identificación y selección de árboles superiores en plantaciones locales y el desarrollo de procedimientos para posibilitar su reproducción vegetativa, mediante técnicas de cultivo *in vitro*.

La obtención de múltiples réplicas vegetativas de individuos selectos, permitirá disponer de material apropiado para establecer plantaciones que puedan ser manejadas bajo esquemas de silvicultura clonal, aprovechando de esta manera las ventajas productivas que se asocian al uso de la propagación vegetativa y silvicultura clonal de especies forestales.

La técnica de cultivo *in vitro*, seleccionada fue la micropropagación por vía organogénica, que conlleva la producción de plantas a través de la formación de brotes que deben ser enraizados en un proceso de varias etapas (Bhojwani y Razdan, 1983; Chalupa, 1987; Smith, 1997).

La micropropagación como técnica, ofrece el potencial de lograr altas tasas de multiplicación, reversión y mantención de la juvenilidad y producción de plantas con estructura radicular uniforme (Ahuja, 1993; Francllet *et al.*, 1987; Libby y Ahuja, 1993; Viera *et al.*, 1992). Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la regeneración de plantas desde árboles adultos, permite capturar y transferir todo el potencial genético del genotipo seleccionado (Ikemori *et al.*, 1994; Merkle y Dean, 2000; Talbert *et al.*, 1993).

Diversos estudios de micropropagación en acacias, coinciden en que es difícil establecer cultivos de árboles adultos debido a la contaminación de los explantes, especialmente cuando estos provienen de la copa del árbol (Beck *et al.*, 1998 y 2000; Quoirin *et al.*, 2001). No obstante, se ha logrado iniciar cultivos a través de material obtenido de rebrotes de tocón (Beck *et al.*, 1998) y a través de cultivo de meristemas (Beck *et al.*, 2000).

Jones y Smith (1988), establecieron cultivos *in vitro* de *Acacia melanoxylon*, utilizando segmentos nodales de estacas enraizadas en vivero, obtenidas de rebrotes de tocón de un árbol adulto. Los explantes, inicialmente desarrollaron brotes axilares cuyas hojas mostraban una morfología de estado adulto (filodios), que al cabo de un tiempo se caían dejando un

tallo inadecuado para enraizamiento. La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, especialmente de citoquininas, mejoró el crecimiento de los brotes axilares y disminuyó la clorosis de las hojas.

Jones (1986), menciona que material juvenil de la especie crece bien en cultivos *in vitro*, mostrando multiplicación de brotes y enraizamiento espontáneo, sin requerir del uso de reguladores de crecimiento. Las plantas micropropagadas, tampoco presentaban problemas en la etapa de aclimatación y posterior crecimiento en vivero.

El propósito de esta investigación, fue desarrollar un procedimiento de micropropagación que permitiera regenerar plantas de árboles adultos de *Acacia melanoxylon* específicos, previamente seleccionados de acuerdo a sus características fenotípicas superiores. Los cultivos fueron establecidos a partir de brotes epicórmicos, se evaluó el efecto de diferentes medios de cultivo, en cuanto a su composición y reguladores de crecimiento, sobre la calidad del cultivo y tasas de enraizamiento obtenidas, finalmente se implementó un procedimiento de aclimatación de plantas micropropagadas.

MATERIAL Y METODO

Material Vegetal y Establecimiento de Cultivos

En el proyecto fueron seleccionados 12 árboles superiores de *Acacia melanoxylon*, en distintas localidades distribuidas entre las Regiones del Bio Bio y de Los Lagos. Se colectó trozos de ramas de los árboles, de entre 1 a 4 cm de diámetro y 30 cm de longitud. Este material fue lavado con detergente líquido (Quix®), colocado en frascos con perlita y agua previamente esterilizados y llevado a una sala acondicionada para estimular la formación de brotes epicórmicos. Las condiciones ambientales fueron 22° C de temperatura, humedad relativa sobre 80% y fotoperiodo de 16 horas luz.

Los brotes epicórmicos obtenidos, fueron seccionados en segmentos nodales y apicales de 1 a 2 cm, que tuvieran al menos un punto de crecimiento. La esterilización fue realizada con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% (v/v) por 10 minutos, seguida de cuatro enjuagues de 10 minutos cada uno, con agua destilada estéril.

El cultivo fue realizado en el medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962), complementado con 0,1 mg/L de tiamina, 0,1 mg/L de piridoxina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 100 mg/L de m-inositol, 6 g/L de agar y 3% de sacarosa. El medio fue adicionado con 1 μM de BAP y 0,01 μM de ANA.

Los explantes fueron cambiados a medio nutritivo fresco cada 21 días, permaneciendo durante cuatro meses en el medio de inducción.

En todos los medios utilizados, el pH fue ajustado en $5,8 \pm 0,05$, antes de su esterilización en autoclave a 121°C y 0,1MPa, durante 20 minutos. Los cultivos fueron mantenidos en una cámara de crecimiento a 22 ± 2 °C con 16 horas de fotoperiodo, usando lámparas fluorescentes ($57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR).



Multiplicación de Brotes

De acuerdo a observaciones preliminares, se probó cuatro tratamientos de multiplicación. En el primero (MS1) se utilizó el medio de cultivo de la etapa anterior, mientras que para el segundo (MS2) se formuló un medio constituido por las sales minerales de medio MS complementado con las vitaminas de White (1943). El tercer tratamiento correspondió a la formulación del medio nutritivo Lainé y David (1994). En el cuarto tratamiento, se evaluó el cultivo en forma alternada de los medios MS1 y MS2.

Los medios fueron adicionados con 20 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar y 1 μ M de BAP más 0,01 μ M de ANA.

El ensayo, se inició una vez que los brotes *in vitro* mostraron desarrollo de hojas bipinnadas (estado juvenil).

Enraizamiento de Brotes

Después de seis meses de cultivo, se seleccionó brotes de material adulto y juvenil, elongados y vigorosos, de 2 a 3 cm que presentaran hojas bipinnadas. El material juvenil, fue obtenido a partir de semilla germinada *in vitro*.

Los explantes fueron seccionados y sometido a cuatro concentraciones de AIB: 0; 0,5; 1,0; y 1,5 mg/L, las que fueron adicionadas al medio de cultivo durante su preparación. Se utilizó como medio base, el medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, los compuestos orgánicos del medio MS1, 20 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar.

Los cultivos fueron mantenidos por 7 días en oscuridad y luego en fotoperíodo normal, hasta el momento de su evaluación.

Aclimatación de Plantas

Las plantas obtenidas del ensayo de enraizamiento, fueron colocadas en cajas estériles, que contenían un sustrato compuesto por turba y perlita en una relación de 1:3. El sustrato fue adicionado con el medio MS con sus macronutrientes reducidos a la mitad, en forma líquida y sin sacarosa.

Las cajas fueron cubiertas con dos capas de film de polietileno, luego de completar un período de 30 días, estas capas fueron removidas en forma gradual hasta lograr la adaptación de los estomas a un ambiente normal.

Diseño Experimental y Análisis de Datos

El diseño de los ensayos fue del tipo factorial totalmente aleatorizado. En el ensayo de multiplicación de brotes se evaluó el efecto de los tratamientos sobre cuatro clones de material adulto, disponiéndose de 3 a 12 repeticiones por cada uno de ellos. El ensayo fue medido, al completar cuatro semanas de cultivo.



En el ensayo de enraizamiento se evaluó el efecto de las distintas concentraciones de AIB, sobre dos clones de material adulto y dos clones de material juvenil, disponiéndose de 12 a 36 réplicas por cada tratamiento. El ensayo fue evaluado a los 25 días.

La validez estadística de los resultados se comprobó mediante análisis de varianza, donde se evaluó el efecto de los tratamientos, el clon y la interacción clon por tratamiento. Las medias entre tratamiento fueron comparadas mediante la prueba de Tukey, a un nivel de significancia $P < 0,005$. Los datos de presencia y ausencia, fueron transformados $\text{ArcoSeno}(\text{raiz}(v))$, antes de proceder a su análisis. La información fue procesada con el software estadístico Infostat®, versión 2004.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento de Cultivos

La emergencia de brotes epicórmicos desde los trozos de ramas, se registró después de 4-6 semanas desde que éstos fueron colocados en un ambiente de alta humedad (Figura N°1). Los brotes desarrollaron filodios, que no son propiamente hojas sino que corresponde al desarrollo del peciolo, morfología asociada a un estado de madurez de la planta (Brodrribb y Hill, 1993).

Se obtuvo brotes epicórmicos en el 80% de los árboles superiores. La frecuencia de brotación a nivel del clon, varió entre 20 a 100%, dependiendo de la homogeneidad y calidad de las secciones de ramas colectadas. Desde cada trozo de rama, se generaron entre 1 a 10 brotes, que podían crecer hasta 12 cm de longitud; la emergencia de nuevos brotes continuó por aproximadamente cuatro semanas, luego del primer corte.

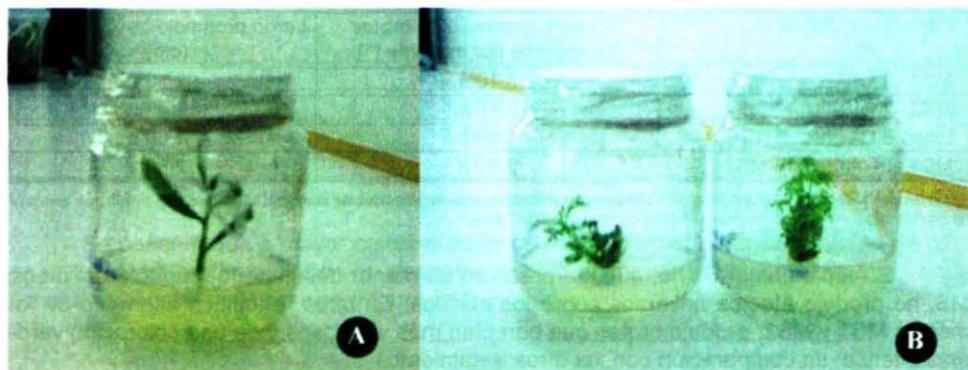
La contaminación promedio de los cultivos fue de 16,1%, principalmente del tipo bacteriana, indicando una buena calidad del material inicial en cuanto a sus condiciones de asepsia; una de las ventajas teóricas del material vegetal producido bajo condiciones controladas, es que facilita el establecimiento de cultivos libres de contaminación (Hernández *et al*, 2003 a).



Figura N° 1

BROTOS EPICÓRMICOS CON DESARROLLO DE FILODIOS, GENERADOS DESDE TROZOS DE RAMAS DE ÁRBOLES ADULTOS DE *A. melanoxylon*.

Los explantes establecidos, respondieron al medio de inducción mostrando brotación *in vitro* con formación de filodios, coincidiendo con el estudio de Jones y Smith (1988). Al cuarto mes de cultivo, los brotes comenzaron a formar hojas bipinnadas juveniles, como las mostradas en la Figura N° 2. Según Brodrribb y Hill (1993), los filodios le confieren a la especie una mayor resistencia tanto a períodos cortos como largos de estrés hídrico; mientras que la función de las hojas bipinnadas sería maximizar el crecimiento durante la fase de plántula.



Se muestra el cambio desde material adulto a material juvenil. (A) Explante inicial con filodios, (B) el mismo explante sub- dividido, exhibiendo hojas bipinnadas juveniles, después de completar cuatro meses de cultivo en medio de inducción.

Figura N° 2
ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS DE *A. melanoxylon*

Se logró establecer cultivos viables en el 50% de los clones superiores seleccionados, la principal causa de pérdida de explantes se debió a la clorosis y posterior caída de los filodios, situación que concuerda con lo observado por Jones y Smith (1988). No se evaluó dosis más altas de BAP, debido a que en observaciones preliminares se advirtió que producían una excesiva formación de callo en la base del explante, impidiendo el desarrollo de los cultivos.

Según Hernández *et al.* (2003 b), tanto la formación de brotes epicórmicos, como la calidad del cultivo obtenido, se encuentran condicionadas por la época de colecta del material; es probable que controlando esta variable se pudiera aumentar el número de clones establecidos *in vitro*. No obstante ello, el genotipo es un factor determinante en la predisposición a la propagación vegetativa de árboles adultos (Oller *et al.*, 2004). Al considerar, que en el presente estudio se trabajó con un número reducido de clones (12 árboles superiores), el resultado logrado es bastante satisfactorio.

El cultivo se consideró establecido cuando los explantes desarrollaron hojas bipinnadas (Figura N° 2b).

Multiplicación.

No se encontró diferencias entre clones en cuanto a las tasa de multiplicación observada. Todas las formulaciones el medio MS lograron buenos resultados, tanto en la tasa de multiplicación como en el tamaño alcanzado por los brotes (Cuadro N° 1).

Cuadro N° 1
EFFECTO DE DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, SOBRE LA MULTIPLICACIÓN DE BROTTRES
IN VITRO DESPUÉS DE 4 SEMANAS DE CULTIVO

Medio de cultivo	Número promedio de brotes adventicios por explante (*)	Largo promedio de los brotes (cm)
MS1	3,10 a	2,50 a
MS2	2,75 a	2,65 a
Lainé & David	1,50 b	1,50 b
MS1 alternado con MS2	2,90 a	2,80 a

(*) Brotes con menos de 0,25 cm de largo no fueron contabilizados. Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0,05$ por la prueba de Tukey.

El medio Lainé&David, aunque presentó un menor desempeño respecto del medio MS, no produjo efectos adversos sobre los cultivos. En tanto, el cultivo alternado de los medios MS1 y MS2, produjo brotes que parecían más vigorosos y de una coloración verde más intensa, en comparación con los otros tratamientos.

Respecto de otras especies de *Acacia*, la tasa de multiplicación es superior a la obtenida en explantes juveniles de *A. mearnsii* (Borges *et al.*, 2004) e inferior al de material adulto de 10 años de *A. mangium* (Nanda *et al.*, 2004). Por otro lado, Jones y Smith (1988) utilizando una concentración de BAP cuatro veces superior a la empleada en este estudio, lograron una rápida formación de brotes *in vitro*, pero se producía clorosis y caída de hojas con una pérdida importante de explantes, efecto que no se observó en los tratamientos de este trabajo.

Es probable, que modificaciones en la concentración de hormonas pudiera aumentar la tasa de multiplicación, aún cuando el procedimiento desarrollado permite multiplicar adecuadamente el material *in vitro*.

Enraizamiento

No se observó diferencias en el porcentaje de enraizamiento entre clones y tampoco entre material adulto y juvenil.

Los porcentajes de enraizamiento son bastantes altos y similares para todos los tratamientos complementados con AIB (Cuadro N° 2). El enraizamiento observado en el tratamiento sin hormona, es producto de enraizamiento espontáneo ocurrido en explantes juveniles.

Los tratamientos con concentraciones más altas de hormona presentaron mayor número de raíces, sin embargo éstas eran más cortas respecto del medio con menor dosis

de AIB. Además, en un porcentaje importante de brotes, concentraciones altas de AIB provocaron clorosis y caída de hojas con la consecuente pérdida de vigor de las plantas. No obstante, una gran proporción de estas plantas volvió a brotar y a formar hojas durante la etapa siguiente de aclimatación, aunque se requirió de más tiempo para su crecimiento.

Cuadro N° 2

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIB, SOBRE EL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE *Acacia melanoxylon*, DESPUÉS DE 25 DÍAS DE CULTIVO

Concentración AIB (mg/L)	Enraizamiento (%)	Promedio de Raíces (N°)	Largo Promedio de Raíces (mm)	Explantos con Clorosis en las Hojas (%)
0	7,3 b	0,11 b	5,67 b	16,3 c
0,5	78,1 a	3,25 ab	14,25 a	20,5 c
1	68,1 a	3,74 ab	12,07 ab	42,0 b
1,5	70,2 a	4,67 a	10,43 ab	69,7 a

Valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a $P < 0,05$ por la prueba de Tukey.

Se observó que a mayor concentración de AIB se formaba mayor cantidad de callo en la base del brote, situación no deseable debido a que se producen problemas en la conexión vascular de las raíces (Figura N° 3).



Figura N° 3

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AIB, SOBRE EL ENRAIZAMIENTO DE BROTES *IN VITRO* DE UN CLON DE MATERIAL ADULTO DE *A. melanoxylon*

El mejor resultado en cuanto a enraizamiento de brotes en todas las variables, evaluadas se obtuvo con una concentración de 0,5 mg/L de AIB, resultado que es similar al determinado para material adulto de *A. mangium* (Nanda *et al.*, 2004).

Aclimatación

En esta etapa se obtuvo un 90% de sobrevivencia de los plantas (Figura N° 4), al igual que en el trabajo de Sabja *et al.* (2005) donde se empleó un procedimiento parecido en *N. alpina*, se observó aumento en el tamaño de las hojas, elongación tanto apical como radicular y crecimiento vigoroso y abundante de raíces secundarias.



A la izquierda, una explante enraizado antes de ser puesto en aclimatación. A la derecha, plantas aclimatadas luego de 30 días de permanencia en caja de aclimatación, la cubierta plástica se ha removido por completo.

Figura N° 4
ACLIMATACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE *A. melanoxyton*.

CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado en este trabajo permite propagar *in vitro* árboles adultos de *A. melanoxyton*, utilizando brotes epicórmicos como material de inicio de cultivos, que tiene la ventaja de ser un método no destructivo del árbol original, como sucede con el empleo de rebrotes de tocón, siendo además un procedimiento más fácil de implementar que el cultivo de meristemas. Es una metodología que además, puede ser replicada para el rejuvenecimiento y micropropagación de árboles adultos de otras especies de *Acacia*, la cual hasta ahora no había sido reportada.

Los resultados obtenidos en cuanto a tasas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación de plantas hacen viable la utilización de este protocolo en la producción de plantas de material genético de alto valor de *A. melanoxyton*, para aprovechar de esta forma las ventajas productivas asociadas a la silvicultura clonal de especies forestales.

REFERENCIAS

- Ahuja, M. R., 1993.** Biotechnology and Clonal Forestry. In: Ahuja M. and Libby, W. (Editors) Clonal Forestry I. Genetic and Biotechnology. Springer-Verlag. Berlin. Pp:135-144.
- Beck, S., Dunlop, R. y J. Staden, 1998.** Rejuvenation and Micropropagation of Adult *Acacia mearnsii* Using Coppice Material. *Plant Growth Regulation*, 26: 149-153.
- Beck, S., Dunlop, R. y J. Staden, 2000.** Meristem Culture of *Acacia mearnsii*. *Plant Growth Regulation*, 32: 49-58.
- Bhojwani, S. y Radzdan, M., 1983.** Developments in Crop Science (5). *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier Science Publishers Company Inc. Pp: 313-337.
- Borges, N., Cássia, R. y M. Pimentel, 2004.** Multiplicação *in Vitro* de Gemas Axilares de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). *R. Árvore, Viosa-MG*, v.28, n.4:493-498.
- Brodribb, T. y R. Hill, 1993.** A Physiological Comparison of Leaves and Phyllodes in *Acacia melanoxylon*. *Australian Journal of Botany* 41(3) 293 - 305
- Chalupa, V., 1987.** European Hardwoods. In: Bonga, J. and Durzan, D. (Editors). *Cell and Tissue Culture in Forestry. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperm and Palm*. Vol.3. Martinus Nijhoff Publishers. Pp:232-248.
- Francllet, A.; Boulay, M.; Bekkaoui, F.; Fouret, Y.; Verschore – Maryouzet, B. y N. Walter, 1987.** In: Bonga, J. and Durzan, D. (Editors). *Cell and Tissue Culture in Forestry. General Principles and Biotechnology* Vol I. Martinus Nijhoff Publishers. Pp: 232-248.
- Hernández, I.; Celestino, C. y M. Toribio, 2003 a.** Vegetative Propagation of *Quercus suber* L. by Somatic Embryogenesis. I. Factors Affecting the Induction in Leaves from Mature Cork Oak Trees. *Plant Cell Report* 21:759-764.
- Hernández, I., Celestino, C. y M. Toribio, 2003 b.** Vegetative Propagation of *Quercus suber* L. by Somatic Embryogenesis. II. Plant Regeneration from Selected Cork Oak Trees. *Plant Cell Report* 21:765-770.
- Ikemori, Y.K., Penchel, R.M., y F.L.G. Bertolucci, 1994.** Integrating Biotechnology into *Eucalyptus* Breeding. International Wood Biotechnology Symposium. August 31th- September 1th. Tokio, Japan. pp-77-84
- Jones, C., 1986.** Getting Started in Micropropagation of Tasmanian Blackwood (*Acacia melanoxylon*). Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society, Volume 36, Pp. 477-481. NZ FRI reprint 2216.
- Jones, C. and Smith, D., 1988.** Effect of 6-Benzylaminopurine and 1-Naphthylacetic Acid on In-vitro Axillary Bud Development of Mature *Acacia melanoxylon*. Combined Proceedings of the International Plant Propagators' Society, Volume 38: 389-393. NZ FRI reprint 2217.
- Lainé, E. y A. David, 1994.** Regeneration of Plants from Leaf Explants of Micropropagated Clonal *Eucalyptus grandis*. *Plant Cell Reports*, V13: 473-476.
- Merkle, S. y J. Dean, 2000.** *J. Current Opinión in Biotechnology*, 11: 298-302.

Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A Revised—Media for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco—Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Libby, W. y M. Ahuja, 1993. Micropropagation and Clonal Options in Forestry. In: Ahuja, M. (Editor). *Micropropagation: Technology and application.* Kluwer Academic Publishers. Pp: 425-442.

Nanda, R.; Das P. y G. Rout, 2004. *In Vitro* Clonal Propagation of *Acacia mangium* Willd. and its Evaluation of Genetic Stability through RAPD Marker. *Ann. For. Sci.* 61: 381-386.

Oller, J., Toribio, M., Celestino C. y G. Toval, 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.

Pinilla, J.; Molina, M. y B. Gutiérrez, 2005. La Investigación en *Acacia dealbata*, *A. melanoxylon* y *A. mearnsii* en Chile. Instituto Forestal. Concepción – Chile. 112 p.

Quoirin, M., Martins, K. M., Silva y M. Alves, 2001. Micropropagation of Juvenile and Adult Blackwattle. *Actas Simposio Red-Bio 2001: IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología.* Pp. 150-157

Sabja, A., Ortiz, O. y C. Treviño, 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.

Smith, D., 1997. The Role of *In Vitro* Methods in Pine Plantation Establishment: The lesson from New Zealand. *Plant Tissue Culture and Biotechnology.* June. 3 (2): 63-73.

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

Vieiria, J., Bressam, D., Diniz A., Silva A. y M. Freitas, 1992. Clonal Silvicultura at Champion Paper e Celulosa Ltda.-Brazil. *Proceedings Mass Production technology for genetically improved fase growing forest tree species.* Tomo. IUFRO Symposium Bordeaux. France. pp 283-291

White, P. R., 1943. *A Handbook of Plant Tissue Cculture.* Lancaster: Cattell.