

## Biotécnicas aplicadas en sauces y álamos en América Latina.

ABEDINI, W.\*\*; ADEMA, M.\*\*; GALARCO, S.\* Y SHARRY, S.\*\*

Diagonal 113 n° 469. CC 31 La Plata (1900), Buenos Aires, Argentina.

\*Curso de Introducción a la Dasonomía.

\*\*Centro Experimental de Propagación Vegetativa, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP-CICPBA.

ceprove@agro.unlp.edu.ar

### Resumen

La investigación y las aplicaciones de la biotecnología en el sector forestal avanzan rápidamente, pudiéndose identificar cuatro biotécnicas que se utilizan principalmente: micropropagación y cultivo de tejidos, biología molecular y marcadores, modificación genética, genómica y crioconservación. La mayoría de las actividades de biotecnología forestal se realizan en países desarrollados, siendo los más activos Estados Unidos, Francia y Canadá. India y China son los países en desarrollo y en transición que más actividades reportan. Aunque la biotecnología forestal se ha extendido a las actividades de por lo menos 140 géneros de árboles, la gran mayoría de los proyectos se ha centrado en sólo seis géneros (*Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia*). Entre las 2700 actividades de biotecnología que se realizaron en el mundo en los últimos 10 años, la modificación genética representa alrededor del 19% solamente. El potencial de los rasgos de interés para los árboles GM son el aumento de la producción y calidad de madera, resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas. En América Latina, se están desarrollando algunos proyectos de biotecnología forestal, pero aún no es una práctica extendida. Brasil, Chile y Argentina lideran este desarrollo. Sin duda, la biotécnica más utilizada es la aplicación de marcadores moleculares. El género *Populus* es el segundo más utilizado en la investigación en biotecnología, en general, y el primero en lo referente a transformación genética. En Latinoamérica, y particularmente en Argentina, el uso de biotécnicas en álamos y sauces no está aún muy desarrollada. Si bien en Brasil se ha logrado transformar álamo (EMBRAPA-INRA), aún no se comercializan los ejemplares genéticamente modificados. En sauces, los trabajos se han centrado mayormente en la micropropagación y caracterización molecular (Chile y Argentina). En el Centro Experimental de Propagación Vegetativa se logró la regeneración *in vitro* de *Populus deltoides* 'Australiano 129/60' a partir de callos, hojas y secciones nodales con el objeto de establecer un sistema eficiente de propagación *in vitro* de la especie *deltoides* para su posterior transformación genética. Otra línea de investigación del Centro, es la propagación de *Salix humboldtiana*, mediante el cultivo *in vitro* de hojas, secciones nodales y la macropropagación por enraizamiento de estacas, con el objetivo de clonar individuos selectos y obtener material de propagación durante todo el año para evaluar el potencial de esta especie en la extracción de metales pesados (fitoextracción).

Palabras claves: biotecnología forestal, micropropagación, *Populus* sp., *Salix* sp.

## Introducción

La biotecnología abarca una gran variedad de técnicas científicas que utilizan organismos vivos o partes de ellos para obtener bienes, productos o servicios. Este conjunto de biotécnicas ofrecen nuevas herramientas para cumplir los dos objetivos básicos y clásicos de la gestión forestal: el mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales y la mejora genética de las plantaciones forestales (Sharry, 2008). La conservación de recursos genéticos forestales se beneficia de los desarrollos en el ámbito de los marcadores moleculares para conocer la amplitud y la distribución de la variabilidad genética a conservar. También utiliza la crioconservación y la regeneración de plantas como medios para la conservación *ex situ* y para la puesta en práctica de la forestación clonal. Los beneficios potenciales de la biotecnología son mayores en la silvicultura que en la agricultura, ya que en muchos casos permitirá acelerar los procesos de mejoramiento de especies arbóreas (Haines, 1994; Yanchuk, 2001). Los problemas de producción o de rendimiento con que tropiezan los silvicultores no son menos urgentes que los que enfrentan los agricultores. El mejoramiento genético de especies forestales ha jugado un rol preponderante en el aumento de la productividad de las plantaciones en los últimos 25 años, pero actualmente, esta herramienta convencional, debe asociarse a las nuevas herramientas biotecnológicas para seguir compitiendo a nivel internacional. Esto significa la incorporación de la biotecnología y en especial de la genómica e ingeniería genética al mejoramiento genético forestal. La aplicación de la biotecnología podría contribuir a generar plantaciones forestales de crecimiento rápido y de mayor rendimiento, que posean menor cantidad de lignina para facilitar el proceso de extracción de celulosa, y que presenten resistencia a determinadas plagas, entre otras características.

Las aplicaciones biotecnológicas en especies forestales se basan en cuatro grandes áreas de actividad, frecuentemente interconectadas:

a) *Técnicas de cultivo de tejidos* que aumentan la tasa de multiplicación vegetativa y permiten la producción a gran escala de materiales uniformes. El cultivo de tejidos vegetales también puede utilizarse para seleccionar características como la resistencia a enfermedades y la tolerancia a herbicidas, metales, salinidad y bajas temperaturas. Existen técnicas de micropropagación que pueden aplicarse a un gran número de especies forestales.

b) *Técnicas basadas en marcadores moleculares* que pueden usarse, entre otras cosas, para: i) cuantificar la diversidad genética entre poblaciones y árboles individuales; ii) identificar genotipos en estudios taxonómicos, estudios biológicos y de "identificación genética"; y iii) localizar genes que determinan características cuantitativas económicamente importantes. Los marcadores pueden proporcionar información importante sobre los patrones migratorios, la cantidad de flujo génico y los sistemas de reproducción, por lo que constituyen instrumentos útiles para la formulación y seguimiento de programas de conservación de árboles forestales.

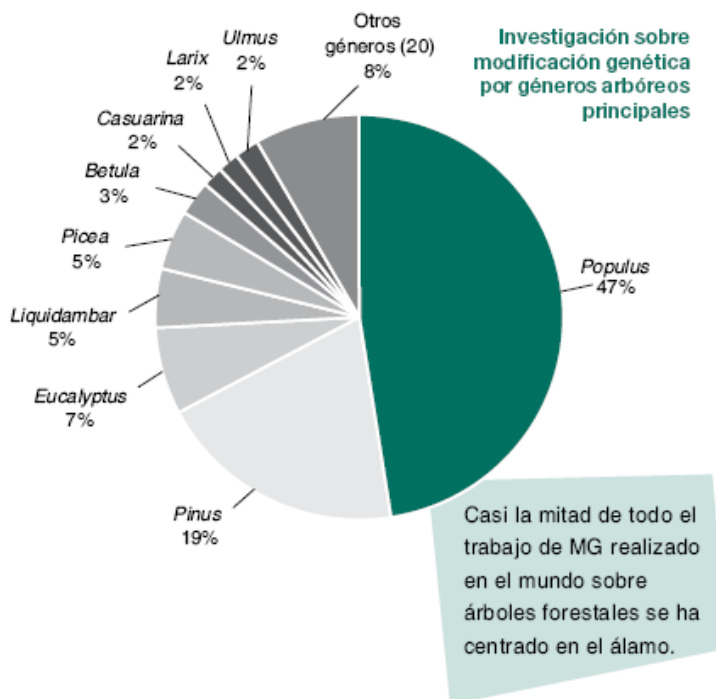
c) *Técnicas de ADN recombinante* para la transformación genética de especies forestales. Se han aplicado para obtener características como resistencia a virus, resistencia a insectos, modificación del contenido de lignina y tolerancia a herbicidas. Introducir los genes que rigen estas características en una nueva especie constituye generalmente una empresa difícil; el mayor obstáculo reside en los escasos conocimientos disponibles sobre el control molecular de las características que se desea modificar. Esto adquiere particular importancia cuando las mismas dependen de varios genes, como es el caso de las que revisten más interés para la producción forestal, como la tasa de crecimiento, la adaptabilidad, y la calidad del fuste y de la madera.

d) *Técnicas de genómica, proteómica, etc (ómicas)* para mejorar la comprensión de la biología, fisiología y su relación con el ambiente (ecofisiología) de las especies forestales cultivadas, lo que permitirá, a través de la identificación de genes que determinen características de interés, acelerar los procesos de selección y desarrollo genético e incorporar nuevas características a los clones elite, a través de la ingeniería genética (Consorcio Genómica Foresta, 2009).

Según Marchandier y Sigaud (2005), la mayoría de las actividades de biotecnología forestal se realizan en países desarrollados, siendo los más activos Estados Unidos, Francia y Canadá. La India y China son los países en desarrollo y en transición que más actividades reportaron. Aunque la biotecnología forestal se ha extendido a las actividades de por lo menos 140 géneros de árboles, la gran mayoría de los proyectos se ha centrado en sólo seis (*Pinus*,

Eucalyptus, Picea, Populus, Quercus y Acacia). Entre las 2700 actividades de biotecnología que se realizaron en el mundo en los últimos 10 años, la modificación genética representa alrededor del 19% solamente. El potencial de los rasgos de interés para los árboles genéticamente modificados (GM) son el aumento de la producción y calidad de madera, resistencia a insectos, enfermedades y herbicidas (FAO, 2004).

Entre 1994 y 2004 el *Populus* fue el segundo género arbóreo más usado en los estudios de biotecnología en general (después del *Pinus*) y el más utilizado en la modificación genética en todo el mundo (Marchandier y Sigaud, 2005, Fig.1). El álamo se ha convertido en un organismo modelo para la biotecnología de árboles. Sus atributos, como rápido crecimiento, fácil propagación vegetativa, genoma relativamente pequeño y facilidad de transformación con *Agrobacterium*, sumados a su importancia económica a nivel mundial, han hecho que sea elegido para esta función. Se ha contemplado la posibilidad de introducir en los álamos características como resistencia a virus, resistencia a insectos, modificación del contenido de lignina y tolerancia a herbicidas. Para las características multigénicas, como es el caso de muchas de interés forestal, la transformación genética resulta difícil y constituye un objetivo de largo plazo (Sharry, 2008). Por otro lado, es la primera especie forestal para la que se determinó la secuencia del genoma completo, trabajo que se realizó en 2004 (Oak Ridge National Laboratory, 2004; Joint Genome Institute, 2004). El álamo es el único árbol forestal genéticamente modificado (GM) que se ha desarrollado comercialmente; la Administración Forestal Estatal de China aprobó en 2002 la plantación comercial de álamos GM, y a fines de ese año se habían plantado en China más de 1,4 millones de álamos GM resistentes a los insectos. En la actualidad, se están realizando investigaciones sobre el impacto de la liberación al ambiente de álamos en China que tienen 5 nuevos genes que les confieren tolerancia a sal, a frío y resistencia a insectos (Instituto de Biotecnología Forestal de Beijing, comunicación personal).



Tomado de : **Los álamos en la investigación biotecnológica, Marchandier y Sigaud, 2005.**

A pesar que los sauces juegan un papel importante en el desarrollo de paisajes y en el mantenimiento del balance ecológico de los ecosistemas, se han aplicado pocos enfoques biotecnológicos a nivel mundial en estos árboles (Lisková *et al*, 1989; Grönroos *et al*, 1990; Vahala y Ericsson, 1991; Haut y Beiderbeck, 1991). Existen diversos intentos de mejoramiento de sauces para ser utilizados como material para obtener bioenergía (Smart *et al*; 2005), principios activos, biorremediación y estabilización de sitios. Se están desarrollando estudios de genómica funcional y de alineamiento del genoma de *Salix* con el de álamo (Hanley *et al*, 2006), pero aún el desarrollo de investigaciones aplicando biotecnología en este género son escasas.

En América Latina, se desarrollan algunos proyectos de biotecnología forestal, pero aún no es una práctica extendida. En este trabajo se realizó un análisis de fuentes bibliográficas disponibles en Internet y se utilizaron entrevistas personales para determinar cuál es el alcance de la investigación biotecnológica aplicada a salicáceas (sauces y álamos) en América Latina, con énfasis en los desarrollos en Argentina.

### **Biotecnología aplicada a salicáceas en América Latina**

El uso de biotécnicas en álamos y sauces no está aún muy extendido en América Latina. Brasil, Chile y Argentina lideran el desarrollo de proyectos de biotecnología forestal y sin duda, la biotécnica más utilizada es la aplicación de marcadores moleculares.

La utilización de la tecnología de ADN recombinante ha permitido obtener álamos genéticamente transformados a los investigadores brasileños de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, (Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología) asociados con el INRA (Francia). (Brasileiro *et al*, 1992), pero aún no se comercializan los ejemplares modificados. Actualmente, la CTNBio tiene 24 solicitudes de aprobación de eucaliptos transgénicos, no así de álamos ([http://www.wrm.org.uy/boletin/126/Brasil\\_Chile.html](http://www.wrm.org.uy/boletin/126/Brasil_Chile.html)). Los resultados de la búsqueda de información demuestran que excepto los trabajos realizados en Brasil este tipo de enfoque se ha desarrollado poco en Latinoamérica, aunque está avanzado en otras especies como eucaliptos y pino.

En sauces, los trabajos se han centrado mayormente en la micropropagación y caracterización molecular (Chile y Argentina). Aunque la mayoría de los sauces pueden ser propagados fácilmente, existen algunas especies o clones con dificultades para enraizar. Para superar este inconveniente, el uso de nuevas técnicas de propagación permite la multiplicación de individuos o clones selectos. Algunos autores latinoamericanos han reportado el éxito del uso del cultivo de tejidos vegetales para propagar diferentes especies de sauces (Pereira *et al*, 2000, Santos *et al* 2001 y 2005, Chung y Carrasco, 1998). Una revisión de la literatura muestra que las variantes en el medio de cultivo y en la concentración de reguladores son determinantes para obtener un protocolo eficiente de regeneración *in vitro*. Por ejemplo, en Chile la utilización comercial de especies del género *Salix* es todavía muy restringida. Para superar estas restricciones y potenciar el cultivo de *Salix*, el Instituto Forestal (INFOR) dentro de sus proyectos de diversificación forestal, introdujo desde Suecia una partida de 25 procedencias. En dicha partida, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) detectó la presencia de un hongo cuarentenario (*Diplodina microsperma*). Por consiguiente, se procedió a desarrollar un programa de micropropagación, destinado al saneamiento de dicho material vegetal. Los objetivos del trabajo fueron el rescate de 25 procedencias de *Salix* spp. con problemas cuarentenarios, por medio de las técnicas del cultivo de tejidos y la obtención de protocolos de desinfección, multiplicación, enraizamiento y aclimatación para cada una de las procedencias. (<http://www.infor.cl/webinfor/PW-Salix/Publicacion/Cultivo%20Invitro.htm>).

En referencia al uso de genómica en especies forestales, Chile ha presentado un Consorcio de Genómica Forestal, entre sector público y privado. Este es un proyecto apoyado por una red tecnológica conformada por otras instituciones de investigación tanto nacionales como internacionales. En una primera etapa, en el Consorcio se han definido cuatro áreas prioritarias de investigación, que se consideran de mayor impacto económico, ambiental y social en el mediano y largo plazo. El desarrollo de estas áreas de investigación tendrá como efecto final la reducción del costo de formación de madera, el aumento del atractivo de la forestación, ampliación de la base industrial, aumento de las exportaciones y empleo regionales. La investigación se desarrolla en el Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, las empresas socias, Fundación Chile (Valdivia) y laboratorios internacionales. Por ahora, el consorcio no abarca la investigación genómica en álamo ni sauce. (<http://www.genomicaforestal.cl/>)

En Brasil, pionero en desarrollo de genómicas en la región, se lleva adelante el proyecto Genolyptus (Red Brasileña de Investigación del Genoma del Eucalyptus). Uno de los grandes desafíos para generar bioenergía de manera sustentable en el futuro y la comprensión de las bases moleculares del crecimiento y adaptabilidad de las plantas perennes, útiles para la producción de energía. Más de 140 investigadores de 82 organizaciones públicas y privadas de 18 países participan de la red EUCAGEN. Es, posiblemente, el mayor proyecto internacional de secuenciamiento ya aprobado y desarrollado, esto sucede porque la especie objeto es muy difundida en todo el mundo.

Este tipo de desarrollo no se aplica a salicáceas en la región. Posiblemente esto se deba a que los países latinoamericanos no participaron en el proyecto de secuenciación del genoma del álamo. En el año 2006, *Populus trichocarpa*, fue la especie de álamo elegida por los científicos para hacer el primer genoma de un árbol. Esta es la tercera especie vegetal secuenciada, después de la *Arabidopsis thaliana* y del arroz, de obvio interés alimentario para millones de personas. *Populus trichocarpa*, con 19 cromosomas, tiene 45.000 genes. Es un genoma grande, en comparación con el humano, que tiene unos 25.000 genes, y aun así, con sus 485 millones de pares de bases (las letras químicas de los genes), es aproximadamente 40 veces menor que el del pino.

Se ha encontrado información sobre un enfoque innovador en el uso de la biotecnología en salicáceas. En Chile, se está utilizando la protección de riberas mediante biotecnología fluvial, en la restauración de los ríos Cachapoal y Tinguiririca (Barrueto y Moyano, 2006). La Corporación Nacional Forestal VI Región (CONAF) y la Dirección de Obras Hidráulicas VI Región (DOH) aunaron esfuerzos para suscribir un convenio que tuvo como objetivo realizar trabajos de estabilización y protección de riberas por medio de Biofiltros. Los trabajos que se desarrollaron corresponden a soluciones biológicas en la forma de forestaciones de alta densidad de estacas de mimbres y sauces, que funcionan como barreras semipermeables frente a las inundaciones, para reducir los impactos de las crecidas de estos ríos sobre los suelos agrícolas y la población ribereña, como una solución complementaria y de refuerzo a las obras civiles de defensa fluvial. Las especies empleadas, sauce y mimbre, presentan una buena adaptabilidad a las condiciones de humedad fluctuante y suelos livianos de las zonas ribereñas de los ríos, cuyas características fisiológicas y morfológicas las hacen plenamente utilizables como buffers vegetales o biofiltros en áreas de riberas. Estas especies demuestran una facilidad de propagación vegetativa mediante estacas y una facilidad de establecimiento para funciones de producción y protección, permitiendo el control y recuperación de las zonas erosionadas e inundadas en forma continua por su rápido crecimiento. (<http://www.sagpya.gov.ar/new/0-/forestacion/biblos/JS%202006/Utilización%20Ambiental%20com.htm>)

### **Uso de biotecnología en salicáceas en Argentina**

Según Cortizo (2006) dentro de estas aplicaciones los marcadores han sido particularmente útiles como fingerprint tanto a nivel científico como comercial, aunque su utilización a nivel productivo no ha sido ampliamente citada. Los programas de mejoramiento

más avanzados han incorporado a los marcadores moleculares para facilitar el proceso de selección de genes específicos (en general los relacionados a la resistencia a roya, el crecimiento, la duración del período vegetativo, etc.). La aplicación de esta metodología fue posible gracias a la generación de mapas genéticos de las características de interés como los desarrollados en Estados Unidos y Francia. En un principio los marcadores moleculares y bioquímicos más usados fueron las isoenzimas y los RAPDs y posteriormente, se incorporaron los microsatélites y AFLPs. Hasta el momento, las técnicas generadas por la biología molecular, salvo los marcadores moleculares, han sido más ampliamente utilizadas en investigación básica que en los programas de mejoramiento.

En el Centro Experimental de Propagación Vegetativa de la Facultad de Ciencias Agrarias y forestales, UNLP, se logró la regeneración in vitro de *Populus deltoides* 'Australiano 129/60' a partir de callos, hojas y secciones nodales, con el objeto de establecer un sistema eficiente de propagación in vitro de la especie deltoides para su posterior transformación genética. Otra línea de investigación del Centro, es la propagación de *Salix humboldtiana*, mediante el cultivo in vitro de hojas, secciones nodales y la macropropagación por enraizamiento de estacas, con el objetivo de clonar individuos selectos y obtener material de propagación durante todo el año para evaluar el potencial de esta especie en la extracción de metales pesados (fitoextracción).

El INTA ha venido aplicando biotécnicas para mejorar, caracterizar y propagar, tanto álamo como sauce. En 1995 se puso a punto la metodología que permite la identificación de Clones de Salicáceas mediante la utilización de marcadores moleculares. El Programa de Producción de Material de Propagación Mejorado, Subprograma para Alamos en el Delta del Paraná. EEA Delta del Paraná, CRBAN, INTA tiene como objetivo la identificación de Salicáceas mediante la técnica de RAPD.

En nuestro país, se llevan a cabo en la actualidad trabajos de investigación en INTA Castelar, sobre la puesta a punto de una técnica de micropropagación para clones comerciales de uso regional para producción de madera; la creación de un protocolo de cultivo in vitro, con miras a crear una metodología para generar sauces modificados genéticamente y para la identificación de clones a través del uso de marcadores microsatélites, para lo cual, se están probando microsatélites actualmente utilizados en álamos, a fin de comprobar si amplifican en sauces y luego hacer los estudios poblacionales pertinentes (Garay *et al*, 2005). Además, se está realizando el mejoramiento genético de sauces (Cerrillo, 2006)

## Conclusiones

La biotecnología ofrece nuevas técnicas complementarias de las metodologías clásicas que permiten un mejor aprovechamiento del potencial biológico disponible y la reducción de las repercusiones negativas sobre la biodiversidad. Sin embargo, la biotecnología moderna debe considerarse como un conjunto de instrumentos que complementan las tecnologías convencionales. Aunque ofrece oportunidades interesantes, sobre todo para la conservación genética y para aumentar la producción de madera, se necesita un enfoque prudente que examine, caso por caso, su integración en los programas de conservación y mejoramiento a largo plazo.

También es posible encarar proyectos genómicos comparativos, que sirven para caracterizar y valorizar la biodiversidad del germoplasma que se conserva como fuente de nuevos genes de utilización en el mejoramiento o en la ingeniería genética.

## Bibliografía

Barrueto Perez, H. y Moyano Cabezas, R. 2006. Protección de riberas mediante biotecnología fluvial, en la restauración de los ríos Cachapoal y Tinguiririca. Actas Jornadas de Salicáceas 2006. Comunicación.

Brasileiro, A. C. M. ; Tourneur, C. ; Leple, J. C. ; Combes, V. y Jouanin, L. 1992. Expression of the mutant *Arabidopsis thaliana* acetolactate synthase gene confers chlorsulfuron resistance to transgenic poplar plants. *Transgenic Research*, v. 1, p. 133-141

Cerrillo, T. 2006. Mejoramiento genético de los sauces. Actas Jornadas de Salicáceas 2006 Disertación

Cortizo, S. 2006. Mejoramiento genético del álamo. Actas Jornadas de Salicáceas 2006 Disertación.

Chung, G., P. y Carrasco, G., B. 1998. Cultivo in vitro: Micropropagación de *Salix* spp a través de meristemas foliares.

<http://www.infor.cl/webinfor/PW-Salix/Publicacion/Cultivo%20Invitro.htm>

El-Kassaby, Y. FAO. 2003. Panel of experts on forest gene resources, Thirteenth Session, Rome, Italy, Discussion Paper: Feasibility And Proposed Outline Of A Global Review Of Forest Biotechnology.

FAO. 2004. Biotechnology in forestry, including. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/59E.Roma. <http://www.fao.org/docrep/008/ae574e/ae574e00.htm>

Galetti, M. 2003. Mejoramiento y genética forestal. [http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/forest/forest\\_genetica.htm](http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/forest/forest_genetica.htm)

Garay, M., R., Nosedá, P., A; Cortizo, S., Mujica, G., Franzone, P. y Rios, R. (Poster). 2005. Cultivo *in vitro* de Salicáceas. III Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Corrientes, Argentina.

Grönroos, L., Hardner, C. y Gullber, U.1990. Field performance of *Salix* clone propagated via shoot culture in vitro. *Scandinavian Journal of Forest Research*, v. 5, p. 487-92.

Haines, R., H.1994. Biotechnology in forest tree improvement with special reference to developing countries. FAO Forestry Paper 118.

Hanley, S., J., Mallott, M., D. y Karp, A. 2006. Alignment of a *Salix* linkage map to the *Populus* genomic sequence reveals macrosynteny between willow and poplar genomes *Tree Genetics & Genomes* , v. 3, n. 1, p. 35-48

Hauth, S. y Beiderbeck, R. 1991. In vitro culture of agrobacterium rhizogenes- induced hairy roots of *Salix alba* L. *Silvae Genetica*, v.41, n.1,p.46-8.

Joint Genome Institute (JGI). 2004. *Populus*.

<http://www.genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>

Lisková, D., Zakutná, L. y Kákoniová, D. 1989. Pigment formation in Willow tissue culture. *Biologia (Bratislava)*, v. 44, n. 11, p. 1039- 45.

Marchandier, H. y Sigaud, P. 2005. Los álamos en la investigación biotecnológica. *Unasylva* 221, v. 56, p. 38-39.

Marinucci, L., Sharry, S. y Abedini, W. 2004. Transformación genética del álamo para resistencia a *Platypus sulcatus*. Establecimiento de un protocolo de cultivo de tejidos eficiente para los clones de *Populus deltoides* cv. "Catfish 2" y "Catfish 5". *SAGPyA Forestal* 32:42.

Oak Ridge National Laboratory. 2004. Creating a genetic resource for the plant. <http://www.ornl.gov/sci/ipgc/home.htm>

Pereira, A., M., S., Bertoni, B., W., Moraes, R., M. y Franca S., C. 2000. Micropropagation of *Salix humboldtiana* Hild. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.2, p 17-21.

Santos, B., R. 2001. Propagação in vitro e abordagem fitoquímica em *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd.). 2001. 89f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal)- Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

Santos, B., R., Paiva, R., Martinotto, C., Nogueira, R., C. y Duarte, P. 2005. Indução de calos friáveis em explantes foliares de *Salix* (*Salix humboldtiana* Willd). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.3, p.510-514.

Sharry, S. 2008. [http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/18\\_AGBT08%20Biotecnologia%20Forestal.pdf](http://www.fbmc.fcen.uba.ar/~23-1-2007/18_AGBT08%20Biotecnologia%20Forestal.pdf)

Smart, L. B., Volk, T. A., Lin, J., Kopp, R. F., Phillips, I. S., Cameron, K. D., White, E. H. y Abrahamson, L. P. 2005. Mejora genética de los cultivos de sauce (*Salix spp*) con fines bioenergéticos y medioambientales en los Estados Unidos. Revista Internacional de Silvicultura e Industrias Forestales. Vol 56. <http://www.fao.org/docrep/008/a0026s/a0026s12.htm>.

Vahala, T. y Eriksson, T. 1991. Callus production from Willow ( *Salix viminalis* L.) protoplasts. Plant Cell Tissue and Organ Culture, v.27, p.243-8.

Yanchuk, A.,D. 2001. Los instrumentos biotecnológicos en la silvicultura. Unasyuva, n.204, v. 52. p. 53-61. FAO.