



POTENCIAL DE LA ORGANOGÉNESIS COMO ESTRATEGIA PARA LA MASIFICACIÓN *in vitro* DE *Fitzroya cupressoides* EN SUDAMÉRICA AUSTRAL

POTENTIAL OF ORGANOGENESIS AS A STRATEGY FOR *in vitro* PROPAGATION OF *Fitzroya cupressoides* IN AUSTRAL SOUTH AMERICA

José Vidal Cob-Uicab¹; Ana M. Sabja²; Darcy Ríos-Leal³; Antonio Lara-Aguilar⁴; Pablo J. Donoso⁴; Mauro E. González⁴; Bernardo Escobar⁴

¹Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. MÉXICO.
Correo-e: cob.jose@inifap.gob.mx (*Autor para correspondencia).

²GenFor S. A. Valdivia, Chile.

³Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción-Chile

⁴Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales. CHILE.

RESUMEN

Fitzroya cupressoides (alerce) es una conífera endémica de Sudamérica austral cuya madera ostenta atributos de belleza y durabilidad. El presente estudio evaluó el efecto de componentes hormonales suplementado con medios de cultivo sobre la capacidad organogénica de *Fitzroya cupressoides*, y se analizó el proceso de regeneración *in vitro* mediante estudios histológicos. Se ensayó el medio de cultivo básico Quorin y Lepoivre (QL) suplementado con diferentes concentraciones de ácido indol 3-butírico (AIB), 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) utilizando segmentos nodales y hojas aciculares. Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco repeticiones balanceado; la unidad experimental fue un frasco de vidrio conteniendo un explante, y la inducción de callogénesis correspondió a una placa petri con cuatro explantes foliares. Hubo efectos significativos ($P = 0.001$) del tratamiento sobre las variables respuesta número de brotes y elongación caulinar. La prueba de rangos múltiples de Duncan confirmó que los tratamientos que observaron diferencias significativas fueron $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de AIB y $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP para número de brotes por explante y $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AIB y $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BAP para la elongación caulinar. El análisis histológico demostró la proliferación de estructuras meristemáticas a partir de tejido subepidérmico.

Recibido: 22 de noviembre, 2010
Aceptado: 25 de marzo, 2011
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.11.118
[http:// www.chapingo.mx/revistas](http://www.chapingo.mx/revistas)

PALABRAS CLAVE:
2,4-diclorofenoxiacético,
callogénesis, segmentos nodales,
propagación *in vitro*.

ABSTRACT

Fitzroya cupressoides, commonly known as Alerce in South American Spanish, is a conifer species native to southern South America, where its wood is highly prized for its beauty and durability. This study evaluated the effect of hormonal components supplemented with culture media on the organogenic process of *Fitzroya cupressoides* and analyzed the *in vitro* regeneration process by histological studies. The Quorin-Lepoivre (QL) basic culture medium, supplemented with different concentrations of indole 3-butyric acid (IBA), 6-benzylaminopurine (BA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), was tested using nodal segments and acicular leaves. A completely randomized design with five balanced replications was used; the experimental unit was a glass jar containing an explant, while a petri dish containing four foliar explants was used for inducing callogenesis. The treatment factor had significant ($P = 0.001$) effects on the response variables number of shoots and caulinary elongation. Duncan's multiple range test confirmed that the treatments that had significant differences were $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of IBA and $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of BA for number of shoots per explant and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA and $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of BA for caulinary elongation. Histological studies demonstrated the proliferation of meristematic structures from sub-epidermal tissue.

KEY WORDS:
2,4-dichlorophenoxyacetic acid
(2,4-D), callogenesis, nodal
segments, *in vitro* propagation.

INTRODUCCIÓN

Fitzroya cupressoides (Mol.) Johnston (Alerce) es una especie arbórea dioica, excepcionalmente monoica (Grosfeld y Barthélemy 2001, Donoso *et al.* 2006). Pertenece a uno de los tres géneros monotípicos que posee la familia *Cupressaceae* en los bosques templados de Sudamérica austral (Veblen *et al.*, 1976; Donoso *et al.*, 2006). En Chile, *Fitzroya cupressoides* ocurre en poblaciones disyuntas entre los 39° 50' y los 43° S. En Argentina, su distribución abarca desde los 40° 57' hasta los 42° 45' S (Donoso, 1981; Kitzberger *et al.*, 2000; Premoli *et al.*, 2003). Esta especie es sumamente longeva, habiéndose fechado mediante técnicas dendrocronológicas un individuo de 3,622 años (Lara y Villalba, 1993), lo que convierte en la segunda especie más longeva del mundo después de Bristlecone pine, *Pinus longaeva* (Currey, 1965; Lara y Villalba, 1993).

La belleza y la durabilidad de la madera de *Fitzroya cupressoides* fueron determinante para su aprovechamiento y explotación desde fines del siglo XVI, cortándose árboles de Alerce en forma indiscriminada para la construcción de casas e iglesias que hoy tienen gran valor arquitectónico y cultural (Lara, 1998; Donoso *et al.*, 2006). Otros factores tales como la frecuencia de incendios, cambios en el uso del suelo y expansión urbana contribuyeron a la transformación de poblaciones de *Fitzroya cupressoides*, convirtiéndola en una especie vulnerable que, actualmente, está protegida nacional e internacionalmente (Donoso *et al.*, 2006).

Por otro lado, la producción de semillas es cíclica, y es común que sean inviables en una alta proporción de los árboles productores en un año determinado. Específicamente, las semillas poseen cierto grado de latencia que es necesario romper mediante estratificación en frío por lo menos durante 30 días, encontrándose el óptimo en términos de capacidad y energía germinativa con 60 días de estratificación en frío, con lo que se logra un 24 % de capacidad germinativa (Donoso *et al.*, 1993; Donoso *et al.*, 2006).

Frente a este escenario, el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una alternativa potencial para superar algunas de las dificultades antes mencionadas. Asimismo, constituye una etapa importante para el establecimiento de un banco *ex situ* de germoplasma libre de enfermedades y patógenos (Uribe *et al.*, 2008).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad organogénica *in vitro* de *Fitzroya cupressoides*. Específicamente, determinar el efecto del ácido 2,4-D diclorofenoxiacético sobre la inducción de callogénesis y realizar estudios histológicos del proceso de regeneración *in vitro*. Lo anterior, como una aportación en los inicios del establecimiento con cimientos científicos de un banco

INTRODUCTION

Fitzroya cupressoides (Mol.) Johnston (Alerce) is a dioecious tree species that is, on rare occasions, monoecious (Grosfeld and Barthélemy, 2001; Donoso *et al.*, 2006). It belongs to one of the three monotypic genera in the *Cupressaceae* family in the temperate forests of southern South America (Veblen *et al.*, 1976; Donoso *et al.*, 2006). In Chile, *Fitzroya cupressoides* occurs in disjunct populations between 39° 50' and 43° S. In Argentina, its natural range is from 40° 57' to 42° 45' S (Donoso, 1981; Kitzberger *et al.*, 2000; Premoli *et al.*, 2003). This species is extremely long-lived, with one specimen having been dated by dendrochronology techniques to 3,622 years old (Lara and Villalba, 1993), making it the world's second longest-living species after Bristlecone pine, *Pinus longaeva* (Currey, 1965; Lara and Villalba, 1993).

Logging of *Fitzroya cupressoides*, motivated by the beauty and durability of its wood, began in the late sixteenth century. Alerce trees were cut indiscriminately for the construction of homes and churches that today have great architectural and cultural value (Lara, 1998; Donoso *et al.*, 2006). Other factors such as fire frequency, land-use changes and urban expansion contributed to the transformation of *Fitzroya cupressoides* populations, making it a threatened species that is now domestically and internationally protected (Donoso *et al.*, 2006).

On the other hand, seed production is cyclical, and often the seeds are unviable in a high proportion of producing trees in a given year. Specifically, the seeds have a certain degree of latency that needs to be broken by cold stratification for at least 30 days, with the optimum in terms of germination capacity and energy being attained with 60 days of cold stratification, which achieves 24 % germination capacity (Donoso *et al.*, 1993; Donoso *et al.*, 2006).

Against this backdrop, *in vitro* plant tissue culture is a potential alternative to overcome some of the difficulties mentioned above. It also constitutes an important step towards the establishment of an *ex situ* germplasm bank free of disease and pathogens (Uribe *et al.*, 2008).

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* organogenic capacity of *Fitzroya cupressoides*. Specifically, to determine the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callogenesis induction and conduct histological studies of the *in vitro* regeneration process. This work is intended as a contribution to the early establishment, based on scientific foundations, of a germplasm bank free of disease and pathogens for future recovery, conservation and *in vitro* propagation of *Fitzroya cupressoides*.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in the GenFor Corp. forest micropropagation and biotechnology laboratory, located in the city of Valdivia, Chile. Valdivia is located between

de germoplasma libre de enfermedades y patógenos con fines futuros de recuperación, conservación y propagación *in vitro* de *Fitzroya cupressoides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de micropropagación y biotecnología forestal de la empresa GenFor, S. A., ubicada en la ciudad de Valdivia, Chile. Valdivia se localiza entre las coordenadas geográficas 39° 49' de latitud S y 73° 14' de longitud W.

Material vegetal. Como material vegetal inicial se utilizaron plántulas logradas a partir de semillas germinadas y mantenidas durante cuatro meses en vivero. Las plántulas fueron sometidas a un tratamiento en vivero aplicando una solución fungicida y bactericida de captan 1.5 gr·L⁻¹, benlate 1.8 gr·L⁻¹ y phyton 1.0 ml·L⁻¹, respectivamente. Las aplicaciones se realizaron mediante una solución compuesta por captan y benlate en dos fases de siete días cada una, vía foliar. Entre cada fase se aplicó phyton vía radicular, y 24 horas antes de la introducción a laboratorio las plántulas fueron asperjadas utilizando únicamente una solución phyton.

Transcurrido el periodo anterior, se procedió a escindir ramas laterales de las plántulas, a las cuales se les cortaron las acículas a tres milímetros de la base y se eliminaron las brácteas evitando desprender la porción caulinar. Posteriormente, se realizaron dos enjuagues en agua corriente durante cinco minutos y tres minutos. Finalmente, se efectuó un último enjuague en agua destilada estéril durante cinco minutos y se cortaron segmentos nodales de dos a tres centímetros de longitud.

A continuación, bajo cámara de flujo laminar y en agitación continua, se inició la asepsia superficial de los explantes mediante una inmersión en solución de etanol al 70 % v/v durante cinco minutos, seguida de dos enjuagues de tres minutos cada uno con agua destilada estéril. Posteriormente, fueron inmersos en una solución de NaClO (hipoclorito de sodio) al 50 % v/v más una gota de Tween 20, manteniéndolos en agitación continua durante 20 minutos. Por último, se efectuaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 3, 4 y 5 minutos.

Finalmente, los explantes fueron cultivados en tubos de ensayo conteniendo 15 ml de medio de cultivo gelificado con agar-agar y se incubaron en cámara de crecimiento a 25 ± 1° C, bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz fría y a una intensidad lumínica de 40 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Después de 90 días del establecimiento del cultivo, bajo cámara de flujo laminar auxiliándose con pinzas y bisturí se procedió a la escisión de acículas como explante para la inducción de callos. A éstas se les realizaron heridas

the geographic coordinates 39° 49' S latitude and 73° 14' W longitude.

Plant Material. As initial plant material, seedlings attained from seeds germinated and maintained for four months in a nursery were used. In the nursery, the seedlings were subjected to a treatment involving the application of a fungicide and bactericide solution of 1.5 gr·L⁻¹ captan, 1.8 gr·L⁻¹ benlate and 1.0 ml·L⁻¹ phyton, respectively. The applications were made using a solution containing captan and benlate in two phases of seven days each, via the foliar method. Between each phase, phyton was applied via the roots, and 24 hours prior to being brought to the laboratory the seedlings were sprayed using only a phyton solution.

After this, the seedling side branches were excised, and from them the needles were cut off at three millimeters from the base and the bracts were removed to avoid detaching the cauline portion. Subsequently, the specimens were rinsed twice in running water, for five minutes and three minutes. Lastly, they were rinsed for the final time in sterile distilled water for five minutes and nodal segments of two to three centimeters in length were cut off.

Next, under a laminar flow chamber and continuous stirring, surface asepsis of the explants was begun by immersion in a 70 % v/v ethanol solution for five minutes, followed by two rinses of three minutes each with sterile distilled water. They were then immersed in a 50 % v/v NaClO (sodium hypochlorite) solution, with a drop of Tween 20 added, and kept under constant stirring for 20 minutes. Finally, there were three consecutive rinses with sterile distilled water for 3, 4 and 5 minutes.

Finally, the explants were cultured in test tubes containing 15 ml of culture medium jellified with agar-agar and incubated in a growth chamber at 25 ± 1° C under a photoperiod of 16 hours of cold light and a light intensity of μmol·m⁻²·s⁻¹.

After 90 days of culture, under a laminar flow chamber and aided by tweezers and a scalpel, the needles were excised for use as explants for callus induction. To these, puncture wounds and cuts were made along the central nerve, placing two in adaxial position and two in axial position for each petri dish containing 25 ml of culture medium. The petri dishes containing the foliar explants were incubated in a growth chamber under dark conditions.

Culture medium. In the establishment, proliferation and caulinary elongation stages, QL medium (Quorin and Lepoivre, 1977) supplemented with the following combination and balance of hormones was used: 0.1 mg·L⁻¹/1.0 mg·L⁻¹, 0.1 mg·L⁻¹/1.5 mg·L⁻¹ and 0.5 mg·L⁻¹/2.0 mg·L⁻¹ IBA (indole 3-butyric acid) and BA (6-benzylaminopurine) (Table 1). Under this morphogenic development model, variables evaluated were number of shoots per explant and caulinary elongation per explant.

en forma de pinchazos y cortes a lo largo del nervio central colocando dos en posición adaxial y dos en posición axial por cada placa petri que contenía 25 ml de medio de cultivo. Las placas petri conteniendo los explantes foliares fueron incubadas en cámara de crecimiento bajo condiciones de oscuridad.

Medio de cultivo. En las etapas de establecimiento, proliferación y elongación caulinar el medio de cultivo utilizado correspondió a QL (Quorin y Lepoivre 1977) suplementado con la combinación y balance hormonal: $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}/1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}/1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}/2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB (ácido indol 3-butírico) y BAP (6-bencilaminopurina) (Cuadro 1). Bajo este modelo de desarrollo morfogénico las variables que se evaluaron fueron número de brotes por explante y elongación caulinar por explante.

Para la inducción de callos, el medio de cultivo base fue QL suplementado con las siguientes concentraciones hormonales: $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (Cuadro 1). Como fuente energética se le agregó sacarosa ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), gelificada con agar-agar ($7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). El pH fue ajustado a 5.7 con NaOH (hidróxido de sodio) previa inclusión del agar y esterilizado en autoclave a 120° C y 1 atm de presión durante 15 minutos. Bajo este modelo de desarrollo morfogénico como respuesta se cuantificó el porcentaje de formación de callo, diámetro en mm y color de callo.

CUADRO 1. Tratamientos evaluados en los procesos morfogénico de organogénesis en *Fitzroya cupressoides*.

TABLE 1. Treatments assessed in the morphogenetic processes of organogenesis in *Fitzroya cupressoides*.

Tratamientos	Modelo de desarrollo morfogénico	
	Organogénesis directa AIB/BAP $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Organogénesis indirecta AIB/BAP/2,4-D $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
T1	0,1/1,0	0,0/0,0/2,0
T2	0,1/1,5	0,0/0,0/2,5
T3	0,5/2,0	0,0/0,0/3,0

Diseño experimental y análisis estadístico. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones balanceado. En las fases de proliferación y elongación caulinar la unidad experimental fue un frasco de vidrio con un explante, estableciéndose quince frascos de cultivo por cada tratamiento. En la inducción de callo la unidad experimental correspondió a una placa petri conteniendo cuatro explantes foliares, con lo que se constituyeron quince unidades por cada tratamiento. Se realizó un análisis de varianza a través del procedimiento PROC GLM del programa estadístico SAS (*Statistical Analysis System*, 1992). Finalmente, la comparación de medias de los tratamientos se realizó

For callus induction, QL culture medium supplemented with the following concentrations was used: $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acid) (Table 1). As an energy source, sucrose ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), jellified with agar-agar ($7\cdot\text{L}^{-1}$), was used, and pH was adjusted to 5.7 with NaOH (sodium hydroxide) after inclusion of agar and sterilized by autoclaving at 120° C and 1 atm pressure for 15 minutes. Under this morphogenic development model, as a response the percentage of callus formation, callus color and callus diameter in mm were quantified.

Experimental design and statistical analysis. The experiment was set up under a completely randomized design with five balanced replications. In the proliferation and caulinary elongation stages, the experimental unit was a glass jar with an explant, with fifteen culture jars established per treatment. In callus induction, the experimental unit was a petri dish containing four foliar explants, with fifteen units per treatment. An analysis of variance was performed using the PROC GLM procedure of the SAS statistical software program (*Statistical Analysis System*, 1992). Finally, the comparison of treatment means was carried out using Duncan's multiple range test.

Histological studies. For the histological study 20 needles were taken, ten during the proliferation stages and ten after 120 days of culture. The samples were fixed between 24-48 hours in FAA [formalin (5 %)-acetic acid (5 %)-ethyl alcohol (90 %)]. They were then washed with running water for 24 hours. After the washing, the tissue was dehydrated in serial ethanol solutions (50, 75, 85 and 95 %) every two hours. Then the samples were immersed three times in pure ethyl alcohol, for two hours in the first two immersions and over night in the last one. After that, they were immersed three times in xylene for two hours each time, and then soaked in paraffin three times, for two hours each time. Next, the samples were placed in paraffin blocks where they were cut into transversal and longitudinal sections with a thickness of 5-8 μm using a vertical sliding microtome. Finally, each section was mounted on a microscope slide and stained with 1 % astra blue/safranin. To observe the samples, an OPTON Axioskop microscope was used and the images were photographed with a Canon Power Shot G5 digital camera fitted to the microscope.

RESULTS AND DISCUSSION

The application of the fungicide and bactericide solution to the donor plants, coupled with the aseptic procedure performed in the laboratory, was 100 % effective in controlling endogenous contamination. Specifically, at 90 days of culture there were vigorous shoots and thicker-looking, dark-green acicular leaves that showed no contamination (Figures 1A-C). According to the characteristics assessed, this was the culture period selected for obtaining the foliar explants that were cultured for callus induction.

mediante el procedimiento prueba de rangos múltiples de Duncan.

Estudio histológico. Para el estudio histológico se tomaron 20 acículas, diez durante las etapas de proliferación y elongación caulinar y diez a los 120 días de iniciado el cultivo. Las muestras fueron fijadas entre 24-48 horas en FAA [formalina (5 %)-ácido acético (5 %)-alcohol etílico (90 %)]. Posteriormente, se lavaron con agua corriente durante 24 horas. Una vez concluido el lavado, el tejido fue deshidratado en soluciones seriadas de alcohol etílico (50, 75, 85 y 95 %) cada dos horas. Seguidamente, las muestras se sumergieron tres veces en alcohol etílico puro, durante dos horas en los primeros dos inmersiones y durante toda la noche en la última traslación. Luego se realizaron tres inmersiones en xilol por dos horas en cada deslizamiento, y se impregnaron tres veces en parafina cada dos horas. A continuación, las muestras se incluyeron en bloques de parafina a los que se les realizaron cortes en secciones transversales y longitudinales con un grosor de 5-8 μm utilizando un micrótopo de deslizamiento vertical. Finalmente, cada corte fue adherido a un portaobjetos y teñido con azul de astra safranina al 1 %. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio Axioskop OPTON, y las imágenes se fotografiaron con una cámara digital Canon Power Shot G5 adaptada al microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de la solución fungicida y bactericida a las plantas donantes, aunada al procedimiento aséptico que se realizó en laboratorio, fue efectiva en un 100 % en el control de la contaminación endógena. Específicamente, a los 90 días de cultivo se observaron brotes de aspecto vigoroso y hojas aciculares de tono verde oscuro de apariencia más gruesa que exhibieron ausencia de contaminación (Figuras 1A-C). De acuerdo a las características evaluadas, este fue el periodo de tiempo de cultivo seleccionado para la obtención de los explantes foliares que fueron cultivados para la inducción de callo.

Acorde a los resultados del ANOVA, el factor tratamiento observó efecto significativo ($P < 0.001$, $F = 104.72$) sobre las variables número de brotes y elongación caulinar. Lo anterior indica la existencia de un efecto diferente significativo producto de alguno de los tratamientos sobre las variables dependientes.

En relación al número de brotes, hubo diferencias significativas con respecto a los tres niveles hormonales analizados (Cuadro 2). Específicamente, el tratamiento T2 (0.1/1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fue el que originó un mayor número de brotes, exhibiendo en promedio cinco brotes por explante (Figura 1B). En contraste, el tratamiento T3 (0.5/2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) estimuló múltiples puntos de crecimiento (Figura 1C), atribuibles a la proporción auxina-citoquinina

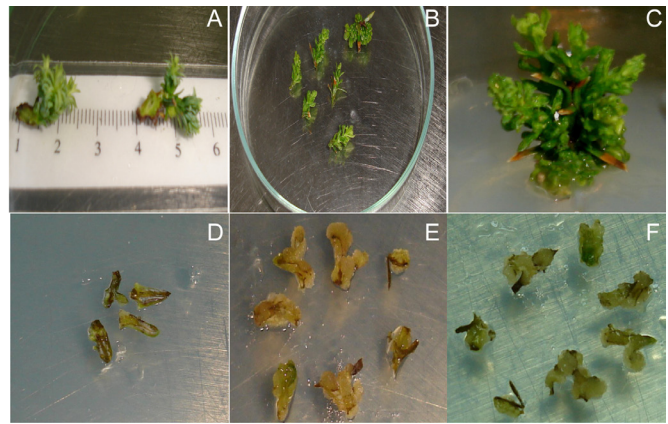


FIGURA 1.- Micropropagación de segmentos nodales e inducción de calogénesis en hojas aciculares de *Fitzroya cupressoides* después de 90 días de cultivo. A) microtallos después de 90 días del establecimiento. B) Brotes escindidos del explante inicial listos para ser transferidos a un medio de cultivo fresco. C) Puntos de crecimiento que darán origen a brotes. D) Hojas con protuberancias formados en la región de las heridas (15 días de cultivo). E) Hojas exhibiendo callos de aspecto heterogéneo. F) Hojas en medio nutritivo QL suplementado con 2,4-D (3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), nótese las características que exhibieron apropiadas para estudios subsecuentes.

FIGURE 1.- Micropropagation of nodal segments and callogenesis induction in acicular leaves of *Fitzroya cupressoides* after 90 days of culture. A) Microshoots at 90 days after the micropropagation process began. B) Shoots excised from the initial explant that presented adequate morphophysiological attributes to be transferred to a fresh culture medium. C) Growth points that will lead to shoots. D) Leaves with protuberances in the wound area (15 days of culture). E) Leaves showing callus with heterogeneous aspect. F) Leaves in QL nutrient solution supplemented with 2,4-D (3,0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); note that the features exhibited are suitable for subsequent studies.

According to the ANOVA results, the treatment factor had a significant ($P < 0.001$, $F = 104.72$) effect on the variables number of shoots and caulinary elongation. This indicates the existence of a statistically significant effect caused by one of the treatments on the dependent variables.

In relation to the number of shoots, there were significant effects with respect to the three hormone levels tested (Table 2). Specifically, treatment T2 (0.1/1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) resulted in a greater number of shoots, averaging five per explant (Figure 1B). By contrast, treatment T3 (0.5/2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) stimulated multiple growth points (Figure 1C), attributable to the auxin-cytokinin ratio being reflected in high proliferation rates. In the caulinary elongation phase, treatment T1 (0.1/1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was the one that produced a significant positive effect (Table 2). Under this hormonal ratio, microshoots were achieved that averaged 18 mm

reflejándose en elevadas tasas de proliferación. En la fase de elongación caulinar, el tratamiento T1 ($0.1/1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) fue el que produjo un efecto positivo significativo (Cuadro 2). Bajo esta proporción hormonal se lograron microtallos que observaron tallas en promedio 18 mm de longitud a los 90 días de cultivo (Figura 1A, Cuadro 2). Por el contrario, los explantes que fueron cultivados en el tratamiento T2 ($0.1/1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) produjeron brotes que exhibieron tallas en promedio de 8 mm de longitud en el mismo periodo de cultivo (Figura 1B, Cuadro 2). Congruente con estos resultados, se demuestra y fundamenta el papel elemental de las relaciones hormonales auxina-citoquinina como un factor clave en el control de la morfogénesis.

CUADRO 2. Prueba comparativa entre medias de tratamientos generado mediante el procedimiento prueba de rangos múltiples de Duncan.

TABLE 2. Comparative test among treatment means generated using Duncan's multiple range test.

Modelo de desarrollo morfogénico	Variabes	Factor de estudio AIB/BAP/2,4-D ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Media \pm S
Organogénesis directa	Número de brotes	0,1/1,0	$1 \pm 0,6 \text{ b}$
		0,1/1,5	$5 \pm 1,0 \text{ a}$
		0,5/2,0	$3 \pm 0,6 \text{ b}$
Organogénesis indirecta	Elongación caulinar (mm)	0,1/1,0	$18 \pm 1,0 \text{ a}$
		0,1/1,5	$8 \pm 6 \text{ b}$
		0,5/2,0	$6 \pm 1,0 \text{ b}$
Organogénesis indirecta	Diámetro de callo (mm)	0,0/0,0/2,0	$6 \pm 4 \text{ a}$
		0,0/0,0/2,5	$5 \pm 3 \text{ a}$
		0,0/0,0/3,0	$9 \pm 7 \text{ b}$

Letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P < 0.01$.

Different letters indicate significant differences according to Tukey's test at $P < 0.01$.

La formación de callo se inició en la superficie adaxial de las acículas, principalmente en la región del nervio central asociado siempre a la herida. Concretamente, a los 30 días de cultivo se comenzó a observar la presencia y formación de callos en los tres tratamientos estudiados. A los 45 días de cultivo se evidenció la formación de gran cantidad de callos con una coloración que varió desde el blanco crema a amarillento, pasando por el verde hasta el café claro (Figura 1D-F). Las evaluaciones evidenciaron que la concentración de $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D fue la que presentó el porcentaje más alto de callogénesis por explante, redundando en un mayor grado de tejido diferenciado. Asimismo, los callos exhibieron una coloración verde, un mejor tamaño y una consistencia más friable (Figura 1F, Cuadro 2). Acorde a lo anterior, se definió como el tratamiento más adecuado para la producción de callo por las características que exhibieron, principalmente la consistencia más friable como una particularidad fundamental para estudios subsecuentes.

long at 90 days of culture (Figure 1A, Table 2). By contrast, explants cultured in treatment T2 ($0.1/1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) produced shoots averaging 8 mm in length in the same culture period (Figure 1B, Table 2). Consistent with these results, the study demonstrates that auxin-cytokinin ratios are a key factor in controlling morphogenesis.

Callus formation began on the adaxial surface of the needles, mainly in the central nerve region always associated with the wound. Specifically, at 30 days of culture the presence and formation of calluses was first observed in the three treatments studied. At 45 days of culture, the formation of a large number of calluses was evident, with coloring ranging from creamy white to yellowish, and from green to light brown (Figure 1D-F). The evaluations showed that the $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration of 2,4-D had the highest percentage of callogenesis per explant, resulting in a higher degree of differentiated tissue. In addition, the calluses exhibited a green color, better size and a more friable consistency (Figure 1F, Table 2). Based on the above, it was identified as the most appropriate treatment for callus production for the characteristics exhibited, mainly the more friable consistency as a fundamental characteristic for subsequent studies.

Histological studies. The image sequence in Figure 2A-F shows the formation of protuberances on nodal segments and acicular leaves of *Fitzroya cupressoides*. Figures 2A and 2B show a longitudinal section of a protuberance excised from the initial explant, which shows the formation of a meristematic dome (MD) and the presence of two leaf primordia (LP), thus causing a cauline meristem (CM).

Figures 2C-F show a cross-section of a needle, including the different sampling times. Figures 2C and 2D show a section before making the needle wounds, highlighting the level of organization and the layout of the tissues that form the cell layers of the epidermis (EP), mesophyll (MS) and, in the center, the vascular bundles (VB). Figures 2E and 2F show a cross section of the adaxial region of the leaf at 45 days of *in vitro* culture. Specifically, Figure 2E shows a disordered cell proliferation in response to the hormonal stimuli associated with the wound. Figure 2F shows the growth of meristematic structures (POS) originating from sub-epidermal tissue (mesophyll).

These results indicate and establish the presence of morphogenic activity in the mesophyll of the leaf, resulting in protuberances that reach a state of differentiation, thereby allowing independence and the organization of a cauline meristem.

In the field of plant tissue culture, the main difficulties are due in part to the endogenous contamination problems posed by the plant material and the recalcitrant features of the species (Leslie and McGranahan, 1992; Caboni

Estudio histológico. En la secuencia de imágenes de la Figura 2A-F se aprecia la formación de protuberancias en segmentos nodales y hojas aciculares de *Fitzroya cupressoides*. Las Figuras 2A y 2B conciernen a un corte de la sección transversal de una protuberancia separada del explante inicial, en el cual se aprecia la formación de un domo meristemático (DM) y la presencia de dos primordios foliares (PF), originando de esta forma un meristemo caulinar (MC).

Las Figuras 2C-F muestran un corte de la sección transversal de una acícula incluyendo los diferentes momentos de muestreo. Las Figuras 2C y 2D corresponden a un corte antes de realizar las heridas a la acícula, destacándose el nivel de organización y la disposición de los tejidos que conforman las capas celulares de la epidermis (EP), mesófilo (MS) y en el centro los haces vasculares (HV). Las Figuras 2E y 2F muestran una sección transversal de la región adaxial de la hoja a los 45 días de iniciado el cultivo *in vitro*. Específicamente, en la Figura 2E se observa una proliferación celular desordenada como respuesta al estímulo hormonal y asociada a la herida. En la Figura 2F se aprecia el crecimiento de estructuras meristemáticas (POS) originadas a partir del tejido subepidérmico (mesófilo).

Estos resultados indican y fundamentan la presencia de una actividad morfogénica en el mesófilo de la hoja, lo que redundará en protuberancias que alcanzan un estado de diferenciación, permitiéndole independencia y con ello la organización de un meristemo caulinar.

En el ámbito del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, las principales dificultades se deben en parte a los problemas de contaminación endógena que presenta el material vegetal y las características recalcitrantes de la especie (Leslie y McGranahan 1992, Caboni *et al.* 1996). De acuerdo con Cassels (1991), la microbiota contaminante en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es la causa de pérdidas económicas muy importantes. Al respecto, Alvarado (1998) expone que en la lucha por prevenir o eliminar los contaminantes en el cultivo *in vitro*, se ensayan y ponen en práctica diferentes opciones que van desde tratamientos a las plantas donantes e incremento de las medidas de asepsia, hasta la utilización de productos antimicrobianos de origen sintético o natural.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación de fungicidas y bactericidas a las plantas donantes, previo al establecimiento *in vitro*, es una alternativa viable que contribuye a la prevención y disminución de la contaminación endógena del material vegetal. Asimismo, se confirma la importancia de la aplicación de un protocolo de desinfección riguroso, el cual permitió incrementar los coeficientes de proliferación.

Por otro lado, es imprescindible la utilización de una relación hormonal auxina-citoquinina apropiada

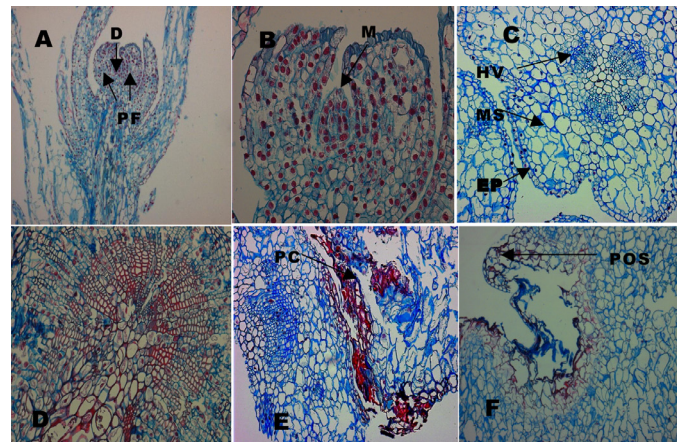


FIGURA 2.- Secuencia histológica de la formación de protuberancias en segmentos nodales y hojas aciculares de *Fitzroya cupressoides*. A) Sección transversal de una protuberancia que muestra la formación del domo meristemático (DM) y la presencia de primordios foliares en desarrollo (PF) después de 90 días de iniciado el cultivo. B) Sección transversal de una protuberancia y un domo meristemático (DM). C) Sección transversal de una hoja exhibiendo las capas celulares, nótese la presencia de la epidermis (EP), el mesófilo (MS) y haces vasculares (HV). D) Corte transversal que muestra un acercamiento de los haces vasculares. E) y F) Secciones transversales exhibiendo proliferación de masas celulares en forma desorganizada (PC) asociada a la herida (POS).

FIGURE 2.- Histological sequence of the formation of protuberances in nodal segments and acicular leaves of *Fitzroya cupressoides*. A) Longitudinal section of a protuberance showing the formation of the meristematic dome and the presence of developing leaf primordia (Spanish acronym PF used in figure) after 90 days of culture. B) Longitudinal section of a protuberance and a meristematic dome. C) Cross section of a leaf showing the cell layers and the presence of the epidermis (EP), mesophyll (MS) and vascular bundles (Spanish acronym HV used in figure). D) Cross section showing a close-up of the vascular bundles. E) and F) Cross sections showing proliferation of disorganized cell masses (PC) associated with the wound (POS).

et al., 1996). According to Cassels (1991), the microbial contaminant in plant tissue cultures is responsible for severe financial losses. In this regard, Alvarado (1998) states that in the struggle to prevent or eliminate contaminants in *in vitro* cultures, various options are tested and put into practice, ranging from treatments to donor plants and increased aseptic measures, to the use of synthetic or natural antimicrobial products.

The results of this study demonstrate that application of fungicides and bactericides to donor plants, prior to *in vitro* establishment, is a viable alternative that contributes to the prevention and reduction of endogenous contamination of plant material. It also confirms the importance of applying a rigorous disinfection protocol, which allowed an increase in the coefficients of proliferation.

On the other hand, it is essential to use an appropriate auxin-cytokinin ratio that promotes cell division

que promueva la división y elongación celular. Al respecto, Fraga *et al.* (2002), Tang *et al.* (2004a) y Ramarosandratanam y Van Staden (2005), sugieren que las diferencias en la respuesta a la división y elongación celular de los tipos de explantes tienen un vínculo con la existencia de marcadores de tipo bioquímico o diferencias en concentraciones hormonales endógenas. Edwald (1998) menciona que la bencilaminopurina en dosis mayores con relación a la auxina es efectiva para la inducción de brotes en coníferas.

En este estudio la combinación y dosis hormonal compuesta por 0.1/1.5 mg·L⁻¹ de AIB/BAP (tratamiento T2) (Cuadro 2) fue la que favoreció un mayor número de brotes por explante. Estos resultados coinciden con los obtenidos en *Pinus canariensis* por Martínez *et al.* (1990), *Pinus halepensis* por Lambardi *et al.* (1993), en *Pinus sp.* por Niella y Rocha (2001) y en *Picea chihuahuana* por Mata *et al.* (2001), donde las mejores respuestas en la tasa de proliferación se lograron en concentraciones similares de BA complementadas al medio nutritivo. No obstante, Pierik (1990) señala que los requerimientos de citoquininas son extremadamente variables y dependen del contenido endógeno de cada especie.

La elongación caulinar se favoreció conforme se disminuyó la concentración de BA, estableciéndose una concentración óptima de 0.1/1.0 mg·L⁻¹ de AIB/BAP (tratamiento T1) (Cuadro 2) atribuible a una disminución de la división celular y promoviéndose la elongación del tejido debido a la acción de las auxinas. En contraste, los microtallos que fueron cultivados en el tratamiento T3 (0.5/2.0 mg·L⁻¹) no elongaron originando arrosamiento de los explantes (Figura 1C, Cuadro 2), lo cual se explica por la alta concentración de citoquinina presente en el medio de cultivo.

Por otra parte, se evidencia la efectividad en la respuesta del tejido foliar para lograr con éxito la formación de callo. En las coníferas los mayores éxitos en la inducción de callo se han logrado empleando como explante embriones cigóticos maduros e inmaduros, debido a que poseen un alto potencial embriogénico en relación con cualquier otra parte de la planta (Tang *et al.*, 1998; Tang y Newton, 2004). No obstante, se ha demostrado la posibilidad de formar y obtener callo a partir de hojas jóvenes como explante inicial (Conde *et al.*, 2004).

La formación de callo ocurrió en los tejidos que conforman el nervio central de la hoja (Figura 1F). Al respecto, Caboni *et al.* (1999) señalan que la alta densidad de tejidos vasculares que existe en la región del nervio central, es la principal causa de la elevada respuesta en la formación de masa callosa. Concretamente, las células subepidérmicas de la superficie adaxial de la hoja se dividen anticlinalmente para formar el parénquima clorofílico en empalizada, mientras que el resto de las células de

and elongation. In this regard, Fraga *et al.* (2002), Tang *et al.* (2004a) and Ramarosandratanam and Van Staden (2005) suggest that differences in the response to cell division and elongation of different types of explants are linked with the existence of biochemical markers or differences in endogenous hormone concentrations. Edwald (1998) mentions that benzylaminopurine in higher doses in relation to auxin is effective for shoot induction in conifers.

In this study the hormone dose combination of 0.1/1.5 mg·L⁻¹ of IBA/BA (treatment 2) (Table 2) favored a higher number of shoots per explants. These results are consistent with those obtained in *Pinus canariensis* by Martínez *et al.* (1990), in *Pinus halepensis* by Lambardi *et al.* (1993), in *Pinus sp.* by Niella and Rocha (2001) and in *Picea chihuahuana* by Mata *et al.* (2001), where the best proliferation rate responses were achieved in similar concentrations of BA supplemented to the nutrient medium. However, Pierik (1990) argues that cytokinin requirements are extremely variable and depend on the endogenous content of each species.

Caulinary elongation was favored as the concentration of BA decreased. The optimal concentration was 0.1/1.0 mg·L⁻¹ of IBA/BA (treatment T1) (Table 2) attributable to a decrease in cell division and tissue elongation due to auxin action. By contrast, the microshoots grown in treatment T3 (0.5/2.0 mg·L⁻¹) did not elongate, causing rosetting of the explants (Figure 1C, Table 2), which is explained by the high concentration of cytokinins present in the culture medium.

Moreover, the effectiveness is evident in the response of the leaf tissue to achieve callus formation. In conifers, the greatest successes in callus formation have been achieved using mature and immature zygotic embryos as explants, as they have a high embryogenic potential in relation to any other part of the plant (Tang *et al.*, 1998; Tang and Newton, 2004). However, the ability to form and obtain callus from young leaves as initial explants has been demonstrated (Conde *et al.*, 2004).

Callus formation occurred in the tissues that form the central nerve of the leaf (Figure 1F). In this regard, Caboni *et al.* (1999) indicate that the high density of vascular tissue that exists in the central nerve region is the main cause of the high response in callus mass formation. Specifically, the sub-epidermal cells of the adaxial leaf surface divide anticlinally to form the chlorophyll-bearing palisade parenchyma, while the other cells of this tissue remain unchanged and give rise to the chlorophyll-bearing spongy parenchyma. Consequently, under favorable inductive conditions the cells that should form the palisade parenchyma keep dividing and form a callus mass.

Other conclusive studies suggest that callus formation from little-differentiated cells (Lara *et al.*, 2003) occurs due to the proximity of the latter with existing meristematic

este tejido no sufren cambios y son las que dan origen al parénquima clorofílico esponjoso. Consecuentemente, en condiciones inductivas favorables las células que deberían formar el parénquima clorofílico en empalizada continúan dividiéndose y forman así una masa callosa.

Otros estudios concluyentes sugieren que la formación de callo a partir de células poco diferenciadas (Lara *et al.*, 2003), ocurre debido a la proximidad de estas últimas con tejidos meristemáticos existentes como el procambium, donde se asume que la concentración de los reguladores de crecimiento es mayor.

La formación de callo estuvo siempre asociada a la herida (Figura 1D-F). Ésta desempeña un papel fundamental como factor de estrés que promueve un mecanismo de defensa, manifestándose en una respuesta morfogénica en los tejidos vegetales. Adicionalmente, las heridas permiten poner en contacto directo algunos tejidos internos con el medio de cultivo y facilitan la absorción de los reguladores de crecimiento (George, 1993).

La composición y concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo son factores determinantes para inducir la formación de callo. Algunas especies sólo requieren de la acción de las auxinas para que se promueva la proliferación de células tipo callo (Robledo y Carrillo, 2004; Montero *et al.*, 2006). Concretamente, una de las auxinas comúnmente empleada en el medio de inducción es el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) con un efecto inductor efectivo, al cual se le atribuye una tendencia a suprimir la morfogénesis dando como resultado una rápida proliferación de células tipo callo (Trejo *et al.*, 2002; Olmos *et al.*, 2004; Robledo y Carrillo, 2004; Montero *et al.*, 2006).

El análisis histológico confirmó la presencia de estructuras meristemáticas, las cuales al dividirse por mitosis dieron origen a nuevas estructuras (Figura 2A, 2B y 2F). Asimismo, evidenció que la formación de las estructuras nodulares estuvo asociada a la herida (Figura 2F), como factor de estrés que redundó en un desarrollo morfogenético *in vitro*.

CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales a partir de segmentos nodales escindidos de plántulas de *Fitzroya cupressoides*, es factible en las fases de proliferación y elongación caulinar. Asimismo, se evidenció la viabilidad del éxito en la inducción de callogénesis a partir de hojas aciculares. Consecuentemente, este estudio pionero en implicar a esta especie demostró el potencial de esta herramienta biotecnológica como una alternativa viable para el rescate, conservación y masificación *in vitro* de *Fitzroya cupressoides*. No obstante, se requiere optimizar el proceso mediante la realización de otros estudios.

tissues such as the procambium, where it is assumed that the concentration of growth regulators is greater.

Callus formation was always associated with the wound (Figure 1D-F), which plays a key role as a stress factor that promotes a defense mechanism, manifesting itself in a morphogenic response in plant tissues. Additionally, the wounds put some internal tissues in direct contact with the culture medium and facilitate the absorption of growth regulators (George, 1993).

The composition and concentration of growth regulators in the culture medium are determining factors for inducing callus formation. Some species only require auxin action to promote the proliferation of callus cells (Robledo and Carrillo, 2004; Montero *et al.*, 2006). Specifically, one auxin that is commonly used in induction medium is 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acid), which has an effective inducing effect attributable to a tendency to suppress morphogenesis, resulting in rapid proliferation of callus cells (Trejo *et al.*, 2002; Olmos *et al.*, 2004; Robledo and Carrillo, 2004; Montero *et al.*, 2006).

The histological analysis confirmed the presence of meristematic structures, which when divided by mitosis give rise to new structures (Figure 2A, 2B and 2F). It also showed that the formation of nodular structures was associated with the wound (Figure 2F), as a stress factor that resulted in *in vitro* morphogenic development.

CONCLUSIONS

The *in vitro* culture of plant tissues from excised nodal segments of *Fitzroya cupressoides* seedlings is feasible in the proliferation and caulinary elongation phases. The feasibility of inducing callogenesis from acicular leaves was also successfully demonstrated. Consequently, this pioneering study involving this species showed the potential of this biotechnological tool as a viable alternative for the rescue, conservation and *in vitro* propagation of *Fitzroya cupressoides*. However, further studies need to be carried out in order to optimize the process.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to express our gratitude to the Ford Foundation's International Fellowship Fund (IFF) for the scholarship awarded to the lead author to undertake doctoral studies at the Universidad Austral de Chile, to the university's Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales (Department of Forestry and Natural Resources' graduate school program) for partial funding granted for the purchase of chemicals in the experimental phase, and to the research staff of GenFor Corp. for the facilities, comments and suggestions provided during the experimental phase.

End of English Version

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Internacional de Becas del *International Fellowships Fund* (IFF) de la Fundación Ford, por la beca otorgada al primer autor para realizar estudios de doctorado en la Universidad Austral de Chile. A la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, por el financiamiento parcial otorgado para la adquisición de productos químicos en la fase experimental. Al personal investigador de GenFor, S. A., por las facilidades, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de la fase experimental.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, Y. (1998). Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. In: *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Pérez, J. N. (edit.). Cuba. Instituto de Biotecnología de las Plantas.
- Caboni, E. M., Tonelli, P., Lauri, S. D., & Damiano, C. (1999). *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 59,1-7.
- Caboni, E. M., Lauri, S., Tonelli, P., Falasca, G., & Damiano, C. (1996). Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. *Plant Sci.* 208,118-203.
- Cassells, A. C. (1991). Problems in tissue culture: culture contamination. In: *Micropropagation*. Edited by Debergh and Zimmerman. Netherlands. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer Academic Publisher.
- Conde, P., Loureiro, J., & Santos, C. (2004). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. *Plant Cell* 22,632-639.
- Currey, D. R. (1965). An ancient bristlecone pine stand in Eastern Nevada. *Ecology* 46,564-566.
- Donoso, C. (1981). *Investigación y desarrollo forestal. Tipos forestales de los bosques nativos de Chile. Documento de trabajo 38*. Santiago, Chile. Corporación Nacional Forestal.
- Donoso, C., Cortes, M., & Escobar, B. (1993). Efecto del árbol semillero y la época de cosecha de semillas en la capacidad germinativa en vivero de *Fitzroya cupressoides*. *Bosque* 14(1),63-71.
- Donoso, C., Lara, A., Escobar, B., Premoli, A., & Souto, C. (2006). Autoecología de las especies coníferas Chilenas. *Fitzroya cupressoides* (Molina) I. M. Johnst. In: *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología*. Ed. Donoso, C. Valdivia, Chile. Ediciones Marisa Cuneo.
- Edwald, D. (1998). Advances in tissue culture of adult larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34(4),325-330.
- Fraga, M., Canal, M., & Rodríguez, R. (2002). *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* D. Don trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 70 (2),139-145.
- George, E. (1993). *Plant propagation by tissue culture*. Exegetics.
- Grosfeld, J., & Barthélemy, D. (2001). Dioecy in *Fitzroya cupressoides* (Molina) I.M. Johnst. and *Pilgerodendron uviferum* (D. Don.) Florin (*cupressoides*). *Life Sciences* 324,245-250.
- Kitzberger, T., Pérez, A., Iglesias, G., Premoli, A., & Veblen, T. T. (2000). Distribución y estado de conservación de Alerce (*Fitzroya cupressoides* Mol) Johnst en Argentina. *Bosque* 21(1),79-89.
- Lambardi, M., Sharma, K. K., & Thorpe, T. A. (1993). Optimization of *in vitro* bud induction and plantlet formation from mature embryos of Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill). *In Vitro Cell y Dev. Biol.* 29,189-197.
- LARA, A. (1998). Alerces, gigantes milenarios del bosque nativo. (*Fitzroya cupressoides* trees: the millenary giants of the native forests): 94-102. In: *Defensores del bosque Chileno* (Eds.). La tragedia del bosque Chileno. Santiago, Chile. Ocho libros editores.
- Lara, A., & Villalba, R. (1993). A 3,620-year temperature reconstruction from *Fitzroya cupressoides* tree rings in southern south America. *Science* 260,1104-1106.
- Lara, A., Valverde, R., & Gómez, L. (2003). Histología de embriones somáticos y brotes adventicios inducidos en hojas de *Psychotria acuminata*. *Agronomía Costarricense* 27(1), 37-48.
- Leslie, C., & Mcgranahan, G. (1992). Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 18,137-150.
- Martínez, P., Harry, I. S., & Thorpe, T. A. (1990). *In Vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). *Can. J. For. Res.* 20,1200-1211.
- Mata, M. R., Chávez, M., & Boettler, R. B. (2001). *In vitro* regeneration of plantlets from in mature zygotic embryos of *Picea chihuahuana* Martínez, an endemic Mexican endangered species. *In Vitro Cell y Dev. Biol.* 1,73-85.
- Montero, C., Macías, E., & Wong-Vega, L. (2006). Organogénesis directa y múltiple en tejidos juveniles de guandú (*Cajanus cajan* L. Millsp). *Invet. Pens. Crit.* 4,20-31.
- Niella, F., & Rocha, P. (2001). Research and development of vegetative propagation techniques for *Pinus* sp. In: *The Northeast Region of Argentina. Proceedings of the 26 Th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference*. Jeffrey, F.D. (Ed). Athens, GA, USA. Dean-Georgia University.
- Olmos, S., Luciani, G., & Galdeano, E. (2004). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. In: *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Echenique, V., Rubinstein, C., & Mroginski, L. (Eds). Buenos Aires, Argentina: Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- Pierik, R. (1990). *Cultivo in vitro de plantas superiores*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa.
- Premoli, A. C., Vergara, R., Souto, C. P., Lara, A., & Newton, C. (2003). Lowland valleys shelter ancient *Fitzroya cupressoides* in temperate South America. *The Royal Society of New Zealand* 33,1-9.
- Quorin, M., & Lepoivre, P. (1977). Etudes de mileux adaptes aux cultures *in vitro* de prunes. *Acta Horticulturae* 78,437-442.
- Ramarosandratnam, A., & Van Stadem, J. (2005). Changes in competence for somatic embryogenesis in Norway spruce zygotic embryo segments. *Journal of Plant Physiology*. 162, 583-588.
- Robledo, A., & Carrillo, G. (2004). Regeneración *in vitro* de plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocótilos. *Fitotecnia Mexicana* 27,121-126.
- SAS Institute Inc. (1992). *Statistical Analysis System*. 6.03 Edition. Cary, NC. USA. 1028 P.
- Tang, W., Harrys, L., Outhavong, C., & Newton, R. 2004. The effect of different plant growth regulators on adventitious shoot formation from *Pinus virginiana* Mill. zygotic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78(3),237-240.

- Tang, W., & Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill). *Plant Science* 167, 621-628.
- Tang, W., Ouyang, F., & Guo, C. (1998). Plant regeneration through organogenesis from callus induced from mature zygotic embryos of loblolly pine. *Plant Cell Rep* 17, 557-560.
- Trejo, G., Maldonado, U., Jiménez, A., Blanqueto, M., Salcedo, G., Martínez, P., & de Jesús, A. (2002). Reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oriza sativa* L. (Cultivar Japónica H2005). *Agrociencia* 36, 441-449.
- Uribe, M., Delaveau, C., Garcés, M., & Escobar, R. (2008). Efecto de asepsia y fitohormonas en el establecimiento *in vitro* de *Berberidopsis corallina*, a partir de segmentos nodales. *Bosque* 29(1),58-64.
- Veblen, T., Delmastro, R., & Schlatter, J. (1976). The conservation of *Fitzroya cupressoides* and its environment in southern Chile. *Environ. Conserv.* 3(4),291-301.