

# Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser

Micropropagation of *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser

GUILLERMO MARTINEZ PASTUR, MIRIAM ARENA

Centro Austral de Investigaciones Científicas, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.  
Malvinas Argentinas s/n. cc 92 (9410) Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina.

## SUMMARY

*Nothofagus pumilio* is the most important forest species in South Patagonia. The present work was carried out to determine the suitable cultural conditions for *in vitro* propagation through shoot culture of saplings and a mature tree. The days after sprouting and the presence of the bud scales were critical for culture initiation. A medium with a low salt concentration and the addition of glutamine, as Broadleaved Tree Medium, was suitable for shoot multiplication, being affected both by cytokinin and giberellin. A multiplication rate of 1:3-5 was obtained with 20-30  $\mu\text{M}$  2iP and 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  at day 63. No significant differences were found between the juvenile and adult material. Rooted shoots (60-70%) were obtained with 0.61-1.23  $\mu\text{M}$  AIB and ten days darkness at the induction stage. Rooted shoots were then successfully acclimatized and 43.2% of good quality plants were obtained after 45 days.

*Key words:* *Nothofagus*, Lenga, *in vitro*, propagation, mature tree.

## RESUMEN

*Nothofagus pumilio* es la especie forestal más importante en Patagonia Sur. El objetivo de este trabajo fue establecer un protocolo de propagación *in vitro* a partir de brotes de renovales y un árbol adulto. El tiempo transcurrido desde la brotación del material vegetal y la presencia de las pérulas fueron críticos para la iniciación de los cultivos. Un medio con baja concentración salina adicionado con glutamina, como el Broadleaved Tree Medium, fue adecuado para la multiplicación de los brotes siendo ésta afectada por las citocininas y el ácido giberélico. Se obtuvo una tasa de multiplicación de 1:3-5 en un medio adicionado con 20-30  $\mu\text{M}$  2iP y 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{GA}_3$  al día 63. No se encontraron diferencias significativas entre el material juvenil y el adulto. Un enraizamiento del 60-70% se obtuvo en un medio con 0.61-1.23  $\mu\text{M}$  AIB y diez días de oscuridad en la etapa de inducción. Se obtuvo un 43.2% de plantas rusticadas de buena calidad después de 45 días de aclimatación.

*Palabras claves:* *Nothofagus*, Lenga, *in vitro*, propagación, material adulto.

## INTRODUCCION

*Nothofagus pumilio*, comúnmente llamado 'lenga', es la especie forestal más importante en Patagonia Sur por su abundancia, calidad de madera y crecimiento. Ocupa 3 millones de hectáreas, encontrándose el 23.7% en el sector argentino. En los mejores sitios alcanza un diámetro de hasta 130-150 cm y más de 30 m de altura total (Fernández *et al.* 1993, Martínez Pastur *et al.* 1994, Martínez Pastur y Fernández 1994).

Es posible que la lenga posea una gran variabilidad intraespecífica debido a su amplio rango de distribución (Uriarte y Grosse 1991), de gran interés para el mejoramiento genético de la especie. La propagación vegetativa posibilita la transmisión de caracteres fenotípicos de baja heredabilidad y capta en forma inmediata todas las características deseables. La propagación *in vitro* es la alternativa más difundida cuando existe dificultad para propagar la especie por métodos agámicos convencionales. Existen varios trabajos sobre el culti-

vo *in vitro* de *Nothofagus* (Jordan y Velozo 1992, Jordan *et al.* 1996, Calderón *et al.* 1994, Mattes Fernández 1995, Martínez Pastur y Arena 1995, 1996, Martínez Pastur *et al.* 1996), presentando uno de ellos resultados preliminares en *N. pumilio* (Martínez Pastur *et al.* 1995). El objetivo de este trabajo fue elaborar un protocolo de cultivo *in vitro* de brotes provenientes de renovales y un árbol adulto de *N. pumilio*.

## MATERIAL Y METODOS

*Material vegetal y condiciones de cultivo.* Los brotes se obtuvieron de 20 renovales de 10 a 15 años de edad y de las ramas bajas de un árbol adulto en fase de envejecimiento (aproximadamente de 200 años) que crecían juntos y en forma natural en un rodal homogéneo del bosque. Dicho material vegetal fue recolectado en las cercanías de la ciudad de Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina), al final del período de reposo (agosto-septiembre) e inmediatamente fueron forzados a brotar en condiciones de laboratorio. Para mejorar su sanidad las ramas fueron rociadas con Agrimicina al 0.1% (mezcla de sulfato de estreptomocina al 88.90% y sal cuaternaria de oxitetraciclina al 11.1%).

Para iniciar cultivos de árboles adultos, es posible utilizar brotes provenientes de esferoblastos (Caso *et al.* 1996). Sin embargo, estas estructuras son muy escasas en lenga y su presencia siempre está asociada a poblaciones de *N. antarctica* ('ñire'), presuponiendo un cierto grado de hibridación en estos puntos de contacto. Por esta razón se descartó el uso de los esferoblastos y se utilizaron brotes de las ramas bajas de un árbol que se encontraba en un bosque puro de lenga.

El material vegetal fue esterilizado con NaOCl (1.0% de Cl<sub>2</sub> activo) por 5 minutos. Luego se enjuagó tres veces en ambiente estéril con agua destilada. Explantos de 1-2 cm de largo que incluían el ápice y dos hojas fueron cultivados en Broad-leaved Tree Medium (BTM) (Chalupa 1983) con los macronutrientes reducidos a la mitad y cultivados por 5-7 días para favorecer la aparición de organismos contaminantes. Para todos los experimentos, el medio de cultivo fue suplementado con sacarosa (3.0% p/v), agar regional (0.7% p/v) y puestos en tubos de 20 mm x 120 mm conteniendo 10 ml del mismo. El pH fue ajustado a 5.7 ± 0.05 con KOH 0.1 N antes de autoclararlo, el cual

se llevó a cabo por 20 minutos a 0.1 MPa. Los cultivos se mantuvieron en una cámara a 22 ± 2°C con un fotoperíodo de 16 h usando lámparas fluorescentes (57 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR).

*Ensayos preliminares.* Se llevaron a cabo los siguientes ensayos para determinar: 1) el medio básico de cultivo (Murashige & Skoog completo, macronutrientes a la mitad y a la cuarta parte, Woody Plant Medium y el BTM), y 2) la composición orgánica (BTM, Murashige & Skoog, Murashige & Skoog + 0.3 μM de tiamina, compuestos orgánicos de De Fossard y un medio libre de compuestos orgánicos) (Murashige y Skoog 1962, De Fossard *et al.* 1974, Lloyd y McCown 1981, Chalupa 1983, George *et al.* 1987, Margara 1988).

*Etapas de multiplicación.* En un primer experimento (A) el efecto de la 6-benciladenina (BA) (0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00 y 10.00 μM) y de la 6-(γ-y-dimetilalilamino) purina (2iP) (2, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 μM) fueron ensayados con BTM como medio básico. En un segundo experimento (B) el efecto del ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) (0.0 y 0.3 μM) y el decapitado de los explantos (al día 0, 21 y un testigo sin decapitar) fueron ensayados con BTM suplementado con 20 μM 2iP. En el último ensayo (C) se analizaron las respuestas comparativas entre brotes de renovales y un árbol adulto en un medio de BTM adicionado con 20 μM de 2iP.

Los explantos se repicaron sin subdividir a medio fresco cada 21 días. Al día 63 finalizaron los ensayos, efectuándose la toma de los datos. La validez estadística de los resultados de todos los ensayos fue obtenida a través de un análisis de varianza mediante un test de Fisher y Tukey, ya que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianza. Los datos de presencia y ausencia fueron analizados por Chi-cuadrado y un test de Post-Hoc. Se trabajó con treinta explantos por cada tratamiento para todos los experimentos y a una significancia de P < 0.05.

*Etapas de enraizamiento.* Brotes de 2.0 cm de largo con dos hojas y cuatro yemas fueron usados para los ensayos de enraizamiento, luego de seis meses en medio de multiplicación. El efecto de diferentes períodos de oscuridad (experimento D) en la etapa de inducción fue ensayado (0, 5, 10, 15 días), mientras que en un segundo ensayo (experi-

mento E) se probó el efecto de la concentración de AIB (0.61, 1.23 y 2.46  $\mu\text{M}$ ). El medio basal empleado fue el BTM con los macronutrientes reducidos a la mitad. Los experimentos finalizaron al día 28 cuando se tomaron los datos.

*Etapa de rusticación.* Los brotes enraizados en el experimento E se pusieron a rusticar, ensayándose el efecto del número de raíces (experimento F) (1 raíz, 2-3 raíces y +3 raíces). Los explantos se colocaron en envases de vidrio de 50 ml con perlita estéril, 10 ml de agua y cubiertos con film de polietileno para evitar la contaminación y el desecamiento. A los 15 días se suplementó la perlita con 3 ml de los macronutrientes de medio BTM reducidos a la mitad, perforando parcialmente el film de polietileno. A los 30 días se eliminó completamente la cubierta de polietileno, regando periódicamente con agua corriente y a los 45 días se dio por finalizado el ensayo. Las condiciones ambientales fueron las de la cámara de cultivo antes descrita.

## RESULTADOS Y DISCUSION

*Iniciación de los cultivos.* En la desinfección se obtuvo un 80% de explantos libres de contaminación, mientras que un 10% de pérdida se debió al ennegrecimiento de los mismos. Los brotes se mantuvieron en BTM con 10-20  $\mu\text{M}$  2iP o 0.5  $\mu\text{M}$  BA por 4-6 meses durante la estabilización de los cultivos.

La presencia de las pérulas sobre las yemas de los brotes producidos *in vivo* fue la principal causa de oxidación de los explantos *in vitro*. Su remoción semanal fue la clave para la iniciación de los cultivos. Por otra parte, cuando se utilizaron brotes de más de una semana posterior a la brotación, fue imposible iniciar cultivos al oxidarse el 100% del material. El cultivo se consideró estabilizado cuando se separó el material vegetal crecido *in vitro* del brote original.

*Ensayos preliminares:* En los experimentos preliminares el BTM fue mejor medio básico de cultivo. Este medio también fue adecuado para propagar a *N. obliqua*, *N. nervosa*, *N. antarctica* y *N. leoni* (Martínez Pastur y Arena 1995, 1996, 1997, Martínez Pastur *et al.* 1996). Otros medios de cultivo con baja concentración salina también fueron adecuados para propagar a *N. nervosa* (Calderón

*et al.* 1994, Mattes Fernández 1995, Jordan *et al.* 1996). Las composiciones orgánicas de BTM y Murashige & Skoog (este último con los macronutrientes a la mitad) fueron las más adecuadas. Sin embargo, los explantos crecidos en el medio y la composición orgánica de BTM estaban más saludables, con hojas más verdes y expandidas, posiblemente debido a la presencia de la glutamina (Martínez Pastur y Arena 1995).

*Etapa de multiplicación.* En el experimento A (cuadro 1) se encontró un efecto significativo en el largo total de los explantos, número y largo de los brotes axilares, tasa de multiplicación, número total de hojas y presencia de callo en la base de los explantos al analizar el efecto de diferentes concentraciones de BA y 2iP. Los mejores valores se encontraron al utilizar 20-30  $\mu\text{M}$  2iP con una tasa de multiplicación de 1:3, así como también lo fue en *N. antarctica* (Martínez Pastur *et al.* 1996). Esta respuesta no se observó en *N. obliqua* y *N. nervosa*, dado que en un medio con 0.55  $\mu\text{M}$  BA se alcanzaron las mejores tasas de multiplicación (Martínez Pastur y Arena 1995, 1996). Como contrapartida, esta concentración de 2iP favoreció el crecimiento de callo en la base de los explantos, el cual fue fácilmente eliminado durante los subcultivos.

Es probable que estas respuestas diferenciales puedan ser explicadas a partir de la filogenia de las especies dentro del género *Nothofagus*. *N. obliqua* y *N. nervosa* son más parientes entre sí, que *N. pumilio* y *N. antarctica* (Hill y Jordan 1993). Existen citas de hibridación entre *N. obliqua* x *N. nervosa* y *N. pumilio* x *N. antarctica* (Donoso y Landrum 1976, Donoso 1993). La filogenia y la existencia de cruzamientos naturales confirmarían nuestros planteamientos, de que especies relacionadas entre sí presentan protocolos de propagación *in vitro* muy semejantes (Martínez Pastur y Arena 1997).

En el experimento B (cuadro 2) se encontraron diferencias significativas en el número de brotes axilares y la tasa de multiplicación, cuando se consideraron como efectos principales al decapitado del ápice y el AG<sub>3</sub>. Cuando no se decapitó el ápice y se adicionaron 0.3  $\mu\text{M}$  de AG<sub>3</sub>, los valores se incrementaron significativamente, obteniendo una tasa de multiplicación de 1:4.7. El agregado de AG<sub>3</sub> favoreció la brotación y el alargamiento de los brotes, al igual que lo observado para diversas especies leñosas (Nadel *et al.* 1991a, 1991b,

CUADRO 1

Efecto del BA y el 2iP (Experimento A) sobre el largo de los explantos (L), número (NB) y largo de los brotes (LB), tasa de multiplicación (TM), número de hojas (NH) y presencia de callo en la base de los explantos (C) durante la multiplicación en medio BTM en la propagación de brotes de renovales de lenga.

Effect of BA and 2iP (Experiment A) on explant length (L), number (NB) and shoot length (LB), multiplication rate (TM), leaf number (NH) and presence of callus at the explant base (C) during multiplication on BTM medium in the propagation of the shoots of lenga sapling.

Tratamiento	L (mm)	NB (n)	LB (mm)	TM (n)	NH (n)	C (%)
Control	16.4a <sup>1</sup>	0.31a <sup>1</sup>	3.11a <sup>1</sup>	0.42a <sup>1</sup>	4.37a <sup>1</sup>	2.9a <sup>2</sup>
BA (μM)						
0.2	22.9ab	0.80ab	4.74abc	1.00abcd	5.31a	14.3ab
0.5	23.1ab	1.27abc	5.81abcdef	1.07abcd	4.86a	20.7ab
1.0	22.9ab	0.83ab	3.91ab	0.77ab	5.55a	5.6a
2.0	21.1ab	1.86bcde	5.62abcde	1.41bcdef	4.13a	52.2bc
5.0	25.0abc	2.60cdef	5.53abcd	1.35abcde	4.25a	45.0bc
10.0	23.1ab	1.47abcd	4.37abc	0.78abc	3.89a	84.2cd
2iP (μM)						
2	34.3bcd	1.33abcd	8.68acdefg	2.00cdefgh	8.75b	75.0bcd
5	41.5de	1.47abcd	11.70g	2.05defgh	9.11b	76.5bcd
10	44.8de	1.10abc	7.51abcdefg	1.72cdefg	9.20b	79.3cd
20	49.3e	2.02bcdef	8.88dfg	2.25egh	10.58b	100.0d
30	48.9de	3.53f	10.63g	3.00h	11.00b	100.0d
40	39.7cde	3.25def	8.00acdefg	2.43efgh	10.25b	93.8cd
50	41.7de	3.37ef	10.21g	2.68gh	8.93b	87.5cd

En cada columna valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a P < 0.05 por el test de Tukey<sup>1</sup> y por el test de Post-Hoc<sup>2</sup>.

CUADRO 2

Efecto de la presencia del ápice y el GA<sub>3</sub> (Experimento B) sobre el número (NB) y largo de los brotes (LB), tasa de multiplicación (TM) y presencia de callo en la base de los explantos (C) durante la multiplicación en medio BTM adicionado con 20 μM 2iP en la propagación de brotes de renovales de lenga.

Effect of the presence of apex and GA<sub>3</sub> (Experiment B) on shoot number (NB) and shoot length (LB), multiplication rate (TM) and presence of callus at the explant base (C) during the multiplication on BTM medium with 20 μM 2iP in the propagation of the shoots of lenga sapling.

Tratamiento	NB (n)	LB (mm)	TM (n)	C (%)	
Medias de los efectos principales					
Apice					
No decapitado	4.78ab <sup>1</sup>	10.42a <sup>1</sup>	3.96b <sup>1</sup>	87.5a <sup>2</sup>	
Decapitado al día 0	3.43a	9.57a	1.90a	93.8a	
Decapitado al día 21	5.56b	11.04a	3.75b	100.0a	
AG <sub>3</sub> (μM)					
0.0	3.85b	9.81a	2.72a	93.8a	
0.3	5.33a	10.88a	3.68b	93.8a	
Medias para cada tratamiento					
Tratamiento	AG <sub>3</sub> (μM)				
No decapitado	0.0	3.68	9.59	3.25	87.5
Decapitado día 0	0.0	3.25	9.08	1.75	93.8
Decapitado día 21	0.0	4.62	10.76	3.18	100.0
No decapitado	0.3	5.87	11.25	4.68	87.5
Decapitado día 0	0.3	3.62	10.06	2.06	93.8
Decapitado día 21	0.3	6.50	11.32	4.31	100.0

Las medias de los efectos principales es para todos los tratamientos. En cada columna y para cada factor, valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a P < 0.05 por el test de Tukey<sup>1</sup> y por el test de Post-Hoc<sup>2</sup>.

Read 1992, Bouza *et al.* 1994). El objetivo del decapitado del ápice fue romper la dominancia apical y lograr una redistribución del contenido hormonal endógeno del explanto (Vieitez *et al.* 1993b, 1994). La extracción del ápice (al día 0 o al día 21) no mejoró la tasa de multiplicación, decayendo el aspecto general de los cultivos respecto del testigo sin decapitar.

En el último experimento (C) no se encontraron diferencias significativas entre ambos cultivos (cuadro 3), a excepción del largo de los explantos. No hubo diferencias significativas en la tasa de multiplicación, como sí ocurrió en *N. antarctica*

(Martínez Pastur *et al.* 1996). Cabe considerar que la tasa de multiplicación alcanzada con el material adulto fue muy baja (1:1.41), igual que la obtenida en *Fagus sylvatica* (1:1.2) (Meier y Reuther 1994) e inferior a las presentadas para otras Fagáceas (1:3.5 para *Quercus robur* y 1:3.7 para *Quercus rubra*) (Vieitez *et al.* 1993b, 1994).

*Etapas de enraizamiento.* Se encontró un efecto significativo en el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces cuando se analizó el efecto de la oscuridad (experimento D). Diez días en oscuridad (cuadro 4) fueron suficientes para mejorar el

CUADRO 3

Respuestas comparativas entre brotes de renovales y un árbol adulto de lenga (Experimento C) sobre el largo de los explantos (L), número (NB) y largo de los brotes (LB), tasa de multiplicación (TM), número de hojas (NH) y presencia de callo en la base de los explantos (C) durante la multiplicación en medio BTM adicionado con 20 µM de 2iP en la propagación de brotes de lenga.

Comparative response between shoots of saplings and mature tree of lenga (Experiment C) on explant length (L), shoot number (NB) and shoot length (LB), multiplication rate (TM), leaf number (NH) and presence of callus at the explant base (C) during multiplication on BTM medium with 20 µM 2iP in the propagation of the shoots of lenga.

	L (mm)	NB (n)	LB (mm)	TM (n)	NH (n)	C (%)
Renoval	46.4a <sup>1</sup>	1.83a <sup>1</sup>	9.15a <sup>1</sup>	2.00a <sup>1</sup>	10.41a <sup>1</sup>	100.0a <sup>2</sup>
Arbol adulto	58.7b	1.08a	9.79a	1.41a	11.66a	100.0a

En cada columna, valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a P < 0.05 por el test de Tukey<sup>1</sup> y por el test de Post-Hoc<sup>2</sup>.

CUADRO 4

Efecto de diferentes períodos de oscuridad (PO) (días) (Experimento D) en el porcentaje de brotes enraizados (E), largo de brotes (L), número (NR) y largo de raíces (LR), explantos con callos en los brotes (C) y raíces secundarias (RS) durante el enraizamiento de brotes provenientes de renovales de lenga en medio BTM con los macronutrientes a la mitad adicionado con 0.61 µM AIB.

Effect of different periods of darkness (PO) (days) (Experiment D) on percentage of rooted shoots (E), shoot length (L), root number (NR), root length (LR), explants with callus on the shoots (C) and secondary roots (RS) during the rooting of shoots of lenga saplings on BTM medium with half strength of macronutrients salts added with 0.61 µM AIB.

Oscuridad (días)	E (%)	L (mm)	NR (n)	LR (mm)	C (%)	RS (%)
0	4.20a <sup>2</sup>	37.00a <sup>1</sup>	3.00ab <sup>1</sup>	6.66a <sup>1</sup>	0.00a <sup>2</sup>	0.00a <sup>2</sup>
5	15.40ab	30.00a	4.00b	6.66a	0.00a	5.00a
10	30.80b	31.87a	2.62ab	5.83a	37.50a	0.00a
15	30.80b	29.62a	1.62a	6.43a	25.00a	0.00a

En cada columna, valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a P < 0.05 por el test de Tukey<sup>1</sup> y por el test de Post-Hoc<sup>2</sup>.

## CUADRO 5

Efecto de la concentración de AIB ( $\mu\text{M}$ ) (Experimento E) en el porcentaje de brotes enraizados (E), largo de brotes (L), número (NR) y largo de raíces (LR), explantos con callos en los brotes (C) (como porcentaje y mediante una clasificación visual de 0-4 por tamaño relativo) y raíces secundarias (RS) durante el enraizamiento de brotes provenientes de renovales de lenga en medio BTM con los macronutrientes a la mitad y 10 días de oscuridad.

Effect of AIB concentration ( $\mu\text{M}$ ) (Experiment E) on the percentage of rooted shoots (E), shoot length (L), root number (NR), root length (LR), explants with callus on the shoots (C) (as a percentage and through a sight observation from 0 to 4 by relative size) and secondary roots (RS) during the rooting of shoots of lenga saplings on BTM medium with half strength of macronutrients salts and 10 days of darkness.

AIB ( $\mu\text{M}$ )	E (%)	L (mm)	NR (n)	LR (mm)	C (%)	C (v)	RS (%)
0.61	60.0b <sup>2</sup>	27.12a <sup>1</sup>	2.56a <sup>1</sup>	5.26a <sup>1</sup>	87.5a <sup>2</sup>	1.56a <sup>1</sup>	25.00a <sup>2</sup>
1.23	72.2b	32.05a	3.45a	3.85a	95.0a	2.05a	5.00a
2.46	44.1a	32.86a	3.40a	5.06a	100.0a	3.26b	6.70a

En cada columna, valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes a  $P < 0.05$  por el test de Tukey<sup>1</sup> y por el test de Post-Hoc<sup>2</sup>.

enraizamiento (30.8%). El efecto positivo de la oscuridad fue encontrado para numerosas especies (Hammerschlag 1982, Zimmerman 1984, Németh 1986, Vieitez *et al.* 1993a, Martínez Pastur y Arena 1995, 1996). El número de raíces disminuyó con la oscuridad, a diferencia de lo observado para *N. obliqua*, *N. nervosa* y *N. antártica* donde no se encontraron diferencias significativas (Martínez Pastur y Arena 1995, 1996, Martínez Pastur *et al.* 1996).

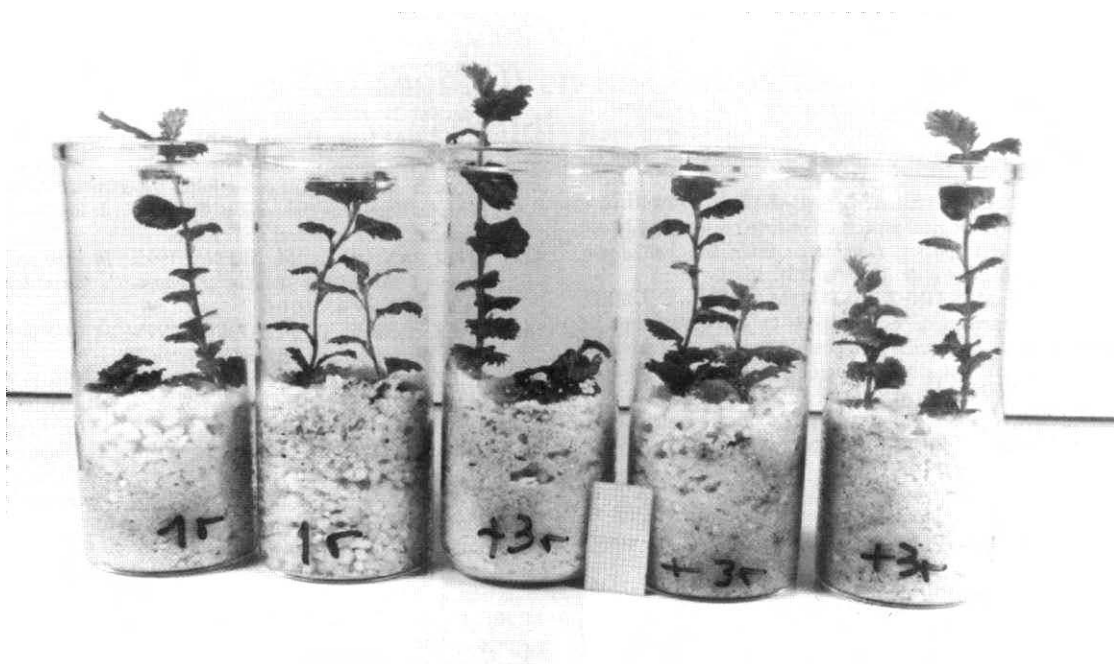
Al analizar la concentración de AIB (experimento E) el porcentaje de enraizamiento y el tamaño relativo del callo presentaron diferencias significativas (cuadro 5). Una concentración de 0.61-1.23  $\mu\text{M}$  de AIB presentó los valores más altos de enraizamiento (60-70%) y niveles aceptables de callo en la base. Esta concentración de AIB es igual a la utilizada en *N. leoni* (Martínez Pastur y Arena 1997) y superior a la empleada en *N. obliqua*, *N. nervosa* y *N. antarctica* (Martínez Pastur y Arena 1995, 1996, Martínez Pastur *et al.* 1996).

*Etapas de rusticación.* Ninguna de las variables estudiadas (altura de las plantas, supervivencia de los explantos, longitud del sistema radical y ennegrecimiento de los ápices) presentó diferencias significativas al analizar el número de raíces como efecto principal (fig. 1). No ocurrió lo mismo en

*N. obliqua* donde el número de raíces iniciales influyó positivamente en el posterior crecimiento de las plantas (Martínez Pastur y Arena 1995). La presencia de raíces secundarias durante el enraizamiento no afectó significativamente el crecimiento posterior de las plantas rusticadas. Sin embargo el largo del sistema radical fue proporcional al número de raíces iniciales (fig. 2). De este ensayo se obtuvieron los siguientes porcentajes de plantas: del 100% de brotes puestos a enraizar, el 60% formó raíces y fue puesto a rusticar. De ese porcentaje el 97.3% sobrevivió a los primeros 45 días de rusticación. De los brotes sobrevivientes el 43.2% tenía buen aspecto, el 21.6% tenía un aspecto regular y el 35.1% tenía mal aspecto (hojas ennegrecidas o con decaimiento generalizado en el explanto).

## CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado en este trabajo permitió propagar *in vitro* brotes de renovales y árboles adultos. Generalmente, el cultivo de material adulto posee una baja tasa de multiplicación, con altos porcentajes de ennegrecimiento de ápices y que culmina con la muerte de los explantos, así como ocurre en material adulto de *Fagus sylvatica* al 15<sup>o</sup> mes (Meier y Reuther 1994). Los brotes de



**Figura 1.** Rusticación de explantos juveniles enraizados de lenga al día 45 (1r = 1 raíz inicial; +3r = más de tres raíces iniciales).

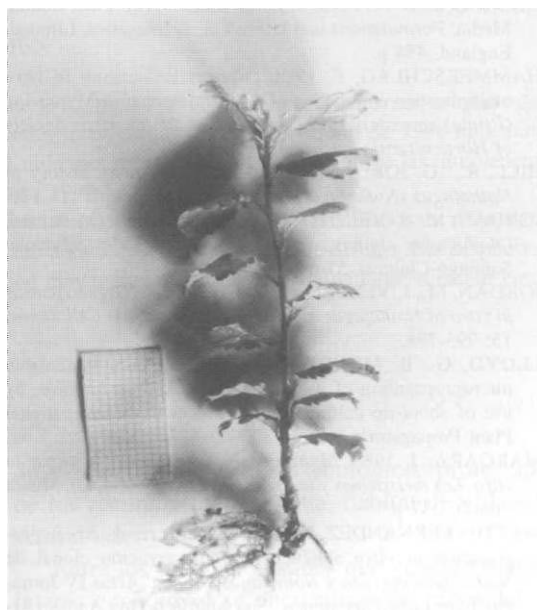
Acclimatisation of rooted juvenile explants of lenga on day 45 (1r = 1 initial root; +3r = more than three initial roots).

lenga de material adulto poseen una baja tasa de multiplicación, pero se mantuvieron a lo largo de un año sin decaer la producción o aumentar la muerte de los explantos.

Los resultados obtenidos en el enraizamiento y la rusticación de plantas juveniles son alentadores para utilizar este protocolo en la producción de plantas de árboles "plus". Este trabajo aporta las primeras contribuciones en el cultivo *in vitro* de plantas juveniles y adultas de *N. pumilio*. Es probable que esta metodología sea la herramienta adecuada para conservar *ex situ* material vegetal de árboles seleccionados de esta especie.

#### AGRADECIMIENTOS

En especial al Dr. Osvaldo Caso (CEVEG-CONICET) que nos guió a lo largo de nuestra investigación. La colaboración del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.



**Figura 2.** Sistema radical de un explanto juvenil de lenga luego de la rusticación al día 45 (tratamiento 2-3 raíces iniciales).

Radical system of a juvenile explant of lenga after rustication on day 45 (treatment 2-3 initial roots).

BIBLIOGRAFIA

- BOUZA, L., M. JACQUES, E. MIGINIAC. 1994. "In vitro propagation of *Paonia suffruticosa* Andr cv 'Mme de Vetry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase", *Scientia Horticulturae* 57: 241-251.
- CALDERON, X., F. PEREZ, C. SALAZAR, V. SANHUEZA. 1994. "Physiological aspects on in vitro preserving Chilean native forest species: *Gomortega keule* and *Nothofagus alpina*", *Noticiero de Biología* 2(3): 15.
- CASO, O., G. MARTINEZ PASTUR, M. ARENA, C. DIZEO. 1996. Presencia de esferoblastos en árboles adultos de *Nothofagus antarctica* y su posible empleo en la propagación clonal. Actas XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mendoza (Argentina), 20-22 marzo, p. 30-31.
- CHALUPA, V. 1983. "Micropropagation of conifer and broad-leaved forest trees", *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.
- DE FOSSARD, R.A., A. MYINT, E.C.M. LEE. 1974. "A broad spectrum tissue culture experiment with tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) pith tissue callus", *Physiologia Plantarum*. 31: 125-130.
- DONOSO, C., L. LANDRUM. 1976. *Nothofagus leoni*: hibridación e introgresión en poblaciones de *N. obliqua* y *N. glauca*. Facultad de Ciencias Forestales, Boletín Técnico N° 36. Santiago, Universidad de Chile, 30 p.
- DONOSO, C. 1993. *Bosques templados de Chile y Argentina: variación, estructura y dinámica*. Ecología Forestal. Santiago, Editorial Universitaria - CONAF, 484 p.
- FERNANDEZ, C., G. MARTINEZ PASTUR, F. BOYERAS, P. PERI. 1993. "Funciones de altura total y área de copa para lenga en Lago Gral. Vintter y Cerro Colorado. Alcances por clases de exposición y altitud", *Ciencia e Investigación Forestal* 7(2): 315-337.
- GEORGE, E., D. PUTTOCK, H. GEORGE. 1987. Plant Culture Media. Formulations and Uses, Vol. 1. Exegetics, Limited, England, 454 p.
- HAMMERSCHLAG, F. 1982. "Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the Plum Rootstock Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh)", *Journal of the American Society of Horticultural Science* 107(1): 44-47.
- HILL, R., G. JORDAN. 1993. "The evolutionary history of *Nothofagus* (*Nothofagaceae*)", *Aust. Syst. Bot.* 6: 111-126.
- JORDAN, M., J. VELOZO. 1992. Micropropagación de raulí (*Nothofagus alpina*). Actas del Segundo Taller Silvícola. Santiago-Chile, p. 57-64.
- JORDAN, M., J. VELOZO, A. SABJA. 1996. "Organogénesis in vitro of *Nothofagus alpina*, *Fagaceae*", *Plant Cell Report* 15: 795-798.
- LLOYD, G., B. MCCOWN. 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. Comb. Proceedings International Plant Propagator's Society 30: 421-427.
- MARGARA, J. 1988. *Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro. Los meristemas y la organogénesis*. Madrid, Ed. Mundi Prensa, 237 p.
- MATTES FERNANDEZ, H. 1995. Primeros resultados en propagación in vitro aplicada a la conservación clonal de *Nothofagus nervosa* y *Nothofagus obliqua*. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes (Argentina), 24-27 octubre, p. 175-180.
- MARTINEZ PASTUR, G., C. FERNANDEZ. 1994. Forest management analysis of SDI's determination for Lenga forest. Proceedings of International Symposium on Cold Region Development, Espoo, 13-16 June, Association of Finnish Civil Engineers Ril.
- MARTINEZ PASTUR, G., C. FERNANDEZ, P. PERI. 1994. "Variación de parámetros estructurales y de composición del sotobosque para bosques de *Nothofagus pumilio* en relación a gradientes ambientales indirectos", *Ciencias Forestales* 9(1-2): 11-22.
- MARTINEZ PASTUR, G., M. ARENA, O. CASO. 1995. Desarrollo preliminar de protocolos de cultivo in vitro para las especies de *Nothofagus* caducifolios patagónicas. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes (Argentina), 24-27 octubre, p. 127-136.
- MARTINEZ PASTUR, G., M. ARENA. 1995. "In vitro propagation of *Nothofagus obliqua* (*Fagaceae*)", *Australian Journal of Botany* 43: 601-607.
- MARTINEZ PASTUR, G., M. ARENA. 1996. "In vitro propagation of *Nothofagus nervosa*", *Phyton* 58: 1-7.
- MARTINEZ PASTUR, G., M. ARENA, O. CASO. 1996. Propagación in vitro de *Nothofagus antarctica* a partir de brotes de renovales y esferoblastos de árboles adultos. Actas XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Mendoza (Argentina), 20-22 marzo, p. 12-13.
- MARTINEZ PASTUR, G., M. ARENA. 1997. Micropropagación de *Nothofagus leoni* Espinosa. Actas II Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Tomo Bosques Nativos y Protección Ambiental. Posadas (Argentina), 13-15 agosto, p. 241-248.
- MEIER K., G. REUTHER. 1994. Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 231-238.
- MURASHIGE, T., F. SKOOG. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- NADEL, B., A. ALTMAN, S. PLEBAN, A. HÜTTERMANN. 1991a. "In vitro development of Mature *Fagus sylvatica* L buds: I. The effect of medium and plant growth regulators on bud growth and protein profiles", *Journal of Plant Physiology* 138: 596-601.
- NADEL, B., A. ALTMAN, S. PLEBAN, A. HÜTTERMANN. 1991b. "In vitro development of Mature *Fagus sylvatica* L buds: II. Seasonal changes in the response to plant growth regulators". *Journal of Plant Physiology* 138: 136-141.
- NEMETH, G. 1986. "Induction of rooting". In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 1: Trees. I. Y.P.S. Bajaj, Ed. Springer-Verlag Heidelberg, p. 49-64.
- READ, P. 1992. Environmental and hormonal effects in micropropagation. En: K. KURATA & T. KOZAI (eds.). *Transplant Production Systems*. Netherlands. Kluwer Academic Publ, p. 231-246.
- URIARTE C, H. GROSSE. 1991. Los bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*). Una orientación para su uso y manejo; recopilación bibliográfica. CORFO-INFOR. Informe Técnico N° 126. Concepción. Chile.
- VIEITEZ, A.M., E.M. FERRO, A. BALLESTER. 1993a. "Micropropagation of *Fagus sylvatica* L. In vitro", *Cellular & Developmental Biology* 29: 183-188.
- VIEITEZ, A.M., F. PINTOS, M.C. SAN-JOSE, A. BALLESTER. 1993b. "In vitro shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L.", *Tree Physiology* 12: 107-117.
- VIEITEZ, A.M., C. SANCHEZ, J.B. AMO-MARCO, A. BALLESTER. 1994. "Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 37: 287-295.
- ZIMMERMAN, R. 1984. "Rooting apple cultivars in vitro: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 3: 301-311.