

AVANCES DE CLONACIÓN *IN VITRO* DE ÁRBOLES ADULTOS DE RAULÍ (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst.) PARA PROPAGACION COMERCIAL

IN VITRO CLONING ADVANCES OF ADULT TREES OF RAULI (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst) TREES FOR COMMERCIAL PROPAGATION

Ana M. Sabja^{1*}, Oriana Ortiz² y Claudia Triviño³

¹Fundación Chile, casilla 567, Valdivia, Chile. (asabja@uach.cl). ²INFOR, Casilla 109 C, Concepción, Chile. (oortiz@infor.cl). ³GENFOR S.A, Casilla 567, Valdivia Chile, (ctrivino@uach.cl)

RESUMEN

Raulí, *Nothofagus alpina* (= *N. nervosa*) es una especie nativa con potencial comercial en Chile. En el presente trabajo se describe el procedimiento para establecer *in vitro* fenotipos adultos de raulí de dos orígenes: terreno e injerto cultivados *in vitro* por periodos de varios años y producir plantas de tamaño y forma adecuada para usar a escala comercial. Se discuten los resultados obtenidos en la fase de enraizamiento, donde esta especie mantenida en cultivo *in vitro* en concentración constante de BAP (0.125 mg L⁻¹) se propaga sin declinar el potencial de enraizamiento después de varios años de subcultivos sucesivos en laboratorio. Para evaluar el potencial rizogénico en el tiempo se aplicaron dos tratamientos: enraizamiento de brotes después de un año del inicio del establecimiento *in vitro* y cuatro años después de subcultivos sucesivos. No hubo diferencias significativas en los porcentajes de enraizamiento entre ambos tratamientos y orígenes. La posibilidad de mantener el potencial rizogénico de una especie cultivada *in vitro* por períodos prolongados es una ventaja para implementar un programa de producción clonal de plantas a gran escala mediante técnicas de micropropagación.

Key words: Raulí, micropropagación, cultivo *in vitro*

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones forestales tienen una función creciente en el abastecimiento futuro de la industria forestal mundial y liberan presión sobre el uso maderero de los bosques naturales. Al respecto, Sedjo (1997) destacó el aporte de las innovaciones en genética y biotecnología para obtener árboles de buen crecimiento y con características deseadas. Sin embargo, la concentración de la producción industrial en plantaciones forestales con unas pocas especies plantea el desafío de la diversificación con nuevas especies para asegurar una producción forestal sostenible.

Entre las especies con potencialidad de uso comercial por su rápido crecimiento y calidad y uso de la

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Noviembre, 2007. Aprobado: Abril, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 595-603. 2008.

ABSTRACT

Rauli, *Nothofagus alpina* (= *N. nervosa*) is a species native to Chile with commercial potential. This study describes the procedure for *in vitro* establishment of adult phenotypes of rauli from two sources, field and graft, cultivated *in vitro* for periods of several years to produce plants of adequate size and form for commercial scale use. We discuss the results obtained in the rooting phase. The species kept in *in vitro* culture with constant concentration of BAP (0.125 mg L⁻¹) propagates with no decline in rooting potential after several years of successive subcultures in the laboratory. To evaluate rhizogenic potential over time, two treatments were tested: shoot rooting one year after establishment *in vitro* and four years of successive subcultures. No significant differences in percentages of rooting were found for treatments or sources. The possibility of maintaining rhizogenic potential of a species cultivated *in vitro* for prolonged periods is an advantage in implementing a program of large-scale production of clones using micropropagation techniques.

Key words: Rauli, micropropagation, *in vitro* culture.

INTRODUCTION

Forest plantations have a growing role in the future supply of the world forest industry, freeing natural forests from pressure exerted by timber extraction. In this respect, Sedjo (1997) highlights the contribution of genetics and biotechnology in obtaining trees with desired characteristics that grow well. However, the concentration of a few species for industrial production in forest plantations raises the challenge of diversification with new species to assure sustainable forest production.

Among the fast-growing, quality wood species with potential for commercial use is rauli, (*Nothofagus alpina* (*Nothofagus procera* (Poepp. Et Engl.) Oerst = *Nothofagus nervosa* (Phil.) Krasser, one of the main species of its genus. The tree is endemic to the subantarctic forests of Chile and Argentina, growing on mountainsides at intermediate altitudes between 300 and 1200 m in deep well-drained soils (Hoffmann,

madera está el raulí, *Nothofagus alpina* (*Nothofagus procera* (Poepp. et Endl.) Oerst = *Nothofagus nervosa* (Phil.) Krasser, una de las principales especies de su género. Árbol endémico de los bosques subantárticos de Chile y Argentina, crece en las laderas de las montañas, a altitudes intermedias entre 300-1 200 m, en suelos profundos con buen drenaje (Hoffmann, 1982). En Chile, las plantaciones con especies nativas se inician desde semillas sin ninguna mejora genética y en algunos casos mediante semillas depuradas obtenidas del programa de mejoramiento genético para raulí. Sin embargo, los niveles de producción de semillas tienen fluctuaciones anuales que corresponden a patrones cíclicos de variación en la especie (Gutiérrez, 2000; Ipinza y Espejo, 2000). Para aumentar la productividad del recurso y obtener un beneficio sostenible, se enfatiza la aplicación de herramientas de mejoramiento genético junto con técnicas biotecnológicas y silvícolas en la propagación de esta especie (Kleinschmit *et al.*, 1993). Las estrategias de mejoramiento de especies forestales incorporan técnicas de propagación asexual como la macropropagación (mediante injerto y estaca) y la micropropagación que permiten transferir toda la varianza genética a los descendientes, duplicando la ganancia genética asociada a los esquemas sexuales de propagación (Ikemori *et al.*, 1994).

La macropropagación por estacas se aplica sólo en material juvenil de raulí, ya que luego pierde esa capacidad de enraizar (Ortiz y Gutiérrez, 2005). La micropropagación vía organogénesis directa se usa en la producción comercial de diversas especies forestales por la alta capacidad de multiplicación, reversión, mantención del estado juvenil y producción de plantas con buena estructura radicular, lo que permite una silvicultura altamente productiva (Ahuja, 1997; MacRae y Cotterill, 1997; Smith 1997). En especies de *Nothofagus* la organogénesis directa se inicia con trozos de tejidos, yemas, secciones nodales y axilares obtenidos de plantas juveniles y adultas y se ha definido el estadio óptimo de los brotes y yemas a propagar (Martínez Pastur *et al.*, 1997a); la embriogénesis somática utiliza semillas como explante inicial (Castellanos *et al.*, 2005). En el cultivo de estos tejidos se emplean los medios nutritivos Broadleaved Tree Medium (BTM), Murashige y Skoog (MS), modificado en las concentraciones de los macronutrientes, y Woody Plant Medium (WPM) con bajas concentraciones salinas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y vitaminas (Martínez Pastur y Arena, 1995; Jordán *et al.*, 1996). El enraizamiento se ha realizado con éxito en oscuridad, distintos tipos y concentraciones de auxinas y aclimatación gradual en invernadero (Martínez Pastur y Arena, 1996; Martínez Pastur *et al.*, 1997b).

1982). In Chile, native species are planted from seed with no genetic improvement. Rauli, in some cases, is planted from selected seeds obtained from the rauli genetic improvement program. However, seed production has yearly fluctuations that correspond to the species' cyclic patterns of variation (Gutiérrez, 2000; Ipinza and Espejo, 2000). To increase productivity of the resource and to obtain sustainable benefits, application of genetic improvement tools, together with biotechnological and silvicultural techniques, for the propagation of this species (Kleinschmit *et al.*, 1993), is emphasized. Improvement strategies of forest species incorporates both asexual propagation techniques: macropropagation (grafting and rooting) and micropropagation, with which all the genetic variance is transferred to descendants, thus duplicating genetic gains associated with sexual propagation schemes (Ikemori *et al.*, 1994).

Macropropagation by cuttings is applied only in young rauli material since at later ages it losses rooting capacity (Ortiz and Gutiérrez, 2005). Micropropagation via direct organogenesis is used in the commercial production of diverse forest species because of its capacity for multiplication, reversion, maintenance of the juvenile stage and production of plants with good root structure, leading to highly productive silviculture (Ahuja, 1997; MacRae and Cotterill, 1997; Smith 1997). In *Nothofagus* species, direct organogenesis begins with portions of tissues, buds or node and axillary sections obtained from young or adult plants; the optimal state of shoots and buds to be propagated has been defined (Martínez Pastur *et al.*, 1997a). Somatic embryogenesis uses seeds as initial explants (Castellanos *et al.*, 2005). In the culture of these tissues the following nutrient mediums were used: Broadleaved Tree Medium (BTM), Murashige and Skoog (MS) modified in macronutrient concentrations, and Woody Plant Medium (WPM) with low salt concentrations, amino acids, growth regulators, and vitamins (Martínez Pastur and Arena, 1995; Jordán *et al.*, 1996). Rooting has been achieved in darkness, different types and concentrations of auxins, and gradual acclimation in greenhouse (Martínez Pastur and Arena, 1996; Martínez Pastur *et al.*, 1997b).

However, previous studies have not considered a number of trees sufficient to permit continuous evaluation of the behavior of different phenotypes in a process of commercial-scale production. Therefore, the objective of this study was to contribute to the diversification of plantations in Chile with a commercially promising native species by evaluating, using micropropagation techniques, the morphogenic capacity of a considerable number of adult rauli phenotypes of field-grown and grafted plants established

Sin embargo, los estudios anteriores no han considerado un número suficiente de árboles que permita evaluar el comportamiento de distintos fenotipos en un proceso de producción a escala comercial de manera continua. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue contribuir a la diversificación de las plantaciones con una especie nativa de Chile con potencial comercial, mediante técnicas de micropropagación, evaluando la capacidad morfogénica de un número considerable de fenotipos adultos de raulí establecidos *in vitro* de dos orígenes, terreno e injerto, por 4 años de cultivo *in vitro*. Como objetivo específico se evaluó el potencial rizogénico en el tiempo, brotes enraizados después de uno y cuatro años del establecimiento *in vitro*, así como el procedimiento para producir plantas plantables.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material vegetal y establecimiento

El material vegetal a micropropagar correspondió a 126 árboles de raulí de 40 a 100 años de edad. Los árboles localizados en toda el área de distribución natural de la especie (35° a 41° S), fueron seleccionados fenotípicamente con base a la rectitud y volumen, con una intensidad de selección promedio de un árbol cada 50 ha, por las instituciones Corporación Nacional Forestal, Instituto Forestal, Complejo Maderero Panguipulli y Universidad Austral de Chile, con proyectos financiados por la Corporación de Fomento (CORFO) y la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de Chile.

El material vegetal óptimo para el inicio del cultivo *in vitro* de raulí adulto corresponde a brotes apicales de yemas en desarrollo. Sin embargo, dado que este material vegetal se obtiene en primavera (inicio de crecimiento vegetativo), para avanzar en esta investigación, los primeros cultivos se hicieron en verano usando brotes apicales de siete árboles (fenotipos) adultos injertados en plantas juveniles y mantenidos en invernadero. En la práctica, el uso de esta metodología es cara pues demanda un número inicial alto de injertos para obtener una cantidad adecuada de brotes apicales. Por esta razón se decidió usar brotes de ramas recolectadas en terreno de 119 árboles adultos seleccionados a inicios de primavera, al término del periodo de receso vegetativo de la especie. Las ramas recolectadas (longitud 30 a 40 cm) fueron llevadas al laboratorio, donde se sumergieron 20 min en una solución de Captan 80WP (Cis-N-((triclorometil)tio)-4 ciclohexen-1, 2-dicarboxamida), 1g L⁻¹; las ramas fueron enjuagadas en agua potable y forzadas a brotar en un ambiente controlado (22±2 °C; humedad 80%; fotoperíodo 16 h luz). Los brotes apicales cosechados (1-2 cm longitud), con uno a dos pares de hojas, fueron desinfectados 10 min en una solución al 10% (v/v) de hipoclorito de sodio comercial, más dos gotas L⁻¹ de Tween 20®, más cuatro enjuagues sucesivos en agua destilada estéril por 4 min. Todo el proceso fue con agitación constante dentro de la cámara de flujo laminar. Inmediatamente los brotes se cultivaron en medio nutritivo Broad-leaved Tree Medium (Chalupa, 1983), con un suplemento 3% de

and cultured *in vitro* for four years. As a specific objective, rhizogenic potential over time was evaluated on rooted shoots after one and four years of *in vitro* growth, as well as the procedure for producing plantable plants.

MATERIALS AND METHODS

Selection and establishment of plant material

The plant material to be micropropagated was selected from 126 rauli trees 40 to 100 years old. The trees located throughout the species natural distribution (35° to 40° S) were selected phenotypically based on straightness and volume by the institutions Corporación Nacional Forestal, Instituto Forestal, Complejo Maderero Panguipulli, and the Universidad Austral de Chile, through projects funded by the Corporación de Fomento (CORFO) and the Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) of Chile. Average selection intensity was one tree per 50 ha.

Optimal plant material for *in vitro* culture of adult rauli is apical shoots from developing buds. However, since this plant material is obtained in the spring (beginning of vegetative growth); in order to advance this study, the first cultures were done using apical shoots from seven adult trees (phenotypes) grafted on young plants and kept in a greenhouse. In practice, the use of this method is expensive since it requires a high initial number of grafts to obtain enough apical buds. For this reason, we decided to use sprouts from branches collected in the field from 119 adult trees selected in early spring at the end of the plant dormant period. The collected branches (30 to 40 cm long) were taken to the laboratory where they were immersed for 20 min in a 1 gL⁻¹ solution of Captan 80WP (Cis-N-((trichloromethyl)thio)-4 cyclohexen-1,2-dicarboximide). The branches were rinsed in potable water and forced to sprout in a controlled environment (22±2 °C; 80% relative humidity; 16 h light photoperiod). The harvested apical shoots (1-2 cm long), with one to two pairs of leaves, were disinfected 10 min in a 10% (v/v) solution of commercial sodium hypochlorite, plus two drops L⁻¹ of Tween 20™ and rinsed four times successively in sterile distilled water for 4 min. The entire process was done under constant shaking inside a laminar flow chamber. The shoots were immediately cultivated in a Broad-leaved Tree Medium (Chalupa, 1983) with a 3% supplement of sucrose (Merck), 0.125 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP, Sigma), Murashige and Skoog vitamins, 2 mg L⁻¹ glutamine (Sigma), 2.3 g L⁻¹ Gelrite™ (Sigma); pH was adjusted to 5.7. Explants were maintained in an incubation chamber (22±2 °C, 16 h photoperiod) for 30 d.

Shoot multiplication

The shoots from the explants were transferred to a fresh BTM medium every 21 d using the same hormone concentration as the previous stage, but reducing the sucrose concentration to 2%. The number of shoots from explants was determined monthly for one year.

sacarosa (Merck), 0.125 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP; Sigma), vitaminas de Murashige y Skoog, 2 mg L⁻¹ de glutamina (Sigma), 2.3 g L⁻¹ de Gelrite® (Sigma); el pH se ajustó a 5.7. Los explantes se mantuvieron 30 d en una cámara de incubación a 22±2 °C, con un fotoperíodo de 16 h.

Multiplicación de brotes

Los brotes originados de los explantes fueron transferidos a medio nutritivo fresco BTM cada 21 d, usando la misma concentración hormonal de la etapa anterior pero reduciendo la concentración de sacarosa al 2%. El número de brotes originados desde un explante fue contabilizado mensualmente durante un año.

Enraizamiento

Se emplearon 35 fenotipos para evaluar la etapa de enraizamiento después de un año (año 1) y cuatro años (año 2) del cultivo *in vitro*, para determinar si el potencial de enraizamiento decrece con subcultivos sucesivos. Para ello 16 110 brotes apicales (2-3 cm longitud) con dos pares de hojas fueron cultivados en medio BTM con los macronutrientes diluidos en 50% (p/v), vitaminas de Murashige y Skoog, 0.12mg L⁻¹ de ácido indol 3-butírico (AIB; Sigma), 15% sacarosa (Merck), 2.3 g L⁻¹ de Gelrite® (Sigma); el pH se ajustó a 5.7. Los explantes fueron colocados 7 d en oscuridad, luego un fotoperíodo de 16 h luz por 18 d y se traspasaron a la etapa de acondicionamiento en laboratorio.

Acondicionamiento y pre-aclimatación en laboratorio

Para evitar las condiciones de estrés observadas al transferir plantas micropropagadas a invernadero, se acondicionaron previamente en laboratorio: los brotes enraizados en sustrato fueron cultivados tres semanas en envases con un filtro en la parte superior que permite intercambio gaseoso. Se adicionó medio líquido BTM estéril, diluido a 25% (v/v), al sustrato de turba y perlita (1:3).

Aclimatación en invernadero

Luego del acondicionamiento en laboratorio, las plantas fueron trasladadas a invernadero y colocadas en tubetes circulares (120 cm³) con sustrato de turba y perlita (1:3) y Osmocote® 15-9-12, en dosis de 5 kg m⁻³. La humedad fue 90% por una semana bajo túnel de plástico, la que gradualmente (tres semanas) se redujo hasta condiciones ambientales normales.

Análisis estadístico

Para evaluar el potencial rizogénico en el tiempo se usaron dos tratamientos de enraizamiento de brotes. La unidad experimental fue el fenotipo de dos orígenes: material adulto de injerto y material adulto de terreno. Los tratamientos fueron los dos períodos de tiempo para el enraizamiento: año 1 (después de un año de cultivo *in*

Rooting

Thirty-five phenotypes were used to evaluate the rooting stage after one year (year 1) and four years (year 2) of *in vitro* culture to determine whether rooting potential decreases with successive subcultures. A total of 16 110 apical sprouts (2-3 cm long) with two pairs of leaves were cultured in BTM medium with diluted (50% p/v) macronutrients, Murashige and Skoog vitamins, 0.12 mg L⁻¹ indol 3-butiric acid (IBA; Sigma), 15% sucrose (Merck), 2.3 g L⁻¹ Gelrite™ (Sigma); pH was adjusted to 5.7. Explants were kept in darkness for 7 d and later with a photoperiod for 16 h light for 18 d; they then passed to the stage of conditioning in the laboratory.

Laboratory conditioning and pre-acclimatation

To prevent symptoms of stress normally observed when micropropagated plants are transferred to a greenhouse, they were previously conditioned in the laboratory: shoots rooted in a substrate were cultured three weeks in vessels with a filter in the upper part to permit gas exchange. Sterile BTM liquid medium diluted to 25% (v/v) was added to peat-perlite (1:3) substrate.

Acclimatation in the greenhouse

After conditioning in the laboratory, the plants were taken to the greenhouse and placed in circular tube containers (120 cm²) with peat-perlite (1:3) substrate and Osmocote™ 15-9-12 at a dosage of 5 kg m⁻³. Humidity was 90% under a plastic tunnel for one week and was gradually (three weeks) reduced until it reached normal environment conditions.

Statistical analysis

To assess potential rhizogenic potential over time, two shoot rooting treatments were used. The experimental unit was phenotype from two sources: grafted adult material and land-grown adult material. The treatments were two time periods for rooting: year 1 (after one year of *in vitro* culture) and year 2 (four years of multiplication *in vitro*). With the rooting results, a one-way analysis of variance was performed by treatment, and treatment means were compared with the Tukey test (p≤0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Selection and establishment of plant material

The use of a considerable number of phenotypes allowed us to define the behavior of the plant material *in vitro*. From the 126 adult rauli trees or phenotypes, and using two sources (apical shoots from grafts and apical shoots from field-grown plants) 47 phenotypes (37%) were established *in vitro*, of these seven were from grafted adult phenotypes and 40 from field-grown adult phenotypes (Figure 1A). Apical shoots were very

vitro) y año 2 (cuatro años de multiplicación *in vitro*). Con los resultados de enraizamiento según tratamientos se hizo un análisis de varianza de una vía y las medias entre tratamiento se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección del material vegetal y establecimiento

El uso de un número considerable de fenotipos permitió definir el comportamiento del material vegetal cultivado *in vitro*. A partir de 126 árboles o fenotipos adultos de raulí y usando dos orígenes (brotes apicales de injerto y brotes apicales de terreno) se establecieron *in vitro* 47 fenotipos (37%), de los cuales siete provenían de fenotipos adultos injertados y 40 de fenotipos adultos de terreno (Figura 1A). Los brotes apicales eran muy heterogéneos entre fenotipos en tamaño y expansión foliar, aspecto determinante en la oxidación del tejido de raulí y de otras especies de *Nothofagus* (Martínez Pastur *et al.*, 1995), lo que condicionó que solo 47 fenotipos se establecieron *in vitro*.

Multiplicación de brotes

En explantes provenientes de injertos de material adulto, las respuestas de multiplicación de brotes se

heterogeneous among phenotypes in size and foliar expansion, a determinant aspect in tissue oxidation of raulí and other *Nothofagus* species (Martínez Pastur *et al.*, 1995); this determined establishment of only 47 phenotypes *in vitro*.

Shoot multiplication

Shoot multiplication response was observed in the seven phenotypes (Figure 2) of explants from grafted adult material. Their multiplication rate fluctuated between 1:1 and 1:2 shoots per explant after two months, reaching 1:2 to 1:62 shoots after 12 months of *in vitro* culture. Some phenotypes showed better capacity for inducing axillary buds, such as phenotypes 43 and 23, which produced more than 50 shoots per explant 12 months after culture initiated.

The shoot multiplication response of 13 field-grown adult phenotypes is described. After two months culture, the rate of shoot multiplication was 1:1 to 1:12, and after 12 months it was 1:1 to 1:230, depending on the phenotype. In phenotypes 141 and 120, more than 100 shoots per explant were obtained (Figure 3). Martínez Pastur and Arena (1996) report similar results, 1:7 to 1:11 after two months of culture using young material. These good results are due to previous experience with cultured material from grafting in a greenhouse.

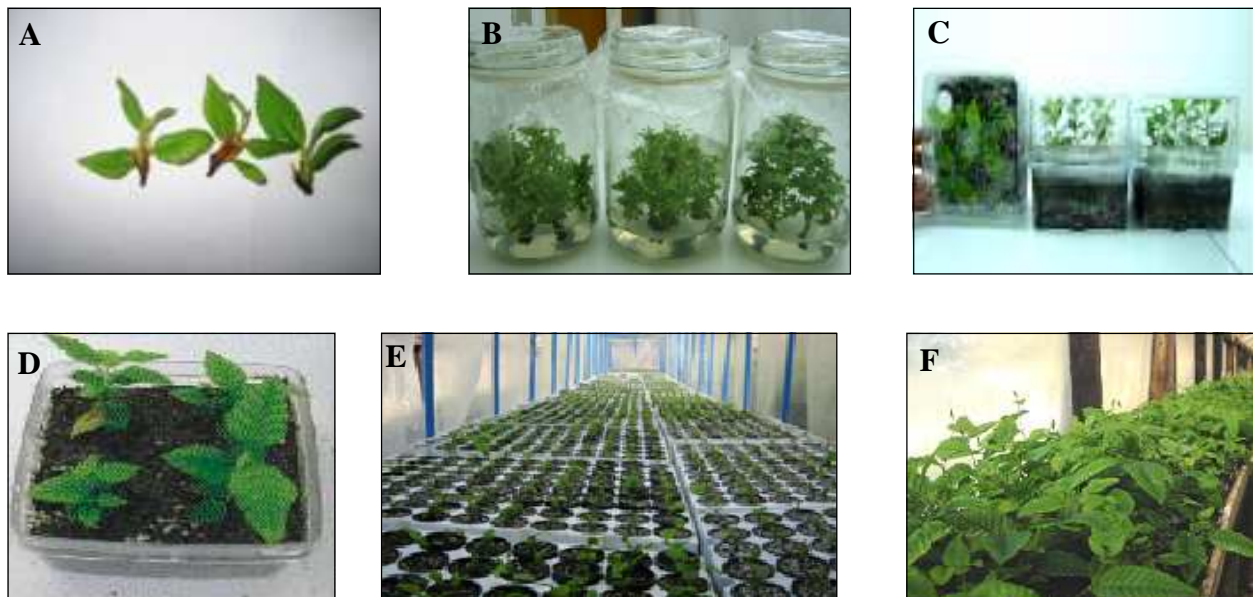


Figura 1. Etapas del proceso de micropropagación de raulí. A) explante inicial: brotes apicales; B) multiplicación de brotes; C) etapa de pre-aclimatación en laboratorio; D) plantas a transferir a invernadero; E) plantas bajo túnel plástico en invernadero para mantener alta humedad; F) plantas después de tres meses en invernadero.

Figure 1. Stages of the raulí micropropagation process. A) initial explant: apical shoots; B) shoot multiplication; C) laboratory pre-acclimatation stage; D) plants to be transferred to the greenhouse; E) plants under plastic tunnel in greenhouse to maintain high humidity; F) plants after three months in greenhouse.

observan en los siete fenotipos (Figura 2). Su tasa de multiplicación fluctuó entre 1:1 a 1:2 brotes por explante a los dos meses, alcanzando 1:2 a 1:62 brotes a los 12 meses del cultivo *in vitro*. Algunos fenotipos mostraron una mejor capacidad de inducir brotes axilares, como los fenotipos 43 y 23 que alcanzan más de 50 brotes por explante a los 12 meses del inicio del cultivo.

La respuesta en multiplicación de brotes en fenotipos adultos de terreno se describe en 13 de ellos, con una tasa de 1:1 a 1:12 brotes originados por explante a los dos meses de cultivo y 1:1 a 1:230 brotes después de 12 meses, dependiendo del fenotipo. En los fenotipos 141 y 120 se obtuvieron más de 100 brotes por explante (Figura 3). Martínez Pastur y Arena (1996) señalan resultados similares: 1:7 a 1:11 al cabo de dos meses de cultivo usando material juvenil. Este buen resultado se debe al conocimiento adquirido previamente en el cultivo del material de injerto de invernadero.

En ambos casos, material adulto de injerto y material adulto de terreno, durante los primeros meses de cultivo los explantes presentan una baja proliferación de brotes. Pero al subcultivarse y estabilizarse se alcanzan niveles interesantes de multiplicación, es decir se requieren 12 meses para alcanzar tasas de propagación adecuadas (Figura 1B). En esta especie hubo un efecto positivo de los subcultivos sucesivos en medio con reguladores de crecimiento, respecto a otras especies que pierden la capacidad morfogénica de los tejidos (Vieitez *et al.*, 1985).

Enraizamiento

No hubo diferencias significativas entre los porcentajes de enraizamiento (Figura 4) obtenidos en el año 1 (un año del cultivo *in vitro*) y en el año 2 (cuatro

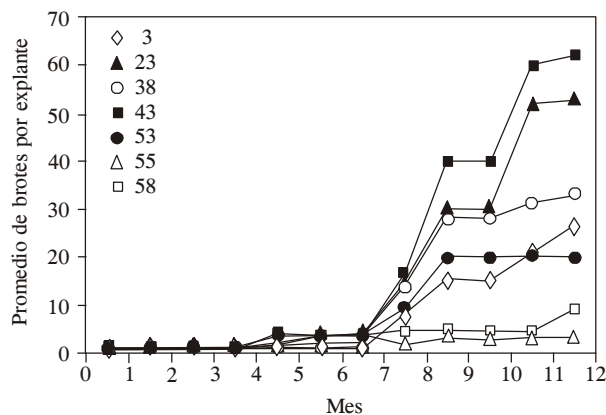


Figura 2. Tasa de multiplicación de brotes en siete fenotipos iniciados a partir de injerto de material adulto y evaluados durante 12 meses.

Figure 2. Rate of shoot multiplication of seven phenotypes from grafted adult material and evaluated during 12 months.

In both cases, during the first months of culture adult grafted material and adult field-grown material had low rates of shoot proliferation. But with subcultures and after stabilization, they reached interesting levels of multiplication; that is, 12 months are required to achieve acceptable levels of propagation (Figure 1B). In this species, there was a positive effect of successive subcultures in medium with growth regulators, compared with others species, whose tissues lose their morphogenic capacity (Vieitez *et al.*, 1985).

Rooting

There were no significant differences between percentages of rooting (Figure 4) obtained in year 1 (one year *in vitro* culture) and year 2 (four years *in vitro* culture). This indicates that successive subcultures in nutritive media with the constant concentration of BAP used did not significantly affect rooting potential over time. This contrasts with *Castanea sativa* and *Eucalyptus* sp., whose response decreases during the rhizogenic process (Ríos *et al.*, 2005, Gómez *et al.*, 2007).

In the analysis of the results of rooting for year 1 and year 2, differentiated by origin of the phenotype (adult graft and adult field), no significant differences were found (Figure 5).

The phenotypes differentiated by source for percentage of rooting obtained in year 2 were classified, and a variation (40 and 90%) in rhizogenic responses was found among phenotypes. Besides, most of the phenotypes decreased percentage of rooting during year 2, relative to year 1. However, as mentioned above, the average rooting percentage of the clones analyzed per year did not exhibit significant differences (Figures 4 and 5).

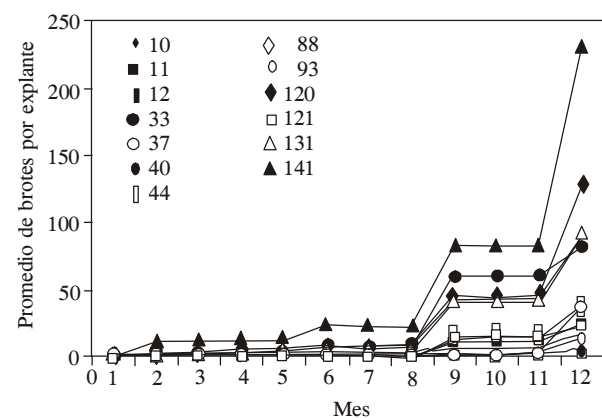


Figura 3. Tasa de multiplicación de brotes en 13 fenotipos adultos de terreno evaluados durante 12 meses.

Figure 3. Rate of shoot multiplication of 13 field-grown adult phenotypes evaluated during 12 months.

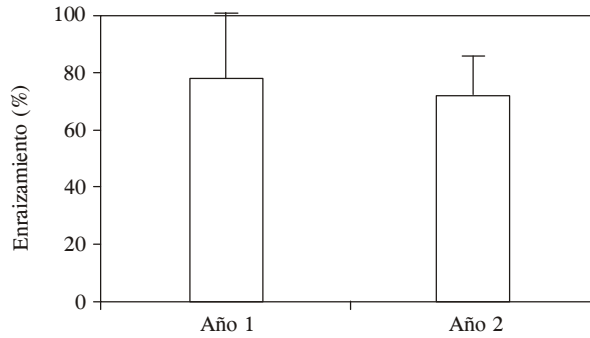


Figura 4. Porcentaje de enraizamiento de los fenotipos para el año 1 y año 2. No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). Año 1, media $\pm 95\%$ intervalo de confianza: 77.8 ± 22.77 . Año 2, media $\pm 95\%$ intervalo de confianza: 71.9 ± 13.43 .

Figure 4. Percentage of rooting of tested phenotypes for year 1 and year 2. There were no significant differences ($p > 0.05$). Year 1, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 77.8 ± 22.77 . Year 2, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 71.9 ± 13.43 .

años del cultivo *in vitro*). Esto indica que los subcultivos sucesivos en medios nutritivos con la concentración constante de BAP usada no afectan significativamente el potencial de enraizamiento en el tiempo. Lo contrario ocurre en *Castanea sativa* y *Eucalyptus sp*, donde

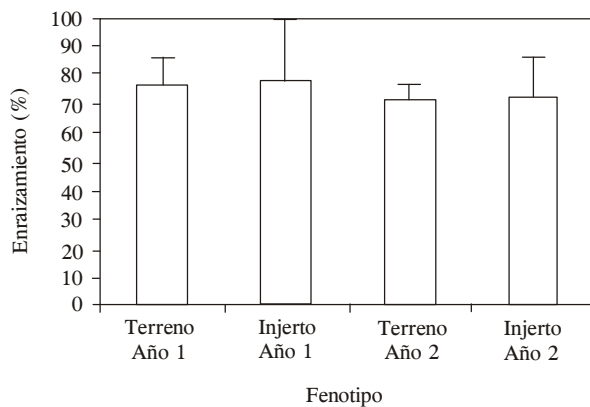


Figura 5. Porcentaje de enraizamiento por origen de fenotipos (injerto y terreno) y año de enraizamiento (año 1 y año 2). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

Terreno Año 1, media $\pm 95\%$ intervalo confianza: 76.99 ± 8.7
 Injerto Año 1, media $\pm 95\%$ intervalo confianza: 79.57 ± 20.6
 Terreno Año 2, media $\pm 95\%$ intervalo confianza: 71.82 ± 5.57
 Injerto Año 2, media $\pm 95\%$ intervalo confianza: 71.57 ± 12.76

Figure 5. Percentage of rooting by source of phenotypes (grafted and field-grown) and year of rooting (year 1 and year 2). There were no significant differences ($p > 0.05$).

Field Year 1, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 76.99 ± 8.7
 Grafted Year 1, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 79.57 ± 20.6
 Field Year 2, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 71.82 ± 5.57
 Grafted Year 2, mean $\pm 95\%$ confidence interval: 71.57 ± 12.76

Laboratory conditioning and pre-acclimation

Laboratory conditioning (Figures 1C and D) enhanced increases in leaf area and apex and root elongation before transferring plants to the greenhouse, thus reducing stress and mortality (Kosai, 1991).

Acclimation in the greenhouse

The procedure used to condition and acclimate contributed to plant survival of 94.3% (12 328) of 35 phenotypes taken to the greenhouse, after reducing humidity to normal environmental conditions (Figure 1E and F).

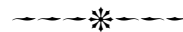
CONCLUSIONS

Rauli (*Nothofagus alpina*) is a species that can be cultivated *in vitro* for long periods. For this species, shoots of different phenotypes were rooted; after four years of successive culture, they were propagated *in vitro* with no decline in morphogenic potential to produce shoots and roots.

The use of a pre-acclimation system in the laboratory before transfer to a greenhouse reduced plant mortality by 5.7%, significantly increasing rauli plant production. Plant growth was not detained by transfer to the greenhouse, indicating a major decrease in stress. Rauli production was 12 328 plants from 35 phenotypes.

It is concluded that it is possible to implement a program for clone production of rauli plants of suitable size and form from adult material for commercial scale use. This is very important to achieve diversity of species used in forest plantations.

End of the English version—



disminuye la respuesta durante el proceso rizogénico (Ríos *et. al.*, 2005, Gómez *et. al.*, 2007).

Al analizar los resultados de enraizamiento para el año 1 y año 2, diferenciados por origen del fenotipo (adulto de injerto y adulto de terreno), no hubo diferencias significativas para estos factores (Figura 5).

Se clasificaron los fenotipos diferenciados por origen para el porcentaje de enraizamiento obtenido el año 2 (Figura 6) y se encontró una variación (40 a 90%) en las respuestas rizogénicas entre fenotipos. Además, la mayoría de los fenotipos presentaron una disminución en el porcentaje de enraizamiento durante el año 2 respecto al año 1. Sin embargo, como ya se indicó, el promedio del porcentaje de enraizamiento

de los clones analizados por año no mostró diferencia significativa (Figura 4 y 5).

Acondicionamiento y pre-aclimatación en laboratorio

El acondicionamiento en laboratorio (Figura 1C y D) permitió aumentar la superficie foliar, elongación apical y radicular de las plantas antes de su traspaso a invernadero, aminorando así el estrés y la mortandad (Kosai, 1991).

Aclimatación en invernadero

El procedimiento usado para el acondicionamiento y aclimatación permitió alcanzar 94.3% (12 328) de sobrevivencia de plantas de 35 fenotipos llevadas a invernadero, luego de reducir la humedad a condiciones ambientales normales (Figura 1E y F).

CONCLUSIONES

Raulí es una especie que puede cultivarse *in vitro* por períodos prolongados. Brotes de diferentes fenotipos enraizados después de cuatro años de cultivo sucesivos se propagan *in vitro* sin declinar el potencial morfológico en proliferación de brotes y enraizamiento.

El uso de un sistema de pre-aclimatación en laboratorio redujo la mortandad de plantas después del traspaso a invernadero a 5.7%, aumentando significativamente la producción de plantas de raulí. El crecimiento de las plantas no se detuvo al traspasar a invernadero, lo que indica una disminución importante del estrés. Se produjeron 12 328 plantas de raulí proveniente de 35 fenotipos.

Se concluye que es posible implementar un programa de producción clonal de plantas de raulí de tamaño y forma adecuada a partir de material adulto, para usar a escala comercial. Esto es muy importante para lograr diversidad de las especies usadas en plantaciones forestales.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio es parte del Proyecto FDI 00C7FT-12. Silvicultura Clonal en Raulí para Aumentar la Productividad de Sitios Forestales en la IX y X Regiones del país.

LITERATURA CITADA

Ahuja, M. 1997. Biotechnology in forestry: expectations and challenges. *In: Perspective of Forest Genetic Tree Breeding on a Changing World*, IUFRO World Series. Vienna, Austria. 6:45-55.
 Castellanos, H., M. Sánchez-Olate, y D. Ríos. 2005. Embriogénesis somática como alternativa potencial para la regeneración *in vitro* del género *Nothofagus*. *In: Gutiérrez B., O. Ortiz, y M. P.*

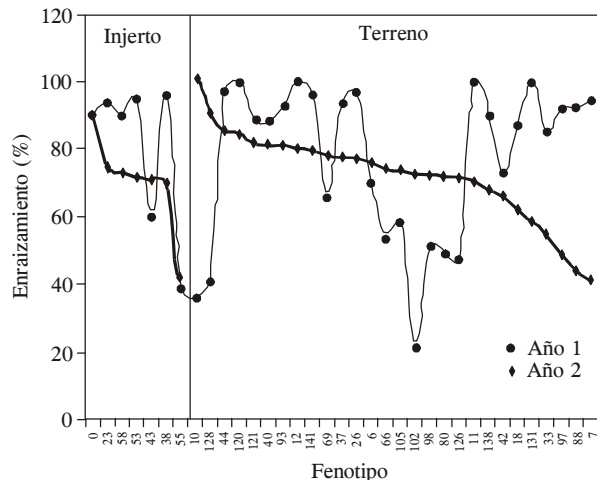


Figura 6. Clasificación de los fenotipos según origen (injerto y terreno), de acuerdo al porcentaje de enraizamiento para el año 2.

Figure 6. Classification of phenotypes by source (graft and field), according to the percentage of rooting for year 2.

Molina (eds). Clonación de Raulí. Estado Actual y Perspectivas. INFOR CEFOR UACH. pp: 59-74.
 Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communications Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13:7-39.
 Gómez, C., D. Ríos, y M. Sánchez-Olate. 2007. Efecto del subcultivo sucesivo sobre la caulogénesis adventicia de *Eucalyptus globulus*. *Bosque* 28 (1): 13-17.
 Gutiérrez, B. 2000. Áreas productoras de semillas en el mejoramiento genético de *Nothofagus*. *In: Ipinza R., B. Gutiérrez, y V. Emhart (eds). Domesticación y Mejora Genética de Raulí y Roble*. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. pp: 215-235.
 Hoffmann, A. 1982. Flora Silvestre de Chile. Zona Austral. Fundación Claudio Gay. Santiago, Chile. Editorial Lord Cochrane. 258 p.
 Ikemori, Y. K., R. M. Penchel, and F. L. G. Bertolucci. 1994. Integrating biotechnology into *Eucalyptus* breeding. *International Wood Biotechnology Symposium*. August 31th- September 1th. Tokio, Japan. pp: 77-84.
 Ipinza, R., y J. Espejo. 2000. Biología Reproductiva en *Nothofagus*. *In: Ipinza R., B. Gutiérrez, y V. Emhart (eds). Domesticación y Mejora Genética de Raulí y Roble*. Universidad Austral de Chile/Instituto Forestal. pp: 75-93.
 Jordán, M., J. Vellozo, and A. Sabja. 1996. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P.et E.) Oerst., (Fagaceae). *Plant Cell Report* 15:795-798.
 Kleinschmit, J., D. K. Khunara, H.D. Gerhold, and W.J.Lobby.1993. Past, present and anticipated applications of clonal forestry. *In: Ahuja, M. R., and W.J. Libby (eds). Clonal Forestry II. Conservation and Application*. Springer-Verlag. Berlin. pp: 9-41.
 Kosai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In: Debergh, P. C., and R.H. Zimmerman (eds). Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers. pp: 447-470.
 MacRae, S., and P. Coterill. 1997. Macropropagation and micropropagation of *E. globulus*. Means of capturing genetic gain. *Proceedings of the IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus v2: Biotechnology applied to genetic improvement of tree species*. Salvador, Brasil. pp: 102-110.

- Martínez Pastur, G., y M. Arena. 1995. Desarrollo preliminar de protocolos de cultivo *in vitro* para las especies de *Nothofagus* caducifolios patagónicos. Actas IV Jornadas Forestales Patagónicas. San Martín de los Andes. Argentina. pp: 127-136.
- Martínez Pastur, G., M. Arena, and O. Caso. 1995. *In vitro* propagation of *Nothofagus oblicua* (Fagaceae). Aust. J. Bot. 43:601-607.
- Martínez Pastur, G., and M. Arena. 1996. *In vitro* propagation of *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. Phytol. 58:1-7.
- Martínez Pastur, G., M. Arena, y O. Caso. 1997a. Micropropagación de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser. Bosque 18 (2): 43-50.
- Martínez Pastur, G., M. Arena, and O. Caso. 1997b. *In vitro* propagation of *Nothofagus antarctica* from phaeoblasts and saplings. Biocell 21(3): 231-236.
- Ortiz, O., y B. Gutiérrez. 2005. Macropropagación vegetativa de raulí: Injertación y enraizamiento de estacas. In: Gutiérrez B., O. Ortiz, y M. P. Molina (eds). Clonación de Raulí. Estado Actual y Perspectivas. INFOR CEFOR UACH. pp: 9-40.
- Ríos, D., M. Avilés, M. Sánchez-Olate, R. Escobar, y G. Pereira. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa* Mill. Agric. Téc. (Chile) 65(3): 258-264.
- Sedjo, R.A. 1997. The forest sector: Important innovations. Discussion Paper 97-42. Resource for the Future, Washington, D.C. 55 p.
- Smith, D. 1997. The role of *in vitro* methods in pine plantation establishment: the lesson from New Zealand. Plant Tissue Culture and Biotechnol 3(2): 63 -73.
- Vieitez, A., A. Ballester, M. San José, and E. Vieitez. 1985. Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. Physiologia Plantarum 65: 177-184.