

## Establecimiento *in vitro* de *Cryptomeria japonica* (Taxocidaceae)

Ana Hine-Gómez & Lisette Valverde-Cerdas

INISEFOR, UNA. Apdo. 86-3000. Heredia, Costa Rica. Telefax: (506) 237 41 51; ahine@una.ac.cr, lvalverd@una.ac.cr.

Recibido 04-IX-2001. Corregido 29-V-2003. Aceptado 00-VI-2003.

**Abstract:** In this work, it was achieved to stablish *in vitro* shoots of *Cryptomeria japonica* from 20 year old trees. The shoots were disinfected and treated with six different concentrations of kinetin and belciladenine in order to induce their development and budding. It was evaluated the effect of quality and lighting intensity on these using for this orange light at  $20 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  and white light at  $30 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ . For shoots rooting it was used different concentrations of NAA (naftalen acetic acid) and IBA (indolbutiric acid) alone or combined. BA and KIN induced the bud formation in *Cryptomeria* but it was observed the best budding with BA at  $9.1 \mu\text{M}$ . White light and orange light promoted the growth of explants as well as the growth of new buds but it was higher with orange light. The bud rooting was observed but it was not posible to find the best auxin concentration for rooting because of the plentiful callus formation on the base of explants and the root formation was very sporadic. The rooted shoots were placed on a substrate for their acclimatation in greenhouse conditions.

**Key words:** Taxocidaceae, *Cryptomeria japonica*, micropropagation, tissue culture, forestry species.

*Cryptomeria japonica* es una conífera de producción uniforme e importante en el control de la erosión y muy utilizada en zonas de protección, cerca viva y como ornamental. De esta especie se pueden obtener productos importantes como son: madera para combustible, madera de calidad para construcción, contenedores, tonelería, artículos de madera, industriales y domésticos, mango de herramientas y madera laminada; entre otros (Anonymous 2000).

En los canales del floema de *Cryptomeria* se encuentran resinas, las cuales pueden ser producidas como defensa al ataque de insectos (Yamanaka 1984) y es productor de algunos metabolitos secundarios como ácido plicático y ácido abiético entre otros. Posee también compuestos flavanoles y fenólicos relacionados con la condensación de los taninos (Samejima 1982).

Aún cuando Streets (1962, citado en Anonymous 2000), menciona que esta especie se regenera bien por semilla y su propagación

vegetativa es muy fácil, la micropropagación es otra alternativa de regeneración que permite el incremento de plantas genéticamente idénticas, donde la probabilidad del límite de producción es considerablemente más elevada que por métodos convencionales (Perea y Navarro 1988). A pesar de estas ventajas, la micropropagación de material adulto muestra algunas dificultades como son la alta contaminación de los explantes, la baja tasa de regeneración de tejido adulto y el lento desarrollo de la técnica de cultivo de tejidos en especies leñosas (Valverde 1996, Abdelnour 1999).

Por esta razón, la micropropagación con material maduro es menos frecuente, con algunas excepciones, ya que es más difícil que la propagación de material juvenil proveniente de embriones cigóticos o de plántulas de semillero. Esto es especialmente cierto en coníferas utilizadas a escala comercial y en árboles caducifolios (Bonga y von Aderkas 1988, Monteuis 1991, Edwald *et al.* 1997).

De acuerdo con estos antecedentes, el presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar una metodología para el establecimiento *in vitro* de la especie *Cryptomeria japonica* a partir de material de campo, fenotípicamente deseable.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como material experimental se empleó yemas terminales de *C. japonica*, que fueron colectados de árboles de 20 años de edad, ubicados en el cantón de Varablanca en la provincia de Heredia. Las yemas fueron lavadas con agua y jabón por 30 minutos en agitación, luego se cepillaron para eliminar la contaminación adherida a la superficie de los explantes y se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 60% p.c. (v/v) por 30 minutos. Seguidamente se sumergieron en una solución de benlate al 0.5% (p/v) y agrimicim al 0.1% (p/v) por 15 minutos consecutivamente en agitación. En la cámara de flujo laminar se realizó una desinfección con hipoclorito de calcio al 20% y tres gotas de tween 20 por 10 minutos en un sonificador. Una vez concluido este tiempo se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

Para estudiar el efecto de dos citocininas sobre el desarrollo de las yemas de *Cryptomeria*, se mantuvieron los explantes 10 días en un medio de agar y luego se inocularon en un medio de cultivo básico de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30% de sacarosa y 7gL<sup>-1</sup> de agar. En todos los ensayos el medio se ajustó a un pH 5.7 antes de la esterilización. El medio se distribuyó en dos diseños irrestrictos al azar e independientes de seis tratamientos con 25 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental consistió de un tubo de ensayo con 10 ml de medio. Las citocininas evaluadas fueron: 6-benciladenina (BA) y N<sup>6</sup>-furfuril adenina (cinetina) en concentraciones de 2.2, 4.5, 6.8, 9.1, 11.4 y 13.6 μM.

El efecto de la calidad de la luz y la intensidad lumínica sobre el crecimiento y la brotación de *Cryptomeria*, se estableció con dos tratamientos: uno con luz blanca a una intensi-

dad lumínica de 30 μEs<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> y otro con luz naranja a 20 μEs<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup>. Ambos tratamientos contenían 50 repeticiones cada uno y cada unidad experimental consistió de un tubo de ensayo con 10 ml de medio en un diseño irrestricto al azar.

Para inducir el enraizamiento de las yemas, se preparó un medio de cultivo MS (1962) a la mitad de las sales, suplementado con 30% de sacarosa, 7gL<sup>-1</sup> de agar y diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolbutírico (AIB) solas o combinadas. Las yemas se distribuyeron en un diseño factorial de diecinueve tratamientos con 25 repeticiones por tratamiento y 10 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo. Las concentraciones evaluadas fueron: 4.92, 7.38 y 9.84 μM de ANA y 5.37, 10.74, 16.11 y 21.48 μM de IBA.

En todos los ensayos, la longitud inicial de las yemas fue de 2.5cm para uniformar las condiciones de crecimiento. El material cultivado fue colocado en una cámara de crecimiento a una temperatura de 22 ± 2 °C, una humedad relativa de 80% y con un fotoperíodo de 16 horas luz.

Los parámetros evaluados fueron: porcentaje de contaminación de las yemas, crecimiento de las yemas medido como longitud en centímetros, número de yemas nuevas y número de yemas que se alargaron. Las evaluaciones se realizaron cada 10 días en el ensayo de brotación por un período de 6 semanas y cada 15 días para el ensayo de tipo de luz e intensidad lumínica. El enraizamiento de las yemas se evaluó como número de yemas enraizadas, número de raíces por planta y presencia de callo. En este caso, los explantes fueron evaluados cada 10 días por un período de 8 semanas.

## RESULTADOS

Contaminación: desde los 10 días de cultivadas las yemas se observó contaminación de los explantes la cual se hizo recurrente y aumentó conforme transcurrió el tiempo. El porcentaje total de contaminación a los 40 días de

cultivo de las yemas fue de un 46.6%. La mayor contaminación de los explantes se debió a un hongo blanco perteneciente al género *Cladosporium* sp, que en sus etapas iniciales fue de color blanco y en su madurez de color verde olivo, el porcentaje de contaminación del material por este hongo fue de un 30% (Figs. 1, 5a). Se observaron dos tipos de infección por bacterias, una colonia de bacterias lechosa de color blanco y otra colonia de bacterias transparente. El porcentaje de contaminación por bacteria lechosa fue de un 10% y se identificó como *Xanthomonas* sp. El porcentaje de contaminación por bacteria transparente fue de un 6% la cual no fue identificada y podría ser endógena.

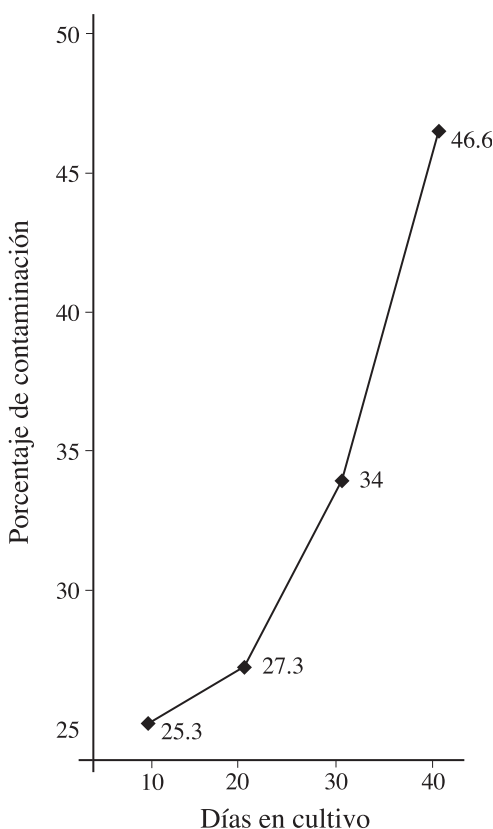


Fig. 1. Porcentaje de contaminación de explantes de *Cryptomeria japonica* durante la etapa de brotación.

Fig. 1. Percent of contamination *Cryptomeria japonica*'s explants in budding step.

Brotación: para el ensayo de brotación en el análisis de varianza se determinó que para el número de brotes nuevos (Figs. 2, 5b, 5c), no existe diferencia significativa entre los tratamientos de cinetina ( $p > 0.05$ ), lo mismo ocurre entre los tratamientos de BA ( $p > 0.05$ ). La concentración 6.8  $\mu\text{M}$  de BA mostró el mayor promedio de brotes nuevos con 1.8 mientras que con cinetina el promedio más alto fue de 1.2 con una concentración de 9.1  $\mu\text{M}$ . Al analizar el efecto del regulador de crecimiento sobre el crecimiento de los explantes se encontró diferencias significativas entre los tratamientos tanto para cinetina ( $p < 0.01$ ) como para BA ( $p < 0.01$ ). La concentración 2.2  $\mu\text{M}$  de cinetina con un promedio de 3.36 cm de longitud y la concentración 4.5  $\mu\text{M}$  de BA con 1.0 cm presentaron los valores más altos (Fig. 3). El crecimiento de las yemas mostró una respuesta cuadrática en los tratamientos con BA. En la variable de número de brotes nuevos alargados también se halló diferencias significativas entre los diferentes tratamientos tanto con cinetina ( $p < 0.05$ ) como para BA ( $p < 0.01$ ). Para esta variable se obtuvo el mayor número de brotes nuevos alargados con una concentración de 6.8  $\mu\text{M}$  de cinetina y una concentración de 2.2  $\mu\text{M}$  de BA (Fig. 4).

Los explantes que presentaban mayor madurez con una coloración verde oscura produjeron nuevas yemas y las que presentaron una coloración verde claro maduraban tornándose a verde oscuro.

Al determinar el efecto de la intensidad lumínica sobre las variables de brotación, longitud de las yemas y número de brotes nuevos alargados, se determinó que para el número de brotes nuevos no existe diferencia significativa entre los tratamientos ( $p > 0.05$ ), aunque los explantes expuestos a la luz naranja mostraron un mayor número de brotes nuevos (87). Sí se observó diferencias significativas en el crecimiento de las yemas entre ambos tratamientos al 5% de significancia (Cuadro 1 y Fig. 5d). En este caso, el mejor tratamiento fue el de luz naranja con un promedio de longitud de 0.9 mm por explante. Finalmente para el número de brotes nuevos alargados se determinó que

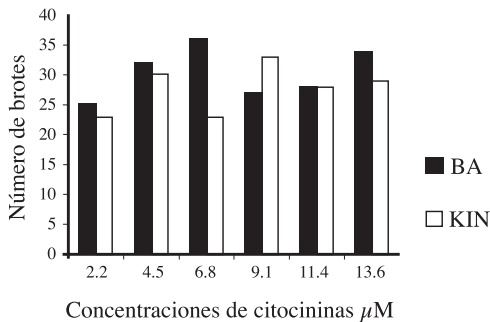


Fig. 2. Efecto de dos citocininas sobre la formación de brotes nuevos de yemas de árboles de 20 años de *C. japonica*.

Fig. 2. Effect of two cytokinins on new bud formation of *C. japonica* shoots.

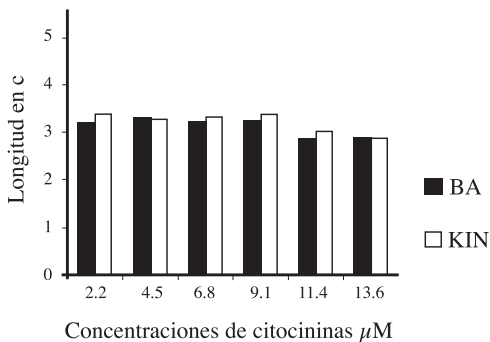


Fig. 3. Efecto de dos citocininas en el crecimiento de yemas de *C. japonica* provenientes de árboles de 20 años de edad.

Fig. 3. Effect of two cytokinins on growth of *C. japonica* shoots from twenty-years-trees.

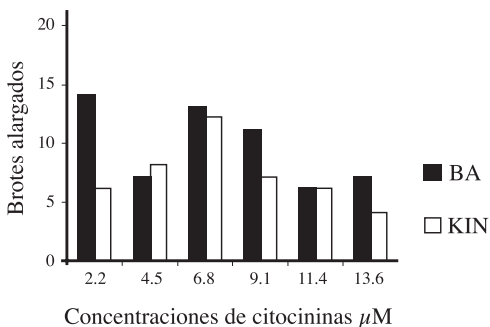


Fig. 4. Efecto de dos citocininas sobre el desarrollo de brotes nuevos en *C. japonica* provenientes de árboles de 20 años de edad.

Fig. 4. Effect of two cytokinins on new bud elongation of *C. japonica* shoots from twenty-years-trees.

existe también diferencia significativa entre los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), el mejor tratamiento de ellos fue la exposición de las yemas a una fuente de luz naranja (Cuadro 1).

Enraizamiento de las yemas: en todos los tratamientos se observó la formación de callo en la base de los explantes (flecha Fig. 5e), esta callosidad no se presentó de la misma forma para cada uno de los tratamientos. En las concentraciones 5.37  $\mu\text{M}$  de IBA, 9.84, 4.92  $\mu\text{M}$  de ANA y 7.38/16.11, 7.38/21.48, 9.84/5.37  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA se observó una abundante proliferación amorfa de callo. En las concentraciones 10.74  $\mu\text{M}$  de IBA y 4.92/10.74, 4.92/ 21.48  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA se obtuvo la menor formación de callo. El callo presentó inicialmente una coloración verde y se decoloró conforme este envejecía.

Se pudo observar también la formación de nudos radicales en casi todos los tratamientos, excepto en las siguientes concentraciones 5.37, 10.74, 16.11  $\mu\text{M}$  de IBA, 7.38, 9.84  $\mu\text{M}$  de ANA y 4.92/16.11  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA, la concentración 21.48  $\mu\text{M}$  de IBA fue la que presentó mayor número de nudos por explante. La formación de raíces se dio esporádicamente (Fig.5e) en las concentraciones de 21.48  $\mu\text{M}$  de IBA, 7.38  $\mu\text{M}$  de ANA, y en 7.38/10.74, 9.84/5.37  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA (Cuadro 2). Los explantes enraizados se transfirieron a un sustrato para su aclimatación (Fig. 5f).

## DISCUSIÓN

Durante los diez primeros días de cultivo se obtuvo un 25.3% de contaminación y a los 30 días de cultivo este porcentaje se incrementó a un 46.6%, lo que demuestra la dificultad de trabajar con material proveniente de campo sin manejo previo. La contaminación por el hongo del género *Cladosporium* sp fue muy significativa al igual que la contaminación bacteriana por la bacteria del género *Xanthomonas* sp. Ambos agentes contaminantes muy comunes en los ensayos de cultivo de tejidos. Reed *et al.* (1998) mencionan que a pesar de que bacterias como *Xanthomonas* pueden cau-

CUADRO 1

*Efecto de la intensidad lumínica en el desarrollo de yemas de Cryptomeria japonica*

Variable	Intensidad lumínica	
	Luz naranja 20 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$	Luz blanca 30 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
Número de brotes nuevos	87a	69a
Longitud promedio del explante	3.38a	3.24b
Número de brotes nuevos alargados	8a	4b
Datos de 50 observaciones		
Letras iguales no difieren entre sí significativamente ( $p \geq 0.05$ )		

sar gran pérdida de explantes conforme crecen y se multiplican, algunos explantes pueden sobrevivir y continuar su desarrollo junto a la bacteria. Ewald (1999) sugiere que el estrés en cultivo de tejidos puede ocasionar la propagación de bacterias endógenas.

Uno de los mayores problemas para trabajar con material maduro es la incapacidad e inexperiencia para manejar fácilmente los explantes provenientes de árboles adultos y la frecuente recalcitrancia que se puede enfrentar a la hora de micropropagarlos (Thorpe *et al.* 1991). Además, Villegas (1990) menciona que una de las razones por la cual es difícil establecer plantas leñosas *in vitro* se debe a que estas plantas son de crecimiento lento, por lo cual pasan expuestas por mucho tiempo en el campo a microorganismos tanto interna como externamente difíciles de erradicar. El protocolo de desinfección establecido mostró alrededor de un 70 a un 80% de eficiencia con material proveniente directamente del campo.

Ewald (1998) menciona que la benciladenina ha sido una de las citocininas más efectivas para la inducción de brotes en coníferas, sin embargo, en este estudio no se encontró diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) entre ambas citocininas. Al evaluar el efecto de BA y cinetina sobre la producción de brotes nuevos se observó que ambas poseen un comportamiento similar ya que en todos los tratamientos favorecieron la formación de brotes. No obstante, las observaciones realizadas coinciden con los resultados obtenidos por Martí-

nez *et al.* 1990 en *Pinus* que mostró brotes múltiples en presencia de BA, mientras que en presencia de cinetina solo mostró brotes individuales. Al respecto, Ewald (1992) anota que

CUADRO 2

*Efecto de diferentes concentraciones de IBA y ANA en el enraizamiento de yemas de Cryptomeria*

Concentración $\mu\text{M}$	Formación de callo	Formación de raíz	Nudos radicales
IBA	+	-	-
5.37	+	-	-
10.74	+	-	-
16.11	+	-	-
21.48	+	+	+
ANA			
4.92	+	-	+
7.38	+	+	-
9.84	+	-	-
ANA/IBA			
4.92/5.37	+	-	+
4.92/10.74	+	-	+
4.92/16.11	+	-	+
4.92/21.48	+	-	-
7.38/5.37	+	-	+
7.38/10.74	+	+	+
7.38/16.11	+	-	+
7.38/21.48	+	-	+
9.84/5.37	+	+	+
9.84/10.74	+	-	+
9.84/16.11	+	-	+
9.84/21.48	+	-	+

+presencia  
-ausencia

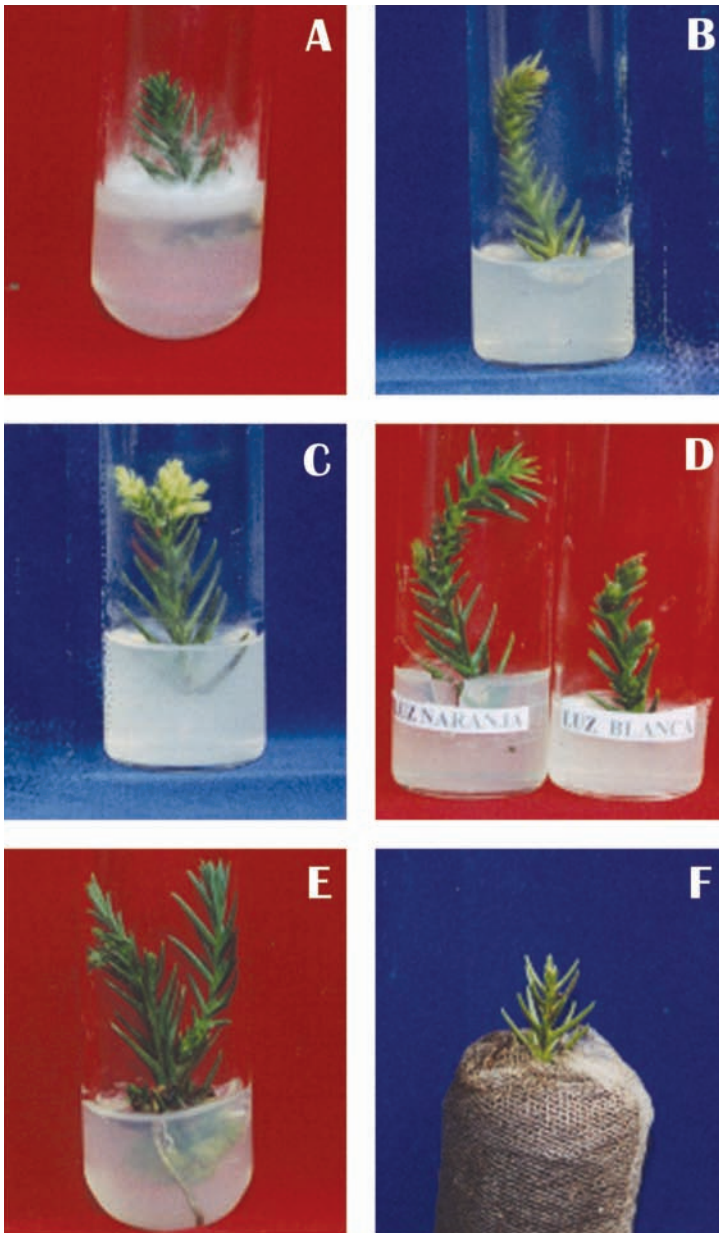


Fig. 5. Hongo *Cladosporium sp* sobre el explante de *C. japonica* (Fig. 5.a). Yemas de *C. japonica* provenientes de árbol adulto mostrando brotación en presencia de cinetina (Fig. 5.b) y BA (Fig. 5.c). Crecimiento de las yemas de *C. japonica* bajo el efecto de la luz naranja (izquierda) y de la luz blanca (derecha) (Fig. 5.d). Enraizamiento de yemas de *C. japonica* provenientes de árbol adulto a una concentración de 7.38/10.74  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA y la formación de callo (señalado con flecha) (Fig. 5.e). Planta de *C. japonica* producida *in vitro* en fase de aclimatación (Fig. 5.f).

Fig. 5. Hongo *Cladosporium sp* sobre el explante de *C. japonica* (Fig. 5.a). Yemas de *C. japonica* provenientes de árbol adulto mostrando brotación en presencia de cinetina (Fig. 5.b) y BA (Fig. 5.c). Crecimiento de las yemas de *C. japonica* bajo el efecto de la luz naranja (izquierda) y de la luz blanca (derecha) (Fig. 5.d). Enraizamiento de yemas de *C. japonica* provenientes de árbol adulto a una concentración de 7.38/10.74  $\mu\text{M}$  de ANA/IBA y la formación de callo (señalado con flecha) (Fig. 5.e). Planta de *C. japonica* producida *in vitro* en fase de aclimatación (Fig. 5.f).

las citocininas como zeatina y cinetina poseen una baja capacidad de inducir la producción de brotes adventicios, pero por otro lado estas promueven el alargamiento de los brotes inducidos. Isikawa (1974), encontró que el BA incrementó en un 25% la formación de brotes en los cultivos de *C. japonica*. Según Martínez *et al.* (1990), las coníferas generalmente producen brotes adventicios en respuesta a la adición de citocininas no combinadas al medio.

Se determinó una diferencia estadística significativa de ( $p < 0.01$ ) en el efecto de BA y cinetina sobre el crecimiento de las yemas, siendo las concentraciones de 4.5 y 2.2  $\mu\text{M}$  de BA las que presentaron una mejor respuesta, respectivamente. La altura de los explantes aumentó conforme incrementó la concentración de BA hasta una concentración de 9.1  $\mu\text{M}$ , después de la cual disminuyó. No fue posible determinar una respuesta clara de los explantes al efecto de ambos reguladores para el número de brotes nuevos, sin embargo se puede decir que el BA fue el regulador de crecimiento que mejor comportamiento mostró en la etapa de brotación y que de las concentraciones estudiadas 9.1  $\mu\text{M}$  de BA fue en la que los brotes mostraron una mejor apariencia, aunque el mayor número de brotes se presentó con una concentración de 13.6  $\mu\text{M}$  de BA.

En este ensayo no se determinó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) sobre la formación de brotes nuevos entre el empleo de lámparas de luz blanca y lámparas proveyendo luz naranja. Para las variables de crecimiento de las yemas y número de brotes nuevos alargados si se determinó diferencia entre los tratamientos de un 5%, en los cuales se observó claramente que el ensayo de luz naranja con una intensidad lumínica de 20  $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  favoreció la especie. La influencia de la calidad de la luz (blanca, roja y azul) en el crecimiento de las yemas ha sido probada concluyéndose que la luz roja posee el mayor efecto de estimulación sobre el crecimiento de las yemas (Ewald 1992).

Los resultados obtenidos reflejan que con la adición de auxinas puras o combinadas al medio se promueve la formación de callo, nudos radicales y raíces en las yemas de *Crypto-*

*meria*. El IBA es la auxina normalmente utilizada para el enraizamiento (Thorpe *et al.* 1991) y el ANA se ha empleado en otros ensayos con *C. japonica*, reportándose la formación de callos (Isikawa 1974, Mehra y Anand 1979, Sato 1990). La formación de callo se dio de forma abundante y esta excesiva formación de callo pudo haber limitado la formación de raíces en esta especie. La formación de nudos radicales al igual que la de raíces se observó en muy pocos explantes lo que no permitió un análisis estadístico de los datos; pero si demostró que esta especie puede ser enraizada *in vitro*.

Aún cuando Martínez *et al.* (1990), recomiendan el empleo de auxinas exógenas, la reducción de las sales y de la sacarosa en el medio como requisitos para un enraizamiento exitoso, la reducción de las sales en este ensayo no pareció favorecer la etapa de enraizamiento en *C. japonica*. Según los resultados obtenidos, esta especie muestra una cierta dificultad de enraizamiento *in vitro* y en algunos explantes se observó una cierta recalcitrancia. En general el enraizamiento de las coníferas es un paso lento y problemático comparado con plantas herbáceas (Martínez *et al.* 1990). Ewald (1998) menciona que el enraizamiento de explantes provenientes de árboles adultos es un paso crítico en el proceso de regeneración de las plantas. Por tanto, se hace necesario un mayor estudio para lograr un óptimo enraizamiento *in vitro* para *C. japonica*.

## RESUMEN

En este trabajo, se logró establecer *in vitro* yemas de *Cryptomeria japonica* provenientes de árboles de 20 años de edad. Las yemas fueron desinfectadas e introducidas al laboratorio y tratadas con seis diferentes concentraciones de cinetina y benciladenina para inducir su desarrollo y brotación. Se evaluó el efecto de la calidad e intensidad lumínica sobre éstas utilizando para ello luz naranja a 20  $\mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$  y luz blanca a 30  $\mu\text{E}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Para el enraizamiento de las yemas se utilizó diferentes concentraciones de ANA (ácido naftalenacético) y AIB (ácido indolbutírico) solas o combinadas. Tanto BA como cinetina inducen la formación de brotes en *Cryptomeria* pero se observó una mejor brotación en presencia de BA a una concentración de 9.1  $\mu\text{M}$ . La luz blanca y la luz naranja promovieron el crecimiento de los explantes así como de las yemas nuevas

pero éste fue mayor en presencia de luz naranja. Se logró enraizar las yemas pero no fue posible determinar la concentración de auxina más adecuada para el enraizamiento ya que se dio abundante formación de callo en la base del explante y la formación de raíces fue muy esporádica. Aquellas yemas enraizadas fueron colocadas en un sustrato para su aclimatación en el invernadero.

## REFERENCIAS

- Abdelnour, A. 1999. Manual de laboratorio cultivo de tejidos I. Editorial tecnológica, Cartago, Costa Rica. 38 p.
- Anonymous, 2000. *Cryptomeria japonica* CD data sheet. Forestry Compendium Global Module. CABI, Wallingford, CABI Publishing.
- Bonga, J.M. & P. von Aderkas. 1988. Attempt to micropropagate mature *Larix deciduas* Mill., 155-168. In M.R.Ahuja (ed.). Somatic cell genetics of woody plants, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Ewald, D. 1992. Aims and Results of Basic Research in the Institute of Forest Tree Breeding in Waldsiedersdorf. *Silvae Genet.* 41: 3.
- Ewald, D. & R. Süß. 1993. A System for Repeatable Formation of Elongating Buds in Norway Spruce Tissue Culture. *Silvae Genet.* 42: 4-5.
- Ewald, D., U. Kretschmar & Y. Chen. 1997. Continuous micropropagation of juvenile larch from different species via adventitious bud formation. *Biol. Plantarum.* 39(3): 321-329.
- Edwald D., G. Naujoks., I. Zaspel & K. Szygiel. 1999. Occurrence and influence of endogenous bacterial in embryogenic culture of Norway spruce, pp. 149-154. In A.C.Cassells (ed.). Pathogen and Microbial Contamination Management in Micropropagation, Kluwer Academic, Dordrecht.
- Edwald, D. 1998. Advances in tissue culture of adult larch. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 325-330.
- Isikawa, H. 1974. *In vitro* formation of adventitious bud and root on the hypocotyl of *C. japonica*. *Bot. Mag.* 87: 83.
- Martínez, P. C., I. S. Harry & T.A. Torpe. 1990. *In vitro* regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*) Can. J. For. Res. 20: 1200-1211.
- Mehra, P. & M. Anand. 1979. Cytology of callus of *Cryptomeria japonica*. *Physiol. Plant.* 45(1): 127-131.
- Monteuuis, O. 1991. Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through *in vitro* meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. *Physiol. Plant.* 81: 111-115.
- Perea, M. & W. Navarro. 1988. Técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. UNA-CONICIT. San José, Costa Rica. 105 p.
- Reed, B., J. Mentzer, P. Tanprasert & X. YU. 1998. Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 52: 67-70.
- Sato, T. 1991. Basic studies of organ and callus culture in woody plants. Bulletin of the forestry and forest products research Institute. Ibaraki, Japan. 360: 35-119.
- Samejima, M., T. Yamaguchi, T. Fukuzumi & T. Yoshimoto. 1982. Effects of phytohormones on accumulation of flavanols in callus cells of woody plants *Cryptomeria japonica*, *Eucalyptus robusta*, pp. 353-354. In Plant tissue culture: proceedings, 5<sup>th</sup> International Congress of Plant Tissue Culture and Cell Culture. Japan.
- Streets, R.J. 1962. Exotic forest trees in the British Commonwealth. Clarendon, Oxford.
- Thorpe, D., I. Harry & P. Kumur. 1991. Application of micropropagation to forestry, 311-336.
- Valverde, L. 1996. El cultivo de tejidos en especies forestales. Manuscrito. 16 p.
- Villegas, A. 1990. Métodos asépticos. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales, FAO. 105: 21 p.
- Yamanaka, K. 1984. Normal and traumatic resin-canals in the secondary phloem of conifers. *J. Japan Wood Res. Soc.* 30(5): 347-353.