



8º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

La **Ciencia forestal** y su contribución a
los **Objetivos de Desarrollo Sostenible**



8CFE

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cataluña | Catalunya - 27 junio | juny - 1 julio | juliol 2022

ISBN 978-84-941695-6-4

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Organiza



Microinjerto de variedades certificadas de castaño

FERNÁNDEZ LORENZO, J.L.¹, CRECENTE CAMPO, S.², PRADO VÁZQUEZ, AN.¹, COUSO VIANA, A.¹ RIGUEIRO RODRÍGUEZ¹, FERREIRO DOMÍNGUEZ, N.¹.

¹ Departamento de Producción Vexetal e Proxectos de Enxeñaría. Escola Politécnica Superior de Enxeñaría de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela.

² Centro de Investigacións Agrarias de Mabegondo. Xunta de Galicia. A Coruña.

Resumen

La reciente certificación de 23 variedades de castaño seleccionadas por su producción de castaña de calidad (Orden AAA/605/2016, de 20 de abril y AMP/848/2017, de 30 de agosto) y la alta demanda de planta injertada en Galicia impulsan el estudio de nuevas estrategias de producción y la necesidad de profundizar en el conocimiento de su compatibilidad en el injerto sobre híbridos euroasiáticos resistentes a la “tinta” (*Phytophthora cinnamomi*).

En este trabajo se han realizado ensayos de microinjerto de algunas variedades sobre patrones híbridos sin enraizar, con el fin de evaluar la potencialidad del método y observar posibles problemas de incompatibilidad precoz.

Los resultados iniciales muestran que para las variedades (‘Negral’, ‘Branca’, ‘Amarelante’, ‘Ventura’) e híbridos (111, 7810, 3, 7521) ensayados, en la mayor parte de las combinaciones se obtienen altos porcentajes de prendimiento, sin detectarse síntomas precoces de incompatibilidad. El uso de patrones sin raíces, seguido de un tratamiento auxínico de los microinjertos, que representa una ventaja en términos de simplificación de la técnica y reducción del riesgo de contaminación in vitro, se ve dificultado por el efecto de necrosis apical sobre las púas y la irregularidad en el enraizamiento de los patrones.

Palabras clave

Castanea sativa, híbridos, compatibilidad, patrones sin raíces, enraizamiento.

1. Introducción

Actualmente, en Galicia existe una alta demanda de planta injertada de castaño (*Castanea sativa* Mill.) para producción de fruto. Para su obtención, púas de variedades de castaña seleccionadas se injertan, frecuentemente, sobre patrones híbridos resistentes a la ‘tinta’, provocada por *Phytophthora cinnamomi*, para realizar plantaciones en zonas de riesgo.

Se han llevado a cabo estudios en campo (Miranda-Fontañá y Fernández-López, 2008) para determinar el grado de compatibilidad de las distintas variedades con diferentes clones híbridos, pero la información disponible aún debe ser ampliada.

El uso de la tecnología del microinjerto in vitro puede representar una herramienta de gran interés en ese ámbito, pues, 1) es posible realizar múltiples combinaciones púa-patrón en poco tiempo y en un espacio reducido, 2) permite detectar incompatibilidades precoces y proporcionar información sobre el comportamiento del injerto y 3) el cultivo in vitro de púas y patrones permite disponer de estos durante todo el año en condiciones adecuadas para realizar el injerto (Fernández-Lorenzo & Creciente, 2010; Creciente & Fernández-Lorenzo, 2016).

En trabajos previos en castaño, el microinjerto se había realizado sobre patrones previamente enraizados, con resultados positivos en cuanto a porcentaje de prendimiento (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005) Ahora bien, la posibilidad de uso de patrones sin raíces, que combina el

injerto y el enraizamiento del patrón en un proceso simultáneo (Solgi et al., 2022) y que se aplica con éxito en otras especies, como *Vitis vinífera* (Zhu et al., 2007) o *Morus* spp (Ma et al, 1996, Solgi et al. 2022) simplificaría la técnica y reduciría el riesgo de contaminación in vitro.

2. Objetivos

Aplicar la técnica de microinjerto de variedades seleccionadas gallegas sobre patrones híbridos sin enraizar resistentes a la ‘tinta’, evaluando la viabilidad de la técnica para diferentes combinaciones variedad/híbrido y la posibilidad de uso de patrones sin enraizar.

3. Metodología

Material vegetal

Las púas y patrones para los microinjertos se obtuvieron de microbrotes cultivados in vitro, de las variedades gallegas ‘Negral’, ‘Branca’, ‘Amarelante’ y ‘Ventura’ y de los híbridos resistentes a la ‘tinta’ 7521, 3, 7810 y 111. Todos estos materiales se habían mantenido mediante subcultivo continuo (cada 5 semanas) durante 3-7 años en medio WPM (Lloyd & McCown, 1981) suplementado con 0,1 mg/l de 6-bencilaminoourina (BAP) + 3% sacarosa + 0,7% agar Difco® (pH 5,55 antes del autoclavado).

Microinjerto

Descripción de la técnica

Las púas de los microinjertos consistieron en explantos axilares o apicales de 1,0-1,5 cm, con 2 yemas axilares, y los patrones se obtuvieron de explantos axilares, sin raíces), de 4,5-5 cm de longitud, con o sin callo basal, y desprovistos de hojas. Púas y patrones fueron obtenidos al final de un ciclo de multiplicación (35 días tras el subcultivo).

Los microinjertos se llevaron a cabo en condiciones asépticas, bajo una cámara de flujo laminar horizontal de aire, empleando una lupa binocular. El tipo de microinjerto fue una versión miniaturizada del injerto “de hendidura”, realizando un corte longitudinal en el patrón decapitado (2-3 mm) e insertando en este la púa, cuya base se corta previamente en forma de “V”. La zona del injerto se aseguró mediante un anillo de silicona de 1-2 mm de diámetro interior y 5 mm de longitud (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005).

Experimento 1: experimento preliminar de microinjerto (combinaciones púa-patrón)

En un experimento preliminar, se llevaron a cabo diversas combinaciones de variedades (‘Ventura’, ‘Branca’, ‘Amarelante’, ‘Negral’) e híbridos (7521, 3, 111, 7810). En estos últimos, usados como patrones, se conservó el callo basal. Todos los microinjertos se instalaron en medio WPM suplementado con 0,1 mg/l de BAP. Los microinjertos se realizaron en número variable, en función de la disponibilidad de material, y se evaluó el porcentaje de prendimiento a los 60 días.

Experimento 2: Prendimiento y enraizamiento de microinjertos en distintas condiciones de cultivo

En este experimento, utilizando como patrón el clon híbrido 7521, los distintos tratamientos se definieron en función de la combinación de las siguientes variables: 1) variedad microinjertada (‘Negral’ o ‘Branca’), 2) tipo de púa (explanto axilar o apical), 3) presencia/ausencia de callo basal en el patrón y 4) condiciones de establecimiento del microinjerto: 4.a) introducción del microinjerto en medio con BAP (0,1 mg/l); 4.b) inmersión basal (2 min) de la base (1 cm) del microinjerto en una

solución concentrada (1 mg/ml) de ácido-3-indolbutírico (AIB) y posterior introducción en medio de cultivo sin reguladores.

Cada tratamiento constó de 3 repeticiones de 8 microinjertos. Para llevar a cabo el ensayo completo se realizaron un total 192 microinjertos (8 tratamientos x 24 microinjertos / tratamiento).

A los 45 días de la realización de los microinjertos se evaluó el porcentaje de prendimiento del microinjerto y el porcentaje de enraizamiento de los patrones.

Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico (previa transformación de los valores en porcentajes mediante la transformación del arcoseno) que consistió en un análisis de varianza seguido de una prueba de comparación de medias (LSD).

Condiciones de la cámara de cultivo

Las condiciones de la cámara de cultivo en la que se establecieron los experimentos son: iluminación con fluorescentes de luz blanca neutra (4000 K), con una densidad de flujo radiante de 35-40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y un fotoperíodo (duración del día) de 16h.

4. Resultados

Experimento 1. Combinaciones púa-patrón

Los resultados obtenidos en el primer experimento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Número de microinjertos realizados en distintas combinaciones variedad/híbrido, y porcentajes de prendimiento a los 60 días de la realización; N: número de microinjertos realizado; Np: número de microinjertos prendidos. En este caso, no se ha realizado análisis estadístico de los datos.

HIBRIDO	VARIEDAD	N	Np	% PRENDIMIENTO
3	NEGRAL	30	14	46,67
	BRANCA	17	12	70,59
	VENTURA	9	7	77,78
7521	AMARELANTE	40	27	67,50
	BRANCA	15	13	86,67
	VENTURA	12	8	66,67
7810	AMARELANTE	38	33	86,84
	BRANCA	1	1	100,00
111	AMARELANTE	52	47	90,38
	BRA	9	8	88,89
TOTAL		223	170	76,23

Como se observa, la tasa de prendimiento medio se sitúa en un 76,23 %, considerando el conjunto de los microinjertos realizados. Algunas combinaciones presentan porcentajes de prendimiento relativamente elevados, como en el caso de 'Amarelante' sobre 111: para un total de 52 microinjertos realizados, el prendimiento supera el 90 %. Este porcentaje fue también elevado cuando esta misma variedad se microinjertó sobre 7810 (86,84%), y algo más bajo sobre 7521 (67,5%).

La variedad 'Branca' presenta igualmente altos porcentajes de prendimiento sobre cualquiera de los clones híbridos sobre los que se ha microinjertado, pero en este caso el número de injertos realizado fue bajo, especialmente sobre 7810 (1 microinjerto). En el caso de 'Ventura', si bien el número de microinjertos realizados ha sido bajo (9 sobre el clon 3 y 12 sobre el clon 7521), el prendimiento presenta valores relativamente elevados (77,8% y 66,7% respectivamente).

El caso menos favorable sería el del microinjerto de 'Negral' sobre el clon 3, en donde, de 30 microinjertos realizados, el porcentaje de prendimiento ha sido del 46,67%.

Experimento 2. Prendimiento y enraizamiento de microinjertos en distintas condiciones de cultivo

Los resultados obtenidos en este experimento se ilustran en las Figuras 1 y 2.

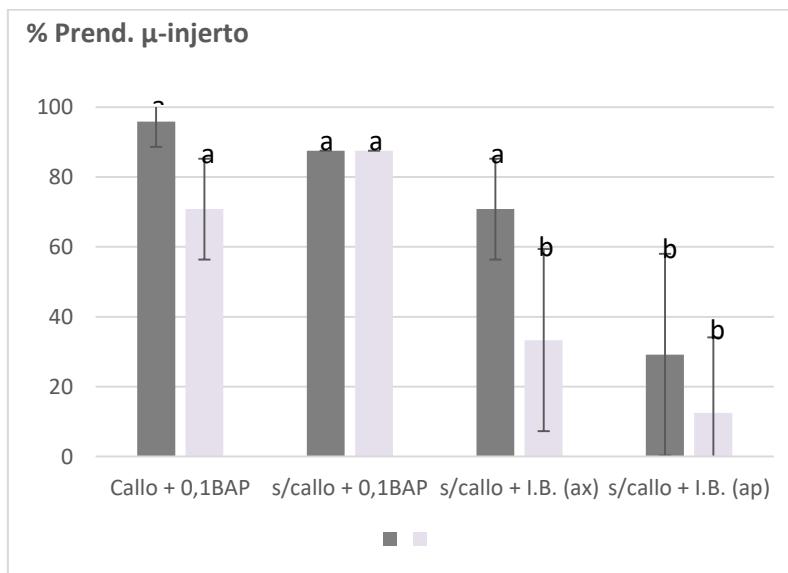


Figura 1. Prendimiento de microinjertos de las variedades 'Negral' y 'Branca' sobre 7521 a los 45 d de la realización del microinjerto. Callo: el patrón conserva el callo basal; s/callo: el patrón no conserva el callo basal; 0,1 BAP: microinjertos establecidos en medio WPM + 0,1 mg ·L-1 de BAP; I.B.: microinjertos sometidos a inmersión basal (60 s) en una solución de 1 mg·mL-1 de AIB y establecidos en medio sin reguladores; (ax): las púas son explantos axilares; (ap): las púas son explantos apicales. Las barras representan las medias ± desviación típica. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

El análisis de los datos de prendimiento indica que existen diferencias significativas ($p = 0,014$) en el prendimiento obtenido en función de la variedad utilizada. Como se observa en la Figura 1, esta diferencia se refleja principalmente en los microinjertos que se someten a inmersión basal en la solución auxínica y se establecen en medio sin reguladores. En este último caso, los microinjertos de 'Negral' con púas consistentes en explantos axilares responden significativamente mejor que aquellos en los que se utilizan explantos apicales. En el caso de 'Branca', no se observan diferencias en función del tipo de púa.

En cuanto al enraizamiento de los microinjertos (Figura 2), los establecidos sobre medio con BAP no emitieron raíces, y aquellos tratados mediante inmersión basal en AIB y establecidos en medio sin reguladores alcanzaron un 40% de enraizamiento en el caso de la variedad 'Negral' cuando se usaron como púas explantos axilares, mientras que en el caso de 'Branca' no se alcanza el 20% de enraizamiento, independientemente del tipo de púa utilizada. Los microinjertos tratados mediante inmersión basal mostraron una alta incidencia de necrosis apical, especialmente en los microinjertos con púas que consisten en explantos apicales, pero esta no parece afectar a la viabilidad de la púa, que recupera normalmente su desarrollo a partir de sus yemas axilares.

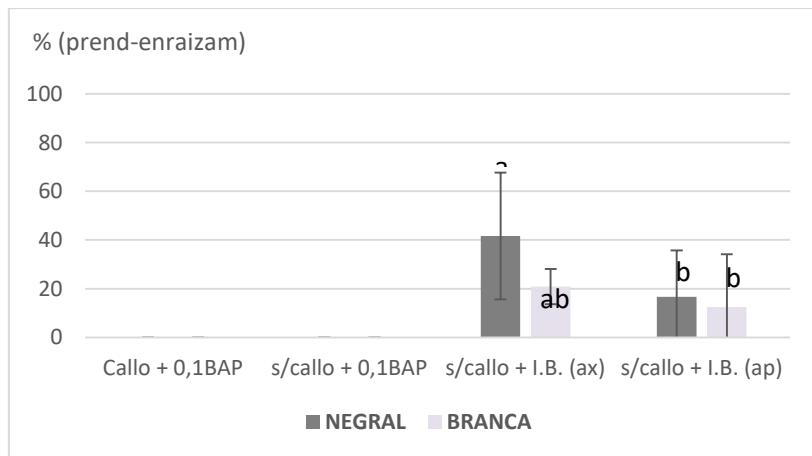


Figura 2. Enraizamiento de microinjertos de las variedades 'Negral' y 'Branca' sobre 7521 a los 45 d de la realización del microinjerto. Callo: el patrón conserva el callo basal; s/callo: el patrón no conserva el callo basal; 0,1 BAP: microinjertos establecidos en medio WPM + 0,1 mg ·L-1 de BAP; I.B.: microinjertos sometidos a inmersión basal (60 s) en una solución de 1 mg·mL-1 de AIB y establecidos en medio sin reguladores; (ax): las púas son explantos axilares; (ap): las púas son explantos apicales. Las barras representan las medias ± desviación típica. Letras distintas expresan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según el test LSD.

5. Discusión

Los resultados de los experimentos muestran que la técnica del microinjerto en ensayos de compatibilidad de variedades de castaña gallega de *Castanea sativa* sobre híbridos euroasiáticos resistentes a la 'tinta' podría complementar los estudios que se realizan en campo. Nuestros estudios preliminares parecen mostrar que existen afinidades diferenciales entre variedades e híbridos que pueden detectarse precozmente a través del microinjerto. Sin duda estos datos deberán ser contrastados con los obtenidos en campo siempre que los resultados del microinjerto sean positivos, pero en el caso de detectarse cualquier síntoma de incompatibilidad *in vitro*, esta información precoz será de vital importancia a la hora de seleccionar las posibles combinaciones a ensayar a largo plazo.

Si bien hemos observado que el uso de un medio con citoquininas resulta claramente favorable para obtener el éxito en el prendimiento del microinjerto, esta condición del medio impide la obtención de raíces en el patrón en castaño. En el estudio de Fernández-Lorenzo y Fernández-López (2005), en el que se utilizaron patrones enraizados, las raíces experimentaban importantes deformaciones en el medio a causa de la presencia de la citoquinina BAP, de tal forma que estas no resultaron funcionales para la aclimatación. Por otra parte, cuando los microinjertos se introducían en medio sin reguladores, los porcentajes de prendimiento y, especialmente, el desarrollo posterior de la púa, se reducían notablemente.

En nuestro segundo experimento, se muestra que el uso de patrones sin raíces y el tratamiento del microinjerto mediante inmersión basal en AIB permite un cierto grado de éxito en la obtención de microinjertos enraizados, con raíces funcionales, que pueden ser aclimatados. El principal escollo es por el momento la aparición de necrosis apical (habitual en los cultivos *in vitro* de castaño) en las púas, más frecuente cuando se utilizan explantos apicales, como consecuencia del tratamiento auxínico. En cualquier caso, verificamos que en la mayor parte de los microinjertos se produce una recuperación del desarrollo de la púa a partir de sus yemas axilares. Las tasas de enraizamiento inusualmente bajas del patrón 7521 están probablemente relacionadas con la disminución del aporte de auxina endógena (que las yemas de la púa no pueden proporcionar hasta que no se verifica la conexión vascular), y con la distribución de recursos entre el proceso de cicatrización y conexión vascular a nivel de la zona del injerto y el proceso organogénico de desarrollo de raíces adventicias a nivel de la base del patrón. Este aspecto no parece limitante en especies que, a diferencia del castaño, presentan altas tasas de enraizamiento espontáneo, como *Morus alba* (Fernández-Lorenzo et al. 2004)

6. Conclusiones

El microinjerto de variedades gallegas de castaña sobre castaños híbridos resistentes a la 'tinta' es susceptible de ser empleado como herramienta complementaria a los ensayos de campo en estudios de compatibilidad, permitiendo la realización a lo largo de todo el año de un número muy elevado de ensayos y ocupando muy poco espacio. El uso de patrones sin raíces facilita el desarrollo de la técnica, pero aún es preciso optimizar las tasas de prendimiento y de enraizamiento.

7. Agradecimientos

Los experimentos del presente estudio han sido financiados a través de Acciones de transferencia para el apoyo a las actividades de demostración e información al campo gallego 2020/114. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural.

8. Bibliografía

- CRECENTE-CAMPO S. & FERNÁNDEZ-LORENZO JL.; 2016. Production of grafted plants of mature *Quercus robur* L. 'Fastigiata' through serial grafting on juvenile rootstocks and effect on micropropagation. *Prop. Ornamental Plants* 16(2):47-55
- FERNÁNDEZ-LORENZO JL. & CRECENTE-CAMPO S.; 2010. In vivo serial micrografting of *Castanea sativa* in short cycles. *Acta Horticult.* 866:291-296
- FERNÁNDEZ-LORENZO JL. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ MJ.; 2005. Reinvigoration of mature *Castanea sativa* by micrografting onto a juvenile clone. *Acta Horticult.* 693:293-298
- FERNÁNDEZ-LORENZO, J. L., PÉREZ, V., LIÑAYO, S., MOSQUERA-LOSADA, M. R., & RIGUEIRO-RODRÍGUEZ, A; 2005. Micropropagation of three clones of *Morus alba* L. selected for fodder use. In Silvopastoralism and sustainable land management. *Proceedings of an international congress on silvopastoralism and sustainable management held in Lugo, Spain, April 2004* (pp. 121-123). CABI Publishing.
- MA, F., GUO, C., LIU, Y., LI, M., MA, T., MEI, L., & HSIAO, A. I.; 1996. In vitro shoot-apex grafting of mulberry (*Morus alba* L.). *HortScience*, 31(3), 460-462.
- MIRANDA-FONTAÑA, ME. y FERNÁNDEZ-LÓPEZ J.; 2008. Clones híbridos de castaño para madera y portainjertos: criterios de selección y propagación. Congreso Internacional do Castiñeiro, Ourense - Spain. (http://www.medioruralemar.xunta.es/fileadmin/archivos/publicaciones/5_M_EUGENIA_MIRANDA.pdf).
- SOLGI, M., TAGHIZADEH, M. & BAGHERI, H. 2022. Response of black mulberry onto white mulberry rootstock to stenting (cutting-grafting) techniques and IBA concentrations. *Ornamental Horticulture*, 28, 78-84.
- ZHU, B., CAO, H. N., ZONG, C. W., PIAO, R. Z., CHEN, L., & ZHOU, L.; 2007. Micrografting technology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1(1), 60-63.