REPRODUCCIÓN EN VIVERO DE CASTAÑOS HÍBRIDOS RESISTENTES A LA TINTA MEDIANTE ESTAQUILLADO SEMIHERBÁCEO

1.- L. OCAÑA, 2.- M.I. SANTOS, 3.- J.A. GÓMEZ, 4.- B. CUENCA
1 y 2. TRAGSA Sede Central: C/ Maldonado, 58. 28006 Madrid
3 y 4. TRAGSA Vivero: Crta. Baldrey a Maceda, Km. 2. 32700 Maceda (Ourense).

RESUMEN

El castaño es, especialmente en Galicia pero también en otras zonas de España, una especie clave en la planificación forestal, económicamente interesante por su producción de fruto y madera.

La enfermedad de la tinta (*Phytophthora sp.*) afectó seriamente a esta especie, de modo que se han seleccionado clones híbridos de *Castanea sativa* y *Castanea crenata*, este último resistente al hongo, por su resistencia a la enfermedad y sus aptitudes forestales. Esta colección se encuentra en el Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán (Pontevedra, España), donde se han llevado a cabo diferentes ensayos para establecer el sistema de propagación más adecuado de este material, que pueda ser empleado por lo viveros comerciales.

En el vivero de TRAGSA en Ourense se han propagado 4 clones de esta colección con porcentajes de enraizamiento comprendidos entre el 42 y el 95% dependiendo de la fecha y del clon. Las estaquillas enraizadas están en estos momentos en aclimatación, por lo que los resultados de planta útil que determinaran la viabilidad económica del sistema estarán disponibles a lo largo de este año.

En la actualidad se está construyendo un laboratorio de cultivo *in vitro* en el vivero de TRAGSA para propagar los clones más recalcitrantes, con objeto de alcanzar la producción óptima en cada caso.

P.C.: castaño híbrido, vivero, Galicia.

SUMMARY

Chestnut is a very interesting forest species not only because the diversity and value of the products obtained from it but also because it is widely extended. It is a key species in Galician forestry planning and it is economically interesting in many other areas in Spain due to its fruit and timber production.

Phytophthora sp. fungus affected seriously this species, so chestnut interspecific hybrid clones of *Castanea sativa* and *Castanea dentata*, the later resistant to the fungus, were selected for resistance to *Phytophthora sp.* and for its aptitudes for forest use. This collection is sitted at Lourizan Forest Research Centre (Pontevedra, Spain), where they carried out different essays to established the most adequated propagation system of this material that could be used by nursery growers.

Four clones of this collection have been propagated at TRAGSA nursery in Ourense, with rooting percentages between 42-95% depending on the date and clone. Rooted stem cuttings are nowadays at acclimation stage, so the results of useful plant that will determine the economical viability of the system will be available during this year.

A laboratory of *in vitro* culture is beeing built now in TRAGSA nursery to propagate recalcitrant clones, among other species, so we can achive the optimal production in every case.

K.W.: Chestnut hybrid, nursery, Galicia.

INTRODUCCIÓN

A partir de 1989, se desarrolló en el Centro de Investigaciones Forestales de Lourizán, un proyecto que pretendía organizar la colección de castaños híbridos seleccionados por su resistencia a la tinta en los años cincuenta, en los programas de mejora del castaño llevados a cabo en el Centro de Fitopatología Agrícola de La Coruña por Urquijo (1957), y en la Misión Biológica de Pontevedra por Vieitez (1966). En el marco de este proyecto, se seleccionó el mejor material, se realizó una red de ensayos para determinar sus aptitudes y se establecieron sistemas de micropropagación y estaquillado para este material como alternativas a la propagación por acodo (Fernandez y col., 1992; Miranda y Fernández, 1992). La propagación clonal del resultado de esta selección requería el desarrollo de

nuevas técnicas de multiplicación, puesto que el acodo, método empleado hasta ese momento por los viveros comerciales, produce plantas de escaso sistema radicular y tiene un bajo rendimiento. En este sentido se han desarrollado profusamente las técnicas de micropropagación del castaño (Vieitez y Vieitez, 1980b; Vieitez y Vieitez, 1982; San José y col., 1984; Vieitez y col., 1990; Miranda y Fernández, 1992; Vieitez y col., 1993). Sin embargo la aplicación de estas técnicas a nivel comercial no siempre es posible, por lo que para los viveros resulta especialmente interesante la producción de este tipo de planta mediante el estaquillado semiherbáceo bajo túnel con nebulización, técnica desarrollada también por el C.I.F. de Lourizán (Fernández y col., 1992). Este sistema ha dado buenos resultados de enraizamiento y supervivencia en los ensayos realizados en el Centro, pero hasta ahora habían tenido poco uso en viveros comerciales. El objeto de este trabajo es presentar los resultados obtenidos con el empleo de esta técnica en la propagación de cuatro clones de castaño híbrido, en un vivero comercial (Vivero de Ourense. TRAGSA).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de 4 clones de castaño híbridos procedentes de la colección de Lourizán fueron establecidos en el vivero de TRAGSA en Julio de 1999 para ser empleados como cepas madres de la estaquilla. El material procedía de estaquillas enraizadas cedidas por el CIF de Lourizán en Junio de 1996, de los siguientes clones: HS, 2671, 7521 y 111, todos ellos con aptitud como portainjertos de *Castanea sativa*.

La plantación se realizó en dos tipos de ambiente:

- a) Bajo cubierta acristalada con pantalla térmica al abrigo de heladas y excesiva insolación aunque sin control de temperatura ni humedad.- Se cultivaron en macetas de 30 litros con un sustrato específico para cultivo en contenedor (Pindstrup FBL-1) y un abonado de fondo con Osmocote Plus 2 g/l. En cada maceta se colocaron dos goteros de caudal 4 l/h. Durante el período de actividad vegetativa, a través del sistema de riego se realizó una fertilización constante (en cada riego), de 700 mS de CE con una solución nutritiva de composición 20+7+19 (Conifer Grower de Peters Professional, Scotts).
- b) En el exterior, expuestos a heladas e insolación directa.- Se plantaron directamente en el terreno, y regadas manualmente durante el período de sequía estival.

Durante el período comprendido entre Abril y Octubre de 2000, se realizaron 7 estaquillados empleando el material cosechado a partir de estas cepas madres, y siguiendo la técnica desarrollada en el CIF de Lourizán (Fernández y col., 1992). El crecimiento del año de cada cepa se cortó a dos yemas. Ese brote se dividió en estaquillas de 4 yemas (entre 15-20 cm) cuya parte basal se sumergió en una solución de AIB 1000 ppm durante 5 minutos, obtenida a partir del preparado comercial Exuberone 0,4 % p/v (Aventis) diluido a la cuarta parte. Tras la aplicación de la hormona, las estaquillas se dispusieron en bandejas termoconformadas de 60 alveolos (150 cc/alv) con una mezcla de corteza de pino 25% y perlita 75%. Las bandejas se colocaron en invernadero bajo túneles de polietileno dotados de sistema de nebulización Fog-Press donde la humedad se mantuvo en torno al 95%. El tiempo de permanencia en el túnel osciló entre 5 y 7 semanas, tras las cuales las estaquillas pasaron un tiempo comprendido entre las 4 y las 13 semanas, según la fecha de estaquillado, en invernadero con humedad controlada, que se mantuvo en torno al 70%. Posteriormente las plantas fueron aclimatadas bajo pantalla de sombreo sin control de humedad.

En cada fecha de estaquillado se empleo material vegetal procedentes de los pies madres cultivados bajo abrigo, y sólo en una ocasión (estaquillado de Julio) y de sólo uno de los clones (HS) se dispuso de material suficiente de los pies madres del exterior, para incluirlo en el ensayo. En alguna de las fechas en las que la disponibilidad de estaquilla fue mayor, se realizaron otro tipo de ensayos. En el estaquillado del mes de septiembre se comparó el enraizamiento de la parte más apical del brote (1 ó 2 estaquillas más apicales, según la longitud del brote) con la parte basal. En el estaquillado del mes de octubre, y dada la escasez ya de luz natural, se comparó el enraizamiento de estaquillas dispuestas bajo suplemento de luz fotosintética (de 17:00 a 21:00) o sin suplemento de luz.

En cada ensayo se dispuso para su enraizamiento, la totalidad del material disponible, puesto que el objetivo último era su propagación máxima con vistas comerciales. Se empleó como unidad

experimental la bandeja de 60 alveolos, y por tanto el número de repeticiones en cada caso varía, e incluso en algunos casos no existen repeticiones (son aquellos datos que figuran sin error estándar y que por tanto no son medias, sino el porcentaje concreto obtenido en una bandeja).

El enraizamiento de las plantas correspondientes a los dos primeros estaquillados (Abril y Mayo), fue evaluado a finales de Agosto. Estas plantas fueron trasplantadas en ese momento realizándose en Septiembre una primera evaluación del porcentaje de supervivencia (porcentaje de plantas vivas y porcentaje de plantas que reemprendieron el crecimiento del brote). El enraizamiento del resto de las plantas fue evaluado a mediados de Enero de 2001, a savia parada, momento que también se aprovechó para el trasplante y a fecha de elaboración de este trabajo aún no han brotado, por lo no se han podido evaluar los resultados de supervivencia definitivos. Para cada fecha de estaquillado se evaluó el porcentaje de enraizamiento total, diferenciando el porcentaje de estaquillas con mucha raiz. Se evaluó también el porcentaje de estaquillas que se secaron durante el proceso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El enraizamiento medio (Tabla 1) de los cuatro clones oscila entre el 47,8 % en el clon 7521 de enraizamiento más bajo, y el 78,6 % en el 2671, de enraizamiento más alto. Estos porcentajes son altamente dependientes de la fecha de estaquillado, de modo que si consideramos las fechas de más alto porcentaje de enraizamiento (Abril, Mayo y Junio) los porcentajes suben considerablemente y están comprendidos entre el 67,9 de HS y el 95,8 % del clon 2671, si exceptuamos el resultado del 30% del clon 7521 del mes de Junio. Sin embargo este resultado podemos considerarlo con ciertas reservas, puesto que corresponde a una sola bandeja del clon 7521 y el mes anterior ese clon alcanzó una media de enraizamiento del 82,5 %.

De esta manera, los resultados de enraizamiento obtenidos se consideran satisfactorios en esos meses, presentando porcentajes de enraizamiento altos los clones 2671 y 111, algo inferior el clon HS y bastante más bajo en el clon 7521. En términos generales, durante el mes

de Julio, desciende el porcentaje de enraizamiento, probablemente por un menor desarrollo debido a las altas temperaturas, y ese mismo descenso vuelve a producirse a partir de Septiembre, bajando muchísimo en el mes de Octubre, coincidiendo con la menor duración de los días y el descenso de la actividad vegetativa.

Tabla 1. Porcentaje de enraizamiento total de las estaquillas

Fecha de estaquillado	HS	111	2671	7521	MEDIA por fecha
Abril*	67,9 ± 2,5	85,0	95,0	---	82,6 ± 9,7
Mayo*	89,3 ± 1,5	94,4 ± 1,6	95,8 ± 1,8	82,5 ± 3,0	90,5 ± 3,5
Junio	76,2 ± 4,3	85,8 ± 4,1	91,7 ± 2,3	30,0	70,9 ± 16,2
Julio	60,5 ± 4,1	69,9 ± 2,5	72,9 ± 4,0	42,5 ± 9,4	61,5 ± 7,9
Agosto	64,4 ± 1,9	65,4 ± 3,2	93,3 ± 1,6	58,3 ± 6,0	70,4 ± 9,0
Septiembre**	61,8 ± 3,6	78,0 ± 4,4	74,6 ± 6,7	56,6 ± 13,1	67,8 ± 5,9
Octubre***	16,2 ± 3,3	18,3	26,7	16,7	19,5 ± 2,8
MEDIA por clon	62,3 ± 9,3	71,0 ± 10,3	78,6 ± 10,1	47,8 ± 10,4	

Tabla 2. Porcentaje de estaquillas con mucha raiz

Fecha de estaquillado	HS	111	2671	7521	MEDIA por fecha
Abril*	57,6 ± 2,3	70,0	83,3	----	70,3 ± 9,1
Mayo*	62,8 ± 2,0	78,9 ± 6,5	70,0 ± 1,2	59,2 ± 3,0	67,8 ± 5,0
Junio	37,6 ± 3,6	50,8 ± 5,3	60,8 ± 4,1	16,7	41,5 ± 11,0
Julio	30,6 ± 2,7	46,2 ± 4,7	45,8 ± 3,9	22,9 ± 6,9	36,4 ± 6,7
Agosto	35,7 ± 1,7	47,9 ± 2,1	66,1 ± 3,2	41,7 ± 4,9	47,9 ± 7,8
Septiembre**	22,0 ± 4,8	41,0 ± 6,8	41,7 ± 7,0	32,8 ± 10,7	34,4 ± 5,3

Octubre***	0,0 ± 0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 ± 0,0
MEDIA por clon	35,2 ± 8,7	47,8 ± 10,3	52,5 ± 11,1	28,9 ± 9,2	

* Valores de los explantos cuyo enraizamiento fue evaluado en Agosto de 2000

**Media para los valores de explantos apicales y basales

*** Valores de los explantos que enraizaron en ausencia de luz artificial

El número de estaquillas secas o muertas sigue una relación inversa al éxito del estaquillado siendo mucho mayor en el clon 7521 que en el resto y presentando los valores más bajos el clon de mejor enraizamiento, el 2671. Este porcentaje es también más alto en el mes de Julio, y sobre todo en el mes de Septiembre.

Dentro del total de plantas enraizadas, se observaron en el momento del trasplante diferencias importantes en cuanto al desarrollo del sistema radical. Entre el 57 % y 67% del total de las plantas enraizadas (entre el 28,9 % y el 52,5 % del total de las plantas estaquilladas, Tabla 2) habían desarrollado un sistema radical que consideramos muy bueno (estaquillas cuyos cepellones salían enteros al tirar del cuello de la planta). Mientras que el resto de las plantas enraizadas presentaban sistemas radicales más pobres que podían poner en duda sus posibilidades de supervivencia tras el trasplante. De hecho, en el primer sondeo de supervivencia realizado en Septiembre sobre las plantas trasplantadas en Agosto (Tabla 3) observamos que el porcentaje de plantas vivas tras el trasplante es muy superior en las estaquillas con un sistema radical bien desarrollado. En general, también el reemprendimiento del crecimiento del brote tras el trasplante es mayor en las plantas de raíz más desarrollada, siendo mayor la diferencia cuanto más joven es la estaquilla (estaquillado de mayo).

Tabla 3. Porcentaje de supervivencia en Septiembre

	Estaquillado de Abril		Estaquillado de Mayo	
	Mucha raiz	Poca raiz	Mucha raiz	Poca raiz
HS	93,4 ± 1,7	46,4 ± 4,2	88,8 ± 1,6	39,3 ± 3,6
111	100,0 ± 0,0	22,2	90,5 ± 4,8	21,4
2671	98,2 ± 1,3	62,5	94,6 ± 1,3	39,3
7521	---	---	35,7 ± 10,11	3,6

A continuación se presentan los resultados de los ensayos que se llevaron a cabo en las diferentes fechas de estaquillado, en cuanto a procedencia de la estaquilla (bajo abrigo y exterior), estaquilla apical o basal, y empleo de luz artificial en octubre. El primer ensayo (Tabla 4) se realizó sólo con el clon HS y los otros dos (Tablas 5 y 6) con los 4 clones.

Tabla 4. Resultados de estaquilla del clon HS de pies madres bajo abrigo o en el exterior

CLON	% de plantas con mucha raiz	% enraizamiento total	% de estaquillas secas
HS bajo abrigo	30,6 ± 2,7	60,5 ± 4,1	39,5 ± 4,1
HS exterior	3,1 ± 2,2	20,8 ± 3,0	79,2 ± 3,0

Tabla 5. Resultados obtenidos con estaquillas apicales y basales

CLON	% de plantas con mucha raiz		% enraizamiento total		% de estaquillas secas	
	Apical	Basal	Apical	Basal	Apical	Basal
HS	31,0 ± 3,9	15,0 ± 3,2	73,0 ± 4,0	53,2 ± 4,1	27,0 ± 4,0	46,8 ± 4,1
111	59,2 ± 0,6	28,9 ± 2,4	85,8 ± 4,1	72,8 ± 3,5	14,2 ± 4,1	27,2 ± 3,5
2671	60,0	35,6 ± 6,1	95,0	67,8 ± 4,3	5,0	32,2 ± 4,3
7521	53,9 ± 2,8	11,7 ± 1,2	82,2 ± 5,1	30,8 ± 0,6	17,8 ± 5,1	30,8 ± 0,6

Tabla 6. Resultados con luz o sin luz artificial en el estaquillado de Octubre

--	--	--	--	--	--

CLON	% con mucha raiz		% total enraizamiento		% estaquillas secas		% estaqui. vivas con callo	
	Luz	No luz	Luz	No luz	Luz	No luz	Luz	No luz
HS	0±0	0±0	8,0±2,3	16,2±3,3	78,5±4,0	50,8±2,8	13,5±2,8	33,0±3,6
111	0±0	0	18,5±2,2	18,3	48,8±14,4	61,7	32,7±12,2	20,0
2671	0	0	58,3	26,7	41,7	73,3	0,0	0,0
7521	0	0	13,3	16,7	86,7	83,3	0,0	0,0

Ha quedado absolutamente patente, la mejora en los resultados obtenidos con el mejor acondicionamiento de los pies madres, ya que mientras que en el material bajo abrigo realizamos 7 cosechas de estaquilla, en el material procedente del exterior se recogió escaso material de un solo clon en una única ocasión y los resultados obtenidos por este material fueron mucho peores, que el del material procedente de bajo abrigo.

La capacidad de enraizamiento se incrementa sensiblemente en las estaquillas apicales frente a las basales, probablemente debido a la mayor acumulación de auxinas endógenas. Este incremento es más acusado en el número de estaquillas con mucha raiz y sobre todo en el clon de enraizamiento más bajo, el 7521.

El resultado obtenido con la luz artificial es contradictorio. En los clones de enraizamiento más alto (2671 y 111) resulta bien indiferente (111) o positivo (2671) aumentando el enraizamiento y disminuyendo el porcentaje de muertes. En el caso de los clones de enraizamiento más bajo (HS y 7521), el empleo de luz resulta negativo, disminuyendo el enraizamiento y aumentando el número de muertes. En cualquier caso, el enraizamiento conseguido en esta fecha, aún en el mejor de los casos, es muy inferior al óptimo y de baja calidad, por lo que no resultaría adecuado realizar este último estaquillado.

Conclusiones: en nuestro vivero, ha dado muy buen resultado el cultivo de madres bajo abrigo con intención de obtener el máximo posible de material. Las fechas más adecuadas para el estaquillado son las comprendidas entre Abril y Septiembre. Las estaquillas más productivas son las apicales, de 4 yemas. Una vez enraizadas las estaquillas deben disponerse fuera del túnel, en invernadero hasta la caída de la hoja, momento en que serán trasplantadas. Pensamos que es adecuado dejarlas desarrollar durante todo el ciclo vegetativo siguiente, hasta alcanzar la envergadura que en nuestro vivero consideramos adecuada para la venta.

Con este sistema, considerando únicamente los pies madres bajo abrigo y excluyendo el estaquillado de Octubre, a partir de 396 plantas se han estaquillado 10.216 estaquillas, de las cuales hemos trasplantado 6300 plantas enraizadas (61,7%), de las que habrá que descontar aquellas que no sobrevivan el trasplante. Podemos pensar en un rendimiento en torno a 10-15 plantas viables (según los porcentajes definitivos de supervivencia) por cepa para el conjunto de los cuatro clones. Este rendimiento es algo inferior al establecido por Lourizán en sus ensayos (≈ 20), lo que nosotros atribuimos a la mayor cantidad de estaquilla que ellos obtienen por corte probablemente por las condiciones de clima más suave de las que se disfruta en la zona costera.

BIBLIOGRAFÍA

- Fernández, J., Pereira, S. y Miranda, E. (1992) Fog and substrate conditions for chestnut propagation by leafy cuttings. En: *Symposium Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*, Tome II. AFOCEL/IUFRO, Bordeaux, Septiembre 14-18, 379-383.
- Miranda, E. y Fernández, J. (1992) Micropropagation of Chestnut tree: in vivo establishment and post-propagation growth. En: *Symposium Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*, Tome I. AFOCEL/IUFRO, Bordeaux, Septiembre 4-18, 421-426.
- San José, M.C., Vieitez, A.M. y Vieitez, E. (1984) *In vitro* plantlet regeneration from adventitious buds of chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 59 (3), 359-365.
- Urquijo, P. (1957) La regeneración del castaño. *Bol. Pat. Veg. Ent. Agr.*, Vol XXII, 217-232.

- Vieitez, E. (1966) Resistencia a *Phytophthora cambivora* y *P. Cinnamomi* de algunas variedades de castaño. *Anales Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, I*, 61-74.
- Vieitez, A.M. y Vieitez, M.L. (1980b) Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 55, 83-84.
- Vieitez, A.M. y Vieitez, M.L. (1982) *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort.*, 18, 343-351.
- Vieitez, F.J., San José, M.C., Ballester, A. y Vieitez, A.M. (1990) Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos of chestnut. *J. Plant Physiol.*, 136, 253-256.
- Vieitez, F.J., Ballester, A. y Vieitez, A.M. (1993) Producción continua de embriones somáticos y regeneración de castaños. En: *Actas del Congreso Forestal Español*. Lourizán, 1993. II. 371-375.