

# PRODUCCIÓN *IN VITRO* Y MEDIANTE ESTAQUILLADO SEMIHERBÁCEO DE HÍBRIDOS DE CASTAÑO EN UN VIVERO COMERCIAL: COSTE Y EFICIENCIA DE AMBOS SISTEMAS

L. Rodríguez<sup>1</sup>, B. Cuenca<sup>1</sup>, B. Pato<sup>1</sup>, M.J. Cámara<sup>1</sup>, L. Ocaña<sup>2</sup>

<sup>1</sup> TRAGSA. Departamentode Mejora Agroforestal. Crta. Maceda-Valdrey, km.2, 32700 Maceda. Ourense. [bcuenca@tragsa.es](mailto:bcuenca@tragsa.es)

<sup>2</sup> TRAGSA. Departamento de Mejora Agroforestal. Dirección Técnica. C/ Maldonado, 58 4ª planta. 28006 Madrid

## Resumen

Se han recopilado materiales de 27 clones híbridos procedentes de colecciones públicas y provadas de Galicia. Durante 2004 se comparó productividad y coste de las plantas obtenidas mediante estaquillado semiherbáceo y mediante cultivo *in vitro*, para cada uno de los 15 clones de los cuales existían stocks estables *in vitro*, teniendo en cuenta la tasa de enraizamiento y supervivencia, y la cantidad de planta producida por planta madre, o por stock *in vitro* al año. La mayor parte de los clones se propagan con éxito mediante estaquillado semiherbáceo, con tasas de enraizamiento entre 1,23 y 84% dependiendo del genotipo, frente al 0 y 78% para el cultivo *in vitro*. La media de supervivencia a la aclimatación de las estaquillas es del 82% frente al 28% de las microestaquillas. El coste medio de producción de una estaquilla enraizada es de 0,34 € mientras que el coste medio de producción de una vitroplanta es de 4,28 €. A este coste hay que añadirle el coste de recrí. Las vitroplantas tienen una mayor calidad del sistema radical y un mayor vigor, por lo que su producción puede ser interesante en casos en los que se compense su mayor coste. Por otra parte, se han realizado diversos ensayos que pretenden mejorar en ambos sistemas, los porcentajes de enraizamiento y supervivencia obtenidos.

**Palabras clave:** *Castanea*, resistencia, *Phytophthora*, multiplicación vegetativa, micropropagación

## INTRODUCCIÓN

Con objeto de compilar y organizar el material de castaño híbrido resistente a la tinta que en la actualidad se comercializa en Galicia, se ha recogido material de los diferentes clones de híbridos de colecciones públicas y privadas, que fue establecido tanto *in vitro* como en grandes contenedores en el vivero como plantas madres. De este modo en el vivero de TRAGSA se habían recopilado 27 clones en la primavera de 2004 y en la primavera de 2005 se agregaron 12 más. Desde 2003, los stocks *in vitro* se han mantenido mediante subcultivos sucesivos y ensayado con objeto de encontrar el mejor protocolo para propagar, elongar, enraizar y aclimatar estos clones trabajando sobre la base establecida por MIRANDA Y FERNÁNDEZ (1992a). Al mismo tiempo, los pies madres en contenedores fueron regados, abonados y podados para obtener estaquillas semiherbáceas que fueron dispuestas en condiciones de enraizamiento (FERNÁNDEZ et al., 1992). Aunque las ventajas técnicas y biológicas de ambos sistemas ya han sido discutidas (MIRANDA Y FERNÁNDEZ, 1992b), desde un punto de vista comercial, es necesario compararlos en términos de coste y número de plantas producidas para aquellos clones que ya pueden ser propagados en viveros forestales. En este trabajo se presentan estos datos para los 15 clones de los que ya disponemos cultivos estables y productivos en nuestro vivero.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Estaquillas semiherbáceas:** los contenedores de pies madres fueron cultivados bajo abrigo, fertilizados a través del sistema de fertirrigación y sus estaquillas semiherbáceas recogidas en dos ocasiones durante el período de primavera-verano, siendo la primera cosecha a finales de Mayo y la segunda a principios de Julio. Los ensayos previos realizados para determinar las fechas de enraizamiento más adecuadas, establecen estas como las comprendidas entre mayo y julio disminuyendo desde Septiembre en adelante (OCAÑA et al, 2001). Estos resultados y la disponibilidad limitada de estaquillas determinaron realizar sólo estas dos cosechas, por la mayor productividad y porcentajes de enraizamiento obtenidos.

Las ramas semiherbáceas cosechadas se prepararon en estaquillas de 3-4 yemas (10-15 cm), dejando sólo la mitad de la hoja apical. Los extremos basales se trataron con una solución de captan (2 g/l) y aplicó mastic al extremo apical. Las estaquillas se sometieron a una inmersión basal en una solución 1000 ppm de ácido indolbutírico (AIB) durante 5 min, e inmediatamente después, se dispusieron estaquilladas en bandejas de cultivo llenas de sustrato constituido por una mezcla de perlita y corteza de pino en proporción 3:1. Estas bandejas fueron dispuestas en túneles de enraizamiento equipados con sistemas de nebulización, y camas calientes de modo que la humedad relativa y la temperatura se mantuvo en torno al 85% y 25°C respectivamente. Un sistema de refrigeración mantuvo la temperatura del invernadero fuera del túnel por debajo de los 30°C. Las bandejas permanecieron en el túnel de enraizamiento durante 6 semanas y posteriormente pasaron a las condiciones habituales del invernadero, donde las estaquillas enraizadas continuaron su desarrollo durante el resto del año de modo que la tasa de supervivencia fue evaluada en la primavera siguiente.

Se consideraron los datos obtenidos para el mes de Julio, ya que fue la primera vez que se dispuso de material procedente de los quince clones considerados. La comparación de las tasas de mayo (disponible sólo para 4 clones) con las de julio no mostraron diferencias importantes, de modo que se consideró la producción total de cada planta madre como el doble de la de julio y los porcentajes válidos para ambas cosechas.

El coste de producción incluye la amortización de las infraestructuras, el consumo de energía, sustratos, reguladores de crecimiento, funguicidas y fertirrigación, poda y escarda de los contenedores así como las labores de estaquillado. El coste fue calculado hasta el comienzo del período de recrí en vivero, puesto que posteriormente tanto las estaquillas enraizadas como las vitroplantas aclimatadas siguen el mismo proceso (transplante, tratamientos, fertirrigación...) y por tanto tiene el mismo coste de producción por planta.

Se realizó un ensayo encaminado a mejorar los porcentajes de enraizamiento y supervivencia en este sistema que consistió en el estaquillado de 6 clones diferentes (3, 111, 125, 1483, 90025 y 90044), en las mismas condiciones que las descritas anteriormente, empleando explantos con la hoja apical cortada o entera, y este último tipo de explantos, colocados densos (60 explantos por bandeja) o al tresbolillo (30 explantos por bandeja). Se estableció un diseño factorial 6 x 3 con dos factores (genotipo x tipo de explanto), donde cada tratamiento fue aplicado a los explantos contenidos en 4 bandejas, siendo cada bandeja una repetición en un diseño completamente aleatorizado (DCA). Los resultados de porcentaje de enraizamiento, nº de raíces, longitud de la raíz más larga y supervivencia, fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA II) y las diferencias entre medias se estimaron empleando el test de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) (SOKAL y ROHLF, 1981) para un nivel de significación del 95% (p=0,05).

**Cultivo *in vitro*:** los clones fueron establecidos en cultivo *in vitro* en Julio de 2001, y atravesaron un periodo de estabilización relativamente largo (McCOWN & McCOWN, 1987). Una vez estabilizados, se mantuvieron 300 explantos de cada clon como cultivos stock. El medio de cultivo empleado fue GRESSHOFF & DOY (1972) adicionado con 30 g/l de sacarosa, 7 g/l de agar Difco y 0,1 mg/l de bencilaminopurina (BAP). La elongación se llevó a cabo colocando el callo basal con grupos de brotes en medio MURASHIGE & SKOOG (1962) con los nitratos reducidos a la mitad. Los cultivos se mantuvieron a 25°C con 16 h de luz y una intensidad lumínica de 2500 luxes. Los brotes elongados fueron escindidos, sometidos a inmersión basal en AIB 1g/l y dispuestos en bandejas de polipropileno de 60 alveolos llenas de sustrato constituido por una mezcla estéril de perlita (75%) y corteza de pino (25%) humedecida con una solución de 2 g/l de propamocarb. Las bandejas fueron colocadas dentro de un miniinvernadero y estas estructuras fueron dispuestas dentro de la cámara de cultivo. Después de 8 semanas, las bandejas se sacaron de los miniinvernaderos y se dispusieron para su aclimatación dentro de los mismos túneles de enraizamiento empleados en el enraizamiento de las estaquillas semiherbáceas.

Se consideraron los porcentajes de enraizamiento y supervivencia de toda la población correspondiente a cada clon en cultivo en Julio. La producción de todo el año se considera 10 veces superior puesto que se realizan en otro turno a 10 subcultivos al año.

Los costes de producción incluyen la amortización de las instalaciones, mano de obra, energía medio de cultivo y otros fungibles del laboratorio, sustratos,

reguladores de crecimiento y funguicidas. El coste fue calculado hasta el comienzo del período de recreo en vivero.

Se están ensayado algunas modificaciones sobre el sistema de enraizamiento y aclimatación. Así para los clones HS y 111, se comparan los porcentajes obtenidos mediante el sistema descrito anteriormente (elongación *in vitro* y posterior enraizamiento y aclimatación simultaneo), con los obtenidos mediante enraizamiento *in vitro* de los brotes no elongados, en agar o en sustrato, y posterior trasplante y aclimatación. Los ensayos están aún en curso por lo que sólo se presentan los resultados correspondientes a enraizamiento y reemprendimiento de crecimiento, no disponiéndose en el momento de presentar esta comunicación de los resultados de supervivencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 muestra la producción y coste del sistema de estaquillado semiherbáceo. La producción total con este sistema es de 22834 plantas, siendo los clones 90044, HS, 111, 7521, 2671 y 1483 los que producen un mayor número de plantas por planta madre y año. La mayor producción de estaquillas por planta madre y año se da en los clones 90044, 110, 19, 90025, 392 y 111, sin embargo las tasas de enraizamiento y supervivencia de los clones 110, 19, 90025 y 392, son muy bajas lo que los convierte en poco productivos. La Tabla 3 presenta los resultados obtenidos al ensayar tres tipos de explanto diferentes. Podemos observar que existe una elevada interacción genotipo-explanto para el porcentaje de enraizamiento y el nº de raíces, de modo que aunque la presencia de la hoja sugiere una mayor síntesis de auxina que puede contribuir al enraizamiento, no es posible generalizar estableciendo que el uso de la estaquilla con la hoja entera mejora los resultados para estos dos parámetros. Sí es significativamente mayor, la longitud de las raíces cuando se emplea el explanto con la hoja completa independientemente de la densidad a la que se coloquen dentro de la bandeja. Este parámetro puede tener relación con una mayor supervivencia posterior de las estaquillas al trasplante (datos aún no disponibles).

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos mediante micropropagación. La producción anual mediante este sistema con un stock de 300 explantos por clon, suponen 6337 plantas por año, pero puede ser fácil y rápidamente incrementada con sólo aumentar el stock inicial. Los mejores resultados se obtiene con los clones HS, 111, 125, 3, 90044 y 2671. Salvo los clones 125 y 3, coinciden con los más productivos también por estaquillado, de modo que parece claro que la capacidad de enraizamiento depende más del genotipo que del sistema empleado. En el caso del 125 y 3, su productividad *in vitro* supera la del 7521 y 1483 (entre los más productivos en estaquillado) porque su tasa de producción de brotes elongados enraizables es mayor que la de estos últimos, y porque a diferencia de lo que ocurría *ex vitro*, su tasa de supervivencia total *in vitro* es también superior a la de 7521 y 1483, que presentan tasa muy bajas. En general, a excepción de estos dos clones, los genotipos difíciles de enraizar mediante estaquillado semiherbáceo, no presentan mejores resultados *in vitro*, e incluso algunos de ellos, (110, 324, 392, 7810 y 90025) no pudieron ser enraizados en absoluto mediante este sistema.

El coste medio de producción por planta mediante estaquillado es de 0,34 € variando desde 0,15 € para el clon 90044 ó 0,20 € para el clon HS hasta 12,25 € para el clon 90025. Con el mismo coste y empleando la misma superficie destinada a contenedores de planta madre, la focalización de los esfuerzos en aquellos clones más productivos (coste por debajo de 0,40 € - 90044, HS, 111, 7521, 2671 y 1483-), permitiría que la producción de híbridos en nuestro vivero se incrementara hasta 28000 ó 30000 plantas por año. El coste medio de producción por micropropagación (Tabla 4) es de 4,28 € variando desde 1,14 € para el clon HS hasta 30,69 € para el clon 7521. Obviamente, en nuestras condiciones no industriales en este momento, no resulta rentable usar esta tecnología con fines comerciales. Sin embargo, el protocolo de enraizamiento y aclimatación puede mejorarse, disminuyendo el número de plantas que se pierden en esta fase y por tanto, disminuyendo considerablemente el coste de producción. Así la Figura 1 muestra como en el ensayo de sistemas de enraizamiento, los porcentajes de enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* no muestran diferencias significativas. Sin embargo, el número de reemprendimientos de crecimiento del ápice (Figura 2) es mayor al realizarse el enraizamiento *in vitro*, sin diferencias significativas para los dos sistemas (agar o sustrato). Aunque de momento no se disponen de los resultados de supervivencia al trasplante, estos resultados preliminares sugieren que el mayor control ambiental en esta fase tan delicada puede favorecer la supervivencia posterior de la planta, al disponer ésta en el momento del trasplante de sistema radical, probablemente más funcional si se ha desarrollado en sustrato, y de un estado activo de crecimiento (reemprendimientos).

Por otra parte, además de las ventajas que tienen que ver con el ahorro de espacio y la rapidez de respuesta a demandas puntuales, existen algunas ventajas obvias de las plantas micropropagadas desde el punto de vista fisiológico. El peso fresco de las raíces es superior en plantas micropropagadas que en estaquillas enraizadas o en plantas obtenidas por acodo bajo y el sistema radical de las vitroplantas está mejor formado, con más raíces primarias y secundarias (Figura 3). Esta característica es la razón de la mayor supervivencia en campo (más del 90%) (MIRANDA y FERNÁNDEZ, 1995). Estas autoras citan una mayor dominancia apical en las vitroplantas, que no presentan problemas de plagiotropismo y se comportan de manera similar a las plántulas de semilla. Esta observación coincide completamente con nuestra experiencia en el vivero, ya que las vitroplantas presentaron siempre un crecimiento más vertical que las plantas de estaquilla (Figura 4).

Comparando los costes para el clon HS, la diferencia entre una vitroplanta y una planta de estaquilla es menor de 1 € y en algunos puede merecer la pena y ser rentable emplear micropropagación, i.e.: cuando las vitroplantas se usen como portainjertos para producir plantas injertadas. Este tipo de producto, cuando cuenta con la calidad y la garantía de identidad varietal y sanitaria, alcanza un elevado precio en el mercado, que los castañicultores están dispuestos a pagar. Así mismo, proporcionar garantía de supervivencia e información fiable de adaptabilidad, resistencia, tolerancia al frío y a la sequía, aptitud, tasa de crecimiento... puede ser una buena razón para convencer a los productores de que elijan la planta de castaño híbrido de mayor calidad, puesto que les garantiza el retorno de su inversión.

## 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*, AFOCEL/IUFRO Burdeos, Francia, 1992. Septiembre, 14-18. Tomo II: 379-383.
- GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H.; 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon sculentum*. *Planta*, 107: 161-170.
- MCCOWN, D.D. & MCCOWN, B.H.; 1987. North American Hardwoods. En: Bonga, J.M.; Durzam (eds) *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3, *Case Histories. Gymnosperms, Angiosperms and Palms*: 247-260, D.J. Martinus Nijhoff Publishers.
- MIRANDA, M.E. Y FERNÁNDEZ, J.; 1992a. The micropropagation of chestnut tree: in vivo establishment and postpropagation growth. En: *Symposium Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fast growing Forest Tree Species*, AFOCEL/IUFRO, Burdeos, Francia, 1992. Septiembre, 14-18. Tomo I: 421-426.
- MIRANDA, M.E. Y FERNÁNDEZ, J.; 1992b. Micropropagation as a nursery technique for chestnut hybrid clones. En: *Symposium Proceedings Mass Production Technology for Genetically Improved Fast Growing Forest Tree Species*, AFOCEL/IUFRO Burdeos, Francia, 1992. Septiembre, 14-18. Tomo I: 101-103.
- MIRANDA, M.E. Y FERNÁNDEZ, J.; 1995. Aclimatación, cultivo en vivero y calidad de planta de castaño micropropagado. *Información técnica Económica Agraria*, Vol. 91V nº 3 pp. 149-156.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- OCAÑA, L.; SANTOS, M.I.; GÓMEZ, J.A. Y CUENCA, B.; 2001. Reproducción en vivero de castaños híbridos resistentes a la tinta mediante estaquillado semiherbáceo. *III Congreso Forestal Español, Mesa 3*: 729-735.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J.; 1981. *Biometry: the principles and practices of statistics and biological research*. 2nd ed. H. Freeman. (ed.) And Company. New York.

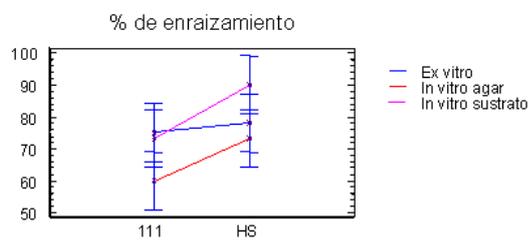
**Tabla 1.** Productividad y coste del sistema de estaquillado semiherbáceo.

Clon	Estaquillas por año y planta madre	Estaquillas por año	Coste cultivo de pies madres	Coste de estaquill.	Coste total	Tasa enraizam. (%)	Tasa de aclimatac. (%)	Plantas por año y planta madre	Plantas por año	Coste por planta
------	------------------------------------	---------------------	------------------------------	---------------------	-------------	--------------------	------------------------	--------------------------------	-----------------	------------------

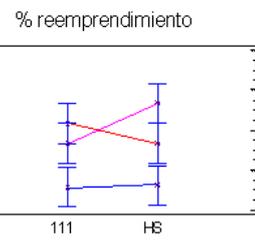


**Tabla 3.** Enraizamiento de tres tipos de explanto diferentes en el sistema de estaquillado semiherbáceo

Genotipo	Porcentaje enraizamiento			N° de raíces por explanto			Longitud media raíz más larga			Medias
	Enteras densas	Enteras 3 bolillo	Cortadas	Enteras densas	Enteras 3 bolillo	Cortadas	Enteras densas	Enteras 3 bolillo	Cortadas	
<b>3</b>	38,2 ± 11,6 bcde	43,3 ± 7,2 cde	58,3 ± 3,6 ef	4,0 ± 0,4 abc	3,6 ± 0,7 ab	4,6 ± 0,3 abcd	8,3 ± 0,4	7,8 ± 0,7	5,8 ± 0,1	7,3 ± 0,8 ab
<b>111</b>	15,0 ± 3,4 a	21,7 ± 8,4 ab	30,9 ± 6,0 abcd	7,0 ± 2,0 defg	9,5 ± 1,8 g	3,9 ± 0,5 abc	7,2 ± 1,1	9,2 ± 0,3	6,0 ± 0,4	7,5 ± 0,9 b
<b>125</b>	26,3 ± 11,0 abc	51,7 ± 8,4 def	81,7 ± 3,8 g	3,3 ± 1,1 ab	3,7 ± 0,3 ab	5,0 ± 0,7 abcd	10,5 ± 0,7	10,6 ± 0,5	7,2 ± 0,2	9,4 ± 1,1 d
<b>1483</b>	65,4 ± 6,1 fg	65,0 ± 1,3 fg	37,5 ± 11,0 bcde	5,7 ± 0,6 abcde	5,0 ± 0,2 abcd	3,0 ± 0,2 a	10,9 ± 0,7	9,0 ± 0,4	6,9 ± 0,7	8,9 ± 1,2 cd
<b>90025</b>	34,6 ± 8,8 abcd	48,3 ± 7,9 def	36,2 ± 10,8 abcd	4,1 ± 0,4 abc	6,3 ± 0,8 cdef	3,5 ± 0,4 ab	9,9 ± 0,4	9,0 ± 0,7	5,6 ± 0,5	8,2 ± 1,3 bc
<b>90044</b>	22,1 ± 3,7 abc	39,2 ± 4,3 bcde	57,8 ± 8,7 ef	8,6 ± 1,1 fg	7,9 ± 0,5 efg	4,7 ± 0,4 abcd	6,4 ± 0,6	7,9 ± 0,5	4,6 ± 0,6	6,3 ± 1,0 a
<i>Medias</i>							8,9 ± 0,8 b	8,9 ± 0,4 b	6,0 ± 0,4 a	
<b>Análisis de varianza</b>										
<b>F. variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>DMS</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>DMS</b>	<b>CM</b>	<b>F</b>	<b>DMS</b>
Genotipo (A)	5	1713,79	7,50 **	15,06	19,0539	6,07 **	1,77	16,7447	12,69 **	1,15
Tipo hoja (B)	2	1647,91	7,21 **	9,52	19,1398	6,09 **	1,11	74,2211	56,18 **	0,72
A x B	10	1063,91	4,65 **	21,30	9,4888	3,02 **	2,50	2,6284	1,99 n.s.	
Error	53	228,63			3,1409			1,3211		



**Figura 1.** Enraizamiento in vitro y ex vitro de microestaquillas en diferentes sistemas de enraizamiento y aclimatación.



**Figura 2.** Reemprendimiento del crecimiento in vitro y ex vitro de microestaquillas en diferentes sistemas de enraizamiento y aclimatación.



Figura 4. Vitroplantas (izquierda) y plantas de estaquilla (derecha) después del recreo. Nótese el hábito plagiotrópico de las plantas de estaquilla .