



9CFE-1881



Establecimiento en condiciones in vitro de una accesión del árbol monumental “Ciprés mediterráneo de A Capela do Salvador” (Concello de Samos, Galicia)

GARCÍA VALCÁRCEL M. (1), FERNÁNDEZ LORENZO J.L. (1), COUSO VIANA A. (1), RIGUEIRO RODRÍGUEZ A. (1), MOSQUERA LOSADA R. (1)

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

Resumen

Se ha establecido una accesión clonal in vitro de explantos del “Ciprés da Capela do Salvador” (*Cupressus sempervirens* L.), incluido en el "Catálogo de árboles e formacions senlleiras de Galicia" (clon ‘Capela’). En el establecimiento in vitro se compararon varios tratamientos de desinfección. Posteriormente, se registró la progresión de los explantos durante 8 subcultivos, estudiándose el efecto del medio, la concentración de BAP (6-bencilaminopurina) y la fuente de luz en la multiplicación in vitro. En el enraizamiento in vitro se ensayaron diversos métodos de inducción auxínica. Paralelamente, se establecieron 4 líneas clonales juveniles, evaluando sus tasas de multiplicación y enraizamiento. Los explantos de una de estas líneas se utilizaron como portainjertos en un ensayo de microinjerto.

Los explantos del clon ‘Capela’ se multiplicaron con éxito sobre medio MS + 0,2 mg·l⁻¹ BAP. No se observaron diferencias significativas entre el uso de luces LED 4000 K y 6500 K. Por el momento, no ha sido posible enraizar los propágulos del clon ‘Capela’ multiplicados. Las líneas clonales de material juvenil se han multiplicado con éxito en medio MS + 0,1 mg/l BAP, obteniéndose porcentajes de enraizamiento alrededor de 35% en uno de los clones. El microinjerto in vitro sobre material juvenil, reportado por primera vez para esta especie, ha proporcionado tasas de prendimiento del 57,6%.

Palabras clave

Cupressus sempervirens, semillas, micropropagación, enraizamiento, microinjerto.

1. Introducción

Los árboles monumentales representan un patrimonio natural y cultural de gran importancia. Son importantes por su función ecológica, pero también porque constituyen una fuente única de diversidad genética, relacionada con la adaptabilidad que han tenido a las condiciones ambientales, muchas veces extremas, que se han ido produciendo a lo largo del tiempo. Por ello, resulta prioritario estudiarlos y protegerlos en la medida de lo posible (MATTIONI et al., 2020). Algunos de estos árboles pueden presentar características especiales, más allá de su antigüedad. En diversos países, a lo largo de los años surgieron iniciativas para conocer, identificar, estudiar y conservar estos árboles singulares. En España, la primera medida para la protección y conservación de árboles

singulares fue establecida en 1974 por el desaparecido Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza (ICONA), que creó un “Inventario de árboles monumentales de España”. Posteriormente, las distintas Comunidades autónomas fueron creando sus propios catálogos (Tabla 1).

Tabla 1. Catálogos, registros e inventarios (Cat/Reg/Inv) de árboles y formaciones singulares en las Comunidades Autónomas (C.A.) de España y año de declaración.

C.A.	Cat/Reg/Inv	Año
Catálogo de Árboles Singulares de la	Comunidad Autónoma de las Islas Baleares	
Catálogo Regional de Especies Amenazadas	de Fauna y Flora Silvestres de la Comunidad de Madrid, en su categoría de «Árboles Singulares»	
País Vasco	Listado de árboles singulares	1995
	Islas Canarias (C. G. Canaria)	
	Inventario de Árboles Singulares de Castilla-La Mancha	

El “Catálogo Galego de árbores e formacións senlleiras de Galicia”) fue creado en 2007 (Decreto 67/2007, de 22 de marzo) con el objetivo de definir el régimen jurídico básico de aquellos árboles y formaciones incluidos en el catálogo, protegiéndolos de cualquier riesgo o amenaza y garantizando su conservación. Está compuesto por ejemplares o formaciones con valor natural, cultural, científico, educativo, estético o paisajístico. En la actualidad, contiene de 144 árboles y 38 formaciones, que representan a 79 especies diferentes.

El ciprés “da Capela do Salvador” constituye el elemento central de los experimentos descritos en el presente trabajo. Su introducción en el “Catálogo” se realizó en el año de su creación. Se trata de un ejemplar de *Cupressus sempervirens* L. ‘*Fastigiata*’ DC., cuyo fuste se encuentra en contacto con una de las paredes de la Iglesia prerromana del Divino Salvador, en la zona norte del municipio de Samos (Lugo). Se estima que podría tener una edad de alrededor de 500 años. Su tronco, con un perímetro normal de 3,30 m, crece recto y poco ramificado, alcanzando una altura de 7,70 m, a partir de la cual se desarrolla la copa, de forma piramidal. El árbol alcanza una altura de 25,90 m (Figura 1) (Bernárdez y Rigueiro, 2021).



Figura 1. Árbol monumental “Ciprés mediterráneo da Capela do Salvador”.

Fuente: Autores.

A raíz de los incendios que asolaron extensas superficies de la ZEC Ancares-Courel en otoño de 2021, se elaboraron unas “Directrices para la conservación de especies silvestres y ejemplares arbóreos singulares de Ancares-Courel” (Fernández-Lorenzo et al., 2023). En dichas directrices se proponen estrategias de conservación de algunos árboles monumentales. En el caso de este ciprés, se aconseja el mantenimiento de una accesión compuesta por material establecido *in vitro*. Otros sistemas de propagación vegetativa, como el estaquillado o el injerto, podrían servir de apoyo para conseguir explantos reactivos para su introducción en cultivo *in vitro*. El injerto podría, asimismo, ser de utilidad si se presentasen dificultades a la hora de enraizar los propágulos vegetativos. La multiplicación a partir de semillas obtenidas del árbol representaría la pérdida del genotipo original, por lo que se descarta en términos de conservación del material genético (Fernández-Lorenzo et al., 2023). En un trabajo de Sánchez et al. (2018), las técnicas de cultivo *in vitro* ya habían sido empleadas para el establecimiento de accesiones clonales de árboles singulares de Galicia (alcornoque, roble, nogal, abedul y eucalipto).

En varias referencias sobre cultivo *in vitro* de brotes apicales de *Cupressus sempervirens* (Fossi et al., 1981; Capuana et al., 1991; Spanos et al., 1997; Giovanelli y De Carlo, 2007), los autores emplean brotes de 2-3 cm, cultivándolos mayoritariamente en medio MS (Murashige & Skoog, 1962) o SH (Schenk & Hildebrandt, 1972), y utilizando como regulador del crecimiento la citoquinina BAP. Los brotes obtenidos se enraizan mediante inmersión basal en soluciones concentradas de ácido indol-butírico (AIB) o ácido naftalén-acético (ANA). Por su parte, Karimi et al. (2018) pusieron a germinar *in vitro* embriones obtenidos de semillas de 20 genotipos de árboles muy antiguos, pero no establecieron los clones adultos. En todos estos estudios, los materiales juveniles presentaban capacidades



variables de enraizamiento, pero los clones adultos enraizaban muy poco. En un estudio reciente, Kamushi et al. (2019) consiguieron establecer *in vitro* un ciprés monumental cuya edad se estima en 4000 años, utilizando medio WPM (Lloyd & McCown, 1980) suplementado con $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y $0,01 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB.

2. Objetivos

Establecer una accesión *in vitro* (clon ‘Capela’) constituida por explantos nodales del “Ciprés da Capela do Salvador” (*Cupressus sempervirens* L.), incluido en el “Catálogo de árboles e formacións senlleiras de Galicia”.

Determinar la capacidad de enraizamiento de los propágulos, para valorar la posible regeneración de plantas completas de este genotipo.

Evaluar el éxito del microinjerto *in vitro* de púas de este clon sobre portainjertos juveniles, lo que constituye, para nuestro conocimiento, el primer ensayo de microinjerto *in vitro* en *Cupressus sempervirens*.

3. Metodología

3.1. Material vegetal

Como material de partida se han empleado (a) ramas terminales de la parte inferior de la copa del ejemplar catalogado de *Cupressus sempervirens* L. “Ciprés da Capela de S. Salvador” (clon ‘Capela’) recolectadas en abril y diciembre de 2023, (b) estróbilos recolectados en septiembre de 2023 de un ejemplar de *Cupressus sempervirens* que crece en la zona verde de la EPSE de Lugo, de los que se extrajeron semillas que se conservaron a $4-8^{\circ}\text{C}$ hasta su uso (lote ‘EPSE’) y (c) semillas de *Cupressus sempervirens* ‘Pyramidalis’ adquirido de la antigua DGCONA en 1993 y conservadas en nevera ($4-8^{\circ}\text{C}$) durante 30 años (lote ‘1993’).

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo *in vitro* del clon ‘Capela’

Desinfección y establecimiento *in vitro*: las ramas recolectadas fueron trasladadas directamente al laboratorio, donde se lavaron exhaustivamente bajo agua corriente y se sumergieron durante 45 min en solución fungicida ($0,3 \text{ g/l}$ Captán®). Una vez tratadas, se dejaron secar. En la primera recolección (abril 2023), las ramas se conservaron en nevera ($4-8^{\circ}\text{C}$) durante 2 meses. Las ramas de la segunda recolección (diciembre 2023) fueron utilizadas inmediatamente para la obtención y establecimiento *in vitro* de explantos. Los explantos, de 2-3 cm, se obtuvieron de brotes terminales, y fueron sometidos a diversos protocolos de desinfección superficial, combinando distintos tiempos en Etanol 70° y NaOCl (con distintas concentraciones de cloro activo) (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolos de desinfección utilizados para la desinfección de explantos iniciales del clon ‘Capela’. En todos los casos, el proceso finalizó con tres lavados de 1 min en agua destilada estéril. Los tiempos de tratamiento se expresan en s para el etanol y en min para NaOCl. La concentración de NaOCl se expresa en % de cloro activo. Ei: explantos iniciales tratados en cada protocolo.

Protocolo	Etanol 70°	NaOCl	Ei
D1	45 s	(1%) 20 min	34
D2	45 s	(1%) 16 min	116
D3	45 s	(2%) 10 min	109
D4	45 s	(2%) 20 min	212
D5	30 s	(2%) 15 min	56

En todos los casos, el proceso finalizó con tres lavados de 1 min en agua destilada estéril. Una vez desinfectados, los explantos se introdujeron en diversos medios de cultivo (Tabla 3).

Tabla3. Medios utilizados para el establecimiento y transferencias a medios diferentes a lo largo de 10 subcultivos sucesivos (se muestra el número de subcultivo en que se realizaron las transferencias y, entre paréntesis, el nuevo medio utilizado). Ei: número de explantos iniciales (no contaminados ni necrosados) en cada medio; 1/3 MS: medio MS con un tercio de la concentración de macronutrientes). La concentración de BAP se expresa en mg/l⁻¹.

Cambios de medio	(M S O , 2 / W P M O , 2)
------------------	--

A los 35 días se tomaron datos de porcentaje de contaminación, porcentaje de necrosis y porcentaje de reactividad (porcentaje de explantos no contaminados ni necrosados que pueden ser subcultivados porque presentan elongación o emisión de yemas axilares) en función del protocolo de desinfección utilizado.



Evolución del número de explantos en los primeros subcultivos: Debido a la limitación de material inicial, se realizaron una serie de subcultivos en ciclos de 35 días, observándose la evolución en el número de explantos a lo largo de los primeros subcultivos, en función del medio utilizado. En algunos casos, cuando las observaciones realizadas parecían indicar una evolución favorable en alguno de los medios ensayados, se tomó la decisión de realizar transferencias de explantos a medios más favorables, lo que se indica convenientemente en cada caso. Los cultivos se establecieron inicialmente en una cámara de cultivo con iluminación LED blanca neutra (4000 K) con un fotoperíodo de 16/8 h, una densidad de flujo radiante de $35\text{--}40\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. En esta fase, se registró conjuntamente la evolución en el número de explantos a lo largo de los sucesivos subcultivos.

Efecto del medio, concentración de BAP y tipo de luz en la multiplicación: Sobre la base de las observaciones realizadas en los subcultivos precedentes, y una vez obtenido un número suficiente de explantos, se realizó un experimento en el que se combinaron los factores medio nutritivo (MS y WPM), y temperatura de color (4000 K y 6500 K) de luz LED blanca, constituyendo un total de 4 tratamientos. La concentración de BAP se mantuvo constante en todos los tratamientos (0,2 mg/l). Cada tratamiento estaba constituido por 3 repeticiones de 12 explantos. A los 35 días se registró la tasa de multiplicación (TM) (número de explantos finales / número de explantos iniciales).

Efecto de la inducción auxínica en el enraizamiento in vitro: Se realizó un ensayo de enraizamiento *in vitro*, tomando explantos de 2-3 cm al final de un ciclo de multiplicación. Se ensayaron diversos tratamientos. En un experimento inicial, sobre medio MS sin reguladores, suplementado con 1% o 3% de sacarosa, se sometió a los explantos a inmersión basal en una solución concentrada de AIB ($1\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) durante 30 o 60 segundos, seguida de la introducción en el medio (4 tratamientos). En un segundo experimento, se utilizó medio base $\frac{1}{2}$ MS (medio MS con macroelementos a mitad de concentración) y combinando los siguientes factores: carbono activo (0% o 0,4%), concentración de sacarosa (1% o 3%), tipo de auxina (AIB, ANA o ambas) y sistema de inducción ((a) inmersión basal en una solución concentrada de AIB o ANA ($1\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) seguida de introducción en medio sin reguladores, o (b) introducción directa en medio con auxina ($1\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$), contabilizándose un total de 16 tratamientos. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones de 8 explantos. A los 90 días, se registró el porcentaje de enraizamiento.

3.2.2. Cultivo *in vitro* de clones derivados de semilla

Establecimiento in vitro de colecciones clonales a partir de semillas de Cupressus sempervirens

Desinfección, establecimiento y multiplicación in vitro: Semillas de los lotes 'EPSE' y '1993' se desinfectaron superficialmente mediante diversos protocolos de desinfección, combinando distintos tiempos en Etanol 70° y NaOCl (con distintas

concentraciones de cloro activo) (Tabla 4).

Tabla 4. Protocolos de desinfección (D1-6) utilizados para la desinfección de semillas del ejemplar de *Cupressus sempervirens* ‘Pyramidalis’ (lote 1993) y del ejemplar de *Cupressus sempervirens* de la EPSE (lote EPSE). En todos los protocolos, al final del proceso se realizaron dos lavados de 1 min en agua destilada estéril. Los tiempos de tratamiento se expresan en s para el etanol y en min para NaOCl. La concentración de NaOCl se expresa en % de cloro activo; S: número de semillas establecidas in vitro.

Lote	Protocolo	Etanol 70°	NaOCl	S
1993	D1	60 s	(1%) 8 min	30
D2	60 s	(1%) 10 min	30	
D3	60 s	(1%) 12 min	30	
D4	60 s	(1%) 14 min	30	
D5	60 s	(1%) 16 min	30	
EPSE	D1	60 s	(1%) 8 min	64
D2	60 s	(1%) 10 min	60	
D3	60 s	(1%) 12 min	60	
D4	60 s	(1%) 14 min	57	
D5	60 s	(1%) 16 min	30	
D6	60 s	(1%) 18 min	27	

En todos los protocolos, al final del proceso se realizaron dos lavados de 1 min en agua destilada estéril. Las semillas tratadas se introdujeron en medio MS + 0,1 mg·l⁻¹ BAP y se establecieron en cámara de cultivo con iluminación LED blanca (4000K), con un fotoperíodo de 16/8 h, una densidad de flujo radiante de 35-40 μmol s⁻¹ m⁻² y una temperatura de 24 ± 2°C. A los tres meses se tomaron datos de % de contaminación y porcentaje de germinación de las semillas no contaminadas.

Del total de semillas no contaminadas y germinadas se seleccionaron 4 líneas clonales (XUV1 a XUV4), todas procedentes del lote ‘EPSE’, que se subcultivaron cada 35 días en medio MS + 0,1 mg·l⁻¹ BAP. Tras 4 ciclos de multiplicación, se obtuvieron las tasas de multiplicación medias de dos ciclos de multiplicación consecutivos, a partir de 3 repeticiones de 12 explantos por clon y subcultivo.

Efecto de la inducción auxínica en el enraizamiento in vitro: Se realizó un ensayo de

enraizamiento *in vitro* sobre explantos del clon XUV1. Se realizaron un total de 8 tratamientos, que se muestran en la Tabla 5. En los tratamientos 7 y 8, tras 45 días en el primer medio de cultivo, los explantos se extrajeron del medio, fueron sometidos a inmersión basal en una solución concentrada de AIB ($1\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) y posteriormente transferidos a un segundo medio durante otros 45 días. Cada tratamiento constó de 3 repeticiones de 8 brotes. A los 90 días se registraron los porcentajes de enraizamiento.

Tabla 5. Tratamientos de inducción del enraizamiento en el clon ‘XUV1’; % SAC: porcentaje de sacarosa en el medio; t_1 , t_2 : tiempo transcurrido en Medio 1 y Medio 2; I.B.: inmersión basal de 1 min en una solución concentrada de AIB ($1\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Nº	% SAC	Medio 1	t_1	I.B.	Medio 2	t_2	
1	3	1/2 MS + 0,2 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-
2	3	MS + 0,2 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-
3	1	1/2 MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-
4	1	1/2 MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	ANA	90	-	-
5	1	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-
6	3	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-
7	1	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	45	sí	MS 45
8	3	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	45	sí	MS 45

3.2.3. Microinjertos del clon ‘Capela’ sobre el clon ‘XUV1’

Se realizó un ensayo preliminar de microinjerto utilizando como púas explantos sin ramificar (0,5-1,0 cm) del clon ‘Capela’ y como portainjertos explantos sin ramificar decapitados (2 cm) del clon ‘XUV1’, sin raíces. En ambos casos, los explantos se obtuvieron al final de un ciclo de multiplicación (35 días).

El microinjerto consistió en una versión miniaturizada del injerto de hendidura y fue realizado en condiciones asépticas bajo lupa binocular, situando púas y portainjertos sobre una placa Petri® con papel de filtro humedecido con agua destilada estéril. Utilizando pinzas de disección y cuchillas de microcirugía, se realizó primero un corte longitudinal de 2-3 mm en el extremo decapitado del portainjertos y se introdujo en este la púa, cuya base se cortó previamente en forma de V. No se utilizó ningún sistema de sujeción. Una vez realizado el microinjerto, este se introdujo en medio WPM + $0,1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BAP. Se realizaron un total de 33 injertos, registrándose a los 35 días los porcentajes de prendimiento y reactividad de las púas.



3.2.4. Análisis estadístico

El software utilizado para el análisis es RStudio (versión 4.0.2) (R Core Team, 2020). En todos los casos se realizaron pruebas paramétricas. Se comprobó la normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y la homocedasticidad (prueba de Levene) de los datos antes de realizar una prueba ANOVA de una o dos vías, según corresponda, con el valor de significación establecido en 0,05. Cuando la prueba ANOVA mostraba diferencias significativas en ensayos con más de dos tratamientos, se realizó una prueba LSD de comparación de medias.

4. Resultados

4.1. Establecimiento *in vitro* del clon ‘Capela’

Los explantos nodales obtenidos de ramillos terminales tomados de la parte baja de la copa del árbol monumental “Ciprés da Capela do Salvador” (clon ‘Capela’) fueron desinfectados superficialmente como paso previo a su establecimiento *in vitro*. La Figura 2 ilustra los porcentajes de contaminación, de necrosis y de reactividad de los explantos a los 30 días del establecimiento, en función del protocolo de desinfección empleado (D1 a D5).

Se observa que los porcentajes de contaminación son muy bajos, a excepción de los obtenidos en los explantos tratados mediante el protocolo D1 (1% Cloro activo, 20 min). Teniendo en cuenta que dicho tratamiento es más intenso que el tratamiento D2 (1% Cl activo, 16 min), la gran diferencia entre ambos no puede atribuirse al factor ‘protocolo’. La explicación más probable es que al proceder los explantos desinfectados mediante el protocolo D1 de ramas recolectadas en abril de 2023 y conservadas en nevera durante dos meses, antes de su establecimiento *in vitro*, mientras que los explantos sometidos a las desinfecciones D2 a D5 procedían de ramas recolectadas en diciembre de 2023 y fueron introducidos *in vitro* un día después de la recolección, es probable que el tiempo de permanencia en nevera haya contribuido al aumento de la carga contaminante en el material, a pesar de que este había sido tratado con una solución fungicida y dejado secar antes de su introducción en frío. Con respecto al porcentaje de necrosis, no se observa correlación entre este valor y la intensidad de la desinfección. En los protocolos de desinfección más suaves, considerando el porcentaje de Cloro activo y/o el tiempo de acción del desinfectante (D2: 1% Cl activo, 16 min; D3: 2% Cl activo, 10 min), los porcentajes de necrosis fueron significativamente más altos que en los protocolos más agresivos, (D1: 1% Cl activo, 20 min; D4: 2% Cl activo, 20 min; D5: 2% Cl activo, 15 min). Desconocemos la causa de estos resultados. En cualquier caso, se constata que el uso de protocolos en los que se empleó una solución de NaClO con un 2% de Cl activo en tiempos entre 15 y 20 min permitió desinfectar superficialmente prácticamente la totalidad de los explantos, con valores de necrosis entre el 25 y el 60% y porcentajes de reactividad entre el 35 y el 76%.

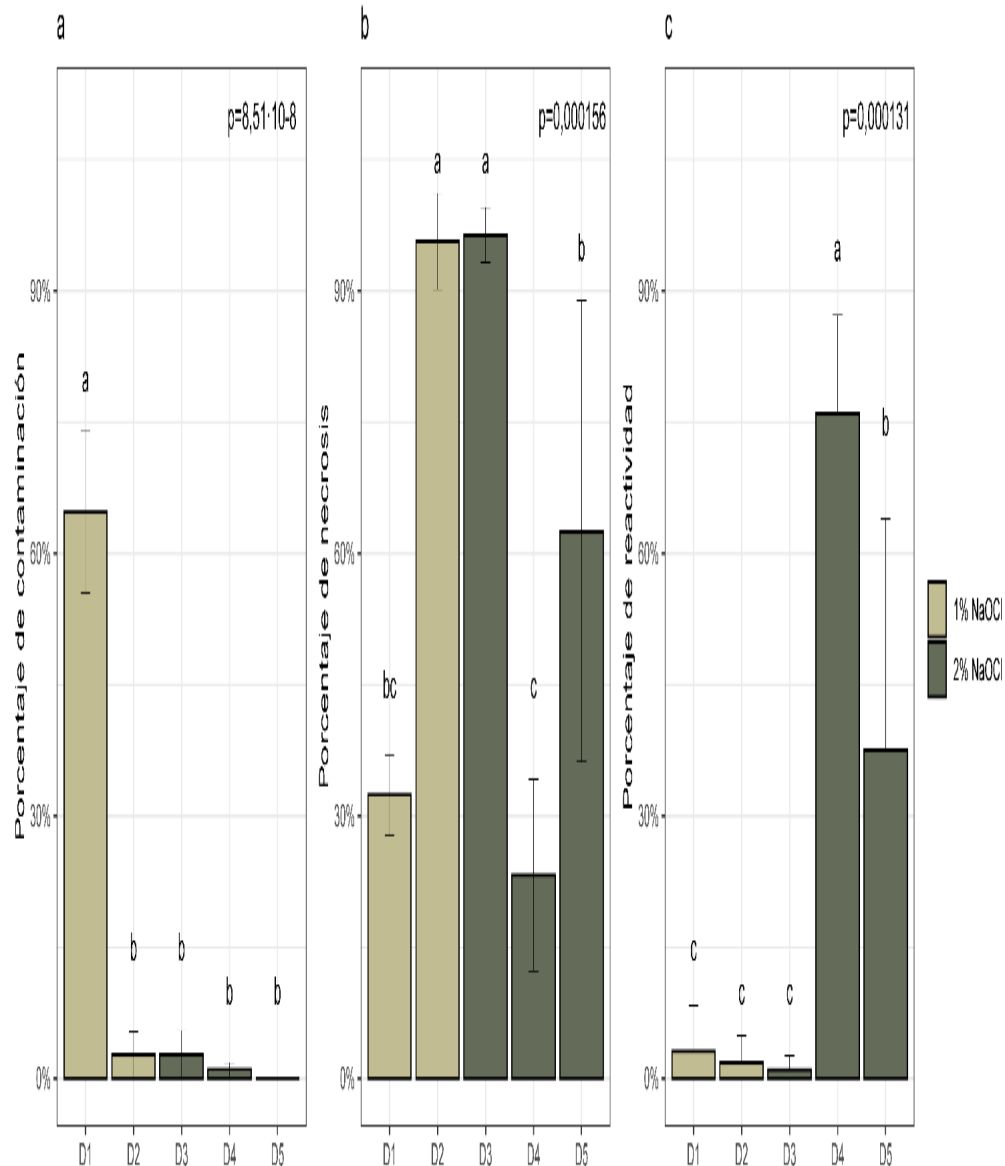


Figura 2. Porcentaje de contaminación (a), porcentaje de necrosis (b) y porcentaje de reactividad (c) a los 30 días del establecimiento en cultivo *in vitro* de explantos nodales del clon 'Capela'. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según la prueba LSD.

4.2. Progresión de los explantos del clon 'Capela' en los primeros subcultivos

Reunificadas diversas tandas de establecimiento *in vitro*, se realizó un primer subcultivo conjunto en el que se obtuvieron un total de 78 explantos no contaminados y reactivos (Figura 3).

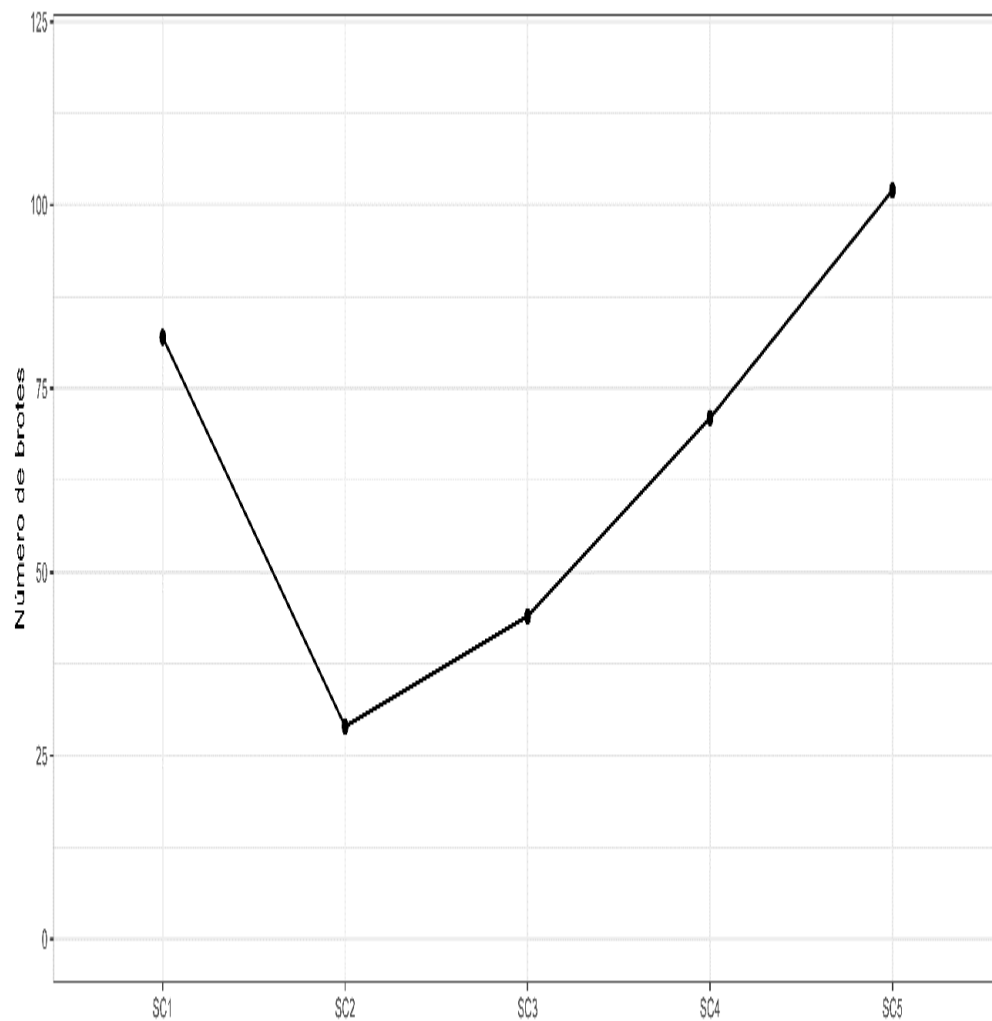


Figura 3. Progresión del número de explantos del clon 'Capela' en los primeros 5 subcultivos.

El escaso número de explantos disponibles en ese momento hizo que se decidiera homogeneizar las condiciones de cultivo, sobre la base de las observaciones precedentes, estableciendo los explantos en el primer subcultivo en un medio MS + $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP. En el segundo subcultivo se produjo un descenso drástico en el número de explantos, debido principalmente al elevado porcentaje de explantos que se necrosaron. Se decidió entonces subcultivar los explantos a partes iguales entre MS + $0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP y MS + $0,2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BAP, permaneciendo en el medio correspondiente a lo largo de los siguientes subcultivos, hasta que el número de explantos alcanzado se estimó suficiente para realizar un experimento más amplio de multiplicación, cuyos resultados se muestran más adelante. Desde el segundo subcultivo se observa un aumento progresivo en el número de explantos, no detectándose apenas fenómenos de necrosis, y verificándose una progresiva tendencia a la ramificación lateral de los nuevos explantos obtenidos (Figura 4). Una vez que se estimó que el material había alcanzado un cierto nivel de estabilización, entre los subcultivos 6 y 8, parte de los explantos fueron utilizados para las pruebas de enraizamiento.



Figura 4. Explanto del clon 'Capela' al final del sexto ciclo de multiplicación.

4.3.Efecto del medio y la fuente de luz en la multiplicación in vitro del clon 'Capela'

Los resultados que se muestran en la Figura 5 corresponden al experimento de multiplicación realizado en el octavo ciclo de multiplicación.

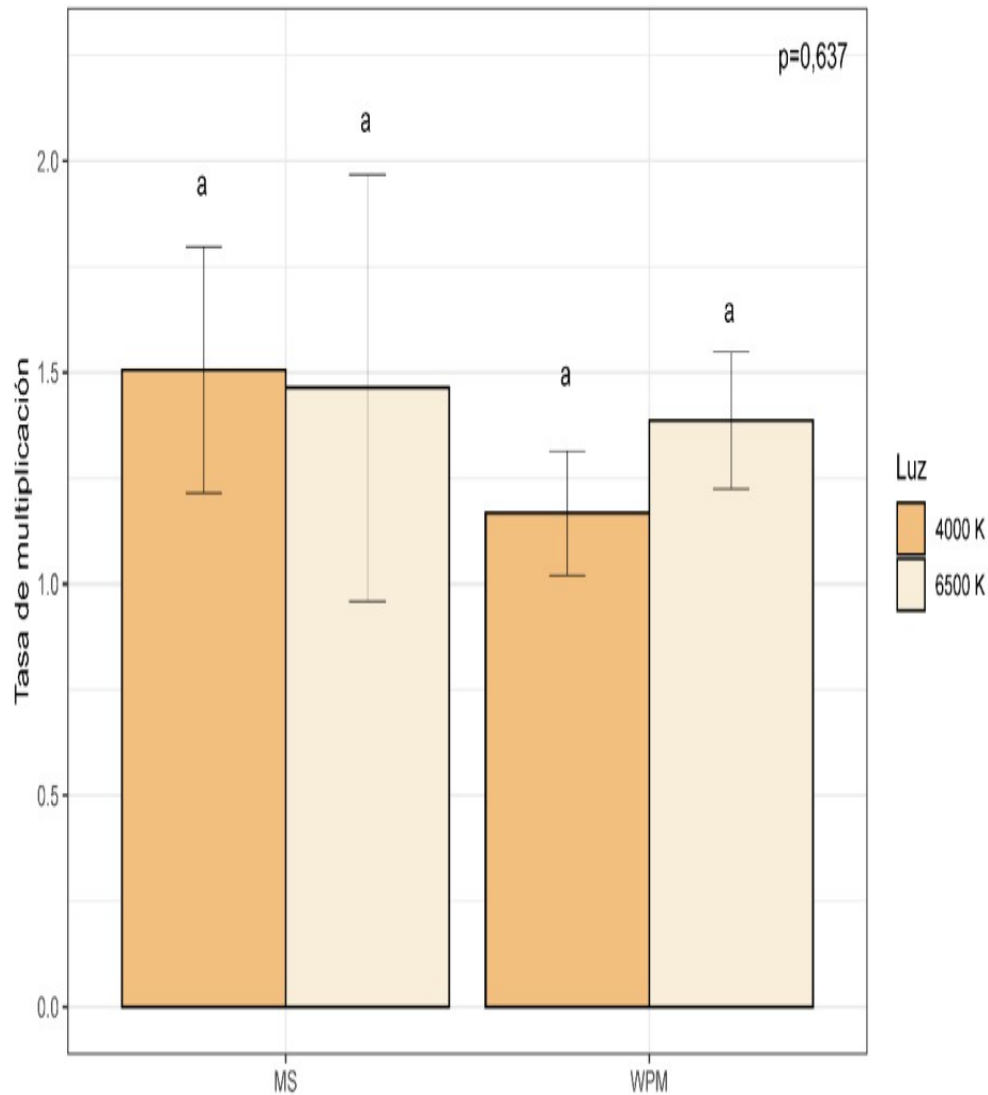


Figura 5. Tasa de multiplicación de los explantos del clon ‘Capela’ en función del medio (MS o WPM) y de las condiciones de iluminación (LED 4000 K o LED 6500 K) empleados. La concentración de BAP en ambos medios fue de 0,2 mg·l⁻¹. Los resultados se expresan como la media ± desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según la prueba LSD.

No se observaron diferencias significativas en función del medio (WPM o MS) ni de la temperatura de color de la iluminación LED (4000 K o 6500 K). Las tasas de multiplicación observadas mostraron valores entre 1,2 y 1,5, suficientes para mantener una multiplicación efectiva. En cualquier caso, estas tasas pueden haber sido infraestimadas con respecto a las registradas en subcultivos precedentes, pues con la mejora generalizada del aspecto de los explantos, reflejada especialmente en el aumento del grado de ramificación de los explantos, en el criterio de obtención de nuevos explantos en este experimento primó la conservación de más de un eje caulinar en el momento del subcultivo.

4.4. Evaluación de la capacidad de enraizamiento de los explantos del clon ‘Capela’

Aparte de establecer una accesión permanente *in vitro* del clon ‘Capela’, en este trabajo se formuló el objetivo de evaluar la posibilidad de regeneración de plantas completas representativas de este genotipo. Para ello, es preciso ser capaces de enraizar los explantos multiplicados *in vitro*, como paso previo a su aclimatación a condiciones *in vivo*.

En el experimento de enraizamiento diseñado en este trabajo, se observó que ninguno de los 18 tratamientos de inducción del enraizamiento aplicados fue efectivo, obteniéndose en todos los casos una tasa de enraizamiento del 0% a los 90 días. Este resultado no es sorprendente, ya que se trata de un material con un grado de maduración muy elevado.

4.5. Germinación *in vitro* de lotes de semillas de *Cupressus sempervirens*

Se establecieron *in vitro* semillas procedentes de los lotes ‘EPSE’ y ‘1993’, con la finalidad de establecer líneas clonales juveniles, una de las cuales sirvió como fuente de portainjertos para el ensayo de microinjerto realizado en este trabajo.

Como se observa en la Figura 6a, el porcentaje de contaminación superó en casi todos los casos el 60%, superando el 90% en el caso de las semillas procedentes del lote ‘EPSE’, con diferencias significativas con respecto al lote ‘1993’. Los porcentajes más bajos de contaminación se obtuvieron en semillas del lote ‘1993’, cuando el tiempo de inmersión en NaOCl superó los 12 minutos.

Con respecto al porcentaje de germinación (Figura 6b), no parece haber correlación entre este y los tiempos de desinfección en NaClO. Resulta relevante que el porcentaje de germinación de las semillas del lote ‘1993’, conservadas 30 años, es relativamente alto, alcanzando el 30%, y similar al observado en las semillas del lote ‘EPSE’.

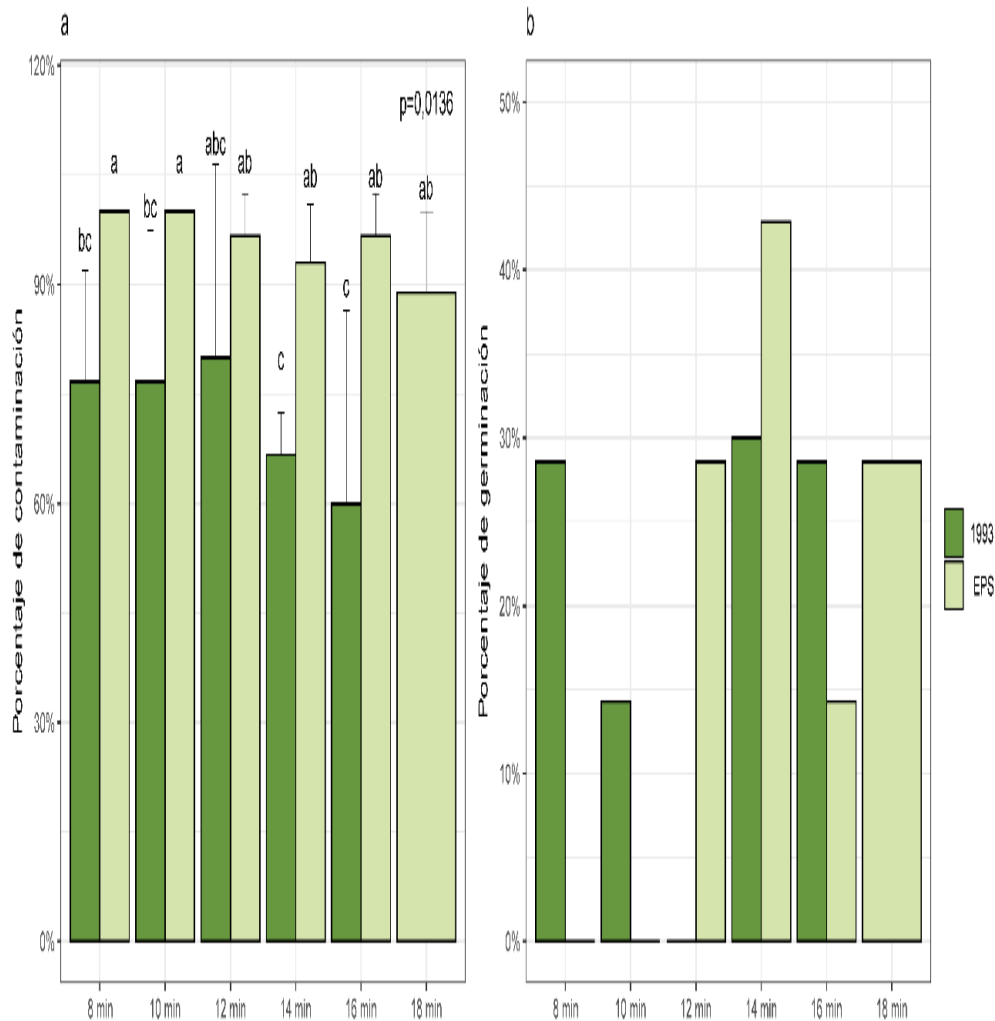


Figura 6. Porcentaje de contaminación (a) y porcentaje de germinación (b) de semillas de los lotes '1993' y 'EPSE'. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$), según la prueba LSD.

4.6. Multiplicación in vitro de líneas clonales juveniles de *Cupressus sempervirens*

A partir de cuatro plántulas obtenidas de semillas germinadas del lote 'EPSE' se establecieron cuatro líneas clonales, analizándose su tasa de multiplicación tras cuatro subcultivos, en dos subcultivos consecutivos. Los resultados se presentan en la Figura 7, en la que se puede observar que la tasa de multiplicación varía entre 1,4 y 2,6, sin diferencias significativas entre los clones 'XUV1', 'XUV2' y 'XUV3', cuyos valores están siempre por encima de 2,2. Estos valores son mayores que los obtenidos en el clon 'Capela', lo que probablemente está relacionado con el carácter adulto de este clon.

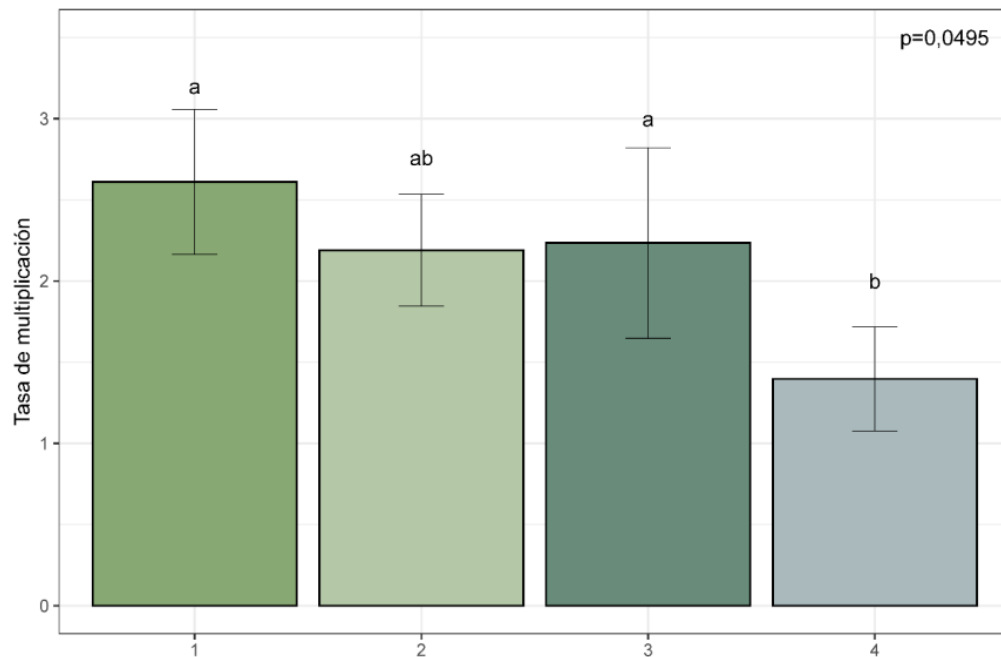


Figura 7. Tasa de multiplicación en medio MS suplementado con 0,1 mg·l⁻¹ BAP de las 4 líneas clonales juveniles de *Cupressus sempervirens* (lote 'EPSE'). Los resultados se expresan como la media ± desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según la prueba LSD.

4.7. Enraizamiento in vitro de ciprés juvenil (clon XUV1)

El clon 'XUV1', utilizado para este experimento, presentó un porcentaje de enraizamiento del 37,5% en el mejor de los tratamientos ensayados (Tabla 6). Estos porcentajes de enraizamiento son relativamente bajos, habida cuenta de que se trata de un clon juvenil.

Tabla 6. Porcentaje de enraizamiento (% E) a los 90 días en el clon 'XUV1' en función del tratamiento de inducción; SAC: sacarosa; t_1 , t_2 : tiempo en medio 1 y medio 2; I.B.: inmersión basal de 1 min en una solución concentrada de AIB (1g·l⁻¹);: porcentaje de enraizamiento. Letras distintas en los porcentajes de enraizamiento indican diferencias significativas según la prueba LSD ($p \leq 0,05$).

Nº	% SAC	Medio 1	t1	I.B.	Medio 2	t2	% E	
1	3	1/2 MS+ 0,2 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-	0 b
2	3	MS + 0,2 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-	0 b
3	1	1/2 MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-	0 b
4	1	1/2 MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	ANA	90	-	-	0 b
5	1	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-	4,2 ± 7,5 b
6	3	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	90	-	-	0 b
7	1	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	45	sí	MS	45 0 b
8	3	MS + 1,0 mg·l ⁻¹	- ⁻¹	AIB	45	sí	MS	45 37,5 ± 0,0 a

4.8. Microinjerto

En el presente estudio, se han realizado 33 microinjertos utilizando como púas explantos del clon ‘Capela’, microinjertadas sobre portainjertos del clon ‘XUV1’. Se han registrado tasas de prendimiento del 57,2% a los 35 días y, de los microinjertos prendidos, se ha observado crecimiento de la púa en el 75% de los casos (Figura 8).



Figura 8. Microinjerto prendido y en desarrollo del clon ‘Capela’ sobre el clon ‘XUV1’, a los 50 días de su realización.

5. Discusión

Para el establecimiento *in vitro* del clon ‘Capela’ los protocolos de desinfección

fueron similares a los empleados en otras investigaciones de cultivo *in vitro* de material adulto de ciprés. SPANOS et al. (1997) emplearon un protocolo con H₂O₂ (30%) durante 10 minutos, seguido de NaClO (0,9%) durante 20 minutos, pero no mencionaron las tasas de contaminación obtenidas. GIOVANELLI & DE CARLO (2007) desinfectaron los explantos con etanol (70%) durante 2 minutos, seguido de NaClO (1,5%) durante 20 minutos, con un porcentaje de contaminación del 30 %, algo superior al obtenido en el presente trabajo. A diferencia del presente estudio, en ninguno de los trabajos consultados se mencionaron tasas de necrosis ni de reactividad tras la introducción *in vitro*.

Tras el establecimiento del clon ‘Capela’, las fluctuaciones observadas en el número de explantos durante los primeros subcultivos son comunes en muchas otras especies arbóreas establecidas *in vitro*. Este intervalo de multiplicación irregular se conoce como período de estabilización *in vitro* (MCCOWN & MCCOWN, 1987), y suele ser más prolongado cuanto mayor es el grado de maduración del material. Una vez alcanzado un cierto nivel de estabilización, se ha constatado que el clon ‘Capela’ se multiplica de forma efectiva y de manera similar tanto en medio WPM como MS, con una concentración de BAP de 0,2 mg·l⁻¹, tanto bajo luz LED blanca 4000 K como 6500 K. Otros autores han utilizado diversos medios de cultivo para la multiplicación *in vitro* de *Cupressus sempervirens* adulto y juvenil. El medio más empleado ha sido el medio MS, suplementado con la citoquinina BAP (FOSSI et al, 1981; CAPUANA et al, 1991; SPANOS et al, 1997). CAPUANA et al (1991) han empleado el medio SH con resultados similares. La concentración de BAP varía entre 0,01 y 1,0 mg·l⁻¹, dependiendo del estudio y de la edad del material. No hemos encontrado estudios en los que se comparen diferentes tipos de luz en esta especie. En los trabajos mencionados se han utilizado siempre luces fluorescentes de luz blanca. A excepción de SPANOS et al (1997), que utilizaron fluorescentes de luz blanca con una temperatura de color de 2950 K, en el resto de los trabajos consultados se utilizaron fluorescentes de 6500 K, que son los habitualmente utilizados para el cultivo *in vitro* de muchas especies. El uso alternativo de las luces LED como fuente de iluminación proporciona ventajas tanto desde el punto de vista energético como de la versatilidad en la elección del espectro electromagnético (BELLO-BELLO et al 2017; BATISTA et al, 2018). La utilidad de las luces LED para la multiplicación *in vitro* se ha demostrado en diversas especies. En nuestro trabajo, se confirma que las luces LED pueden ser utilizadas para la multiplicación *in vitro* de *Cupressus sempervirens*, sin diferencia en la respuesta entre el uso de lámparas de luz neutra (4000 K) y fría (6500 K) en el clon estudiado.

El ciprés de “A Capela de San Salvador”, al tratarse de un árbol singular, sujeto a una figura de protección legal, condiciona la obtención de material de partida, de forma que en este trabajo se ha pretendido establecer una accesión *in vitro* de propágulos vegetativos de este ejemplar a partir de un material limitado. Los resultados obtenidos en cuanto a producción de explantos, la progresiva mejora del aspecto general de estos y la disponibilidad de medios de cultivo y condiciones de iluminación que permiten una multiplicación efectiva, demuestran que uno de los objetivos perseguidos, referente al establecimiento de un banco de germoplasma en condiciones *in vitro* con una mínima afectación de la planta madre, se ha cumplido.

En lo que concierne a las posibilidades de enraizamiento *in vitro* del material del clon ‘Capela’, con vistas a su propagación, los resultados hasta el momento han sido negativos. En gran parte de las especies arbóreas se verifica un descenso gradual de la capacidad de propagación vegetativa a medida que aumenta el grado



de maduración del material vegetal, lo que se refleja comúnmente en el descenso de la capacidad de enraizamiento adventicio (PIERIK, 1990). En *Cupressus sempervirens*, CAPUANA & GIANNINI (1997) observaron, comparando material de 5-6 semanas, 15 años y más de 150 años, que la edad de la planta madre influía de manera importante en la respuesta *in vitro* en todas las fases del cultivo. Por su parte, KAMUSHI et al (2019) consiguieron un porcentaje de enraizamiento del 11% a los 90 días en un ejemplar de ciprés con una edad estimada de 4000 años. Si bien el subcultivo continuo *in vitro* permite en algunos casos recuperar en cierta medida la capacidad de enraizamiento adventicio (WENDLING et al, 2014), esto puede no ocurrir hasta que han transcurrido un número muy elevado de subcultivos. A la vista de los resultados obtenidos hasta ahora sobre el clon 'Capela', será necesario realizar nuevos experimentos de enraizamiento para intentar obtener plántulas completas, evaluando al mismo tiempo la posible mejora de la capacidad de enraizamiento de los explantos a lo largo de sucesivos subcultivos.

En contraste con el clon adulto 'Capela', los materiales juveniles de *Cupressus sempervirens* establecidos *in vitro* en el presente trabajo han presentado una capacidad organogénica netamente mayor. En otros trabajos en *Cupressus sempervirens* se han registrado tasas de multiplicación mayores cuanto más juvenil era el material (CAPUANA & GIANNINI, 1997). En el establecimiento, el porcentaje de germinación *in vitro* de las semillas rondó el 30%, incluso en las semillas conservadas durante 30 años. Según la bibliografía consultada (CATALÁN, 1991; GIOVANELLI & DE CARLO, 1997) el porcentaje de germinación de las semillas de *Cupressus sempervirens* se encuentra en general en torno al 50% tras la recolección. Con respecto al porcentaje de enraizamiento de los explantos juveniles, en la literatura se reportan porcentajes mayores para materiales juveniles de ciprés que en el caso del clon 'XUV 1' empleado en este trabajo. Por ejemplo, FOSSI et al (1981) obtuvieron un 80% de enraizamiento sobre explantos procedentes de plántulas de 5-6 semanas en un medio con 1 mg·l⁻¹ de ANA, y SPANOS et al (1997) obtuvieron un 95% de enraizamiento sobre explantos procedentes de plántulas de 18 meses en un medio suplementado con 0,5 mg·l⁻¹ de AIB. En el futuro, se prevé ensayar otras líneas clonales y protocolos para mejorar los porcentajes de enraizamiento de los clones juveniles.

La disponibilidad de material juvenil establecido *in vitro* en este estudio ha permitido abordar ensayos de microinjerto de ciprés adulto sobre patrones juveniles, obteniéndose tasas de éxito cercanas al 60%. Para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se describe el microinjerto *in vitro* en *Cupressus sempervirens*.

En nuestra línea de investigación, el microinjerto del clon 'Capela' sobre patrones juveniles será una herramienta útil para el mantenimiento de la accesión *in vitro* del clon 'Capela', además de proporcionar una alternativa para la obtención de plantas completas micropropagadas de este clon. Por una parte, conjuntamente con el subcultivo continuo, podría mejorar el grado de rejuvenecimiento del material adulto del clon 'Capela', y con ello su capacidad de multiplicación y, sobre todo, de enraizamiento adventicio. En este caso el microinjerto sería transitorio. Por otra parte, en el caso de que no fuese posible obtener vitroplantas del clon 'Capela' sobre sus propias raíces, permitirá la obtención de material clonal microinjertado disponible para su aclimatación a las condiciones *in vivo*.

6. Conclusiones



En este trabajo se confirma la posibilidad de obtener, con carácter permanente, una accesión activa *in vitro* del clon ‘Capela’, constituida por propágulos vegetativos del árbol monumental catalogado “Ciprés da Capela do Salvador”. Asimismo, se han obtenido los primeros microinjertos *in vitro* documentados de *Cupressus sempervirens*, utilizando púas de material adulto microinjertadas sobre explantos de origen juvenil. Aún no ha sido posible inducir enraizamiento en los explantos del clon ‘Capela’, por lo que será preciso seguir trabajando en la optimización de las condiciones de enraizamiento y evaluar el efecto de técnicas de rejuvenecimiento como el subcultivo continuo *in vitro* y el microinjerto.

7. Bibliografía

- BATISTA, D. S., FELIPE, S. H. S., SILVA, T. D., de CASTRO, K. M., MAMEDES-RODRIGUES, T. C., MIRANDA, N. A., & OTONI, W. C. (2018). Light quality in plant tissue culture: Does it matter? *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 54(3), 195-215.
- BELLO-BELLO, J. J., MARTÍNEZ-ESTRADA, E., CAAMAL-VELÁZQUEZ, J. H., & MORALES-RAMOS, V. (2016). Effect of LED light quality on *in vitro* shoot proliferation and growth of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). *Afr. J. Biotechnol.*, 15, 272-277.
- BERNÁRDEZ, J. G., e RIGUEIRO, A. (2021). Árbores e formacións senlleiras da contorna dos Ancares e do Courel. Monografías do Ibader, Universidade de Santiago de Compostela.
- CAPUANA, M., GIANNINI, R., LAMBARDI, M., LEVA, A. R., & NICESE, F. P. (1991). Micropropagation of mature plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Acta Hort.*, 289, 91-92.
- CATALÁN, G. (1991). Semillas de árboles y arbustos forestales. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- FERNÁNDEZ-LORENZO, J. L., COUSO, A., GÓMEZ, L., e RIGUEIRO, A. (2023). Proposta técnica de Directrices para a creación dun Banco de Xermoplasma de especies e árbores silvestres e senlleiras da ZEC Ancares-Courel. Informe interno. Xunta de Galicia.
- FOSSI, D., LIPUCCI, P. D., & TOGNONI, F. (1981). *In vitro* induction of axillary buds in *Cupressus sempervirens*. *Rivista della Ortoflorofrutticoltura Italiana*, 65(4), 293-299.
- GIOVANELLI, A., & DE CARLO, A. (2007). Micropropagation of Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.). In S. M. Jain y H. Haggman (Eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (pp. 93–105). Springer.
- KARIMI, H. R., JANGHORBAN, K., & RAQAMY, M. (2018). *In vitro* propagation of some old Persian cypress accessions (*Cupressus sempervirens* L.) by embryo culture. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24, 1285–1294.
- KHAMUSHI, M., DEHESTANI-ARDAKANI, M., ZAREI, A., & KAMALI ALIABAD, K. (2019). An efficient protocol for micropropagation of old cypress of Abarkuh (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* [Mill.]) under *in vitro* condition. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 138(3), 597-601.



LLOYD, G. & MCCOWN, B.H. (1981). Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16: 453.

MATTIONI, C., RANZINO, L., CHERUBINI, M., LEONARDI, L., LA MANTIA, T., CASTELLANA, S., VILLANI, F., & SIMEONE, M.C. (2020). Monuments unveiled: Genetic characterization of large old chestnut (*Castanea sativa* Mill.) trees using comparative nuclear and chloroplast DNA analysis. *Forests* 11 (10): 1118.

MCCOWN, D. D., & MCCOWN, B. H. (1987). North American hardwoods. In J. M. Bonga & D. J. Durzan (Eds.), *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff Publishers.

MURASHIGE, T., & SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15(3), 473-497.

PIERIK, R. L. M. (1990). Rejuvenation and micropropagation. In H. J. J. Nijkamp, L. H. W. Van Der Plas, & J. Van Aartrijk (Eds.), *Progr. Plant Cell. Mol. Biol.*, 115–121.

SÁNCHEZ, M. C., COVELO, P., ALDREY, A., VILLEGAS, J. M. V., RICO, S., & VIDAL, N. (2018). Conservación de germoplasma de árboles singulares de Galicia por cultivo in vitro. *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.*, (44), 39-50.

SCHENK, R. U., & HILDEBRANDT, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50(1), 199-204.

SPANOS, K. A., PIRRI, A., & WOODWARD, S. (1997). Micropropagation of *Cupressus sempervirens* L. and *Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murr.) *Par. Silva Genet.*, 46(5), 291-295.

WENDLING, I., TRUEMAN, S. J., & XAVIER, A. (2014). Maturation and related aspects in clonal forestry—Part II: Reinvigoration, rejuvenation, and juvenility maintenance. *New Forests*, 45, 473–486.