



9CFE-1890

Actas del Noveno Congreso Forestal Español
Edita: **Sociedad Española de Ciencias Forestales. 2025.**
ISBN: 978-84-941695-7-1



Establecimiento *in vitro* de accesiones de dos castaños monumentales de Galicia

RODRÍGUEZ DÍAZ H. (1)., FERNÁNDEZ LORENZO J. (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 (EPSE). Universidade de Santiago de Compostela.

Resumen

Se han establecido *in vitro* explantos nodales de los castaños monumentales ‘Val da Fonte’ (injertado) y ‘Ramil’, pertenecientes al “Catálogo de Árbores e Formacións Senlleiras” de Galicia. En ambos ejemplares se utilizaron segmentos de rama como fuente de explantos. En ‘Val da Fonte’, de dos zonas del árbol: copa (clon ‘VdF-Co’) y base (clon ‘VdF-Bs’). Se evaluaron varios protocolos de desinfección y se registró la tasa de multiplicación durante los primeros subcultivos. Posteriormente, se evaluó el efecto del tipo de luz LED (4000K y 5500K) sobre la multiplicación. Se realizaron ensayos de enraizamiento sobre ‘Ramil’ y ‘VdF-Bs’, comparándose dos tratamientos de inducción auxínica. En ‘Ramil’, se realizaron ensayos preliminares de microinjerto sobre material juvenil y cultivo de meristemos para mejorar su capacidad de enraizamiento. Todos los materiales se establecieron *in vitro* con éxito. No se observaron diferencias significativas en la multiplicación en función del tipo de luz. En el material ‘VdF-Bs’, el porcentaje de enraizamiento alcanzó el 30-40%, mientras que en ‘Ramil’ no superó el 17%. El porcentaje de éxito de los microinjertos realizados se acercó al 60%, y, de los meristemos aislados, el 67% desarrollaron brotes.

Palabras clave

Castanea sativa, micropropagación, microinjerto, enraizamiento, meristemos.

1. Introducción

El castaño (*Castanea sativa* Mill.) es una especie ligada fuertemente a Galicia, constituyendo desde hace siglos una fuente de alimentación y de madera y un elemento esencial del paisaje y de la cultura gallega desde el Medioevo. En Galicia se encuentra frecuentemente formando ‘soutos’, formaciones de castaño de origen antrópico constituidas por árboles injertados con variedades de castaña tradicionales. La elevada variabilidad encontrada en los viejos ‘soutos’ indica que los agricultores usaron diversas fuentes de poblaciones locales multiplicadas por injerto, habiéndose identificado un gran número variedades gallegas tradicionales (FERNÁNDEZ-LÓPEZ & FERNÁNDEZ-CRUZ). El progresivo abandono y la amenaza de las enfermedades criptogámicas de la tinta (*Phytophthora* spp.) y del chancro (*Cryphonectria parasitica*), han hecho que muchos de estos ‘soutos’ se degradaran o desaparecieran. La obtención de clones híbridos (*Castanea sativa* x *C. crenata* / *C. mollissima*) resistentes a la tinta ha permitido, en las últimas décadas, establecer con este tipo de material plantaciones para madera o crear nuevos ‘soutos’, utilizando los clones híbridos como portainjertos, en zonas de riesgo de ‘tinta’.



Ahora bien, la presencia de estos clones híbridos en repoblaciones ha provocado una progresiva introgresión de alelos asiáticos sobre las poblaciones naturales de *Castanea sativa* (FERNÁNDEZ-CRUZ & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2012). El genoma de las variedades tradicionales, gracias a su multiplicación secular mediante injerto, se conserva libre de introgresión. Esto es también aplicable a aquellos árboles muy longevos, muchos de ellos árboles monumentales, presentes desde antes de la expansión del uso de clones híbridos.

Es por ello que los antiguos castaños monumentales, injertados o no, son importantes no sólo por su carácter monumental, su interés histórico, social o cultural y por su función ecológica, sino también porque representan una fuente única de diversidad genética, hasta hoy muy poco conocida, que puede ser considerada un gran recurso para la gestión de programas de mejora. Por ejemplo, sus características genéticas pueden estar relacionadas con la adaptación a cambios ambientales y/o con rasgos de productividad ventajosos (MATTIONI et al., 2020; BRÄUTIGAM et al., 2013). Por este motivo, en la actualidad se concede cada vez más importancia a la recuperación, conservación y estudio de estos árboles, especialmente en un contexto de cambio climático y de presión antrópica que amenazan su supervivencia.

Existen normativas en muchos países europeos para el registro, catalogación y protección de árboles monumentales (CANNIZZARO & CORINTO, 2014). En Galicia, la Consejería de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible ha creado el «Catálogo Gallego de Árboles y Formaciones Arbóreas Singulares» (DECRETO 67/2007), que incluye actualmente 17 castaños monumentales (*Castanea sativa* Mill.) y 4 formaciones singulares de castaños. En dicho catálogo se promueven medidas de conservación *in situ*, prohibiendo cualquier acción que afecte negativamente a su integridad, salud o apariencia, y se insta a la elaboración de planes de gestión para la conservación si el estado de los ejemplares lo requiere, pero no se hace ningún tipo de mención al interés o la necesidad de su conservación *ex situ*. Catálogos más recientes del ámbito nacional, como el 'Inventario de árboles y ejemplares singulares de Castilla-La Mancha' (DECRETO 37/2023) ya mencionan expresamente la necesidad de crear bancos de germoplasma específicos para conservar *ex situ*, y reproducir, estos ejemplares singulares.

Recientemente, en el marco de propuestas de Directrices para la creación de bancos de germoplasma de flora silvestre y árboles monumentales de espacios protegidos de la Comunidad Autónoma de Galicia (FERNÁNDEZ LORENZO et al., 2023), se han propuesto estrategias para la conservación y propagación de estos valiosos genotipos de castaño. Estas estrategias se basan principalmente en la propagación clonal mediante cultivo *in vitro*.

Existen protocolos eficientes para el establecimiento, micropropagación y conservación del castaño (CORREDOIRA et al., 2017), algunos de ellos adaptados a genotipos específicos, como algunas variedades seleccionadas que producen castañas de calidad (PAVESE et al., 2022, FERNÁNDEZ-LORENZO et al., 2024a). En el caso de los castaños monumentales, con un alto grado de maduración, los protocolos para su conservación *in vitro* requieren el uso de técnicas como el microinjerto (VIDOY-MERCADO et al., 2021) o el aislamiento de meristemos (MONTEUUIS, 2012), que permitan la revigorización/rejuvenecimiento del



material, con vistas a posibilitar la estabilización y conservación de los cultivos y el eventual enraizamiento de los propágulos.

2. Objetivos

En este trabajo, se propone un protocolo para el establecimiento de accesiones *in vitro* de dos castaños monumentales, el castaño 'Ramil' y el castaño injertado 'Val da Fonte', ambos incluidos en el «Catálogo Gallego de Árboles y Formaciones Arbóreas Singulares», estudiándose el efecto de factores como el espectro lumínico, el microinjerto y el cultivo de meristemos sobre el éxito del establecimiento y la multiplicación *in vitro*.

3. Metodología

3.1. Material vegetal

El material vegetal empleado en este trabajo procede de dos ejemplares de castaño (*Castanea sativa* Mill.) incluidos en el Catálogo de Árboles y Formaciones Singulares de Galicia (DECRETO 67/2007 y DECRETO 10/2015), denominados "Castaño de Ramil" (Cód. 19A) (Concello de Triacastela, Lugo), un árbol sin injertar que podría tener alrededor de 400 años, y "Castaño do Val da Fonte" (Cód. 160A) (Concello de Folgoso do Courel, Lugo). Recientemente se ha demostrado que este último se trata de un árbol injertado. (PEREIRA et al, 2019). Mediante marcadores moleculares (microsatélites o SSRs) se determinó que la parte de la copa pertenece a la variedad gallega tradicional 'Courelá', mientras que la base del árbol pertenece a un ejemplar silvestre. Ambos ejemplares han sido ampliamente descritos por BERNÁRDEZ y RIGUEIRO (2020).

A partir de ramas de la copa del "Castaño de Ramil", recolectadas a finales de marzo de 2023 y sometidas a forzado en cámara de cultivo se obtuvieron brotes axilares que sirvieron como fuente de explantos para su establecimiento *in vitro*. Dichos explantos se establecieron *in vitro* en mayo de 2023 y se multiplicaron mediante subcultivo continuo (6 ciclos) en WPM (LLOYD & MCCOWN, 1980), suplementado con 3 g·l⁻¹ de sacarosa, 7 g·l⁻¹ de agar (Bacto™) (medio base: MB), y 0,1 g·l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), con un pH 5,5-5,6, previamente al inicio de los ensayos, constituyendo el clon 'Ramil'.

Los clones correspondientes al "Castaño Val da Fonte" se establecieron *in vitro* a partir de ramas recolectadas de la base (clon 'VdF-Bs') y de la copa (clon 'VdF-Co') recolectadas en marzo de 2024.

Igualmente, se utilizó material del cultivar 'Branca' (variedad certificada para producción de castaña), establecido *in vitro* en 2018 y mantenido hasta la actualidad mediante subcultivo continuo en MB + 0,1 g·l⁻¹ de BAP. El material de 'Branca' se utilizó para obtener portainjertos empleados en ensayos de microinjerto.



3.2. Experimentos

3.2.1. Forzado de la brotación axilar de segmentos de rama

En marzo de 2024 se tomaron ramas del castaño “Val da Fonte”, de la base del árbol (clon ‘VdF-Bs’) y de partes bajas de la copa, por encima del punto de injerto (clon ‘VdF-Co’= variedad ‘Courelá’). Las ramas se lavaron exhaustivamente en laboratorio, se cortaron en segmentos (25 cm longitud, 1-3 cm diámetro) y se sumergieron durante 1 h en una solución de Captan® ($0,3 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$). Posteriormente, se colocaron verticalmente en recipientes con agua que cubría 2-3 cm basales de los segmentos y se instalaron en cámara de cultivo: temperatura de 23-25 °C; fotoperíodo 16/8 h; iluminación con luz fluorescente blanca fría (6500 K) y densidad de flujo radiante de fotones de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En total, se instalaron 18 y 11 segmentos de ‘VdF-Bs’ y ‘VdF-Co’ respectivamente. Los segmentos del clon ‘VdF-Co’ fueron tratados impregnando con un pincel las yemas axilares con una solución de BAP ($0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a los 9 y 37 días tras el inicio del forzado. A lo largo del experimento, se tomaron datos del número de segmentos que emitieron brotes axilares, días transcurridos hasta la brotación, número de yemas productivas por segmento y número de explantos obtenidos, en función del clon.

3.2.2. Desinfección superficial de los explantos y establecimiento *in vitro*

De los brotes axilares obtenidos (Figura 1), se obtuvieron explantos nodales (1-2 cm, 1-2 yemas), que fueron sometidos a esterilización superficial.



Figura 1. Brotes axilares de los clones ‘VdF-Bs’ (A) y ‘VdF-Co’ (B) utilizados como fuente de explantos.

Se ensayaron varios tratamientos de desinfección, combinando Etanol 70° con distintas concentraciones de NaClO (+ unas gotas de Tween™ 20), comparando diversos tiempos de desinfección (Tabla 1). En todos los casos se realizaron 4 lavados de 1 min en agua destilada estéril tras la desinfección.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección superficial de explantos de los clones ‘VdF-Bs’ y ‘VdF-Co’; t: tiempo de inmersión (min); % Cl: porcentaje de cloro activo; e: explantos tratados e introducidos *in vitro*.

Clon	t Et 70°	t NaClO	% Cl	e
VdF-Bs	0,75	12	0,8	2
7-8		5		
0,5	7	0,6	15	
5,5		50		
VdF-Co	0,5	5'5	0'6	8

Tras la desinfección, los explantos obtenidos se introdujeron *in vitro* en medio MB + BAP (1 mg·l⁻¹) y se instalaron en cámara de cultivo: temperatura de 23-25 °C; fotoperíodo 16/8 h; iluminación con luz fluorescente blanca neutra (4000 K) y densidad de flujo radiante de fotones de 35-40 μmol·m⁻²·s⁻¹. Se realizaron transferencias a medio fresco con la misma composición los días 1 y 15 día. A los 30 días, se tomaron datos de porcentaje de explantos no contaminados y reactivos, y se transfirieron a MB + 0,1 mg·l⁻¹ BAP, iniciando la fase de multiplicación.

3.2.3. Ensayos de multiplicación (clones ‘VdF- Bs/Co’ y ‘Ramil’)

Ensayo sobre los clones ‘VdF’: consistió en la observación de la progresión del número de explantos y su tasa de multiplicación en los 4 primeros subcultivos. Los cultivos se mantuvieron bajo luz blanca neutra (LED 4000 K). Se realizaron subcultivos cada 30-35 días, tomándose datos de explantos iniciales y finales y de tasa de multiplicación.

Ensayo sobre el clon ‘Ramil’: el stock utilizado para el experimento fueron explantos obtenidos al final del sexto subcultivo tras su introducción *in vitro*, iniciándose el experimento en el 7º subcultivo. El ensayo consistió en evaluar el efecto sobre la tasa de multiplicación de dos tipos de luz (LED 4000 K y LED 5500 K). Cada tratamiento consistió en 3 repeticiones de 26 explantos. A los 35 días se registró la tasa de multiplicación en ambos tratamientos.

3.2.4. Enraizamiento *in vitro*

En los ensayos de enraizamiento se utilizaron dos métodos de inducción: 1)



inmersión basal de los explantos durante 1-2 min en una solución concentrada de ácido indolbutírico (AIB, 1,0 g·l⁻¹) y posterior transferencia a medio MB (sin reguladores de crecimiento), y 2) introducción directa en medio MB + 1,0 mg·l⁻¹ AIB.

Ensayo sobre el clon 'VdF-Bs': Se comparó la inmersión basal durante 1,5 min en AIB y posterior introducción en medio sin reguladores con la introducción directa de los explantos en medio con AIB. El tratamiento 'control' consistió en la introducción en medio MB, sin inducción auxínica. Los tratamientos estaban constituidos por 3 repeticiones de 12 explantos. A los 35 días se tomaron datos de porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explanto enraizado y longitud de la raíz más larga (en mm) por explanto enraizado.

Ensayos sobre el clon 'Ramil': inicialmente, se realizó un pequeño ensayo con 24 explantos sometidos a inmersión basal (1 o 2 min), realizándose posteriormente un ensayo más completo, en el que se evaluó el efecto combinado del tipo de luz (LED 4000 K y LED 5500 K) y el tratamiento de inducción (inmersión basal 1,5 min o introducción directa en medio con AIB). Se realizó un tratamiento 'control' en medio MB sin reguladores de crecimiento. Cada tratamiento consistió en 3 repeticiones de 6 explantos. A los 14, 21, 28 y 35 días se tomaron datos del porcentaje de explantos enraizados, número de raíces por explanto enraizado y longitud de la raíz más larga (mm) por explanto enraizado.

3.2.5. Ensayos de microinjerto

Los microinjertos se realizaron con la finalidad principal de evaluar en posteriores estudios su posible efecto de mejora de la capacidad de enraizamiento del clon 'Ramil'. Consistieron en una versión miniaturizada del injerto de hendidura, realizando un corte longitudinal en el portainjertos, previamente decapitado, e insertando en este la púa, cuya base se corta en forma de "V". La sujeción se lleva a cabo mediante la colocación de un anillo de silicona previamente ensartado en el portainjertos (Figura 2).

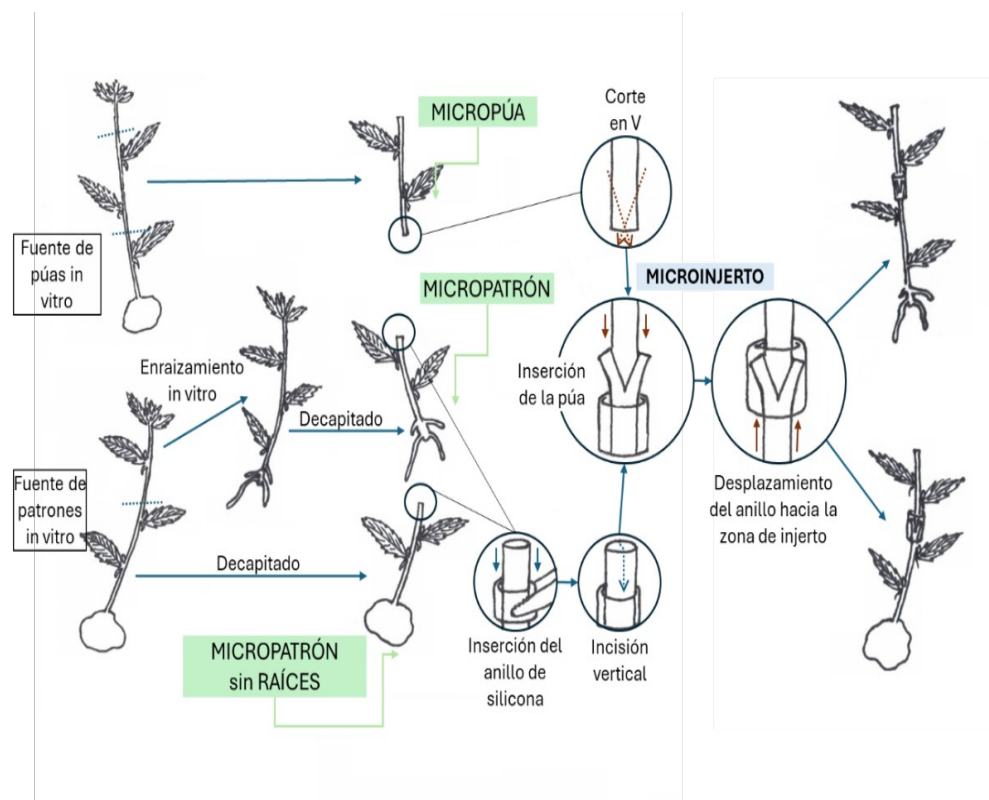


Figura 2. Ilustración de la realización de un microinjerto en castaño. © Fernández-Lorenzo, J.L.

Para preparar los portainjertos, se tomaron 24 explantos del clon ‘Branca’ (con alta capacidad de enraizamiento, >70%) al final de un ciclo de multiplicación, sometidos a inmersión basal (1 min en 1,0 g·l⁻¹ AIB) seguida de introducción en MB. Cuando emergieron las primeras raíces, se extrajo el portainjerto, se realizó el microinjerto de púas del clon ‘Ramil’ (explantos nodales de 2 cm, con 2 yemas axilares), obtenidos al final de un ciclo de multiplicación) y se reintrodujo en medio MB, con cuidado de no dañar las raíces. El microinjerto se realizó en condiciones asépticas, empleando como superficie de apoyo una placa Petri con papel de filtro humedecido y como instrumental se emplearon pinzas de disección y escalpelos de microcirugía. A los 30 días se registró el porcentaje de microinjertos prendidos y reactivos (aquellos en los que se observa crecimiento de la púa).

3.2.6. Aislamiento de meristemas

Sobre la base teórica del efecto de rejuvenecimiento que se puede obtener mediante “miniaturización” (MONTEUUIS, 2012), se ha ensayado el aislamiento de meristemas de brotes cultivados *in vitro* del clon ‘Ramil’, con la finalidad de mejorar su enraizamiento.

Se aislaron 12 secciones de meristemo apical (0,2-1,0 mm), a partir de las yemas apicales de 12 explantos obtenidos al final de un ciclo de multiplicación, y se introdujeron en medio de multiplicación (MB + 0,1 mg·l⁻¹ BAP), hundiéndolo levemente en el medio la cuchilla de microcirugía que portaba el fragmento de ápice meristemático. Pasados 30 días se realizó transferencia a medio fresco de los meristemas viables.

3.3. Tratamiento estadístico



Los análisis estadísticos se realizaron con el programa RStudio versión 4.0.2 (R Core Team, 2020). Se realizaron pruebas paramétricas en todos los casos. Previamente a la prueba ANOVA, se comprobó la normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, con un nivel de significación de 0,05. Se realizaron pruebas LSD en ensayos con más de 2 tratamientos cuando se detectaron diferencias significativas en el ANOVA.

4. Resultados

4.1. Producción de explantos por “forzado” de segmentos de rama

Los resultados del ensayo de forzado de segmentos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Producción de explantos del árbol monumental ‘Val da Fonte’ (clones ‘VdF-Bs’ y ‘VdF-Co’) a partir del forzado de brotes axilares en segmentos de rama; Expl/seg.: número medio de explantos por segmento de rama.

MT 5: HÁBITATS Y BIODIVERSIDAD



Clon	Nº segm.	Nº segm.	React.	Nº yemas	react.	Nº brotes	axilares	Nº expl.	obtenidos	Expl/	Seg.
VdF-Bs	18	12	31	52	72				4,0		
VdF-Co	11	4	8	14	8				0,73		

Como se puede observar, partiendo de un número reducido de segmentos de rama, condicionado por las limitaciones de disponibilidad de material de partida, al tratarse la planta madre de un árbol monumental sujeto a protección, se pudo obtener un número suficiente de explantos para iniciar los cultivos. En el caso del clon 'VdF-Bs' (que corresponde al portainjertos del árbol) se obtuvieron 72 explantos a partir de 18 segmentos de rama. En el caso del clon 'VdF-Co', el número de explantos obtenidos fue sensiblemente inferior (8), e incluso menor que el número de brotes axilares emergidos, puesto que algunos de estos brotes se marchitaron rápidamente antes de poder obtener de ellos explantos. El bajo número de explantos por segmento obtenidos del material procedente de la copa (0,73) da una idea de la dificultad para obtener explantos de este material, considerando las restricciones de recolección. La decisión de tratar todos los segmentos de este clon impregnando BAP en las yemas axilares respondió a la necesidad de maximizar la obtención de explantos.

En la Figura 3 se ilustran los datos relativos a las yemas reactivas por segmento y al número medio de días en que comienza la brotación, en función del clon. No se observaron diferencias significativas en cuanto a estos parámetros, aunque la brotación en 'VdF-Bs' parece comenzar antes.

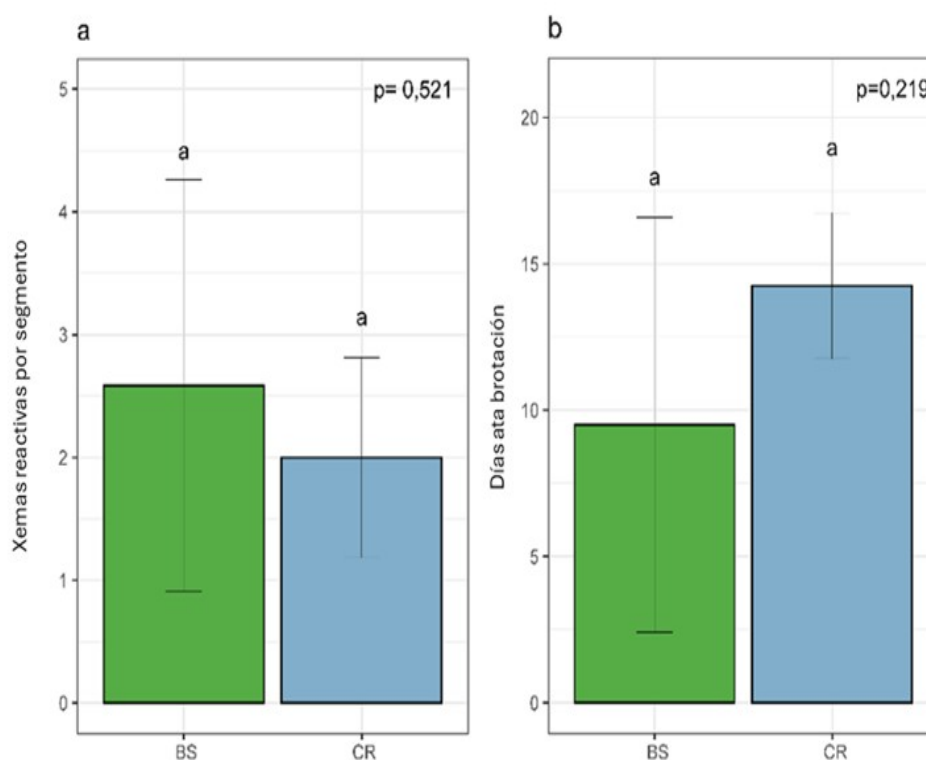


Figura 3. Yemas reactivas por segmento (a) y número medio de días hasta que se inicia la brotación (b) en función del clon (BS: 'VdF-Bs' o CR: 'VdF-Co'), en segmentos obtenidos del árbol monumental 'Val da Fonte'. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.2. Desinfección superficial, establecimiento *in vitro* y primeros subcultivos de los clones 'VdF-Bs' y 'VdF-Co'

Los resultados de la desinfección superficial de los explantos de los clones 'VdF-Bs' y 'VdF-Co' se reflejan en la Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de contaminación de los explantos de los clones 'VdF-Bs' y 'VdF-Co' a los 30 días, en función del protocolo de desinfección superficial; t: tiempo de inmersión (min); % Cl: porcentaje de cloro activo en la solución de hipoclorito sódico; e: explantos desinfectados; e. cont: explantos contaminados; % cont.: porcentaje de explantos contaminados.

Clon	Protoc.	t Et 70°	t NaClO	% Cl	e	e. cont	% cont
VdF-Bs	D1	0,75	12	0,8	2	2	100
D2	0,75	7-8	0,8	5	3		60
D3	0,5	7	0,6	15		0	
D4	0,5	5,5	0,6	50	1	2	
VdF-Co	D4	0,5	5'5	0'6	8	1	12,5

Los protocolos de desinfección empleados se han ordenado de mayor a menor intensidad. En los dos primeros protocolos, D1 y D2, los altos porcentajes de contaminación observados (60-100%) se corresponden a la primera puesta en cultivo, de tan sólo 7 explantos, del clon 'VdF-Bs', por lo que estos resultados deben ser tomados con cautela. En los protocolos D3 y D4 se ha empleado un número más elevado de explantos (65) del mismo clon, observándose que, globalmente, el porcentaje de contaminación no alcanza el 1%.

En el caso del clon 'VdF-Co', de los 8 explantos disponibles, únicamente 1 se contaminó. Basándonos en los resultados obtenidos con los protocolos D3 y D4, se puede considerar que estos protocolos son eficaces en la desinfección de explantos de los clones 'VdF-Bs' y 'VdF-Co', obtenidos de brotes axilares procedentes de forzado de segmentos de rama. Estos protocolos son similares a los empleados para la introducción *in vitro* de algunas variedades gallegas certificadas de castaño (*Castanea sativa*) (Fernández-Lorenzo et al. 2024a).

Con respecto al porcentaje de reactividad de los explantos, este fue del 100%. A los 35 días, los explantos se transfirieron del medio de establecimiento (MB + 1,0 mg·l⁻¹ BAP) al medio de multiplicación (MB + 0,1 mg·l⁻¹ BAP). La Figura 6 muestra la evolución del número de explantos y las tasas de multiplicación de cada subcultivo a lo largo de los 4 primeros subcultivos para los dos genotipos que constituyen el ejemplar 'Val da Fonte'.

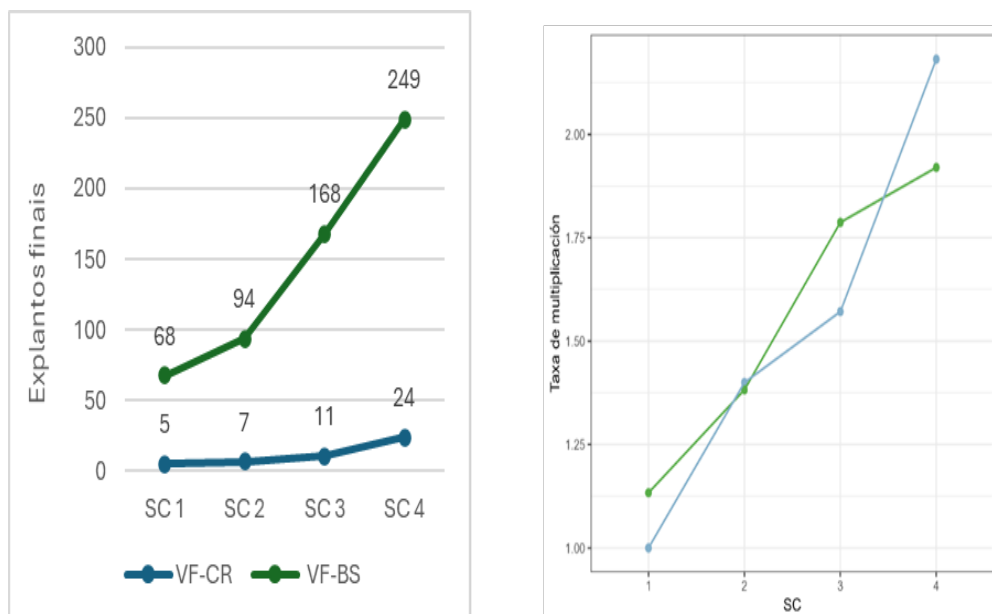


Figura 4. Evolución del número de explantos (izquierda) y tasas de multiplicación en cada subcultivo (derecha) en los 4 primeros subcultivos (SC) de los clones 'VdF-Bs' y 'VdF-Co'.

Como se puede observar, hay un aumento importante y sostenido en el número total de explantos del clon 'VdF-Bs', gracias a su buena respuesta desde el establecimiento *in vitro*. En el caso del clon 'VdF-Co', el aumento en el número absoluto de explantos es pequeño. Ahora bien, si nos basamos en las tasas de multiplicación, estas se asemejan para ambos clones, mejorando progresivamente a lo largo de los 4 primeros subcultivos, lo que induce a pensar que, en términos relativos, ambos materiales se comportan de forma semejante. En realidad, el criterio adoptado para la obtención de nuevos explantos en cada subcultivo tuvo que ser diferente para ambos clones, pues los explantos del clon 'VdF-Co' presentaban entrenudos más cortos, tallos más gruesos y hojas menos desarrolladas que los del clon VdF-Bs (Figura 5), por lo que el valor de las tasas de multiplicación considerado aisladamente no es en este caso un buen parámetro para estimar las diferencias en la capacidad de multiplicación de ambos clones.

En el caso del clon 'VdF-Bs', puede considerarse que la estabilización *in vitro* (es decir, la entrada en ciclos de multiplicación con tasas de multiplicación regulares) se ha completado o está muy próxima, mientras que en 'VdF-Co' aún será preciso obtener un mayor número de explantos y verificar que se siguen obteniendo tasas de multiplicación regulares que aseguren la conservación de la accesión. En todo caso, las tasas de multiplicación observadas son siempre superiores a 1,0, lo que asegura actualmente una multiplicación efectiva.



Figura 5. Explantos de los clones 'VdF-Bs' (izquierda) y 'VdF-Co' (derecha) al final de un ciclo de multiplicación (35 días).

En el caso del clon 'VdF-Bs', puede considerarse que la estabilización *in vitro* (es decir, la entrada en ciclos de multiplicación con tasas de multiplicación regulares) se ha completado o está muy próxima, mientras que en 'VdF-Co' aún será preciso obtener un mayor número de explantos y verificar que se siguen obteniendo tasas de multiplicación regulares que aseguren la conservación de la accesión. En todo caso, las tasas de multiplicación observadas son siempre superiores a 1,0, lo que asegura actualmente una multiplicación efectiva.

Efecto de la fuente de luz LED en la multiplicación in vitro del clon 'Ramil'

A diferencia de los clones procedentes del árbol monumental 'Val da Fonte' ('VdF-Bs' y 'VdF-Co'), que fueron introducidos *in vitro* durante la realización del presente estudio, el clon 'Ramil' ya había sido establecido *in vitro* y se encontraba en su sexto ciclo de multiplicación cuando se inició este trabajo. Sobre este material se realizó un experimento para evaluar el efecto sobre la tasa de multiplicación de la fuente de luz LED blanca en función de la temperatura de color (4000 K vs. 5500 K). La Figura 6 muestra la tasa de multiplicación a los 35 días en función de la fuente de luz. No se observan diferencias significativas en las tasas de multiplicación, que varían entre 1,6 y 1,7.

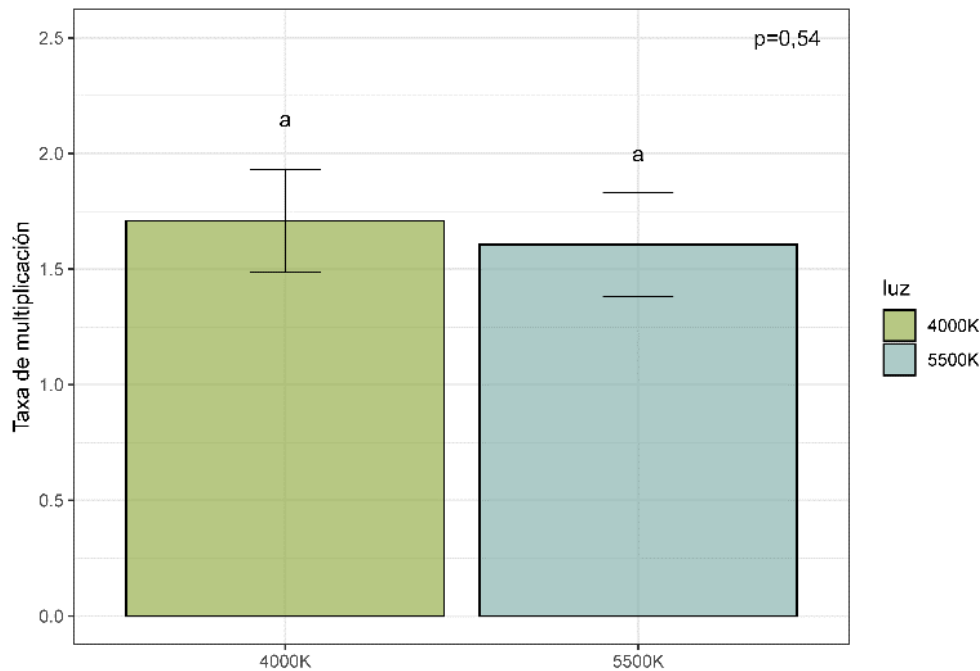


Figura 6. Tasa de multiplicación de explantos del clon 'Ramil' a los 35 días del subcultivo en función da temperatura de color de la luz LED blanca (4000 K o 5500 K). Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según la prueba LSD.

Aunque consideramos que el clon 'Ramil' está cercano a superar la fase de estabilización *in vitro*, sigue existiendo una cierta irregularidad en el comportamiento de los explantos, observándose fenómenos de necrosis con cierta frecuencia a lo largo de los ciclos de multiplicación (Figura 7).



Figura 7. Diferencias en el comportamiento de explantos del clon 'Ramil'; Arriba: explantos subcultivados en los que no se aprecia necrosis; Abajo: explantos no válidos para subcultivo en un brote necrosado.

4.3. Ensayos de enraizamiento

Enraizamiento del clon 'VdF-Bs': Como se ha mencionado en los resultados de multiplicación, al disponer actualmente de un número elevado de explantos del genotipo de la base del árbol monumental 'Val da Fonte' (clon 'VdF-Bs'), se realizó sobre este clon un experimento para determinar el efecto de dos métodos de inducción del enraizamiento *in vitro* mediante estímulo auxínico, a saber, (1) inmersión basal en una solución concentrada de AIB ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) seguida de la introducción en un medio sin reguladores (MB) y (2) introducción directa en MB + $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB. En la Figura 10 se muestran los porcentajes de enraizamiento, el número medio de raíces por explanto enraizado y la longitud de la raíz más larga por explanto enraizado a los 35 días del inicio del experimento. Se han omitido los datos correspondientes al tratamiento control (sin estímulo auxínico), porque no se observó enraizamiento.

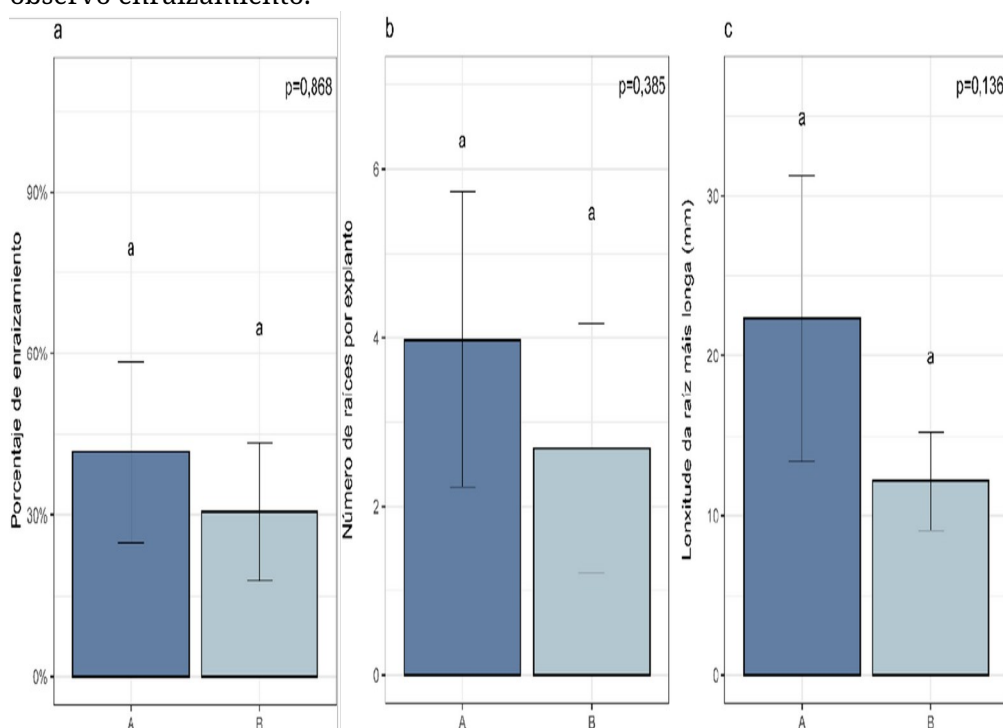


Figura 8. Porcentaje de enraizamiento, número de raíces por explanto enraizado y longitud de la raíz más larga (en mm) por explanto enraizado en el clon 'VdF-Bs'; A: inducción por inmersión basal en una solución de $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB seguida de introducción en MB; B: inducción por introducción directa en MB + $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($\leq 0,05$), según la prueba LSD.

Como se puede apreciar, no existen diferencias significativas entre ambos métodos de inducción para ninguno de los parámetros estudiados. Aunque no se observan diferencias estadísticas significativas en cuanto al número de raíces por explanto enraizado y la longitud de las raíces, se percibe que los explantos tratados mediante inmersión basal presentan una cierta tendencia a desarrollar un sistema radicular de mejor calidad (Figura 9), pues este sistema permite reducir los posibles efectos inhibidores de las auxinas a medio y largo plazo sobre el desarrollo de las raíces (DE KLERK, 2002).



Figura 9. Explanto del clon 'VdF-Bs' a los 35 días de la inducción auxínica por inmersión basal en una solución concentrada de AIB (1 g·l⁻¹).

Enraizamiento del clon 'Ramil': De la misma manera que en el clon 'VdF-Bs', en este experimento se ha pretendido evaluar la capacidad de enraizamiento que presenta el clon 'Ramil' para poder valorar el objetivo de regenerar plantas completas de este clon sobre sus propias raíces.

En una prueba de enraizamiento preliminar, realizada tras el séptimo subcultivo, se comparó el efecto del tiempo de inmersión (1 o 2 min) en la inducción mediante inmersión basal en una solución concentrada de AIB (1,0g·l⁻¹), no obteniéndose enraizamiento en ninguno de los tratamientos, lo que refleja la dificultad de enraizamiento de explantos procedentes de un árbol tan longevo, unido al hecho de que solo se pudo obtener explantos a partir de ramas de la copa del árbol, al no poderse disponer de brotes basales. Dos ciclos de multiplicación más adelante, tras el noveno subcultivo, se realizó el experimento en el que se analizó el efecto del tratamiento de inducción (inmersión basal o introducción directa en medio con AIB), ya descrito para el enraizamiento de 'VdF-Bs', combinado con el tipo de luz (LED blanca 4000 K o 5500 K). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10.

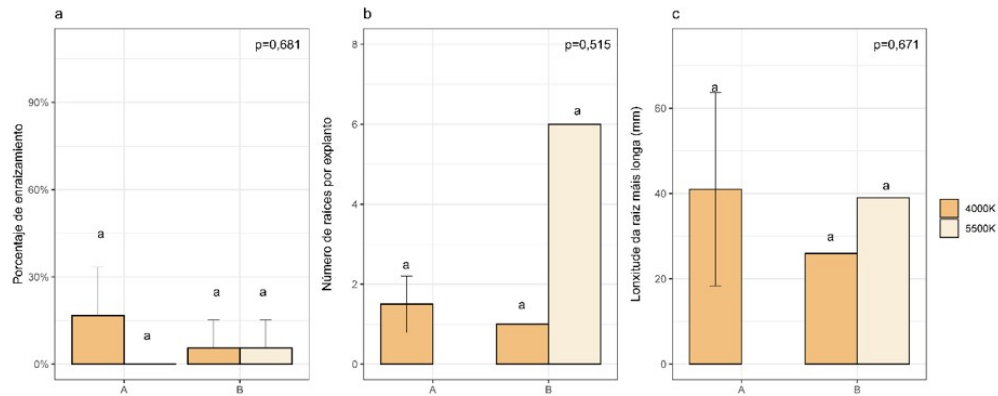


Figura 10. (a) Porcentaje de enraizamiento, (b) número de raíces por explanto enraizado y (c) longitud de la raíz más larga (mm) por explanto enraizado de los explantos del clon 'Ramil' a los 35 días del inicio del experimento. A: inducción por inmersión basal ($1,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB) + introducción en MB (sin reguladores); B: inducción por introducción directa en MB + $1,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ AIB. Los resultados se expresan como la media $\pm$ desviación típica (barras verticales). Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas ($\leq 0,05$), según la prueba LSD.

Como se observa, no existen diferencias significativas en función de los tratamientos ensayados para el porcentaje de enraizamiento ni en cuanto a la calidad del enraizamiento (número de raíces y longitud de la raíz más larga). Las tasas de enraizamiento no superan el 16,67%, lo que refleja la dificultad de enraizamiento del clon 'Ramil'.

4.4. Microinjerto sobre material con alta capacidad organogénica

La Tabla 4 muestra los resultados de prendimiento obtenidos sobre 24 microinjertos, usando como púas explantos del clon 'Ramil' y como patrón explantos enraizados de la variedad gallega certificada de castaño 'Branca'.

Tabla 4. Microinjertos prendidos (μ -inj. prend.), porcentaje de prendimiento (%prend.) y número y porcentaje de microinjertos reactivos (en los que se observó desarrollo de la púa) (μ -inj. react.; % react.), sobre un total de 24 microinjertos constituidos por púas del clon 'Ramil' sobre portainjertos enraizados del clon 'Branca', a los 20, 30 y 40 días (d) de su realización.

d	μ -inj. prend.	% prend.	μ -inj. react.	% react.
20	12	50	3	12,5
30	14	58,3	9	37,5
40	14	58,3	11	45,8

Como se observa en la Tabla 4, el porcentaje de prendimiento fue casi del 60%, alcanzando el valor máximo a los 30 días. Las púas comenzaron a desarrollarse en

su mayoría entre los 20 y 30 días. Cerca de la mitad (45,83%) de los microenjertos realizados prendieron y presentaron desarrollo posterior de la púa a los 40 días. A partir de los microinjertos en los que se desarrolló la púa se han recuperado nuevos explantos del clon 'Ramil', que constituyen actualmente un nuevo stock, caracterizado por proceder de un tratamiento de microinjerto temporal sobre material con alta capacidad de enraizamiento (clon 'Branca'). En el tiempo de redacción del presente trabajo, se dispone en el laboratorio de más de 50 explantos en el cuarto ciclo de multiplicación, procedentes del reaislamiento tras el microinjerto. Este stock será evaluado en futuros experimentos para verificar si presenta una mejora tanto en términos de multiplicación como de enraizamiento con respecto al material control.

4.5. Aislamiento y cultivo de meristemos

En un experimento preliminar de aislamiento de meristemos se aislaron e introdujeron en cultivo 12 meristemos apicales (0,2-1 mm) obtenidos de 12 ápices caulinares procedentes de explantos del clon 'Ramil'. A los 30 días del aislamiento, 8 de ellos (66,67%) sobrevivieron, presentando un desarrollo variable (Figura 15). En la actualidad, se dispone de un pequeño stock de 18 explantos en el tercer ciclo de multiplicación desde el aislamiento, que, al igual que en el caso del stock procedente de microinjerto, formarán parte de experimentos para verificar si se obtiene una mejora de la capacidad organogénica con respecto al stock original.



Figura 11. Brote obtenido de un meristemo del clon 'Ramil', aislado y cultivado *in vitro*.

5. Discusión

Los resultados demuestran que el forzado de segmentos de rama permite obtener explantos reactivos para la introducción *in vitro* de material vegetativo de árboles monumentales de *Castanea sativa*. Esta técnica ya había sido utilizada con éxito en el establecimiento *in vitro* de explantos de un árbol monumental de *Quercus robur* 'Fastigiata' (CRECENTE & FERNÁNDEZ-LORENZO, 2016). La diferencia en la capacidad productiva observada entre los segmentos de los dos clones establecidos a partir del árbol monumental "Val da Fonte" podría deberse en parte al factor genotipo, pero el efecto de topófisis, según el cual las partes más bajas y más cercanas al tronco (en este caso, las del clon VdF-Bs) presentan una mayor

juvenilidad ontogenética (SÁNCHEZ et al., 1991) juega sin duda un papel relevante en la respuesta. Estas diferencias también se han manifestado en el menor tiempo requerido para la estabilización *in vitro* del clon que representa el portainjertos del árbol monumental 'Val da Fonte'.

Los ensayos realizados durante la fase de multiplicación han demostrado que las luces LED son efectivas en la propagación *in vitro* de los clones introducidos. El uso de luces LED para la propagación *in vitro* es cada vez más frecuente, por las ventajas que confiere con respecto al uso de la luz blanca fluorescente, en términos de ahorro energético y de versatilidad de espectro. Estudios recientes han demostrado que este tipo de luces resulta efectivo en el cultivo *in vitro* de *Castanea sp.*, y que la luz blanca neutra (4000 K) puede proporcionar resultados similares (como se ha observado en el presente estudio) o incluso mejores que la luz blanca fría (5500-6500 K), que es la más utilizada tradicionalmente (FERNÁNDEZ-LORENZO et al., 2024a).

Una fase crítica en la obtención de plantas micropropagadas de castaños monumentales es el enraizamiento, puesto que *Castanea sativa* es una de las muchas especies arbóreas que pierde progresivamente la capacidad de enraizamiento adventicio con la maduración y el envejecimiento (SÁNCHEZ et al, 1991). En el presente estudio, en el caso del clon VdF-Bs, a pesar de su elevada edad, cronológica y ontogenética, los valores de enraizamiento obtenidos (30-40%), pueden considerarse moderadamente elevados. Estos resultados son de gran interés si se pretende regenerar y aclimatar ejemplares microinjertados constituidos por los dos genotipos que conforman el árbol monumental 'Val da Fonte', pues en ese caso es indispensable que el genotipo de la base (clon 'VdF-Bs') presente una capacidad de enraizamiento suficiente para servir como patrón para los microinjertos.

En el caso del otro clon estudiado en este trabajo, representativo del castaño monumental 'Ramil', las tasas de enraizamiento no han superado el 16,67%, lo que refleja, como era de esperar, la dificultad de enraizamiento de este clon. Ahora bien, estas tasas representan una mejora con respecto a ensayos realizados en ciclos de multiplicación precedentes, en los que no se había observado enraizamiento, lo que puede relacionarse con el efecto del subcultivo continuo *in vitro* sobre la mejora de la capacidad de enraizamiento adventicio. Otros autores han demostrado que el subcultivo continuo puede aumentar la capacidad de enraizamiento *in vitro* en *Castanea sativa* (GIOVANNELLI & GIANNINI , 2000; FERNÁNDEZ-LORENZO et al, 2024a). En cualquier caso, la baja capacidad de enraizamiento que expresa el clon 'Ramil' en la actualidad obliga a abordar el desarrollo de técnicas complementarias al subcultivo continuo que promuevan el aumento de su capacidad de enraizamiento, como el microinjerto sobre patrones juveniles o la miniaturización mediante aislamiento y cultivo de meristemos. Los resultados de los ensayos de microinjerto desarrollados en este trabajo en el clon 'Ramil' son prometedores -teniendo en cuenta que se trata de un estudio preliminar, en el que factores como el diámetro, longitud y tipo de explanto (apical o axilar, con una o más yemas axilares...) o medio de cultivo, entre otros, no han sido aún analizados en profundidad-, puesto que se obtuvieron porcentajes de prendimiento y desarrollo de la púa razonablemente elevados, en la línea de los obtenidos en otros trabajos sobre castaño (FERNÁNDEZ-LORENZO & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2005; FERNÁNDEZ-LORENZO et al., 2024b). En lo que respecta al aislamiento y cultivo de meristemos en este mismo clon, el porcentaje desupervivencia y regeneración de brotes a partir de los meristemos aislados



constituye un éxito, sobre todo teniendo en cuenta la gran dificultad de aplicación de esta técnica, que requiere alta precisión y destreza para realizar el aislamiento y la introducción en el medio en un tiempo muy corto, evitar la desecación del meristemo y minimizar el exudado de compuestos fenólicos. Prueba de la alta dificultad de esta técnica en *Castanea sativa* es la ausencia de publicaciones, para nuestro conocimiento, que describan el aislamiento y cultivo *in vitro* de meristemos en esta especie.

6. Conclusiones

Este trabajo muestra la posibilidad de obtener accesiones constituidas por explantos procedentes de brotes axilares de ramas de los árboles singulares 'Val da Fonte' y 'Ramil'. El subcultivo sucesivo *in vitro* parece proporcionar una mejora de la capacidad organogénica de los genotipos establecidos. Aspectos como la calidad de la luz LED en función de la temperatura de color pueden jugar un papel importante y deberían formar parte de los experimentos para obtener protocolos válidos en esta y otras especies. La posible mejora de la capacidad organogénica del clon 'Ramil' mediante microinjerto y aislamiento de meristemos (miniaturización) debe ser analizada. En este trabajo se muestra que es posible aplicar con éxito ambas técnicas sobre los clones estudiados.

7. Bibliografía

BERNÁRDEZ, J.G. y RIGUEIRO, A. (2020). Árbores e formacións senlleiras da contorna dos Ancares e do Courel. Monografías do Ibader - Serie Cadernos da Estación Científica do Courel 3. Ibader. Universidade de Santiago de Compostela. Lugo. 108pp.

BRÄUTIGAM, K., VINING, K.J., LAFON-PLACETTE, C., FOSSDAL, C.G., MIROUZE, M., MARCOS, J.G., FLUCH, S., FRAGA, M.F., GUEVARA, M.A., ABARCA, D., JOHNSEN, O., MAURY, S., STRAUSS, S.H., CAMPBELL, M.M., ROHDE, A., DÍAZ-SALA, C., & CERVERA, M.T. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecol. Evol.*, 3: 399–415.

CANNIZZARO, S., & CORINTO, G.L. (2014). The role of monumental trees in defining local identity and in tourism: a case study in the Marches Region. *Geoprogess Journal*, 1 (1): 29-48.

CORREDOIRA, E., MARTÍNEZ, M.T., CERNADAS, M.J. & SAN JOSÉ, M.C. (2017). Application of biotechnology in the conservation of the genus *Castanea*. *Forests*, 8 (10): 394.

CRECENTE-CAMPO S. & FERNÁNDEZ-LORENZO J.L. (2016). Production of grafted plants of mature *Quercus robur* L. 'Fastigiata' through serial grafting on juvenile rootstocks and effect on micropropagation. *Propag. Ornam. Plants*, 16 (2): 47-55.

DE KLERK, G.J. (2002). Rooting of microcuttings: theory and practice. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38 (5): 415-422.



DECRETO 37/2023, de 4 de abril, por el que se regula el procedimiento de declaración de inclusión o exclusión, en el inventario de árboles y ejemplares singulares de Castilla-La Mancha, así como su régimen de protección y los rodales de bosque próximos a la madurez forestal en Castilla-La Mancha. Nº 77: Pag.13225. Diario Oficial de Castilla-La Mancha.

DECRETO 67/2007, do 22 de marzo, polo que se regula o Catálogo Galego de árbores senlleiras. Nº 74: 6.136-6.141. Consellería de Medio Ambiente e Desenvolvemento Sostible. Diario Oficial de Galicia.

FERNÁNDEZ-CRUZ, J. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. (2012). Morphological, molecular and statistical tools to identify *Castanea* species and their hybrids. *Conserv. Genet.* 13:1589-1600.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. & FERNÁNDEZ-CRUZ, J. (2015). Identification of traditional Galician sweet chestnut varieties using ethnographic and nuclear microsatellite data. *Tree Genet. & Genomes*, 11: 111.

FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.J. (2005). Reinvigoration of mature *Castanea sativa* by serial micrografting onto a juvenile clone. *Acta Hortic.*, 693: 293-298.

FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L., COUSO, A., FERREIRO, N., MOSQUERA-LOSADA, R. & RIGUEIRO, A. (2024b). Protocols for the micropropagation of several chestnut cultivars. *Acta Hortic.*, 1400: 211-220.

FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L., PRADO, A.N., COUSO, A., FERREIRO, N., MOSQUERA-LOSADA, R. & RIGUEIRO, A. (2024a) *In vitro* micrografting of selected Galician chestnut cultivars on chestnut hybrids (*Castanea*×*coudercii*). *Acta Hortic.*, 1400: 245-252.

FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L.; COUSO, A.; GÓMEZ, L.; 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. Xunta de Galicia, xuño 2023. *Informe interno*, 134 pp.

GIOVANNELLI A. & GIANNINI R. (2000). Reinvigoration of mature chestnut (*Castanea sativa*) by repeated graftings and micropropagation, *Tree Physiol.*, 20 (18): 1243-1248.

LLOYD, G. & MCCOWN, B.H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30:421-427.

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.

MONTEUUIS, O. (2012). *In vitro* grafting of woody species. *Propag. of Ornam. Plants*, 12 (1): 11-24.

PAVESE, V., RUFFA, P., ABBÀ, S., LOURENÇO COSTA, R., CORREDOIRA, E., SILVESTRI, C., TORELLO MARINONI, D. & BOTTA, R. (2022). An *in vitro* protocol for propagating *Castanea sativa* Italian cultivars. *Plants*, 11 (23): 3308.

PEREIRA-LORENZO, S., RAMOS-CABRER, A. M., BARRENECHE, T., MATTIONI, C., VILLANI, F., DÍAZ-HERNÁNDEZ, B., MARTÍN, L.M., ROBLES-LOMA, A., CÁCERES, Y. & MARTÍN, A. (2019). Instant domestication process of European chestnut cultivars. *Ann. Appl. Biol.*, 174 (1): 74-85.

SÁNCHEZ M.C. & VIEITEZ A.M. (1991). *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut, *Tree Physiol.*, 8 (1): 59–70.

VIDOY-MERCADO, I., NARVÁEZ, I., PALOMO-RÍOS, E., LITZ, R.E., BARCELÓ-MUÑOZ, A. & PLIEGO-ALFARO, F. (2021). Reinvigoration/Rejuvenation induced through micrografting of tree species: Signaling through graft union. *Plants*, 10 (6): 1197.

VIEITEZ, A.M., SÁNCHEZ, M.C., AMO-MARCO, J.B. & BALLESTER, A. (1994). Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 37: 287–295.