



## 6º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

---

**6CFE01-230**

---

Montes: Servicios y desarrollo rural  
10-14 junio 2013  
Vitoria-Gasteiz



---

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales  
Vitoria-Gasteiz, 10-14 junio de 2013  
ISBN: 978-84-937964-9-5  
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

## Micropropagación de *Castanea sp.* mediante Inmersión Líquida Transitoria (TIS)

CUENCA VALERA, B.<sup>1</sup>, CORREA GARCÍA, B.<sup>2</sup> y VIDAL GONZÁLEZ, N.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> TRAGSA. Dpto de Mejora Agroforestal

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (CSIC).

### Resumen

El sistema habitual de producción de brotes de castaño por cultivo *in vitro* es la multiplicación de yemas axilares, que con vistas a la producción a gran escala resulta poco eficiente en términos económicos. Para mejorar este aspecto se ha procedido al desarrollo de un sistema de micropropagación utilizando biorreactores de inmersión temporal (TIS), con el fin de reducir costes de producción y mejorar la calidad de los brotes con vistas a la aclimatación de las plantas. En este trabajo se presentan los resultados de evaluar diferentes tipos de envases, número de inmersiones, medios de cultivo, presencia o no de soporte y tipo de explanto en 7 clones de castaño. Los tratamientos se han evaluado en función de las tasas de multiplicación, la proporción de brotes sin características de hiperhidricidad y la proporción de brotes enraizables. Los experimentos realizados han permitido obtener por primera vez en este género un protocolo eficaz de cultivo mediante TIS, que consiste en cultivar segmentos apicales y nodales y callos basales en los biorreactores RITA<sup>®</sup> o PlantForm<sup>®</sup> sobre dados de lana de roca, e incluso sin sustrato en el caso de los callos basales en PlantForm<sup>®</sup>. Los segmentos apicales y nodales se cultivan en medio GD para mantener el stock, y los callos basales en medio MS con nitratos a la mitad para generar brotes elongados que se enraizan *ex vitro*.

### Palabras clave

Cultivo *in vitro*, biorreactores, castaño, fotoautotrofismo, hidricidad.

## 1. Introducción

El castaño es una especie forestal de considerable importancia agroeconómica pero recalcitrante a la propagación vegetativa por métodos convencionales (estaquillado, injerto, etc.). El cultivo *in vitro* por el método de yemas axilares constituye un sistema adecuado para su propagación, aunque económicamente es poco rentable si se persigue su producción a gran escala.

Desde el año 2000, el Vivero de TRAGSA ha desarrollado un programa de obtención de nuevos materiales forestales de reproducción (MFR) de castaño del país mediante selección en campo de genotipos resistentes a *Phytophthora cinnamomi*. En el contexto de este programa se seleccionaron 206 genotipos, de los que 137 se han establecido en cultivo *in vitro* convencional con éxito. Tras la realización de los test de resistencia 7 de ellos se han propuesto al Catálogo Nacional de Materiales de Base (CNMB) como clones resistentes de categoría cualificada y serán producidos a gran escala para su comercialización (CUENCA et al., 2010).

Con el fin de propagar eficientemente este material seleccionado, se ha abordado la tarea de su producción utilizando biorreactores con medio líquido, puesto que este sistema induce una mayor proliferación en los tejidos vegetales. Además, permite un mayor grado de

automatización, así como reducir costes y residuos, ya que se elimina el agar como agente gelificante. Sin embargo, el cultivo en biorreactores convencionales presenta problemas para algunas especies, ya que al estar los brotes continuamente sumergidos en medio líquido pueden producirse síntomas de anoxia e hiperhidricidad. La hiperhidricidad, inicialmente denominada vitrificación, consiste en un aumento de la cantidad de agua presente en los tejidos, con engrosamiento de hojas y tallos y, lo que es más importante, una disminución drástica de la capacidad de proliferación y enraizamiento. El castaño es una especie proclive a la formación de brotes hiperhídricos incluso cuando se cultiva en medio semisólido con agar (VIEITEZ et al., 1985) por lo que no parecía adecuado utilizar para esta especie un sistema de inmersión continua. La alternativa la constituyen los sistemas de inmersión temporal (TIS) donde los explantos sólo están en contacto con el medio de cultivo unos minutos al día (ETIENNE & BERTHOULY 2002). En estos sistemas, además, se produce un intercambio gaseoso con el exterior de los contenedores, ya que el movimiento del medio se debe a la entrada en los contenedores, a intervalos regulares, de aire estéril impulsado por una bomba.

En la actualidad esta tecnología de TIS ya se ha aplicado al cultivo por yemas axilares de numerosas plantas herbáceas e incluso leñosas (AITKEN-CHRISTIE & JONES, 1987; ZHU et al., 2005; MURCH et al., 2004; QUIALA et al., 2012), pero no a especies forestales caducifolias como el castaño, ni a ninguna otra especie de la familia Fagaceae.

## 2. Objetivos

Se pretende desarrollar un sistema de producción a gran escala de clones de castaño resistentes a la enfermedad de la tinta seleccionados por la Unidad de Viveros de TRAGSA mediante su cultivo *in vitro* en distintos tipos de biorreactores, evaluándolos según las tasas de multiplicación y la calidad de los brotes, con vistas al enraizamiento y aclimatación.

## 3. Metodología

Se han utilizado cultivos de brotes de castaño de 8 clones de origen adulto (3, 111, 1483, 7521, 90025, PO28, PO43, y CO63) establecidos *in vitro* en la Unidad de Viveros de TRAGSA. Los clones 3, 111, 1483, 90025 y 7521 son híbridos artificiales de *C. sativa* x *C. crenata* en los cuatro primeros casos y de *C. sativa* x *C. mollissima* en el último caso, incluidos en el CNMB. Los clones PO28, PO43, y CO63 corresponden a la nueva selección de TRAGSA y se han caracterizado como híbridos espontáneos puesto que presentan algunos alelos exclusivos tanto de *C. sativa* como de *C. crenata*. (GONZÁLEZ et al., 2011). Los medios utilizados fueron GD (GRESSHOFF & DOY, 1972) (ápices y nudos) o MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) con los nitratos reducidos a la mitad (callos basales), en ambos casos suplementados con 0,1 ó 0,05 mg/L de N<sup>6</sup>-benzyladenina (BA) y 3% de sacarosa. El pH se ajustó a 5,6 antes del autoclavado a 121° C. Los medios semisólidos (SS) fueron gelificados con 0,7% (w/v) Bacto agar. En todos los casos los cultivos se incubaron en cámaras de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16 h suministrado por lámparas fluorescentes de luz blanca y fría (50-60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) con un régimen de 25° C en el período de luz y 20° C en el de oscuridad.

Se utilizaron diferentes biorreactores de Inmersión Temporal (Foto1): frascos de vidrio organizados en 4 módulos (Mod) diferentes, A y D (1 L), B (10 L), y C (5 L), diseñados y montados en la Unidad de Viveros de TRAGSA, y reactores comerciales RITA<sup>®</sup> (Vitropic; www.vitropic.fr) y PlantForm<sup>®</sup> (www.plantform.se). El volumen de medio líquido en los

biorreactores fue de 150 mL para los RITA<sup>®</sup> y ModA, 260 mL para el ModB, 500 mL para los PlantForm<sup>®</sup> y ModC, 600 mL para ModD y 1 L para ModB. En los envases PlantForm<sup>®</sup> y los módulos diseñados en TRAGSA, a diferencia de los RITA<sup>®</sup>, es posible realizar aireaciones adicionales a las que tienen lugar con las inmersiones del medio de cultivo.

Los parámetros testados en los biorreactores han sido: 1) tipo de explanto inicial (segmentos apicales (ápices), nodales (nudos) y callos basales (callos)), 2) reguladores de crecimiento, 3) n° de inmersiones diarias (inm) y 4) diferentes soportes para los explantos. Dichos parámetros se evaluaron a través de las siguientes variables: aspecto de los brotes obtenidos (% de brotes hiperhídricos; % BH), capacidad de multiplicación (n° de segmentos/explanto (NS) y longitud máxima/explanto (LB)) y porcentaje de brotes enraizables (% BEnr), que corresponde a brotes mayores de 3-4 cm y con un ápice en crecimiento activo. En todos los casos se utilizaron cultivos en medio SS como controles. Los brotes de 3-4 cm de longitud se utilizaron para realizar ensayos de enraizamiento *ex vitro*, sometiéndolos a inmersión basal en una disolución de 1 g/L de ácido indol-3-butírico (AIB) durante 1 minuto, seguido de su establecimiento en sustrato turba- perlita (1:1).

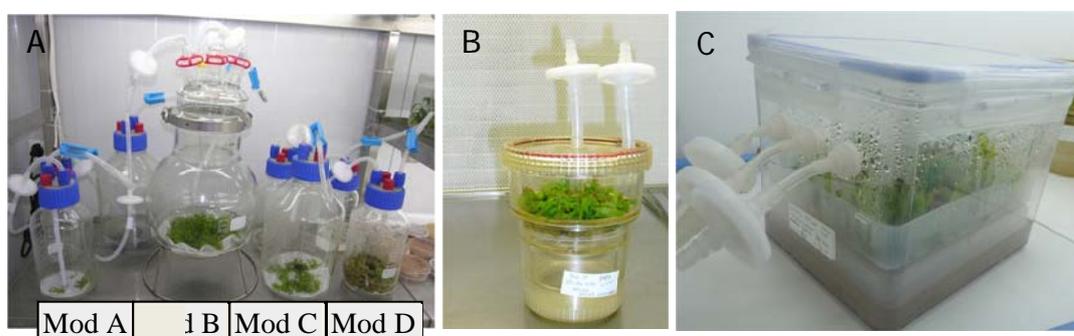


Foto 1. Biorreactores utilizados en los ensayos de inmersión temporal. A. Reactores diseñados en TRAGS. B. Reactores comerciales RITA<sup>®</sup>. C. PlantForm<sup>®</sup>.

El efecto de los diferentes parámetros evaluados sobre las variables medidas se evaluó mediante Análisis de Varianza (ANOVA1 o ANOVA2). Se utilizaron 3 repeticiones de 24 explantos cada una. La comparación entre medias se realizó mediante el test de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) al 5% de probabilidad ( $p = 0,05$ ). Previamente al análisis de la varianza se comprobaron las hipótesis de homocedasticidad, normalidad e independencia, y los datos porcentuales fueron transformados mediante la raíz cuadrada del arcoseno.

#### 4. Resultados

Los ensayos preliminares realizados con 4 clones de castaño (7521, 111, 1483 y 90025) indicaron la necesidad de reducir a la mitad (0,05 mg/L) los niveles de BA en el medio líquido con respecto al SS y de utilizar un soporte inerte que permitiese mantener los explantos en posición vertical durante las inmersiones, ya que de otro modo todos los brotes presentaban hiperhidricidad.

En la Figura 1 se presenta el efecto sobre la calidad de los brotes de situar los explantos sin soporte, entre dados de lana de roca o entre ranuras de fieltro (1A), y del tipo de explanto inicial, segmentos apicales o callos basales (2B). El uso de un soporte, especialmente discos de fieltro, mejora la calidad de los brotes, produciendo menos brotes hiperhídricos. Sin embargo, disponer los explantos entre ranuras del fieltro resultó ser un método tedioso e incompatible con la automatización del sistema de cultivo, por lo cual fue necesario buscar

otras soluciones al problema de la hiperhidricidad. Por otra parte, los callos basales con yemas incipientes suponen un explanto de partida adecuado para la propagación en inmersión temporal, puesto que generan más brotes, más largos y menos hídricos que los ápices.

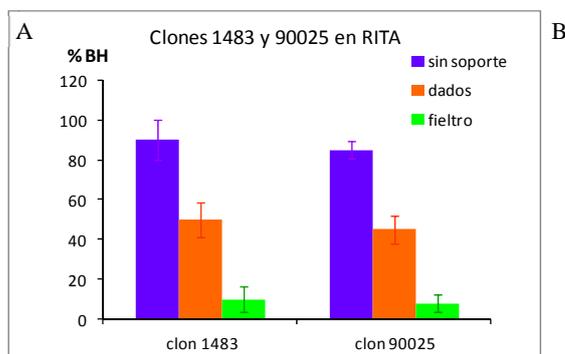


Figura 1. A. Efecto del soporte sobre la calidad de los brotes obtenidos de segmentos nodales de los clones 1483 y 90025 cultivados en RITA<sup>®</sup> (2 inmersiones diarias), y B. Efecto del tipo de explanto inicial sobre las tasas de multiplicación y calidad de los brotes del clon 111 cultivados en los módulos C y D diseñados en TRAGSA (B). (BH: Brotes Hídricos; NS, n° de segmentos obtenidos por explanto inicial; LB, longitud del brote más largo de cada explanto(cm)).

Con el fin de aumentar la calidad de los brotes y las tasas de multiplicación, se evaluó el efecto del n° de inmersiones en los clones 90025 y 1483 cultivados en envases RITA<sup>®</sup> con lana de roca (Figura 2). Aunque los datos parecen indicar un ligero mejor comportamiento de los segmentos apicales con el incremento de inmersiones, el % BH sigue siendo demasiado alto, sobre todo en el clon 1483, y no se alcanzan las tasas de multiplicación del medio SS.

A

A

Figura 2. Efecto del n° de inmersiones en las tasas de proliferación y calidad de los brotes obtenidos a partir de segmentos nodales o apicales de los clones 1483 (A) y 90025 (B) propagados en RITA<sup>®</sup>. NS: n° de segmentos por explanto inicial; LB: longitud del brote más largo (cm); % BH: porcentaje de brotes hídricos.

En otra serie de experimentos, se evaluó el uso de nuevos contenedores de inmersión temporal (PlantForm<sup>®</sup>) frente a los envases RITA<sup>®</sup> y al medio SS (Tabla 1). Para ambos clones, los envases PlantForm<sup>®</sup> generan significativamente más brotes que los RITA<sup>®</sup> y estos son significativamente más largos, más válidos para enraizar y menos hídricos. En el caso del clon 90025, los resultados obtenidos con el sistema PlantForm<sup>®</sup> son incluso superiores al sistema SS. En este clon y empleando envases PlantForm<sup>®</sup>, fue posible incluso propagar callos sin soporte (datos no mostrados) sin que se mostrasen síntomas de hiperhidricidad. Se obtuvo un % BEnr mayor que al emplear dados de lana de roca ( $152,6 \pm 45,5$  frente a  $124,9 \pm 8,4$  %), si bien con menor tamaño de superficie foliar.

Tabla 1. Efecto del sistema de cultivo y tipo de explanto en las tasas de proliferación (NB: N° de segmentos; LB: Longitud del brote más largo (cm); % BEnr.: % de brotes enraizables) y calidad de los brotes (% BH: % de brotes hídricos) en los clones 1483 y 90025. Los explantos cultivados en RITA® y PlantForm® se sometieron a 3 inmersiones diarias y los de PlantForm® a 16 aireaciones suplementarias. Los datos presentados son medias  $\pm$  error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel de 95% de probabilidad.

Tipo de explanto	Sistema de cultivo			Medias (tipo de explanto)	
	PlantForm® (TIS)	RITA® (TIS)	SS		
<b>Clon 90025</b>					
NB.	Callos	8,6 $\pm$ 0,33	5,6 $\pm$ 0,26	5,3 $\pm$ 0,20	6,7 $\pm$ 0,18 a
	Ápices	4,6 $\pm$ 0,30	3,4 $\pm$ 0,08	2,6 $\pm$ 0,12	3,4 $\pm$ 0,07 c
	Nudos	4,0 $\pm$ 0,26	3,9 $\pm$ 0,08	3,4 $\pm$ 0,15	3,8 $\pm$ 0,07 b
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>6,6 <math>\pm</math> 0,23 a</b>	<b>3,8 <math>\pm</math> 0,06 b</b>	<b>3,7 <math>\pm</math> 0,10 b</b>	
LB (cm)	Callos	6,9 $\pm$ 0,20	4,9 $\pm$ 0,22	4,5 $\pm$ 0,16	5,6 $\pm$ 0,13 a
	Ápices	4,1 $\pm$ 0,21	3,2 $\pm$ 0,06	2,2 $\pm$ 0,08	3,1 $\pm$ 0,05 c
	Nudos	3,3 $\pm$ 0,16	3,5 $\pm$ 0,06	2,8 $\pm$ 0,11	3,4 $\pm$ 0,05 b
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>5,4 <math>\pm</math> 0,15 a</b>	<b>3,5 <math>\pm</math> 0,05 b</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,08 c</b>	
% BEnr	Callos	124,9 $\pm$ 8,37	65,8 $\pm$ 8,55	43,4 $\pm$ 5,47	93,8 $\pm$ 5,52 a
	Ápices	33,9 $\pm$ 6,67	28,2 $\pm$ 2,32	6,7 $\pm$ 3,25	26,6 $\pm$ 2,02 b
	Nudos	16,2 $\pm$ 3,51	27,1 $\pm$ 2,47	14,7 $\pm$ 4,33	23,8 $\pm$ 5,52 b
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>77,9 <math>\pm</math> 5,46 a</b>	<b>30,5 <math>\pm</math> 1,72 b</b>	<b>23,7 <math>\pm</math> 2,93 c</b>	
% BH	Callos	4,5 $\pm$ 1,46	84,0 $\pm$ 2,83	2,3 $\pm$ 1,33	30,9 $\pm$ 2,07 b
	Ápices	35,6 $\pm$ 6,29	33,9 $\pm$ 1,63	0,7 $\pm$ 0,65	29,2 $\pm$ 1,40 b
	Nudos	47,3 $\pm$ 4,78	53,0 $\pm$ 1,74	0,6 $\pm$ 0,63	44,8 $\pm$ 1,50 a
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>22,2 <math>\pm</math> 2,16 b</b>	<b>47,1 <math>\pm</math> 1,16 a</b>	<b>1,1 <math>\pm</math> 0,50 c</b>	
<b>Clon 1483</b>					
NS	Callos	4,0 $\pm$ 0,15	2,5 $\pm$ 0,11	5,0 $\pm$ 0,20	3,5 $\pm$ 0,09 a
	Ápices	2,4 $\pm$ 0,14	1,9 $\pm$ 0,05	6,1 $\pm$ 0,15	2,9 $\pm$ 0,07 b
	Nudos	3,3 $\pm$ 0,20	2,1 $\pm$ 0,05	5,3 $\pm$ 0,16	2,7 $\pm$ 0,06 b
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>3,4 <math>\pm</math> 0,10 b</b>	<b>2,1 <math>\pm</math> 0,03 c</b>	<b>5,6 <math>\pm</math> 0,10 a</b>	
LB (cm)	Callos	2,9 $\pm$ 0,10	1,8 $\pm$ 0,06	3,4 $\pm$ 0,14	2,5 $\pm$ 0,06 a
	Ápices	2,1 $\pm$ 0,07	1,9 $\pm$ 0,03	3,3 $\pm$ 0,10	2,3 $\pm$ 0,04 b
	Nudos	1,9 $\pm$ 0,09	1,6 $\pm$ 0,03	2,7 $\pm$ 0,07	1,8 $\pm$ 0,03 c
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>2,5 <math>\pm</math> 0,06 b</b>	<b>1,8 <math>\pm</math> 0,02 c</b>	<b>3,1 <math>\pm</math> 0,06 a</b>	
% BEnr	Callos	24,2 $\pm$ 3,34	2,8 $\pm$ 1,24	37,5 $\pm$ 5,44	18,7 $\pm$ 1,94 a
	Ápices	14,0 $\pm$ 3,37	2,3 $\pm$ 1,71	48,1 $\pm$ 7,00	14,9 $\pm$ 2,15 a
	Nudos	13,5 $\pm$ 3,81	2,3 $\pm$ 1,24	47,1 $\pm$ 8,50	10,4 $\pm$ 1,59 b
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>19,1 <math>\pm</math> 2,12 b</b>	<b>2,4 <math>\pm</math> 0,64 c</b>	<b>43,3 <math>\pm</math> 4,00 a</b>	
% BH.	Callos	47,0 $\pm$ 3,27	59,6 $\pm$ 2,98	3,6 $\pm$ 1,76	44,7 $\pm$ 2,00 b
	Ápices	38,6 $\pm$ 4,34	45,8 $\pm$ 2,21	5,8 $\pm$ 1,79	36,2 $\pm$ 1,69 c
	Nudos	45,8 $\pm$ 5,11	66,0 $\pm$ 1,76	0,7 $\pm$ 0,72	54,6 $\pm$ 1,61 a
<b>Medias (sistema de cultivo)</b>		<b>44,4 <math>\pm</math> 2,33 b</b>	<b>58,0 <math>\pm</math> 1,27 a</b>	<b>3,5 <math>\pm</math> 0,90 c</b>	

En otra batería de ensayos, se evaluó de nuevo el efecto del sistema de cultivo, pero comparando únicamente el envase PlantForm® con el sistema SS, y del tipo de explanto sobre 5 nuevos clones: 7211, 3, 111, CO63 y PO28. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. Podemos observar que con el uso de PlantForm® se consiguen unas tasas de multiplicación similares o superiores a las del medio SS, sobre todo cuando se utilizan callos.

Además, en la mayor parte de los genotipos, el envase PlantForm<sup>®</sup> aumenta el % BEnr. Esto también ha sido observado en experimentos preliminares con el clon PO43, que presentan un 65% de brotes enraizables en medio SS frente al 82% en brotes cultivados en PlantForm<sup>®</sup>.

Tabla 2. Efecto del sistema de cultivo y tipo de explanto en las tasas de proliferación (NB: N° de segmentos; LB: Longitud del brote más largo (cm); % BEnr.: % de brotes enraizables) y calidad de los brotes (% BH: % de brotes hídricos) en los clones 7521, 3, 111, CO63 y PO28 de castaño. Los explantos cultivados en PlantForm<sup>®</sup> se sometieron a 4 inmersiones diarias y 24 aireaciones suplementarias. Los datos presentados son medias  $\pm$  error estándar. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes al nivel de 95% de probabilidad.

Clon	Explanto	Sist. cultivo	NB	LB (cm)	% BEnr	% BH
7521	Callos	PlantForm	6,5 $\pm$ 1,00 a	5,7 $\pm$ 0,45 ab	156,0 $\pm$ 31,87 a	24,0 $\pm$ 9,80 a
		SS	5,9 $\pm$ 1,01 a	6,1 $\pm$ 0,56 a	90,0 $\pm$ 19,15 a	0,0 $\pm$ 0,00 b
	Nudos	PlantForm	1,5 $\pm$ 0,15 b	4,8 $\pm$ 0,29 bc	40,0 $\pm$ 16,33 b	15,0 $\pm$ 5,00 a
		SS	2,3 $\pm$ 0,22 b	3,1 $\pm$ 0,29 c	4,0 $\pm$ 2,67 c	0,0 $\pm$ 0,00 b
			<i>P</i> < 0,001 ***			
3	Callos	PlantForm	6,4 $\pm$ 0,58 a	5,5 $\pm$ 0,39 a	100,0 $\pm$ 0,00 a	10,0 $\pm$ 10,00 ab
		SS	4,3 $\pm$ 0,33 b	5,2 $\pm$ 0,25 a	95,8 $\pm$ 4,17 a	0,0 $\pm$ 0,00 b
	Nudos	PlantForm	0,9 $\pm$ 0,70 c	4,0 $\pm$ 0,52 ab	40,0 $\pm$ 13,09 b	33,3 $\pm$ 13,30 a
		SS	3,2 $\pm$ 0,40 b	3,2 $\pm$ 0,44 b	24,9 $\pm$ 11,39 b	0,0 $\pm$ 0,00 b
			<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> = 0,001 ***	<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> = 0,013 *
111	Callos	PlantForm	5,6 $\pm$ 0,53 a	5,1 $\pm$ 0,22 b	104,5 $\pm$ 16,30 a	36,8 $\pm$ 12,07 a
		SS	5,7 $\pm$ 0,88 a	6,5 $\pm$ 0,67 a	133,3 $\pm$ 23,62 a	0,0 $\pm$ 0,00 b
	Nudos	PlantForm	2,1 $\pm$ 0,18 b	3,2 $\pm$ 0,23 c	29,8 $\pm$ 5,83 b	40,4 $\pm$ 42,62 a
		SS	2,2 $\pm$ 0,29 b	3,0 $\pm$ 0,27 c	13,2 $\pm$ 7,56 b	0,0 $\pm$ 0,00 b
			<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> = 0,005 **
PO28	Callos	PlantForm	2,3 $\pm$ 0,35 ab	3,7 $\pm$ 0,28 a	43,3 $\pm$ 9,55 a	27,3 $\pm$ 11,62 a
	Nudos	PlantForm	1,4 $\pm$ 0,13 b	2,2 $\pm$ 0,19 b	10,0 $\pm$ 5,77 b	0,0 $\pm$ 0,00 b
		SS	2,4 $\pm$ 0,19 a	2,3 $\pm$ 0,27 b	25,8 $\pm$ 11,39 ab	0,0 $\pm$ 0,00 b
			<i>P</i> = 0,050 *	<i>P</i> = 0,001 ***	<i>P</i> = 0,049 *	<i>P</i> = 0,035 *
CO63	Callos	PlantForm	4,0 $\pm$ 0,31 a	3,7 $\pm$ 0,21 a	53,3 $\pm$ 7,15 a	17,0 $\pm$ 9,78
	Nudos	PlantForm	1,6 $\pm$ 0,14 c	2,6 $\pm$ 0,20 b	21,7 $\pm$ 8,72 b	16,0 $\pm$ 9,33
		SS	3,1 $\pm$ 0,22 b	3,8 $\pm$ 0,19 a	26,1 $\pm$ 5,21 ab	0,0 $\pm$ 0,00
			<i>P</i> < 0,001 ***	<i>P</i> = 0,001 ***	<i>P</i> = 0,031 *	<i>P</i> = 0,174 ns

A pesar de las mejoras aportadas por el uso de los envases PlantForm<sup>®</sup>, un problema asociado a este tipo de contenedores más grandes es la pérdida de un mayor n° de explantos en los casos de contaminación bacteriana o fúngica. Para tratar de paliar este problema se estableció un ensayo para evaluar la incorporación al medio de cultivo del compuesto biocida Plant Preservative Mixture (PPM<sup>TM</sup>) en los clones 111 (PlantForm<sup>®</sup>) y 1483 (RITA<sup>®</sup>). Si bien al añadir 1 ml de PPM por litro de medio disminuyó el nivel de contaminación bacteriano, no evitaron completamente las contaminaciones fúngicas y además, el PPM produjo una disminución en la capacidad proliferativa de los explantos. En los callos del clon 111, el NS bajó de 7,1  $\pm$  1,56 a 4,0  $\pm$  0,85, y la LB de 6,5  $\pm$  0,28 a 5,4  $\pm$  0,21 cm. En los nudos del clon 1483, el NS bajó de 2,5  $\pm$  0,35 a 1,5  $\pm$  0,24, mientras que en los callos de este mismo clon disminuyó de 4,8  $\pm$  1,05 a 2,3  $\pm$  0,51, y la LB se redujo de 2,6  $\pm$  0,23 a 1,7  $\pm$  0,15 cm. Por este motivo no se planteó añadir PPM sistemáticamente al medio de cultivo.

## 5. Discusión

En este trabajo se presenta por primera vez un protocolo eficaz para la propagación de brotes axilares de castaño en biorreactores de inmersión temporal. Los principales retos a los que hubo que hacer frente fueron la hiperhidricidad de los explantos cultivados en medio líquido, la presencia de contaminaciones fúngicas y bacterianas en los biorreactores y las bajas tasas de multiplicación obtenidas en los experimentos iniciales.

La proporción de brotes hiperhídricos, que depende del genotipo, del tipo de explanto y del sistema de cultivo se ha mantenido en niveles aceptables, incluso en los clones más propensos, mediante el uso de un soporte inerte como es la lana de vidrio y las aireaciones adicionales de los envases PlantForm<sup>®</sup> y los módulos construidos en TRAGSA. De esta forma se han conseguido valores de hidricidad del rango de los referidos por ZHU et al. (2005) en manzano y QUIALA et al. (2012) en teca.

Por otra parte, los intentos de controlar la contaminación bacteriana y fúngica utilizando PPM se han visto limitados por la disminución que provoca dicho compuesto en las tasas de proliferación de los cultivos. Este efecto también ha sido citado en *Ilex dumosa* por LUNA et al. (2008). Un método alternativo para disminuir el grado de contaminación microbiana podría ser la disminución de los niveles de sacarosa en el medio de cultivo, lográndose así un sistema más fotoautotrófico, si bien en compensación, sería necesario modificar algunas condiciones del cultivo como la intensidad lumínica y la concentración de CO<sub>2</sub> de las cámaras de crecimiento (XIAO et al., 2011).

En cuanto a las tasas de multiplicación, las obtenidas con 3 a 6 inmersiones/día en la mayoría de los genotipos estudiados, producen un n° de segmentos y una longitud de los brotes superior o no significativamente inferior a los valores obtenidos en medio semisólido, lo que indica la eficacia del sistema y la posibilidad de extenderlo a otros genotipos. La mayor proporción de brotes enraizables se alcanza con callos basales cultivados en PlantForm<sup>®</sup>, produciendo los ápices y nudos brotes de menor tamaño. Estos brotes más pequeños pueden cultivarse en envases PlantForm<sup>®</sup> o en RITA<sup>®</sup> para mantener el cultivo y a la vez suministrar callos para los enraizamientos, de forma que el sistema sea autosuficiente.

## 6. Conclusiones

Se ha conseguido propagar por primera vez brotes de castaño en medio líquido en un sistema de inmersión temporal. A pesar de las diferencias genotípicas, ha sido posible propagar en biorreactores, material vegetal de 8 clones de castaño. El esquema propuesto consiste en cultivar segmentos apicales y nodales en biorreactores (RITA<sup>®</sup> o PlantForm<sup>®</sup>) sobre lana de roca con 3-4 inmersiones diarias. Los ápices y nudos obtenidos se recultivarían para mantener el cultivo mientras que los callos se inocularían en envases PlantForm<sup>®</sup> con o sin lana, a fin de generar brotes elongados aptos para el enraizamiento *ex vitro*.

## 7. Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada parcialmente por la Xunta de Galicia (09MRU016E).

## 8. Bibliografía

AITKEN-CHRISTIE, J.; JONES, C. 1987. Towards automation: radiate pine shoot hedges in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 8:185–196.

CUENCA, B.; FERNÁNDEZ, M.R.; OCAÑA, L.; SALINERO, C.; PINTOS, C.; MANSILLA, J.P.; RIAL, C. 2010. Selection of *Castanea sativa* Mill. for resistance to *Phytophthora cinnamomi*: testing of selected clones. *Acta Hortic.* 866:111–119.

ETIENNE, H.; BERTHOULY, M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215–231

GONZÁLEZ, M.V.; CUENCA, B.; LÓPEZ, M.; PRADO, M.J.; REY, M.; 2011. Molecular characterization of chestnut plants selected for putative resistance to *Phytophthora cinnamomi* using SSR markers. *Sci. Hortic.* 130: 459–467.

GRESSHOFF, P.M.; DOY, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107:161–170.

LUNA C.; COLLAVINO M.; MROGINSKI L.; SANSBERRO P. 2008. Identification and control of bacterial contaminants from *Ilex dumosa* nodal segments culture in a temporal immersion bioreactor system using 16S rDNA analysis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 95:13–19.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497

MURCH, S.J.; LIU, C.Z.; ROMERO, R.M.; ROMERO, M.; SAXENA, P.K. 2004. In vitro culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 78:63–68.

QUIALA, E.; CAÑAL, M.J.; MEIJÓN, M.; RODRÍGUEZ, R.; CHÁVEZ, M.; VALLEDOR, L.; DE FERIA, M.; BARBÓN, R. 2012. Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 109:223–234.

VIEITEZ, A.M.; BALLESTER, A.; SAN JOSE, M.C.; VIEITEZ, E. 1985. Anatomical and chemical studies on vitrified shoots of chestnut regenerated in vitro. *Physiol. Plant* 65: 177–184.

ZHU, L-H.; LI, X-Y; WELANDER, M. 2005. Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 81:313–318.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. 2011. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 105:149–158.