



---

MICROENXERTO E RECLUTIVO DO CALO BASAL NA MICROPROPAGACIÓN  
DE MATERIAL ADULTO DE CARBALLO E CASTIÑEIRO

---

TESE DOUTORAL

REP/437/2013



Santiago Crecente Campo

Director: Juan Luis Fernández Lorenzo

Lugo, xullo 2013

---

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	VII
<b>I - INTRODUCCIÓN</b>	1
1 - Descrición xeral e usos do carballo e do castiñeiro	1
1.1 - Caracterización botánica e autoecoloxía	1
1.2 - Importancia e utilización na actualidade	2
2 - A multiplicación vexetativa	4
2.1 - Técnicas convencionais de multiplicación vexetativa	5
2.1.1 - Estacaxe	5
2.1.2 - Enxerto	6
2.1.3 - Porbaixa	7
2.2 - Técnicas modernas de multiplicación vexetativa: a propagación por cultivo <i>in vitro</i>	8
2.2.1 - Concepto e vías de micropropagación	8
2.2.2 - Tipos de explantos na multiplicación a partir de meristemas preexistentes	9
2.2.2.1 - Nós, ápices e calo basal	9
2.2.2.2 - O calo basal	11
2.2.2.2.1 - Xeralidades. Calo basal vs calo organoxénico	11
2.2.2.2.2 - O uso do recultivo do calo basal e outros sistemas semellantes en micropropagación	12
2.2.3 - Fases da micropropagación de nós e ápices	14
2.2.4 - Factores que afectan ó éxito da micropropagación	16
2.2.5 - Cultivo <i>in vitro</i> no xénero <i>Quercus</i>	17
2.2.6 - Cultivo <i>in vitro</i> no xénero <i>Castanea</i>	24
2.2.7 - A maduración e a súa influencia na micropropagación	30
2.2.7.1 - Maduración e propagación vexetativa nas árbores	30
2.2.7.2 - Fundamentos do cambio de fase	31
2.2.7.3 - Control do cambio de fase	32
2.2.7.4 - Partes “xuvénis” en plantas adultas	34

2.2.7.5 - Obtención de material xuvenil a partir de plantas adultas: concepto de rexuvenecemento. Técnicas de rexuvenecemento.	36
3 - O microenxerto	38
3.1 - Descrición xeral	38
3.2 - Factores que afectan ó prendemento dos microenxertos	39
3.3 - O microenxerto como método de rexuvenecemento	41
3.3.1 - Introducción	41
3.3.2 - Microenxertos <i>in vitro</i> vs Microenxertos <i>in vivo</i>	41
3.3.3 - Uso do microenxerto <i>in vitro</i> na micropropagación	42
3.3.4 - Uso de enxertos e microenxertos <i>in vivo</i> con fins de micropropagación	47
3.3.5 - (Micro)enxerto de carballo e castiñeiro	50
3.3.6 - Fundamentos do microenxerto como método de rexuvenecemento	51
<b>II - OBXECTIVOS</b>	55
<b>III - MATERIAL E MÉTODOS</b>	57
1 - Material vexetal	57
1.1 - Material vexetal de <i>Quercus robur</i> L.	57
1.1.1 - Ensaio de recultivo do calo basal	57
1.1.2 - Ensaio de microenxerto	58
1.2 - Material vexetal de <i>Castanea sativa</i> Mill.	59
1.2.1 - Ensaio de recultivo do calo basal	59
1.2.2 - Ensaio de microenxerto	59
2 - Métodos	60
2.1 - Condicións xerais de cultivo	60
2.2 - Introducción <i>in vitro</i> de material vexetal	62
2.2.1 - Material vexetal introducido <i>in vitro</i>	62
2.2.2 - Obtención de brotes	62
2.2.3 - Proceso de desinfección	65

2.2.4 - Medio de cultivo utilizado	66
2.2.5 - Ensaio realizado	66
2.3 - Ensaio de recultivo do calo basal	67
2.3.1 - Tipos de explanto con calo	67
2.3.2 - Descripción do recultivo do calo basal	68
2.3.3 - Variables estudadas	70
2.3.4 - Ensaio realizado	71
2.4 - Ensaio de microenxerto	73
2.4.1 - Obtención de plántulas <i>in vitro</i>	73
2.4.1.1 - Obtención de plántulas de carballo <i>in vitro</i>	73
2.4.1.2 - Obtención de plántulas de castiñeiro <i>in vitro</i>	75
2.4.2 - Obtención de plántulas <i>in vivo</i>	76
2.4.3 - Obtención de púas de material adulto para o microenxerto <i>in vitro</i>	76
2.4.4 - Obtención de púas de material adulto para o microenxerto <i>in vivo</i>	77
2.4.5 - Realización de microenxertos <i>in vitro</i>	78
2.4.6 - Realización de microenxertos <i>in vivo</i>	83
2.4.7 - Multiplicación <i>in vitro</i> dos explantos procedentes dos microenxertos	87
2.4.7.1 - Desenvolvemento dos microenxertos e reallamento de explantos	87
2.4.7.2 - Ensaio realizado <i>in vitro</i> sobre explantos reallados	87
2.4.8 - Avaliación do enraizamento <i>in vitro</i>	89
2.5 - Tratamento estatístico	91
<b>IV - RESULTADOS</b>	93
1 - Introducción <i>in vitro</i> de material vexetal	93
1.1 - Clons introducidos <i>in vitro</i>	93
1.2 - Introducción <i>in vitro</i> dos clons MIÑO, SISTO e EPS	93
1.3 - Introducción do clon QRFa	94
1.4 - Ensaio de medio base no clon QRFa	95

2 - Ensaio de recultivo do 'calo basal'	96
2.1 - Recultivo do calo en <i>Quercus robur</i> L.	96
2.1.1 - Taxa de multiplicación	96
2.1.2 - Número de brotes maiores de 1 cm	102
2.1.3 - Lonxitude do brote máis longo	104
2.1.4 - Porcentaxe de calos que se obteñen de cada tipo	106
2.1.5 - Porcentaxe de calos que se deixan de recultivar	107
2.2 - Recultivo do calo en <i>Castanea sativa</i> Mill.	108
2.2.1 - Taxa de multiplicación	108
2.2.2 - Porcentaxe de calos que se deixan de recultivar	110
2.3 - Natureza (axilar ou adventicia) dos brotes que emerxen a través do calo	113
2.4 - Cálculo de produción estimada	114
2.4.1 - Taxa de multiplicación utilizando o recultivo do calo basal	114
2.4.2 - Produción anual estimada	118
2.4.3 - Estudo de rendibilidade	123
3 - Ensaio de microenxerto	127
3.1 - Desinfección de landras (patróns) e xerminación	127
3.2 - Prendemento dos microenxertos	129
3.2.1 - Clons de <i>Quercus robur</i> (TROBO, MUÍÑOS, QRFa e MIÑO)	129
3.2.2 - Clons de <i>Castanea sativa</i> (EPS, SISTO, LOURA e PAREDE)	134
3.3 - Efecto do microenxerto sobre a multiplicación <i>in vitro</i>	141
3.3.1 - Introducción <i>in vitro</i> dos explantos procedentes dos microenxertos <i>in vivo</i>	141
3.3.2 - Taxa de multiplicación <i>in vitro</i> do material procedente de microenxerto	144
3.3.2.1 - Clons de <i>Quercus robur</i>	144
3.3.2.2 - Clons de <i>Castanea sativa</i>	147
3.3.2.2.1 - Microenxertos <i>in vivo</i>	147
3.3.2.2.2 - Microenxertos <i>in vitro</i>	149

3.3.2.2.2.1 - Microenxerto <i>in vitro</i> de EPS <sub>copa</sub> sobre EPS <sub>base</sub>	149
3.3.2.2.2.2 - Microenxerto <i>in vitro</i> de EPS <sub>copa</sub> sobre XUV9	151
3.3.2.2.2.3 - Microenxerto <i>in vitro</i> de SISTO sobre EPS <sub>base</sub>	153
3.4 - Enraizamento <i>in vitro</i> do material procedente de microenxerto	154
3.4.1 - Clons de <i>Quercus robur</i>	154
3.4.2 - Clons de <i>Castanea sativa</i>	160
3.5 - Utilidade teórica do microenxerto en serie <i>in vivo</i> en ciclos curtos	168
<b>V- DISCUSIÓN</b>	171
1 - Consideracións sobre a introdución <i>in vitro</i> do material vexetal utilizado neste traballo	171
2 - O recultivo do calo basal e as súas implicacións na multiplicación <i>in vitro</i>	172
2.1 - Modificación dos parámetros produtivos mediante o recultivo do calo basal	172
2.2 - Sobre a natureza (axilar ou adventicia) dos brotes que emerxen a través do calo	175
2.3 - Implicacións produtivas e económicas do uso dos explantos con calo basal	176
3 - Microenxerto <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de carballo e castiñeiro	177
3.1 - Contaminación de patróns procedentes de landras obtidos <i>in vitro</i>	177
3.2 - Prendemento dos microenxertos	177
3.2.1 - Consideracións xerais	177
3.2.2 - Prendemento dos microenxertos <i>in vitro</i> . Importancia da natureza do patrón e da púa	179
3.2.2.1 - Sobre os patróns	179
3.2.2.2 - Sobre as púas	180
3.2.3 - Prendemento dos microenxertos <i>in vivo</i> . A orixe das púas, o estado fisiolóxico, a lignificación e os ciclos de enxerto	182
3.3 - ¿Resulta efectivo o microenxerto como técnica de rexuvenecemento no material ensaiado?	186

---

3.3.1 - O efecto do microenxerto sobre a taxa de multiplicación <i>in vitro</i>	186
3.3.1.1 - Nos clons de <i>Quercus robur</i>	186
3.3.1.2 - Nos clons de <i>Castanea sativa</i>	187
3.3.2 - O efecto do microenxerto sobre o enraizamento <i>in vitro</i>	189
3.3.2.1 - Nos clons de <i>Quercus robur</i>	189
3.3.2.2 - Nos clons de <i>Castanea sativa</i>	190
3.4 - Posibilidades prácticas do uso do microenxerto <i>in vivo</i> en ciclos curtos	192
<b>VI - CONCLUSIÓNS</b>	195
<b>VII - BIBLIOGRAFÍA</b>	197



**ABREVIATURAS**

A	adulto
AD	adolescente
A <sub>x</sub>	adulto con características xuvenís
ADN	ácido desoxirribonucleico
AIA	ácido indolacético
AIB	ácido 3-indolbutírico
ANA	ácido naftalén-acético
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensaxeiro
ARNi	ARN de interferencia
BA	6-benciladenina
D	días dende aplicación de tratamento
D.F.R.	densidade de fluxo radiante
E	enraizamento
EPS <sub>copa</sub>	material procedente da copa do clon EPS
EPS <sub>base</sub>	material procedente de rebentos basais do clon EPS
GA <sub>3</sub>	ácido xiberélico
GD	medio de cultivo de Gresshof e Doy (1972)
GD 1/3	medio GD con un terzo da concentración de macronutrientes
IB	inmersión basal en disolución concentrada de auxina
L	lonxitude da raíz máis longa
LSD	test da mínima diferenza significativa
MC	hormona engadida ó medio de cultivo
MS	medio de cultivo de Murashige e Skoog (1962)
N	número de raíces por brote enraizado
P	nivel de significación
Púa SC	púa procedente do subcultivo convencional
Púa RC	púa procedente do recultivo do calo basal
REC	número de recultivo
s.d.	sen datos
TDZ	Tidiazurón
TMV	virus do mosaico do tabaco

WPM	Woody Plant Medium (Lloyd e McCown, 1981)
X	xuvenil
®	marca rexistrada
µenx	microenxerto
1ºrp	primeiro microenxerto con púas procedentes de repouso
1ºfz	primeiro microenxerto con púas procedentes de forzado

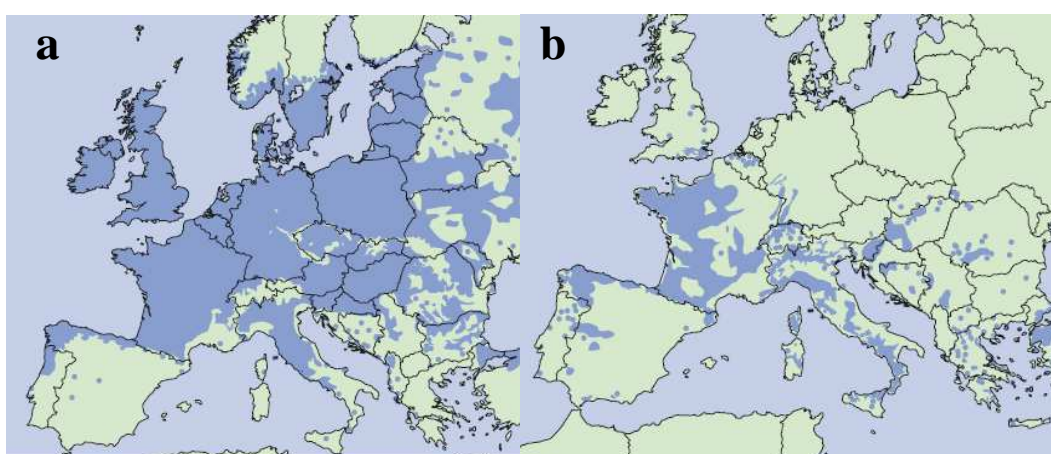


## I - INTRODUCCIÓN

### 1 - Descrición xeral e usos do carballo e do castiñeiro

#### 1.1 - Caracterización botánica e autoecoloxía

As especies *Quercus robur* L. (carballo) e *Castanea sativa* Mill. (castiñeiro) pertencen á familia Fagaceae. Esta importante familia está formada por 8 xéneros e unhas 700 especies, repartidas principalmente polas zonas temperadas e cálidas do Hemisferio Norte (Figura 1).



**Figura 1.** (a) Distribución de *Quercus robur* L. e (b) *Castanea sativa* Mill. en Europa.

Fonte: www.inia.es.

En canto á morfoloxía da planta, o carballo é unha árbore caducifolia, robusta, que pode superar os 40 m de altura. De copa ampla, ovoide ou irregular, e folla caduca. As súas ramas son grosas e algo tortuosas; a cortiza é grisácea ou blanquecina, moi resquebraxada e de tonalidade pardusca. Ten follas grandes, simples, en disposición alterna, con estípulas alongadas que caen rapidamente; son lampiñas polos dous lados, de cor verde intenso pola cara e máis pálidas, cos nervios ben marcados, polo envés. Teñen aurículas na base e son sentadas. As flores masculinas dispóñense en amentos colgantes, e as femininas na parte apical dun longo pedúnculo. O froito, en landras colgantes, madura en setembro e cae en outubro.

Medra dende o nivel do mar ata uns 1300 m de altitude, formando bosques en chans profundos e frescos, principalmente nos que carecen de cal e son algo húmidos. Require un clima húmido, oceánico, onde se acuse pouco a seca estival, e é algo resistente ó frío.

O castiñeiro do país, ou castiñeiro, é unha árbore corpulenta, de folla caduca, que acada 35-40 m de alto, con copa máis ou menos fusiforme na xuventude, tendente a formas máis globosas na madurez, moi ramificada e con ampla superficie foliar. Ten troncos grosos de cortiza marrón grisácea, con fisuras que forman deseños en espiral. As súas follas son oblongo-lanceoladas, de ata 25 cm de lonxitude, puntiagudas e aserradas. As flores dispóñense en amentos erectos, non colgantes coma na maioría das fagáceas. Florece en xullo e o froito recóllese en outubro. Ten un sistema radicular moi estendido e potente, pero pouco profundo.

É unha especie tipicamente calcífuga e acidófila, que non soporta condicións climáticas extremas, tanto no que se refire á temperatura como á falta de precipitacións. Desenvólvese ben con temperaturas medias de 10-14 °C e precisa polo menos 700 mm de precipitación anual. O exceso de precipitación e humidade ambiental aféctalle negativamente, pois favorece a aparición de enfermidades.

## 1.2 - Importancia e utilización na actualidade

No que atinxe ó carballo, a súa importancia económica radica fundamentalmente no ámbito forestal, con destino á produción de madeira e leña. Aínda así, tamén destaca o seu interese dende o punto de vista ornamental, incluíndo certas variedades como *atropurpurea*, *fastigiata*, *filicifolia*, *pendula*, *variegata*, etc., e, sobre todo, ambiental, sendo unha especie típica de comunidades clímax en moitos ecosistemas, especialmente en Galicia.

No caso do castiñeiro, a importancia económica ven marcada pola dobre aptitude para produción de castaña e madeira. De feito, na produción de froitos en terreos de monte, o castiñeiro é a especie de uso máis relevante e tradicional en Galicia, existindo multitude de variedades autóctonas empregadas con este fin (Pereira-Lorenzo e Fernández-López, 1997b). Por outro lado, ten un valor paisaxístico e ecolóxico moi alto, sendo compoñente de espazos con un alto interese de conservación dende o punto de vista medioambiental e de sostemento da vida silvestre.

En canto á calidade dos produtos obtidos destas dúas especies, a madeira do carballo, por unha banda, é moi apreciada comercialmente; ten unha cor pardo-leonada e é moi dura, de gran fino, con aneis de crecemento ben marcados, bastante pesada, moi resistente á putrefacción aínda dentro da auga, e axeitada para pulir; serviu nos edificios

históricos como madeira estrutural e ornamental, para a construción de grandes flotas de guerra e pesca, en carpintería, ebanistería e tornería. É clásico o seu emprego en toneis e bocois de viño e licores.

No tocante ó castiñeiro, a madeira, de gran calidade, pode acadar altos prezos unitarios cando se cultiva de forma axeitada, sendo o seu destino a carpintería e ebanistería. Presenta propiedades físicas e mecánicas moi variables, cunha dureza media. É elástica e flexible, cunha alta resistencia á tracción e flexión. No entanto, cando o destino das plantacións é a produción de castañas, a madeira non ten interese comercial, xa que a árbore presenta un tronco curto e grosso con moitas ramas. As plantacións para froito deron lugar a unha paisaxe típica de Galicia coñecida como soutos, onde os exemplares, ás veces de moita idade, son enxertados coas variedades máis interesantes en cada momento. Actualmente existe a Indicación Xeográfica Protexida “Castaña de Galicia”, que pretende establecer como diferenciación no mercado a calidade das castañas procedentes de variedades autóctonas galegas.

Respecto á distribución actual destas especies en España, segundo o 3º Inventario Forestal Nacional (Ministerio de Medio Ambiente, 2000), o carballo está presente de xeito dominante en 195.000 ha, sen contar as superficies onde se mestura con piñeiros e eucaliptos, sendo soamente superado en superficie pola especie *Pinus pinaster*. Actualmente é unha especie moi pouco plantada, abundando cada vez máis os rexenerados naturais en terreos agrícolas abandonados.

O castiñeiro, mesturado con outras frondosas, ocupa unhas 45.000 ha (Ministerio de Medio Ambiente, 2000). Durante as últimas décadas produciuse un incremento dos poboamentos de castiñeiro por rexeneración natural, como consecuencia da diminución do pastoreo, as rozas e o abandono de terras agrarias, especialmente en zonas de clima atlántico, e grazas ás subvencións á forestación que concede a Xunta de Galicia con fondos europeos, o que provocou o aumento das plantacións dedicadas á obtención de madeira ou froito. As masas teñen, en certas áreas, problemas sanitarios importantes, sendo os principais a “tinta”, causada polo fungo *Phytophthora cinnamomi* Rands., e o chancro, provocado por *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr.

O feito de ser especies de crecemento lento fai que o carballo e o castiñeiro se vexan relegadas fronte a outras especies de crecemento rápido, coma o eucalipto, o pino radiata e o carballo americano, que son máis rendibles a curto prazo.

Para que estas especies non perdan peso no eido forestal, débense poñer en marcha, entre outras medidas, programas de mellora xenética que lles proporcionen unha maior aceptación por parte dos propietarios privados. Cómpre seleccionar árbores de interese, que amosen características sobresalientes (árbores “plus”), prevendo que estas sexan herdables e/ou mellorar a súa resposta fenotípica mediante unha boa elección de estación e unha silvicultura axeitada.

Para desenvolver os mencionados programas de mellora requírese, en diversas fases, a propagación vexetativa de individuos seleccionados. Este tipo de multiplicación ten a vantaxe de que, ademais de reter os efectos aditivos dos xenos, permite manter as combinacións xenéticas específicas, non aditivas, que afectan a un carácter, e que son difíciles de conservar en experimentos de mellora por cruzamentos (Bonga, 1982). Na maior parte dos esquemas de mellora tradicional, que inclúen a reprodución sexual, é difícil mellorar máis dun carácter simultaneamente, sobre todo cando se trata de características de baixa herdabilidade (Bonga e Von Aderkas, 1992).

## **2 - A multiplicación vexetativa**

En principio, unha planta pode ser multiplicada de dúas maneiras: vexetativamente (de forma asexual mediante clonación) e de forma sexual (por sementes). Non todas as especies se adaptan ben ós dous tipos de propagación. Cando a multiplicación sexual non é satisfactoria, a multiplicación vexetativa pode resultar unha alternativa. Por exemplo, a multiplicación sexual pode ser pouco conveniente cando a descendencia obtida é moi heteroxénea, coma no caso de moitas especies arbóreas de clima temperado de interese forestal, incluíndo o carballo e o castiñeiro.

Por outra banda, en árbores lonxevas, os programas de mellora baseados na propagación sexual adoitan ser moi lentos. Así mesmo, en moitos casos a produción de sementes é insuficiente e/ou irregular, o que, xunto á dificultade de conservación das mesmas a longo prazo cando estas son de natureza recalcitrante, permite pensar na propagación vexetativa de clons seleccionados como técnica alternativa para solucionar, ó menos parcialmente, estes problemas.

A multiplicación vexetativa consiste na rexeneración clonal dunha planta a partir dunha parte vexetativa da mesma. Permite, desta maneira, conservar as características xenotípicas das árbores seleccionadas. Agora ben, adóitase seleccionar as árbores “plus”

cando xa teñen acadada a fase adulta, na que a capacidade de propagación vexetativa tense reducido en maior ou menor medida, debido á perda da capacidade morfoxenética que acompaña á madurez (Bonga, 1982). Isto vese ilustrado, por exemplo, na diminución da capacidade das estacas para emitir raíces adventicias.

Para contrarrestar a diminución da capacidade morfoxenética, téñense desenvolvido técnicas que poden provocar “revigorización” ou “rexuvenecemento” do material adulto, o que permite unha mellor resposta do material tratado ás técnicas de multiplicación vexetativa (Pierik, 1990a). Estas técnicas describíranse no texto máis adiante.

As especies estudadas neste traballo, o carballo e o castiñeiro, considéranse recalcitrantes dende o punto de vista da multiplicación vexetativa (Schwarz, 1987), o que fai que este tipo de propagación, sobre todo en exemplares adultos, sexa especialmente complicada, e mesmo ás veces non se poida levar a cabo. Isto fai que ambas especies sexan utilizadas, frecuentemente, como fonte de material vexetal para experiencias nas que se analizan problemas relacionados coa propagación vexetativa no estado adulto, xa que constitúen modelos de estudo moi apropiados neste aspecto (Viéitez, 1987; Chalupa, 1993).

## **2.1 - Técnicas convencionais de multiplicación vexetativa**

As técnicas convencionais máis utilizadas para a multiplicación vexetativa son a estacaxe, o enxerto e a porbaixa.

### **2.1.1 - Estacaxe**

A estacaxe é, globalmente, a técnica de propagación vexetativa máis empregada. Utilízase de forma frecuente para multiplicar material de interese ornamental, sendo indispensable que o material presente unha boa capacidade de enraizamento adventicio.

No carballo, cando as estacas proceden de plantas nai de máis de 3-5 anos de idade, non enraízan ou fano escasamente (Kleinschmidt *et al.*, 1975; Chalupa, 1993). O tipo de material que achega mellores porcentaxes de enraizamento son os rebentos basais (Bellarosa, 1989; Chalupa, 1993), xa que medran na parte máis nova da árbore dende o punto de vista ontoxenético. Para incrementar a formación de raíces adventicias nas estacas de material adulto empréganse habitualmente métodos de

revigorización ou rexuvenecemento, como o etiolado ou bandeio (Iglesias-Díaz *et al.*, 2000) e a pulverización con citoquininas (Sánchez, 1991).

En castiñeiro, numerosos estudos mostran que se trata dunha especie de difícil enraizamento no estado adulto, e os intentos para propagalo por estacas foron infrutuosos (Urquijo, 1952; Viéitez, 1952, 1956; Jaynes, 1961). No entanto, no estado xuvenil o enraizamento conséguese doadamente (Viéitez, 1963). Foron identificados inhibidores do enraizamento en material adulto (Viéitez *et al.*, 1987) e promotores do enraizamento en material xuvenil (Vázquez e Gesto, 1982).

Recentemente foi estudada a estacaxe semiherbácea en clons de castiñeiro híbrido (Rodríguez *et al.*, 2005), obténdose resultados positivos en canto á porcentaxe de enraizamento e á aclimatación das plantas enraizadas.

### 2.1.2 - Enxerto

O enxerto consiste na unión de dúas plantas diferentes, unha que serve de patrón (achega o sistema radical) e outra que serve de púa (achega a parte aérea), como consecuencia da posta en contacto dos sistemas vasculares das dúas partes.

O cambium é unha capa de células que se encontra en constante división no período vexetativo e que permite á planta o crecemento en grosor. Ó poñer en contacto o cambium da púa e do patrón, as células poden unirse, e a estrutura á que dá lugar esa fusión coñécese como calo de cicatrización. Hai casos de incompatibilidade cando as células de púa e patrón non se recoñecen, pero esta non adoita presentarse cando se fai o enxerto dentro da mesma especie (Darikova *et al.*, 2011).

O enxerto utilízase primordialmente cando os outros métodos de multiplicación non funcionan ou cando o sistema radicular do xenotipo que se pretende multiplicar ten algunha característica que non o fai apropiado para os obxectivos perseguidos (exceso de vigor, sensibilidade á seca ou anegamento, sensibilidade a enfermidades...) e é substituído polo sistema radicular dun patrón que presenta as características axeitadas.

No carballo e no castiñeiro o enxerto tamén é unha técnica utilizada en certos casos. De feito, a maior parte da planta comercial de *Quercus robur* L. ornamental provén de enxerto sobre patrón xuvenil (Kothencz *et al.*, 2001; Obdržálek *et al.*, 2006), xa que a pesar de ser un método laborioso e relativamente lento, resolve os problemas

de enraizamento da estacaxe de material adulto, ademais de manter as características desexadas, como pode ser un determinado hábito de crecemento ou a presenza de follas variegadas (Borzan, 1993). Os tipos de enxerto que proporcionan os mellores resultados en carballo son o inglés, o de fendadura ou o de cortiza, mentres que o de xema non resulta moi efectivo. Patróns e púas deben pertencer á mesma especie (Hartmann *et al.*, 1990).

No caso do castiñeiro, toda a planta producida con destino á plantación de soutos é enxertada coas variedades produtoras de castaña máis demandadas no mercado nese momento, xa que os castiñeiros silvestres raramente producen castañas de calidade comercial. Así mesmo, esta técnica resulta útil para substituír, mediante reenxerto, unhas variedades por outras. Actualmente, debido ós problemas existentes en relación coa doenza da “tinta”, as variedades de froito adoitan enxertarse sobre patróns híbridos resistentes a esta enfermidade (Pereira-Lorenzo e Fernández-López, 1997a; Pereira-Lorenzo *et al.*, 2000). No castiñeiro fixéronse diversos estudos acerca da compatibilidade variedade-patrón e das diferentes técnicas de enxerto (Craddock e Bassi, 1999; Serdar e Soyly, 2005; Bueno *et al.*, 2009; Celik *et al.*, 2009; Serdar, 2009).

### 2.1.3 - Porbaixa

Outro dos métodos que se inclúen na propagación vexetativa convencional é a porbaixa. Esta técnica non deu resultados satisfactorios na propagación do carballo (Hartmann *et al.*, 1990).

No entanto, no caso do castiñeiro, é unha técnica moi usada, sobre todo para a multiplicación do castiñeiro híbrido (Fernández *et al.*, 1995), no que a multiplicación por sementes supón case sempre a perda de resistencia á ‘tinta’. O sistema de propagación vexetativa que mellores resultados ten achegado é a porbaixa por corte e recalce, mediante o recepado de plantas nai. Tras o recepado, a cepa emite brotes longos e vigorosos, que son anelados e tratados con hormonas na súa parte basal, aporcando terra finalmente para tapar a zona tratada. Estes brotes emitirán raíces e poderán ser separados da planta nai para continuar o seu crecemento coma plantas independentes. Estas novas plantas, coñecidas como “barbados”, adoitan ter entre 1 e 1,5 m de altura e un diámetro basal de uns 2 cm. Este sistema presenta, porén, algúns inconvenientes, como a baixa produción por unidade de superficie, a necesidade dun longo período para a entrada en produción, a necesidade dun elevado número de xornais en curtos períodos

de tempo, os custos de produción elevados e a obtención de plantas de calidade deficiente, descompensadas e con un sistema radical asimétrico e pouco desenvolvido.

## **2.2 - Técnicas modernas de multiplicación vexetativa: a propagación por cultivo *in vitro***

### **2.2.1 - Concepto e vías de micropropagación**

O cultivo *in vitro* consiste en cultivar pequenos fragmentos de material vexetal dentro de recipientes de vidro, en condicións asépticas, sobre medios de cultivo específicos e en condicións ambientais controladas.

Baséase en dúas propiedades das células vexetais: a dediferenciación, que permite a unha célula especializada reverter ó estado meristemático, e a totipotencia, segundo a cal calquera tipo de célula vexetal, nas condicións axeitadas, pode dar lugar a unha planta enteira.

Unha das aplicacións máis importantes da técnica do cultivo *in vitro* é a multiplicación *in vitro* ou micropropagación, que se caracteriza por permitir a obtención dunha gran cantidade de plantas nun espazo e tempo reducidos, sendo empregada cada vez máis na produción comercial de planta, en numerosas especies de valor ornamental, forestal e alimentario, e na produción de material vexetal libre de microorganismos.

O principio da multiplicación vexetativa *in vitro* consiste en tomar da planta órganos, tecidos ou células (explantos) e cultivalos en condicións asépticas, procedendo a realizar subcultivos periódicos para obter cada vez un número maior de plantas.

Os explantos máis comúns na micropropagación son embrións, cotiledóns, xemas, brotes e follas xuvenís (Bonga e Von Aderkas, 1992).

As vantaxes do cultivo *in vitro* son, entre outras, a posibilidade de obter unha multiplicación máis rápida que en condicións *in vivo*, conseguir plantas libres de enfermidades, precisar dunha cantidade relativamente pequena para iniciar o cultivo, achegar unha produción homoxénea ó longo do ano, e ser especialmente útil para o establecemento de bancos de xenes.

A micropropagación pode levarse a cabo, de forma xeral, por dúas vías, en función da preexistencia ou non sobre o explanto de puntos meristemáticos caulinares:

- A partir de estruturas organoxénicas, que inicialmente non portan meristemas caulinares, procedentes de células diferenciadas que requiren unha certa dediferenciación, como o cultivo de calo ou a embrioxénese somática. Estas técnicas poden presentar un certo risco de que se produza mutación somaclonal.
- A partir de tecido meristemático xa existente no explanto, como xemas (na multiplicación de nós e ápices) ou a partir de embrións. Este tipo de propagación garante practicamente a fidelidade clonal (Joshi e Dhawan, 2007; Alizadeh e Singh, 2009; Nadha *et al.*, 2011).

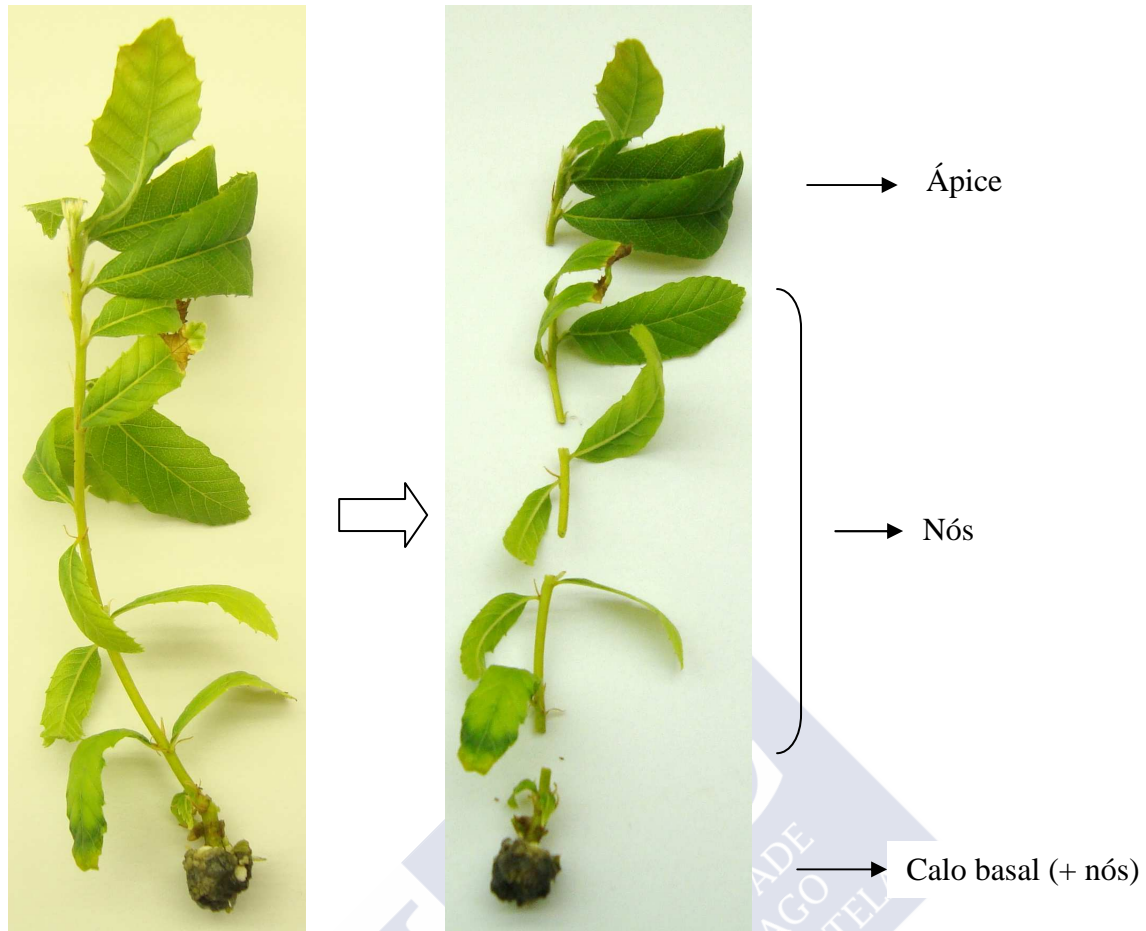
## 2.2.2 - Tipos de explantos na multiplicación a partir de meristemas preexistentes

### 2.2.2.1 - Nós, ápices e calo basal

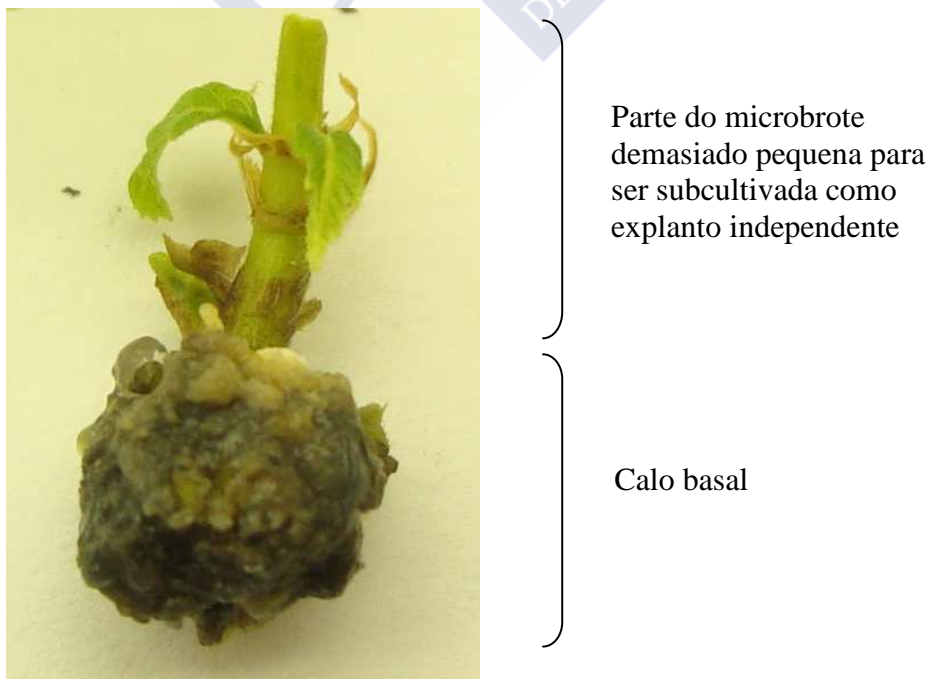
Con respecto á multiplicación *in vitro* de explantos que portan meristemas preexistentes, os máis comúns son os nós e ápices. Estes explantos proveñen da división dun brote, xa alongado, en partes máis pequenas, que levan polo menos unha xema axilar (nó) ou apical (ápice) e que se introducirán de novo en medio de cultivo (Figura 2).

Respecto da lonxitude dos explantos, esta pode variar dende uns poucos milímetros ata varios centímetros. En xeral, canto máis pequena é a parte dunha planta que se establece *in vitro* máis problemas ofrece, xa que cada fracción illada ten a súa propia proporción de reservas e hormonas, e é obvio que canto maior sexa o fragmento vexetal, máis fácil é inducir o crecemento e rexeneración (Pierik, 1990a). Un problema dos explantos pequenos é que a proporción da superficie cortada en relación co volume do explanto é elevada. Deste xeito, a reacción á ferida é severa e, ás veces tan acusada, que os tecidos non se dan recuperado (Bonga e Von Aderkas, 1992).

Unha vez que o brote se divide, é frecuente que unha pequena parte basal do mesmo, que está unida ó calo basal que se forma durante o período de crecemento do brote, non teña a lonxitude suficiente para ser subcultivada. Neste caso, esa parte pode subcultivarse xunto co calo basal (Meier-Dinkel *et al.*, 1993), o cal lle confire o tamaño suficiente para formar un novo explanto (Figura 3). Un mesmo calo pode ser subcultivado (recultivado) varias veces consecutivas, xa que pode permanecer sen deteriorarse varios subcultivos.



**Figura 2.** Tipos de explantos obtidos tras o subcultivo dun microbrote de castiñeiro.



**Figura 3.** Explanto composto polo calo basal e pola parte remanente do microbrote despois de subcultivar.

### 2.2.2.2 - O calo basal

#### 2.2.2.2.1 - Xeralidades. Calo basal vs calo organoxénico

Un calo é, basicamente, un tecido tumoral, que se divide de forma activa, máis ou menos organizado, que xeralmente xorde sobre feridas de órganos e tecidos diferenciados (Pierik, 1990a). No cultivo *in vitro* prodúcese como resposta á separación do explanto e á acción estimuladora de substancias tróficas (sales minerais, azucres, etc.) e dos reguladores do crecemento do medio de cultivo. O calo pode localizarse a nivel das feridas ou pode estenderse a rexións indemnes, e o seu crecemento pode prolongarse ó longo de diferentes transplantes a medio fresco. A estrutura do calo pode ser homoxénea ou heteroxénea. A súa heteroxeneidade pode ser inicial, debida á heteroxeneidade dos tecidos do explanto a partir dos que xorde, ou secundaria. O calo pode ter un crecemento máis ou menos activo, máis ou menos dissociado ou compacto; pode ser incoloro ou, máis raramente, clorofílico ou antociánico (Margara, 1988).

Poderíase dicir que, en función de que teñan ou non capacidade de rexenerar órganos ou embrións, hai dous tipos de calos: organoxénicos e non organoxénicos. A formación de calos organoxénicos estímase co obxectivo de conseguir rexeneración, mentres que os calos non organoxénicos prodúcense xeralmente como resposta directa a unha ferida.

Con respecto ós calos organoxénicos, hai multitude de órganos (raíz, caule, folla, flor, ...) ou tecidos que poden ser empregados como material inicial para a súa indución (Rani e Grover, 1999). Unha vez estimulada a súa formación, o calo organoxénico pode dar lugar á formación de órganos adventicios (Pillai e Hildebrandt, 1969; Pierik, 1976; Han *et al.*, 1997; Ntui *et al.*, 2010) e/ou á formación de embrións (Rout *et al.*, 2000; Shibli *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2002; Gopi e Ponmurugan, 2006) que reciben o nome de embrións somáticos (embrioxénese somática indirecta), o cal se consegue xeralmente utilizando medios con elevadas concentracións de auxina.

A maior desvantaxe de usar o potencial organoxénico dos calos consiste no risco de que teñan lugar mutacións e variacións citoxenéticas, o que se coñece como variación somaclonal. Según Vestri *et al.* (1991), o estatus xenético de plantas rexeneradas vía calo pode ser diferente que o do tipo parental, existindo o risco de

perder a fidelidade clonal, sendo este un problema moi grave nun programa de multiplicación vexetativa.

Por outra banda, os calos non organoxénicos son aqueles que se forman, xeralmente, como reacción a unha ferida ou corte. Na micropropagación de nós e ápices adoita formarse calo na base do explanto (o que en adiante denominaremos calo basal) que se introduce no medio de cultivo, como resposta á ferida producida polo corte no momento de subcultivar. O calo basal vai incrementando o seu tamaño de xeito progresivo dende que o explanto se introduce no novo medio de cultivo ata o momento no que é necesario subcultivar de novo.

Cando se realiza o subcultivo de nós e ápices, é habitual desfacerse do calo basal e non aproveitalo de ningún xeito. Agora ben, o recultivo do calo basal permitiría aproveitar partes do brote que non teñen o tamaño suficiente para ser illadas individualmente, e que permanecen unidas ó calo, obténdose así un maior número de explantos.

No caso do uso do calo basal como fonte de explantos, a probabilidade de variación somaclonal é moito menor que a que presentan os calos organoxénicos, xa que a estabilidade xenética normalmente permanece intacta se a propagación *in vitro* se leva a cabo utilizando o método de explantos nodais ou de xemas axilares (Pierik, 1990a). Soamente podería dubidarse da orixe axilar dun brote se este se ve xurdir do interior do calo, xa que non se podería asegurar se o brote procede dunha xema axilar (que quedou rodeada polo calo) ou se trata dun brote adventicio.

#### **2.2.2.2.2 - Recultivo do calo basal e outros sistemas semellantes en micropropagación**

O uso do calo basal como explanto para a micropropagación foi documentado en varios traballos, coas especies *Pithecellobium scalare* (Castillo de Meier e Bovo, 1989), *Ulmus procera* (Fenning *et al.*, 1993), *Robinia pseudoacacia* (Woo *et al.*, 1995) e *Acer palmatum* (Pérez *et al.*, 2003).

Sánchez (1991), utilizando o recultivo do calo basal en castiñeiro e carballo, conseguiu acurtar o período de subcultivo de microbrotes de castiñeiro de 4-5 semanas a 3 semanas, así como mellorar significativamente a taxa de multiplicación do clon de carballo durante 2 recultivos.

Meier-Dinkel *et al.* (1993) utilizaron o recultivo do calo basal para obter brotes para facer probas de enraizamento en *Quercus robur*. Observaron unha maior porcentaxe de enraizamento nas microestacas procedentes dos calos basais que nas procedentes de nós e ápices, achacándolle o efecto a un mellor estado fisiolóxico daqueles debido ó seu maior tamaño. No entanto, Sánchez (1991) comparando o enraizamento adventicio do mesmo tipo de explantos non observou un aumento significativo da porcentaxe de enraizamento. Nesta mesma especie, Llamazares (2003) comprobou que, en xeral, o primeiro recultivo do calo basal achega un maior número de explantos que un brote convencional (nó ou ápice).

Os estudos realizados con calos basais, en todo caso, non son moi numerosos, adoptándose nalgúns casos sistemas parecidos, pero con claras diferenzas.

Así, San José *et al.* (1988), nun estudo feito en carballo, estudaron a influencia do recultivo do mesmo explanto (inicialmente un segmento nodal), situado horizontalmente no medio de multiplicación, sobre as taxas de multiplicación e as porcentaxes de enraizamento dos brotes obtidos a partir del. Neste sistema, os explantos orixinais desenvolven un calo en cada un dos seus extremos, polo que se pode considerar, ata certo punto, semellante ó recultivo do calo basal. Unha vez que se cortan novos microbrotes, o explanto orixinal é recultivado a medio fresco (segundo ciclo de cultivo). Nos sucesivos recultivos, os novos microbrotes desenvólvense a partir de xemas do explanto orixinal que non agromaron, ou de xemas axilares remanentes de novos microbrotes de recultivos precedentes, sendo neste aspecto semellante ó recultivo do calo basal.

O sistema permitiulles obter maiores taxas de multiplicación que realizando o subcultivo convencional de nós e ápices. No quinto recultivo, a maior parte dos explantos reducía a súa produtividade, sendo a taxa de multiplicación menor de 1. Esta mesma técnica foi utilizada por Ballester *et al.* (1990) en dous clons de carballo e un de camelia. Nos clons de carballo, a porcentaxe de enraizamento dos explantos procedentes dos 2-4 primeiros recultivos era maior ca dos explantos subcultivados de forma convencional, e no de camelia, a porcentaxe de enraizamento aumentaba nos explantos obtidos no 2º e 3º recultivo.

Por outra banda, Sánchez *et al.* (1997) utilizaron un proceso idéntico na micropropagación de castiñeiro. A taxa de multiplicación dos explantos situados

horizontalmente foi significativamente maior que a dos nós e ápices colocados de forma vertical no medio. O número de novos microbrotes por explanto orixinal foi aumentando na maioría dos seguintes recultivos. Recultivar os explantos colocados de forma horizontal tivo un efecto positivo nas porcentaxes de enraizamento dos brotes producidos. Nun dos clons, a mellora nas taxas de multiplicación estendeuse ata o 8º recultivo e o ciclo de multiplicación, debido á maior velocidade de crecemento dos microbrotes, reduciuse a dúas semanas.

A colocación en horizontal de explantos foi utilizada, así mesmo, noutras especies, como *Rhododendron* sp. (Anderson, 1984), *Malus* sp. (Yae *et al.*, 1987), *Quercus rubra* (Viéitez *et al.*, 1993) e *Codiaeum variegatum* (Orlikowska *et al.*, 2000), o que habitualmente permite obter maior número de microbrotes por explanto que o cultivo en vertical (McClelland e Smith, 1990).

A principal diferenza deste sistema co recultivo do calo basal é que no recultivo horizontal as xemas axilares do explanto están en contacto co medio de cultivo, mentres que no recultivo do calo a parte do caule que permanece sobre o mesmo non toca o medio.

O recultivo do calo basal achega, en certos casos, resultados positivos na micropropagación, proporcionando un aproveitamento máis efectivo do material vexetal (Sánchez, 1991); non hai, porén, estudos que determinen a implicación sobre as taxas de multiplicación usando esta técnica, é dicir, como afecta incluír o recultivo do calo basal ó rendemento do sistema se o comparamos con aquel que non aproveita este explanto. Por outra parte, tampouco se define a influencia que pode ter aproveitar o calo basal no risco de variación somaclonal que normalmente se asocia a estes tecidos.

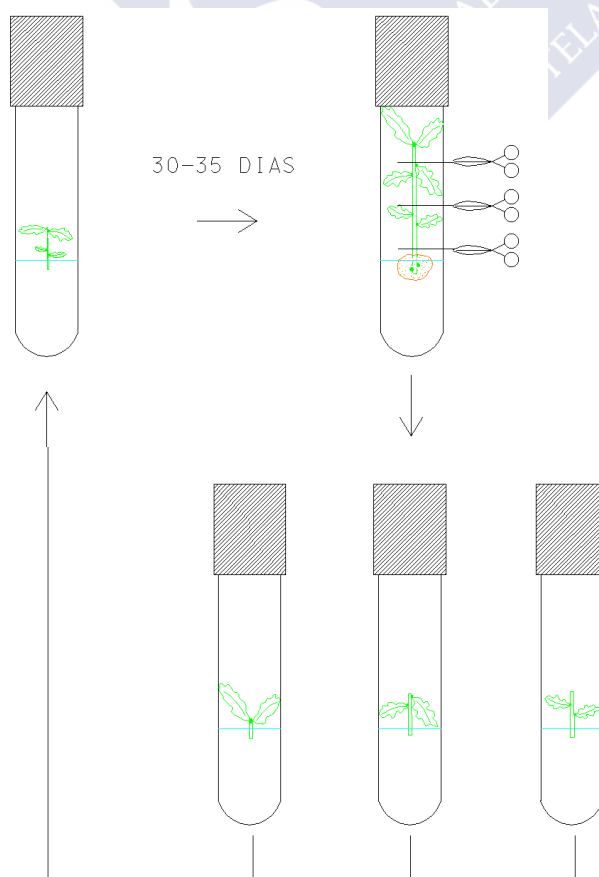
### **2.2.3 - Fases da micropropagación de nós e ápices**

A micropropagación abarca unha serie de fases, que van dende o momento en que o material vexetal que se pretende propagar se introduce *in vitro*, ata o momento no que se obteñen plantas en condicións de establecérense no campo. De forma xeral, a micropropagación de nós e ápices engloba catro fases:

1 - Introdución ou establecemento *in vitro*: corresponde á fase na que un fragmento do material vexetal procedente do exterior se introduce en condicións de cultivo *in vitro*. Debido a que a micropropagación ten lugar en condicións asépticas,

previamente á introdución *in vitro* é necesario levar a cabo un proceso de desinfección, para evitar a contaminación dos cultivos provocada polos microorganismos que poida portar o material vexetal procedente das condicións *ex vitro*. Unha vez desinfectado superficialmente, o explanto introdúcese nun medio de cultivo que contén reguladores do crecemento (normalmente citoquininas), para forzar o agromo das xemas que porta o explanto, obtendo así novos microbrotes que permitirán iniciar a fase de multiplicación.

2 - Fase de multiplicación: unha vez que se consegue o desenvolvemento dos primeiros microbrotes, e estes acadan unha lonxitude suficiente ( $\geq 2$  cm), divídense en partes máis pequenas (1-2 cm) e introdúcese en medio de multiplicación (normalmente cunha concentración de citoquininas inferior á utilizada para a fase de introdución *in vitro*). Transcorrido un certo tempo, e unha vez que os novos explantos producen novos microbrotes, repítese o proceso de división e introdución en medio de multiplicación (subcultivo) (Figura 4). Os sucesivos subcultivos teñen lugar a intervalos periódicos, obténdose cada vez un número maior de explantos. Esta fase finaliza cando se consegue acadar o número de microbrotes necesarios para o fin desexado.



**Figura 4.** Esquema da fase de multiplicación.

3 - Fase de enraizamento: esta fase ten lugar cando finaliza a fase de multiplicación, e consiste en inducir a formación de raíces nos microbrotes obtidos naquela, comportándose neste momento como microestacas. O enraizamento pode levarse a cabo *in vitro* ou *in vivo*. No primeiro caso conséguese, de forma habitual, utilizando medios de cultivo cunha concentración de macronutrientes máis baixa que para a multiplicación (Viéitez e Viéitez, 1983; Volkaert *et al.*, 1990), e utilizando auxinas como indutores do enraizamento. No segundo caso, as microestacas introdúcense directamente nun substrato utilizado en propagación (turba, perlita, area, mesturas), mantendo unha alta humidade relativa e utilizando tamén auxinas. É bastante frecuente que haxa unha porcentaxe de microestacas que non produzan raíces, fenómeno que é máis acusado en certas especies recalcitrantes, coma o carballo e o castiñeiro. Este é un problema fundamental da micropropagación destas especies, xa que esta fase é crucial para poder chegar a dispor de plantas completas.

4 - Fase de aclimatación: as microestacas que desenvolven raíces (vitroplantas) pasan á fase de aclimatación, que consiste no acondicionamento gradual das vitroplantas ás condicións exteriores. Isto faise, normalmente, introducindo as vitroplantas en bandexas de cultivo cun substrato semiestéril (turba, perlita, vermiculita, cortiza de piñeiro ou mesturas) e colocándoas en condicións ambientais controladas, iniciando o proceso con altos niveis de humidade ambiental, os cales se van reducindo progresivamente ata chegar ás condicións propias do ambiente natural. Unha vez remata esta fase, obtéñense plantas completas e independentes, xenotípicamente idénticas a aquelas das que se recolleu o material de partida.

#### **2.2.4 - Factores que afectan ó éxito da micropropagación**

A micropropagación vese influída por múltiples factores (Mantell, 1985; Debergh, 1988; Benson, 2000), entre os que destacan o estado fisiolóxico da planta nai, o medio e as condicións físicas de cultivo, o estrés fisiolóxico da planta *in vitro*, a idade da planta e, por suposto, o xenotipo.

Non tódalas especies arbóreas teñen a mesma facilidade para adaptarse á micropropagación; entre as consideradas doadas de propagar encóntrase por exemplo os xéneros *Betula* e *Populus*, mentres que os xéneros *Quercus* e *Castanea* se consideran de difícil multiplicación (McCown e McCown, 1987).

Con respecto ó medio de cultivo, existen diversas formulacións empregadas habitualmente no cultivo *in vitro*, como os medios de Heller (1953), MS (Murashige e Skoog, 1962), Lepoivre (Quoirin e Lepoivre, 1977), WPM (Woody Plant Medium) (Lloyd e McCown, 1981) e GD (Gresshof e Doy, 1972). A estes medios engádeselles frecuentemente un axente xelificante, unha fonte de carbono (xeralmente sacarosa), vitaminas e reguladores do crecemento. Os medios mais comúns son semisólidos, pero na actualidade están tomando importancia os medios líquidos, utilizando sistemas de inmersión temporal, onde os microbrotes non están continuamente en contacto co medio de cultivo, senón temporalmente a intervalos regulares (Kim, 2010; Troch *et al.*, 2010). No entanto, esta técnica ten aínda escaso uso en *Quercus robur* e *Castanea sativa* (Troch *et al.*, 2010; Mallón *et al.*, 2012).

Como xa se mencionou, un dos factores que máis inflúe no éxito da micropropagación das árbores é a idade do material de partida. Este aspecto, que xoga un papel central neste traballo, tratarase máis adiante de xeito detallado.

Os factores mencionados poden ser decisivos á hora de decidir comezar, ou non, un programa de micropropagación, xa que inflúen de forma máis ou menos directa na rendibilidade do mesmo. En certos casos, a micropropagación comercial pode non ser rendible, pero o gran desenvolvemento que experimentou nos últimos anos convértea nun método alternativo e complementario á propagación tradicional de árbores, que facilita enormemente a propagación en masa de xenotipos seleccionados, como parte do proceso dos programas de mellora xenética das especies cultivadas. Así mesmo, constitúe unha ferramenta moi útil para establecer modelos de estudo sobre os factores que afectan á propagación vexetativa, e mesmo para estudos a nivel de investigación básica no campo da fisioloxía vexetal.

### 2.2.5 - Cultivo *in vitro* no xénero *Quercus*

Os primeiros estudos de cultivo *in vitro* en *Quercus* datan dos anos cincuenta e versan sobre a formación e proliferación de calo a partir de tecido cambial, sen rexeneración de órganos completos (Jacquiot, 1952, 1956, 1973).

As primeiras referencias de organoxénese *in vitro* describiron a aparición de estruturas anómalas organoideas no cultivo de calos de *Quercus rubra* (Seckinger *et al.*, 1979). Lineberger (1980) relatou a presenza de estruturas nodulares no cultivo de calos de *Quercus palustris*. Srivastana e Steinhauer (1982) obtiveron formación de xemas, raíces e embrioides partindo de embrións de *Quercus lebaní*. Pevalek-Kozlina e Jelaska (1986) lograron o desenvolvemento e a elongación de xemas adventicias a partir de calos procedentes de brotes de plantas xuvenís de *Quercus robur* e *Quercus petraea*. Chalupa (1988) obtivo formación de calo e diferenciación de xemas adventicias mediante adición de TDZ (Tidiazurón) ó medio de cultivo.

A embrioxénese somática conseguiuase primordialmente sobre embrións cigóticos inmaturos (Sasaki *et al.*, 1988; Feraud-Keller *et al.*, 1989; Gingas e Lineberger, 1989; Maataoui *et al.*, 1990; Chalupa, 1990; Evers *et al.*, 1996b; Mauri e Manzanera, 2003). Non obstante, nestes estudos os resultados foron pouco satisfactorios en canto á rexeneración de plantas completas. Wilhelm (2000) conseguiu embrioxénese somática a partir de material adulto en algunhas especies do xénero *Quercus*. Chalupa (2000) promoveu a xerminación e a conversión de embrións somáticos de *Quercus robur* a plántulas mediante tratamentos de desecamento. Por outra banda, Hernández *et al.* (2001), obtiveron embrioxénese somática a partir de material adulto de *Quercus suber*.

Máis recentemente, conseguiuase a embrioxénese somática en material adulto de *Quercus robur* (Toribio *et al.*, 2004) con rexeneración de plantas completas. Para iso, cultiváronse follas en placas de Petri nun medio de MS (Murashige e Skoog, 1962), con 2,5  $\mu\text{M}$  de 6-benciladenina (BA) e 20  $\mu\text{M}$  de ácido naftalén-acético (ANA), cultivando explantos foliares en escuridade a 25 °C durante 42 días, e logo transferíndoos ó mesmo medio, reducindo a concentración de BA e ANA a 0,5  $\mu\text{M}$  e establecendo os cultivos cun fotoperiodo de 16 h de luz (30-40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 25  $\pm$  2 °C durante 30 días. O medio para a expresión da embrioxénese tiña a mesma composición, pero sen reguladores do crecemento. En todos os clons ensaiados a porcentaxe de embrioxénese

somática foi menor do 4 %. Porén, a embrioxénese secundaria permitiu obter resultados positivos.

Con respecto á micropropagación de *Quercus robur* a partir de xemas axilares (é dicir, a partir de meristemas xa existentes no explanto inicial), a bibliografía existente é moi ampla. A continuación cítanse diversos estudos tomando como referencia os resultados acadado nas diferentes fases da micropropagación.

#### *Introdución in vitro*

No proceso de introdución *in vitro* son importantes as condicións de obtención do material de partida, xa que, por exemplo, se debe ter en conta que hai períodos específicos durante o ciclo anual da árbore no que os tecidos mostran maior plasticidade morfoxenética (Bonga e Von Aderkas, 1992). En castiñeiro e carballo, os explantos procedentes de material colleitado no inverno, almacenado uns meses en frío e “forzado” en condicións controladas (Sánchez e Viéitez, 1991; Viéitez *et al.*, 1994) presentan unha mellor reactividade, cando son introducidos *in vitro*, que os explantos tomados directamente da árbore en período de actividade vexetativa.

Otero (1999) comprobou que a disposición horizontal sobre perlita de segmentos de rama conservados en frío e posteriormente sometidos a forzado é máis aconsellable, en canto á produción de explantos, que a colocación en vertical. Se non hai conservación previa en frío, a disposición vertical dá mellores resultados. Na fase de establecemento, os explantos procedentes dos segmentos de rama postos a forzar en posición vertical achegan mellores resultados que os procedentes da disposición horizontal sobre perlita.

Por outra banda, Llamazares (2003) determinou, en material adulto de *Quercus robur* var. “Fastigiata”, que o inicio da actividade vexetativa parece un momento axeitado para a obtención de material reactivo *in vitro*, do mesmo xeito que noutras especies (Pérez-Francés *et al.*, 2001; Thakur e Kanwar, 2008). Con respecto á composición do medio de cultivo utilizado na introdución *in vitro*, cómpre destacar a utilización dunha concentración de citoquinina máis elevada que a utilizada na fase de multiplicación, normalmente nun rango de valores que oscilan entre 0,5 e 1 mg·L<sup>-1</sup> (Chalupa 1981, 1984; Meier-Dinkel *et al.*, 1993; Viéitez *et al.*, 1993).

*Fase de multiplicación*

A multiplicación de nós e ápices é ata hoxe o método máis utilizado nos estudos de micropropagación de *Quercus robur* (Chalupa 1984, 1988, 1990, 1993, 2000; Viéitez *et al.*, 1985, 1994, 1997; Favre e Juncker, 1987; San José *et al.*, 1988; Volkaert *et al.*, 1990; Pevalek-Kozlina, 1991; Meier-Dinkel *et al.*, 1993; Juncker e Favre, 1994; Ostrolucka e Bezo, 1994), así coma en *Q. suber* (Bellarosa 1989; Manzanera e Pardos, 1990), *Q. acutissima* (Ide e Yamamoto, 1986; Sato *et al.*, 1987) ou *Q. rubra* (Vengadesan e Pijut, 2009).

Na fase de multiplicación xogan un papel decisivo os reguladores do crecemento, en concreto as citoquininas, que empregadas ás concentracións axeitadas estimulan o crecemento e eliminan a dominancia apical. En *Quercus robur* ensaiáronse diversas citoquininas, como a kinetina (Chalupa 1984, 1988), o TDZ (Chalupa, 1988), a zeatina (Juncker e Favre, 1994) e a BA, sendo esta última a máis utilizada e a que mellores resultados proporciona. Ás veces usáronse combinadas con outros tipos de reguladores do crecemento, como o GA<sub>3</sub> (Ostrolucka e Bezo, 1994), ANA (San José *et al.*, 1983) ou AIB (Pevalek-Kozlina e Jelaska, 1986). Aínda así, na micropropagación do carballo, a BA utilizada como único regulador do crecemento achega resultados satisfactorios, cunha concentración óptima na fase de multiplicación que varía entre 0,1 e 0,5 mg·L<sup>-1</sup> (Táboa 1). Estas concentracións de BA foron utilizadas, así mesmo, na micropropagación doutras especies do xénero *Quercus* (San-José *et al.*, 1990; Chalupa, 1993).

O tipo de medio de cultivo tamén foi estudado na micropropagación de *Quercus robur*, sendo, de forma xeral, GD e WPM os que mellores resultados achegan (Táboa 1), aínda que os resultados dependen en gran medida do xenotipo. Outros medios, empregados con menor frecuencia, foron MS (Chalupa, 1993), Heller (San José *et al.*, 1983; Viéitez *et al.*, 1993) ou Lepoivre (San José *et al.*, 1983).

Así mesmo, na fase de multiplicación téñense estudado outros factores como a fonte de carbono (sacarosa, glucosa ou frutosa) e a súa concentración no medio de cultivo (Gruselle e Nicaise, 1997), o tipo de agar (Pierik, 1997b; Iglesias-Díaz *et al.*, 2000), a intensidade lumínica (Iglesias-Díaz *et al.*, 2000), e a temperatura (Puddephat *et al.*, 1997), entre outros.

**Táboa 1.** Estudos nos que foron utilizados os medios GD e/ou WPM con adición de BA na multiplicación *in vitro* de *Quercus robur*. Indícase a concentración de BA utilizada.

Referencia	[BA] (mg·L <sup>-1</sup> )	Medio de cultivo
San José <i>et al.</i> , 1983	0,1 e 0,2	GD
San-José <i>et al.</i> , 1988	0,2	GD
Pevalek-Kozlina, 1991	0,2	GD
Viéitez <i>et al.</i> , 1994	0,2	GD
Otero, 1999	0,2	GD
Meier-Dinkel <i>et al.</i> 1993	0,2	GD e WPM
Evers <i>et al.</i> , 1993	0,5	WPM
Chalupa, 1993	0,2	WPM

### *Fase de enraizamento*

No material adulto da especie *Quercus robur*, é habitual que a fase de enraizamento sexa máis difícil de abordar con éxito, debido a que a porcentaxe de microestacas que enraízan é normalmente baixa. Por este motivo, foron numerosos os estudos que incidiron no estudo do enraizamento de microbrotes adultos de carballo.

En canto ós reguladores do crecemento utilizados para inducir a formación de raíces nas microestacas, os máis importantes son as auxinas. Utilizáronse diferentes tipos de auxinas, como ANA, AIA e, especialmente, AIB (Táboa 2). A necesidade de auxinas para conseguir rexeneración radical eficaz non é constante ó longo do proceso de enraizamento adventicio, xa que despois da iniciación da raíz, o desenvolvemento dos primordios radicais require unha baixa concentración destas (Pierik, 1990a). Os métodos utilizados para achegar a hormona ás microestacas no enraizamento *in vitro* son basicamente dous: (1) engadir a auxina no medio de cultivo, facendo xeralmente unha transferencia das microestacas a medio sen hormona despois dun período variable (normalmente entre 1-7 días) ou (2) mergullar os brotes nunha solución concentrada de auxina antes da introdución nun medio de enraizamento sen reguladores do crecemento (Táboa 2). O método máis económico adoita ser o segundo, xa que non precisa transferencia a un medio de cultivo diferente do inicial. Respecto ó máis axeitado, os resultados demostran que o éxito de cada método depende en gran parte do xenotipo (Sánchez *et al.*, 1996), aínda que as diferenzas entre ambos métodos non adoitan ser moi elevadas. A concentración de hormona utilizada e os tempos de exposición á

mesma foron variados, utilizándose as concentracións máis altas durante poucos segundos, e, as máis baixas, durante varios días. Os medios de cultivo para a expresión do enraizamento *in vitro* adoitan levar unha concentración de sales menor que para a multiplicación (Táboa 2).

Respecto ó enraizamento *ex vitro* ou *in vivo* (Chalupa, 1993; Meier-Dinkel *et al.*, 1993), a hormona proporciónase mergullando as microestacas nunha disolución concentrada, do mesmo xeito que no enraizamento *in vitro*, ou nunha mestura en po da auxina con outras substancias, xeralmente talco.

Pierik *et al.* (1997a) analizaron a capacidade de enraizamento de material adulto e xuvenil de *Quercus robur* “Fastigiata”, concluíndo que o subcultivo prolongado de brotes adultos non modifica a súa capacidade de enraizamento e que este só se produce se no medio están presentes azucre, auxina e macronutrientes. Otero (1999) observou, ó igual que outros autores (Pierik 1997a), que o enraizamento é maior no material xuvenil que no adulto, con grandes diferenzas en función do xenotipo. Este punto tratarase polo miúdo máis adiante.

Á parte dos reguladores do crecemento, hai estudos sobre o efecto doutros factores no enraizamento. Viéitez *et al.* (1994) citan a necesidade dun período inicial máis ou menos prolongado de escuridade durante a indución ó enraizamento. Noutros estudos (Llamazares, 2003), o período de escuridade inicial favorece o enraizamento unicamente cando as concentracións de AIB son baixas ( $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

A adición de carbón activo ó medio de enraizamento tamén foi estudada, obténdose melloras no enraizamento (Volkaert *et al.*, 1990). Sánchez *et al.* (1996) combinaron o emprego de auxina (AIB) coa presenza de carbón activo no enraizamento de microbrotes de *Quercus robur* e *Quercus rubra*, concluíndo que o carbón activo melloraba as porcentaxes de enraizamento en varios dos clons estudados, e a calidade dos brotes, e do sistema radicular, en todos eles.

Outros parámetros estudados no enraizamento foron, entre outros, a adición de poliaminas (Soto, 2003), a fonte de carbono (Simpson e Marks, 1995; Llamazares, 2003) ou o tipo de axente xelificante (Simón-Pérez *et al.*, 1997).

**Táboa 2.** Condicións de enraizamento utilizadas en diversos estudos de micropropagación de *Quercus robur* (MC: hormona engadida ó medio de cultivo; IB: inmersión basal en disolución concentrada).

Referencia	Tipo de hormona	Exposición á hormona	Concentración e tempo de exposición	Medio de expresión
Chalupa 1981, 1984	AIB	MC	0,3 mg·L <sup>-1</sup>	
	ANA		0,1 mg·L <sup>-1</sup>	
Volkaert <i>et al.</i> , 1990	AIB e ANA	MC	0,04 - 4 mg·L <sup>-1</sup>	1/2 WPM
Otero, 1999	AIB	MC	3 mg·L <sup>-1</sup>	
Puddephat <i>et al.</i> , 1999	AIB	MC	1 mg·L <sup>-1</sup> - 7 días	
		MC	3 mg·L <sup>-1</sup> - 7 días	
Sánchez <i>et al.</i> , 1996	AIB	MC	25 mg·L <sup>-1</sup> - 1 día	1/3 GD
		IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 30 s	
San-José <i>et al.</i> , 1988	AIB	IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 120 s	1/2 GD
San José <i>et al.</i> , 1983	AIB	IB	0,5 g·L <sup>-1</sup> - 10 min	
			1 g·L <sup>-1</sup> - 2 min	
Pevalek-Kozlina, 1991	AIB	g		1/2 GD
Llamazares, 2003	AIB	IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 30 s	

### *Fase de aclimatación*

Con respecto á fase de aclimatación, os factores que máis inflúen son as condicións ambientais ás que se someten as microestacas ou microbrotes e o substrato no que se introducen.

Volkaert *et al.* (1990) aclimataron microbrotes de carballo en vermiculita, humedecida cunha disolución mineral e manténdoos nun invernadoiro con temperaturas entre 20 e 30 °C, cun fotoperíodo natural, unha humidade relativa do 80 % e regando unha vez á semana con auga desionizada. Así, conseguiron unha supervivencia dun 90 %, acadando as plantas ós 2 meses unha lonxitude de 10-15 cm. Altos niveles de supervivencia tamén foron conseguidos por Chalupa (1988) ó transplantar os

microbrotes enraizados ó solo. Noutros casos, como na especie *Quercus rubra*, a supervivencia na aclimatación non superou o 30 % (Vengadesan e Pijut, 2009).

Por outra banda, Sha Valli Khan *et al.* (1999), para aclimatar brotes de carballo enraizados *in vitro*, transplantáronos a bandexas de plástico con vermiculita estéril e saturada cunha disolución de ½ MS. Tres semanas despois foron transplantadas de novo a envases con substrato fertilizado e mantidas en invernadoiro. Analizando as características dos estomas e a perda de auga, concluíron que as plantas aclimatadas tiñan estomas en forma de elipse, mentres que nas follas dos brotes na fase de multiplicación *in vitro* a densidade de estomas era maior, con forma esférica e con aberturas máis grandes. A forma esférica dos estomas está relacionada cunha menor funcionalidade, mentres que a elipsoide denota un funcionamento normal (Zacchani *et al.*, 1997). En canto á perda de auga, as follas de cultivo *in vitro* perdían un 88 % do seu contido en 30 min ó situálas en aire seco, mentres que as follas aclimatadas soamente perdían un 14 % no mesmo intervalo de tempo. Resultados moi parecidos, en canto á perda de auga, foron encontrados na especie *Quercus suber* (Romano e Martins-Loução, 2003).

#### 2.2.6 - Cultivo *in vitro* no xénero *Castanea*

Existen multitude de estudos de multiplicación *in vitro* de castiñeiro a partir de xemas adventicias e/ou por embrioxénese somática. Por exemplo, San José e Viéitez (1984), conseguiron a formación de xemas adventicias en seccións de epicotilo de plántulas de castiñeiro, mediante a adición de BA ó medio, obtendo os mellores resultados co medio de Heller (1953) e os tratamentos con 2 mg·L<sup>-1</sup> de BA soa ou en combinación con 0,01 mg·L<sup>-1</sup> de ANA ou AIB.

Co obxectivo de obter un protocolo de rexeneración de plantas de castiñeiro para usar en enxeñería xenética, Mulin *et al.* (1999) utilizaron seccións lonxitudinais de entrenós e segmentos de entrenós de brotes cultivados *in vitro*. Para estimular a formación de brotes adventicios empregaron medio MS modificado, con BA e AIA, obtendo brotes que enraizaron *in vitro* e foron funcionais unha vez transferidos ó solo.

Giovannelli *et al.* (2004) obtiveron brotes e raíces adventicios a partir de fragmentos de cotiledóns de *Castanea sativa*. A presenza ou ausencia de reguladores do

crecemento non influíu significativamente na rexeneración de raíces, mentres que as citoquininas estimularon a formación de brotes.

En canto ós estudos de embrioxénese somática no xénero *Castanea*, estes fixéronse inicialmente a partir de embrións cigóticos inmaturos (Merkle *et al.*, 1991; Viéitez, 1995; Xing *et al.*, 1999). Sauer e Wilhelm (2005) investigaron a iniciación da embrioxénese somática a partir de diferentes explantos xuvenís de castiñeiro: ovarios, óvulos e embrións cigóticos inmaturos, obtendo os mellores resultados nos embrións cigóticos recollidos 5-10 semanas despois da antese.

Ballester *et al.* (2001) estudaron a indución de embrioxénese en *Castanea sativa* a partir de tecidos procedentes de castañas, 1-10 semanas despois da antese, e a partir de seccións de folla e de entrenós. No primeiro caso, comparando os resultados a partir de diferentes explantos, a porcentaxe de embrións somáticos conseguidos foi de 5,1 % para os ovarios, 3 % para os óvulos e 27 % para os embrións cigóticos. As follas e entrenós, procedentes de brotes dun clon xuvenil cultivado *in vitro*, cultiváronse en medio MS con diferentes concentracións de BA en combinación con AIA ou ANA. Despois de 6 semanas, transferíronse ó mesmo medio con  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA e  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA durante 4 semanas. Os resultados mostraron unha baixa ocorrencia de embrioxénese (0,5 %), que se consegue con  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA e  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA no medio inicial. Unha vez formados os embrións, estes son subcultivados en medio MS, coa metade da concentración de macronutrientes, e con  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA e  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA, obténdose novos embrións por embrioxénese secundaria.

Por outra banda, Corredoira (2002) demostrou que a indución de embrións somáticos é posible a través de material clonal cultivado *in vitro*. Estableceu liñas embrioxénicas a partir de explantos procedentes de follas de brotes cultivados *in vitro*, usando medio MS con  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA e  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA. Posteriormente (Corredoira *et al.*, 2003), estudouse a embrioxénese secundaria a partir dos embrións somáticos iniciais, con respecto á fase de maduración e xerminación. Neste estudo optimizouse o medio de maduración engadindo un 3 % de maltosa, e determinouse que a conversión a plántulas soamente ten lugar nos embrións sometidos a un tratamento en frío.

Con respecto á multiplicación *in vitro* de nós e ápices a partir de xemas preexistentes de *Castanea sativa*, existen igualmente na bibliografía multitude de

estudos, que se comentan tomando como referencia os resultados acadados nas diferentes fases da micropropagación.

### *Introdución in vitro*

Respecto á época de colleita do material vexetal de castiñeiro do que se tomarán explantos para introducir *in vitro*, debe terse en conta que o material colleitado no inverno produce maior exudación de taninos que se é colleitado na primavera ou verán (Biondi *et al.*, 1981), os cales poden afectar negativamente ó desenvolvemento dos explantos. Mert e Soyly (2009) utilizaron ápices de xemas en repouso como fonte de explantos para iniciar a fase de multiplicación en tres clons de castiñeiro, conseguindo así ampliar a época de dispoñibilidade de material fronte ó método convencional, onde se adoita utilizar brotes na época de crecemento vexetativo.

En canto ó proceso de desinfección previo ó establecemento *in vitro*, o tratamento con lixivia é máis efectivo que con auga osixenada, e o grao de contaminación depende do estado vexetativo da planta nai e da localización e tipo de explanto inicial (Ferrador *et al.*, 2005). Os microorganismos endóxenos máis habituais pertencen ós xéneros *Bacillus* e *Pseudomonas*. Viéitez *et al.* (2007) aconsellan utilizar brotes procedentes de forzado de segmentos de rama, en cámara de cultivo, para reducir a porcentaxe de contaminación no establecemento *in vitro*.

Os medios de cultivo máis empregados para o establecemento *in vitro* foron MS (Viéitez e Viéitez, 1980; Mullins, 1987) e GD (Sánchez e Viéitez, 1991; Viéitez *et al.*, 2007), principalmente. Con respecto ás hormonas, a BA é a que mellores resultados proporciona, en concentracións que varían entre 0,5 e 1 mg·L<sup>-1</sup> (Viéitez e Viéitez, 1980; Sánchez e Viéitez, 1991; Viéitez *et al.*, 2007).

### *Fase de multiplicación*

Na fase de multiplicación, coma no caso do carballo, a hormona máis empregada en cultivo *in vitro* de nós e ápices é a BA; en combinación con outros reguladores, como ANA (Viéitez e Viéitez, 1983) ou AIB (Chevre *et al.*, 1983), ou como único regulador do crecemento, resultou ser máis efectiva que outras citoquininas (Osterc *et al.*, 2005). Os medios de cultivo máis empregados son GD e MS. Na Táboa 3 detállanse os medios de cultivo e a concentración de BA que achegaron os mellores resultados en diversos estudos de micropropagación de castiñeiro.

**Táboa 3.** Medios e concentracións de BA empregados en diversos estudos de multiplicación *in vitro* de nós e ápices de *Castanea sativa*.

Referencia	[BA] (mg·L <sup>-1</sup> )	Medio de cultivo
Viéitez e Viéitez, 1980	0,1	MS
Viéitez e Viéitez, 1983	0,1-0,5	MS, Heller, Lepoivre
Chevre <i>et al.</i> , 1983	1	MS
Sánchez e Viéitez, 1991	0,2	GD
Gonçalves <i>et al.</i> , 1998	0,2	GD
Miranda-Fontaíña e Fernández-López, 2001	0,2	GD
Osterc <i>et al.</i> , 2005	1	MS-1/2NO <sub>3</sub>
Viéitez <i>et al.</i> , 2007	0,1-0,2	GD

O medio GD foi un dos máis usados na multiplicación *in vitro* do castiñeiro, e é o medio de referencia nos protocolos actuais de micropropagación para *Castanea sativa* (Viéitez *et al.*, 2007), onde se aconsella utilizar xunto coa adición de 0,1-0,2 mg·L<sup>-1</sup> de BA. No noso laboratorio téñense obtido mellores resultados utilizando medio WPM que con GD, como sucede, por exemplo, en *C. dentata* (Xing *et al.*, 1997; Guochen *et al.*, 2009). No tocante á concentración de BA, a nosa experiencia di que, globalmente, 0,1 mg·mL<sup>-1</sup> achega mellores resultados que 0,2 mg·mL<sup>-1</sup>. A BA a doses baixas tamén deu bos resultados en híbridos con *Castanea crenata* (Viéitez *et al.*, 1983; Sánchez e Viéitez, 1991; Ballester *et al.*, 2001), ou noutras especies do mesmo xénero, coma *C. mollissima* (Qi-Guang *et al.*, 1986). No entanto, coma noutros aspectos da micropropagación, a resposta a un ou outro medio de cultivo ou concentración hormonal depende en gran medida do xenotipo (Chauvin e Salesses, 1988; Miranda-Fontaíña e Fernández-López, 2001).

Outros aspectos, que tamén foron estudados na fase de multiplicación do castiñeiro, foron o tratamento con antioxidantes para reducir o exudado de taninos ó medio por parte dos brotes (Chevre *et al.*, 1983), a concentración de nitróxeno no medio (Piagnani e Eccher, 1988), o tipo de fonte de carbono (Ballester *et al.*, 2001) ou a orientación do explanto no medio de cultivo (Sánchez *et al.*, 1997).

*Fase de enraizamento*

Do mesmo xeito que o carballo, o castiñeiro considérase unha especie difícil de enraizar no estado adulto, o que condiciona moito o éxito da micropropagación. Foron moitos os estudos enfocados a solucionar o problema do enraizamento *in vitro*, cuxos resultados máis significativos se mencionan a continuación.

No tocante ó medio de cultivo e ós reguladores do crecemento empregados na fase de enraizamento, na bibliografía atópanse numerosas referencias, que inclúen como factor determinante do éxito desta fase, do mesmo xeito que no carballo, a presenza dun estímulo auxínico, normalmente o AIB (Táboa 4).

Noutras especies de *Castanea*, as condicións de enraizamento foron semellantes ás detalladas na Táboa 4. Por exemplo, Viéitez *et al.* (1983), para enraizar brotes cultivados *in vitro* de híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata*, mergullaron a base dos brotes en disolucións de AIB a unha concentración de  $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  e  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 15 min e 2 min respectivamente. Neste mesmo híbrido, Gonçalves *et al.* (1998) mergullaron a base dos brotes nunha disolución de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB durante 1 min, ou mantiveron as microestacas 5 días nun medio con  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB.

O enraizamento de microestacas de *Castanea mollissima* conseguiuase mergullando a base das mesmas, durante 1 s, en disolucións de 2 e  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de AIB, obtendo os mellores resultados coa concentración máis elevada (Qi-Guang *et al.*, 1986). Na especie *Castanea dentata* (Marsh.) Borkh., o enraizamento levouse a cabo mergullando a base das microestacas en disolucións de AIB ( $2$  ou  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 1 min e transferíndoas a medio MS coa metade de concentración de macronutrientes (Xing *et al.*, 1997).

Outros factores estudados no enraizamento de microestacas de castiñeiro foron, por exemplo, a concentración de sacarosa no medio de cultivo e a temperatura da cámara de cultivo (San José e Viéitez, 1984), a adición de carbón activo ó medio para evitar a necrose apical das microestacas (Viéitez *et al.*, 1989) e a influencia das micorrizas na supervivencia de microestacas (Martins *et al.*, 1996, 1997), entre outros.

**Táboa 4.** Condicións de enraizamento utilizadas en diversos estudos de micropropagación de *Castanea sativa* (MC: hormona engadida ó medio de cultivo; IB: inmersión basal en disolución concentrada).

Referencia	Tipo de hormona	Exposición á hormona	Concentración e tempo de exposición	Medio de expresión
Chevre <i>et al.</i> , 1983	AIB	MC	1 mg·L <sup>-1</sup>	
		IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 20 s	MS
Viéitez e Viéitez, 1983	AIB e ANA	MC	3 mg·L <sup>-1</sup> - 12 días	1/2 MS (1/2 NO <sub>3</sub> )
		IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 2 min	
San José e Viéitez, 1984	AIB	MC	2 mg·L <sup>-1</sup> - 6 días	1/2 MS (1/2 NO <sub>3</sub> )
		IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 2 min	
Sánchez e Viéitez, 1991	AIB	IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 0,5 - 3 min	1/3 GD
Viéitez <i>et al.</i> , 2007	AIB	MC	3 mg·L <sup>-1</sup> - 5-7 días	
		MC	25 mg·L <sup>-1</sup> - 1 día	
		IB	1 g·L <sup>-1</sup> - 1-2 min	

#### *Fase de aclimatación*

No que atinxe á fase de aclimatación, Viéitez *et al.* (2007) indican que a porcentaxe de supervivencia das microestacas de castiñeiro é maior se o enraizamento ten lugar directamente no substrato de aclimatación que se ten lugar *in vitro*. Isto foi comprobado previamente por Gonçalves *et al.* (1998) na aclimatación de microestacas de híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata*.

Respecto ó protocolo aconsellado por Viéitez *et al.* (2007), unha vez que os brotes son mergullados en hormona, trasládanse a bandexas de poliestireno, colocando 100 brotes por bandexa, cunha mestura 1:2 de cortiza de piñeiro e perlita tratada con solución funxicida. As bandexas tápanse cun film de polietileno transparente e déixanse nunha cámara de cultivo durante 2 meses, onde se regan dúas veces á semana, unha con solución funxicida e outra con auga. Posteriormente, sácanselles as tapas e lévanse ó invernadoiro durante 1 mes, utilizando un sistema de nebulización para manter un 90 % de humidade relativa. Finalmente, as plantas enraizadas trasládanse a envases individuais cunha mestura 1:2:1 de cortiza de piñeiro, perlita e turba suplementada con Osmocote®, e sométense a unha humidade relativa progresivamente máis baixa.

Outros factores estudados na aclimatación de híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata* foron a influencia da intensidade lumínica (Gonçalves *et al.*, 2000; Carvalho e Amâncio, 2002) e da concentración de CO<sub>2</sub> (Ballester *et al.*, 2001; Carvalho e Amâncio, 2002), obtendo os mellores resultados coas intensidades de luz máis elevadas (300 vs 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) e concentracións de CO<sub>2</sub> máis altas (700 vs 350 ppm).

## **2.2.7 - A maduración e a súa influencia na micropropagación**

### **2.2.7.1 - Maduración e propagación vexetativa nas árbores**

Como xa se comentou anteriormente, un dos factores que máis inflúen sobre a capacidade de multiplicación dun material vexetal é o seu grao de xuvenildade ou madurez, e estes relaciónanse directamente co proceso de maduración ou cambio de fase.

No desenvolvemento de tódalas especies leñosas hai un período no que a floración non é posible de forma natural, coñecéndose dito período como fase xuvenil. A súa duración é variable, oscilando dende unhas semanas nas plantas herbáceas ata varios anos nas leñosas. Unha vez que se acada a capacidade de florecer e se mantén baixo condicións naturais, considérase que a planta entrou na fase adulta. O paso dunha a outra fase denomínase cambio de fase ou maduración (Hackett e Murray, 1996).

A maduración pode definirse, globalmente, como un proceso de desenvolvemento que inclúe cambios en características morfolóxicas e fisiolóxicas que conducen ó estado reprodutivo. Unha vez que se acada o estado adulto, este é relativamente estable, xa que normalmente non ten lugar a reversión ó estado xuvenil. No entanto, dita reversión prodúcese de forma natural durante a reprodución sexual e apomítica. Ademais, pode ser inducida por medio de certos tratamentos que conlevan a formación de brotes adventicios e de embrións somáticos.

Mentres que a propagación vexetativa do material xuvenil se leva a cabo facilmente empregando métodos tradicionais (Hackett, 1976; Mantell, 1985), o envellecemento fisiolóxico que conduce ó estado adulto afecta negativamente a este tipo de propagación (Hackett, 1985; Bonga e Von Aderkas, 1992; Huang *et al.*, 1995; Ewald, 1999). Non obstante, as plantas nai para propagación vexetativa son a miúdo árbores adultas, porque é nesta fase, normalmente, cando se poden seleccionar por

aquelas características que as fan interesantes para ser clonadas, e que demostraron no campo durante un tempo suficiente (Bonga e Von Aderkas, 1992).

Numerosos autores demostran nos seus estudos o diferente comportamento *in vitro* do material xuvenil e adulto en *Quercus robur* L. (Chalupa, 1981, 1984; Viéitez *et al.*, 1985; San-José *et al.*, 1985, 1988; Favre e Juncker, 1987; Juncker e Favre, 1989; Evers *et al.*, 1996a; Appelgren e Vintland, 1997; Appelgren, 1997; Pierik *et al.*, 1997a; Pierik *et al.*, 1997b) e *Castanea sativa* Mill. (Biondi *et al.*, 1981; Chevre *et al.*, 1983; Mullins, 1987; Sánchez e Viéitez, 1991; Ballester *et al.*, 1999), sendo sempre o material adulto máis difícil de propagar que o xuvenil.

Durante o cambio de fase, ademais da transición cara ó estado reprodutivo, teñen lugar cambios progresivos noutros atributos, como modificacións nas cutículas foliares, na cortiza, na forma e grosor das follas, na presenza ou non de espiñas, na orientación dos brotes, na pigmentación do caule, no tamaño dos ápices, na resistencia a enfermidades, na velocidade de crecemento ou na capacidade de formación de xemas e raíces adventicias (Hackett e Murray, 1993). En ocasións, algúns destes atributos, coma o ángulo de inserción dos brotes ou algunhas características biométricas do caule, poden servir de marcadores morfolóxicos da xuvenilidade, como amosan algúns estudos (McGowran *et al.*, 1998) en *Quercus robur* e *Quercus petraea*.

Os problemas que presenta a propagación vexetativa de material adulto acentúanse ó traballar con material seleccionado para o eido forestal, xa que a diminución no vigor de crecemento que acompaña á maduración é un factor negativo que incide directamente na produción de madeira (Bonga, 1982).

#### **2.2.7.2 - Fundamentos do cambio de fase**

O meristema apical e a rexión meristemática subapical do ápice dun caule, así coma os puntos de inserción das follas, son os lugares onde se orixinan as diferentes vías de diferenciación celular, de tecidos e órganos. Este feito leva á conclusión de que estas partes da planta están relacionadas coas diferenzas en características fisiolóxicas, anatómicas e morfolóxicas que acompañan á maduración (Hackett e Murray, 1996). Pénsase que a xuvenilidade é un estado que existe nos meristemas (Thomas, 2002), e a través dunha serie de pasos avanza a un estado relativamente estable característico do meristema adulto (Pierik, 1990b).

Para explicar a estabilidade que acompaña á adquisición do estado adulto, propuxéronse as seguintes hipóteses (Wareing e Frydman, 1976):

- Hipótese celular: as variacións entre o estado xuvenil e adulto débense a diferenzas intrínsecas entre as células meristemáticas dos ápices xuvenís e adultos.
- Hipótese estrutural e de organización: as propiedades estables dos meristemas débense á estrutura e organización do ápice caulinar coma un todo.
- Hipótese correlativa: a estrutura e propiedades do meristema apical están controladas por influencias de tecidos diferenciados preexistentes e localizados en zonas máis ou menos remotas da planta.

Os datos experimentais non exclúen ningunha das tres, polo que é moi factible que o proceso de maduración se desenvolva nos tres niveis, e mesmo que o peso relativo de cada un deles sexa diferente segundo a especie considerada (Hackett, 1985).

### 2.2.7.3 - Control do cambio de fase

En canto ós factores que desencadean o cambio de fase, Haffner *et al.* (1991) conclúen que son as hormonas vexetais as que controlan a maduración, e que os ratios entre elas son máis importantes que a súa concentración absoluta. O feito de que o GA<sub>3</sub> exógeno poida causar reversión a un estado xuvenil de plantas de *Hedera helix* adultas (Robbins, 1957) conduciu á hipótese de que esta hormona era importante no proceso de maduración. Outros experimentos concluían que as xiberelinas poderían ser as responsables do proceso de maduración (Pharis e King, 1985), xa que promovían a floración. No entanto, se o contido de xiberelinas inflúe na maduración, debería haber un mecanismo que regulase as concentracións endóxenas destas substancias, e probablemente doutras hormonas, ou a capacidade da planta para responder á súa presenza.

Por outra banda, dende o punto de vista xenético, o paso ó estado adulto contéplase como unha acumulación de cambios epixenéticos, que supoñen a expresión diferencial dalgúns xenes, pero non necesariamente un cambio permanente na constitución do xenoma (Gil *et al.*, 2003). O control da expresión diferencial de xenes

nunha porcentaxe relativamente pequena de células da planta (neste caso as células meristemáticas) pode resultar nunha gran diferenza no fenotipo (Hackett e Murray, 1996).

Os cambios na expresión xénica que teñen lugar durante o crecemento e conducen ó estado adulto aínda non se coñecen totalmente (Poethig, 2010). Unha das hipóteses máis aceptadas en canto á modulación dos cambios epixenéticos que teñen lugar no cambio de fase fai referencia á metilación das cadeas de ADN a nivel da citosina, o que impediría a transcrición dos xenes (Bolstad e Libby, 1982; Vanyushin e Kirnos, 1988; Poethig, 1990; Fraga *et al.*, 2002b; Fraga *et al.*, 2002c). Nos organismos superiores, a medida que transcorre o desenvolvemento, o ADN experimenta un aumento progresivo no grao de metilación, o que provocaría a modificación da expresión xénica, responsable da variación nos caracteres adquiridos coa maduración (Razin e Riggs, 1980). O incremento dos niveis de metilación está normalmente asociado cun descenso da expresión xénica a nivel da transcrición (Razin e Szyf, 1984). Diversos resultados mostran a activación ou represión de xenes e a presenza de proteínas diferenciais segundo o estado ontoxenético do material (Bon, 1988; Huang *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003a). Este proceso coñécese como plasticidade fenotípica, xa que afecta á expresión do ADN, pero non á súa composición.

Por outra banda, segundo Arnholdt-Schmitt *et al.* (1995), a diferenciación e dediferenciación celular, así como a división, están acompañadas por procesos de metilación e demetilación do ADN en tecidos específicos.

Paralelamente ó fenómeno da metilación, os estudos xenéticos máis recentes parecen indicar que certos microRNAs teñen un papel fundamental no cambio de fase (Wu e Poethig, 2006; Poethig, 2010; Wang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011), a través dun mecanismo coñecido como ‘silenciamento xénico’. Este mecanismo permitiría que a maquinaria celular impedise a expresión dun xene que debería estar activo.

A expresión xénica pode regularse tanto a nivel transcricional como post-transcricional. No primeiro caso, o silenciamento prodúcese a nivel das histonas, e no segundo, a través da degradación dun determinado ARN mensaxeiro (ARNm). A destrución deste ARNm impide a súa normal tradución e como consecuencia non se sintetiza a proteína correspondente. Dise que esta degradación é específica de secuencia, xa que soamente degrada moléculas de ARNm que conteñan unha secuencia en

particular. É un proceso dirixido inicialmente por precursores de ARN de dobre cadea, que rapidamente se transforman en pequenas moléculas de ARN de 21-28 nucleótidos de lonxitude (Meister e Tuschl, 2004), coñecéndose como ARN de interferencia (ARNi).

Unha das características que define o proceso de silenciamento a través de ARN é que pode actuar en zonas distantes a aquela onde ten lugar a síntese do mesmo. O sinal de silenciamento xénico parece moverse dunha célula a outra a través dos plasmodesmos e ó longo da planta polo floema (Kehr e Buhtz, 2008). Estudos recentes suxiren que o transporte de ARN a través do floema non é un proceso raro, senón bastante frecuente nas plantas superiores (Lucas *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2004). O floema parece ser unha ruta de transporte ideal para o ARN, debido a que, a diferenza doutros tecidos, no zume do floema non se detectou actividade RNasa (Sasaki *et al.*, 1998; Doering-Saad *et al.*, 2002). O movemento a longa distancia de moléculas de ARNm pode estar relacionado cun sinal auxínico (Omid *et al.*, 2007).

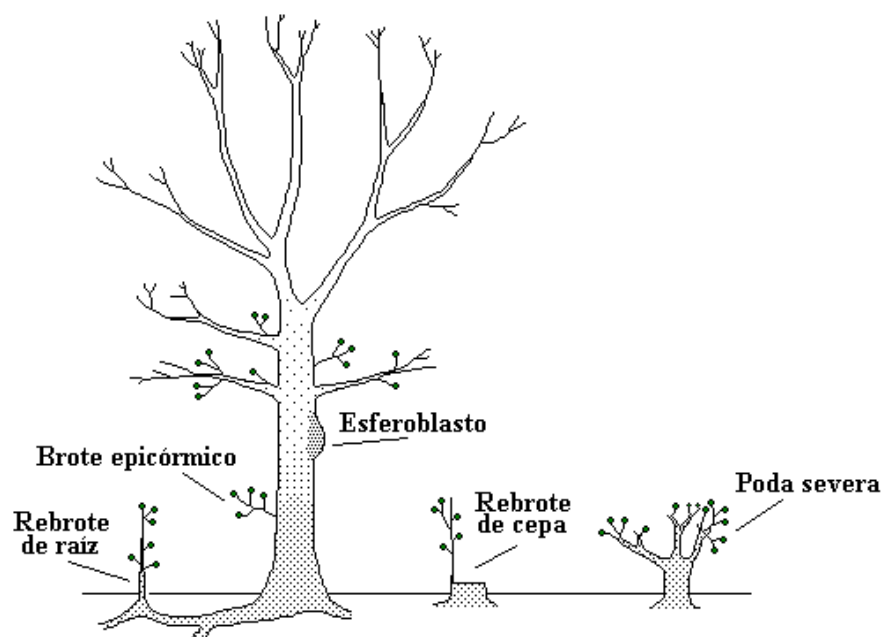
O sinal pode moverse bidireccionalmente, pero de forma máis eficiente en sentido acropétalo que basipétalo (Voinnet *et al.*, 1998; Sonoda e Nishiguchi, 2000). Parece que o silenciamento de xenes non se produce nas zonas meristemáticas, pero non se demostrou se é que o sinal non pode acceder ós tecidos meristemáticos ou se dito tecido é capaz de facerse insensible ó sinal.

#### **2.2.7.4 - Partes “xuvénis” en plantas adultas**

Moitas árbores conservan un gradiente de xuvenilidade cara á base do tronco. O grao de xuvenilidade dun meristema apical dependería da súa distancia á base do tronco e, consecuentemente, ás raíces. Así, os brotes das ramas periféricas dunha árbore, que son os máis xuvénis cronoloxicamente, serían os máis adultos dende o punto de vista ontoxenético (Bonga, 1982; Hackett, 1987; Francllet e Boulay, 1989), mentres que as partes basais e inferiores terían características máis xuvénis (Ball, 1978; Bonga e Von Aderkas, 1992).

Baseándose neste gradiente de xuvenilidade, terían carácter xuvenil os rebentos basais (producidos pola árbore de forma natural), os rebentos de cepa (como resultado da corta da árbore), os rebentos de raíz, os brotes epicórmicos e os esferoblastos. No

diagrama da Figura 5 represéntase graficamente o gradiente de xuvenilidade dunha frondosa.



**Figura 5.** Diagrama dos gradientes de xuvenilidade en frondosas (Bonga, 1992). A densidade da trama indica o grao de xuvenilidade. Brotes epicórmicos, rebrotes de raíz, esferoblastos, rebrotes de cepa e árbores sometidas a podas severas son xuvenís. Na zona xuvenil, nótese o tronco simple, a retención de follas preto do tronco en inverno e as ramas formando ángulos obtusos. Na zona madura, nótese a bifurcación do tronco e as ramas formando ángulos agudos.

Sánchez e Viéitez (1991) demostraron que, en castiñeiro, o material procedente de renovos basais presenta unha elevada capacidade morfoxenética, que permite o establecemento *in vitro* de árbores adultas, exhibindo altas taxas de multiplicación e enraizamento, que se manteñen estables ó longo de moitos anos de subcultivo. Igualmente, numerosos autores que manexaron material adulto de *Quercus robur* L. utilizaron explantos obtidos a partir de renovos basais (Viéitez *et al.*, 1985; Favre e Juncker, 1987), os cales presentaron unhas mellores porcentaxes de enraizamento que o material da copa (Viéitez *et al.*, 1997; Vidal *et al.*, 2003).

Evers *et al.*, (1996a) traballando con árbores de diversas idades, aplicaron pretratamentos para o rexuvenecemento, que incluían podas moderadas ou intensas e a obtención de explantos a partir de brotes epicórmicos.

Outra forma de obter material máis reactivo en árbores adultas, cando non se dispón de brotes epicórmicos e renovos basais, consiste en recoller segmentos de rama

da parte inferior da copa, que se someten a un forzado en cámara de crecemento, o cal serve como método de rexuvenecemento antes da súa introdución *in vitro* (Viéitez *et al.*, 1994). Aínda así, este material non sempre presenta un grao de xuvenildade suficiente como para permitir a súa propagación vexetativa. En exemplares moi vellos de carballo e castiñeiro, explantos obtidos de material vexetal procedente das partes inferiores da copa non se conseguiron establecer *in vitro* (Llamazares, 2003; Soto, 2003).

#### **2.2.7.5 - Obtención de material xuvenil a partir de plantas adultas: concepto de rexuvenecemento. Técnicas de rexuvenecemento.**

En especies recalcitrantes á propagación vexetativa, coma o carballo e o castiñeiro, resulta moi habitual atopar dificultades cando se pretende multiplicar e enraizar *in vitro* material adulto. O problema resólvese en parte micropropagando árbores adultas a partir das zonas máis xuvenís da árbore dende o punto de vista ontoxenético, ou aplicando técnicas de rexuvenecemento que melloren a resposta *in vitro*.

O rexuvenecemento sería a reversión ó estado xuvenil. Os métodos de rexuvenecemento perseguen devolver ó material adulto, total ou parcialmente, as características xuvenís que perderon durante o cambio de fase, por exemplo, a capacidade de enraizamento adventicio. Estes métodos poden aplicarse *ex vitro* ou *in vitro*. En moitas ocasións obtéñense mellores resultados aplicándose varios métodos sucesivamente. Esta observación é acorde coa idea de que a maduración é un fenómeno progresivo (Hackett, 1985).

Entre os métodos de rexuvenecemento destacan:

- O subcultivo continuo *in vitro* (Favre e Juncker, 1987; Bonga e Von Aderkas 1992). Para levalo a cabo ten que ser posible establecer o material *in vitro*. Certos resultados suxiren que o rexuvenecemento expresado *in vitro* durante a micropropagación de plantas adultas pode desaparecer despois de que as vitroplantas se volven a instalar en condicións *ex vitro*, recuperando rapidamente a súa madurez fisiolóxica (Nas *et al.*, 2003).
- A poda intensa da planta nai (San José *et al.*, 1985; Mantell, 1985; Evers *et al.*, 1996a).

- O forzado de segmentos de rama (Viéitez *et al.*, 1994), previo á introdución *in vitro*.
- A pulverización de citoquininas (Mantell, 1985; San José *et al.*, 1985), especialmente nas partes do tronco que están máis preto do chan.
- O enxerto ou o microenxerto de púas de árbores adultas sobre patróns procedentes de semente. O proceso pode repetirse de forma cíclica (enxerto en serie ou en cascada). Do uso do microenxerto como método de rexuvenecemento falarase amplamente máis adiante.

Todos estes métodos poden aumentar as posibilidades de establecer cultivos *in vitro*, mais presentan dificultades técnicas de diversa natureza. A poda intensa, por exemplo, é un método parcialmente destrutivo, cuxos efectos poden ser negativos para a planta nai; a pulverización con citoquininas é efectiva só nalgúns casos, e o microenxerto é unha técnica laboriosa, cuxo éxito depende dun bo número de factores (Fraga *et al.*, 2002a).

Heybroek e Visser (1976) afirman que o verdadeiro rexuvenecemento é posible, polo menos no que atinxe a certos atributos, como a capacidade de enraizamento. No entanto, Pierik (1990b) sinala que o verdadeiro rexuvenecemento tan só se produce como resultado da reprodución sexual ou da embrioxénese somática, e que no resto dos casos o que se dá é un incremento de vigor (revigorización), que é temporal (Nas *et al.*, 2003), e non sempre vai acompañado dun rexuvenecemento verdadeiro e estable.

Hai características da maduración que parecen cambiar independentemente unhas doutras (Poethig, 1990). Un incremento temporal do vigor de crecemento podería deberse a ser un cambio provocado por condicións de cultivo puntuais, máis que un verdadeiro rexuvenecemento. Debido a isto, non se podería asumir que o rexuvenecemento aparente dun solo atributo, como a capacidade de enraizamento, vai acompañado do rexuvenecemento asociado a outros (Greenwood, 1995).

Segundo Greenwood (1995), a expresión das características da madurez é determinada polo ratio de células xuvenís e adultas no meristema apical. Se isto é así, as condicións que favorezan a multiplicación das células xuvenís poderían desencadear un proceso de rexuvenecemento. Isto sería comparable ó efecto que podería ter un patrón xuvenil sobre unha púa de material adulto. Von Aderkas e Bonga (2000) diferencian

mecanismos de rexuvenecemento que inclúen factores de estrés (coma o estrés nutricional que sofre a púa nun enxerto) e factores non relacionados co estrés (coma o pH ou a metilación do ADN). Estes mesmos autores afirman que durante o desenvolvemento dunha planta, o cambio de fase nos meristemas é virtualmente irreversible, debido á interacción de factores fisiolóxicos coa expresión diferencial de xenes, que fixan fortemente o proceso.

### 3 - O microenxerto

#### 3.1 - Descrición xeral

En termos xerais, un enxerto consiste na unión de dúas plantas diferentes, unha que serve de patrón (achega o sistema radicular) e outra que serve de púa (achega a parte aérea), mediante a conexión, a nivel do cambium, dos sistemas vasculares das dúas partes.

O cambium é tecido formado por unha capa de células que separa a cortiza da madeira, e que se encontra en constante división no período vexetativo, proporcionándolle á planta o crecemento en grosor. Ó poñer en contacto o cambium da púa e do patrón, as células poden unirse e a estrutura á que dá lugar esa fusión coñécese como calo de cicatrización. Hai casos de incompatibilidade, cando as células da púa e do patrón non se recoñecen, pero isto non adoita suceder cando se practica o enxerto con púas e patróns da mesma especie.

Considerado como un enxerto a pequena escala, o microenxerto consiste na realización dun enxerto de púas de moi pequeno tamaño, como meristemas, ápices ou brotes apicais, sobre plántulas establecidas *in vivo* ou *in vitro*, que se usan como patrón.

A técnica do microenxerto pódese usar como método de multiplicación de plantas (Monteuuis, 1995a; Palma *et al.*, 1997; Cortizo *et al.*, 2004; Onay *et al.*, 2004; Sanjaya *et al.*, 2006; Farahani *et al.*, 2011; Nava *et al.*, 2011), pero o seu uso máis importante en condicións de laboratorio relacionase con outros campos. Un deles é, sen dúbida, a obtención de plantas libres de enfermidades, principalmente aquelas provocadas por virus (Navarro, 1988; Bonga e Von Aderkas, 1992; Naz *et al.*, 2007). Limasset e Cornuet (1949) observaron que plantas de tabaco infectadas con TMV (virus do mosaico do tabaco) posuían, na parte aérea, un gradiente de concentración descendente de virus en dirección acropétala, sendo esta concentración, na maioría dos

casos, nula no ápice. Estes coñecementos foron tomados como base para obter plantas libres de virus a través do microenxerto de meristemas *in vitro*, descrito por primeira vez por Murashige *et al.* (1972). Desta forma, foron saneados principalmente árbores frutais, como cítricos (Navarro *et al.*, 1975; Starrantino e Caruso, 1988; Tusa *et al.*, 1988; Vilela *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2008), especies do xénero *Prunus* (Deogratias *et al.*, 1986; Deogratias *et al.*, 1989; Barba *et al.*, 1995), *Passiflora edulis* (Monteiro *et al.*, 2008), ou plantas herbáceas, como *Capsicum* sp. (Kato *et al.*, 2004).

No caso de material xenético de elevado valor, como as plantas transxénicas, o microenxerto pode ser usado para proporcionarlle un sistema radicular eficiente a aqueles brotes que non enraizaron *in vitro* (Luo e Gould, 1999), xa que, neste tipo de material, un enraizamento adventicio deficiente representa unha alta perda de eficiencia.

Así mesmo, o microenxerto utilízase como método de indexado para detectar viroses en material vexetal (por exemplo en vide; Pathirana e McKenzie, 2005), ou para inocular bacterias co obxectivo de ensaiar material resistente (p. ex. en *Malus* sp.; Bisognin *et al.*, 2007).

Como se indicou, o microenxerto foi ensaiado en moitos casos como método de rexuvenecemento de material adulto, sendo este un dos aspectos tratados neste traballo. Dito uso descríbese polo miúdo no apartado 3.3.

### 3.2 - Factores que afectan ó prendemento dos microenxertos

O éxito na realización do microenxerto depende primordialmente da especie e xenotipo utilizados, e da compatibilidade entre púa e patrón. Outros factores, mencionados na literatura son, entre outros, o tipo de enxerto, o tamaño da púa e o estado ontoxenético da mesma.

Entre os tipos de enxerto, o de fendedura é o máis empregado e o que achega os mellores resultados en *Garcinia mangostana* (Te-chato *et al.*, 1992), *Larix* sp. (Ewald, 1997), *Malus domestica* (Dobránszki *et al.*, 2000), *Pinus radiata* (Fraga *et al.*, 2002a), *Pistachia vera* (Onay *et al.*, 2004), *Ziziphus mauritiana* var. *Gola* (Danthu *et al.*, 2004), *Persea americana* (Raharjo e Litz, 2005), *Garcinia indica* (Chabukswar e Deodhar, 2006) e *Protea cynaroides* (Wu *et al.*, 2007). Tamén tivo éxito o enxerto lateral en *Pseudotsuga menziesii* (Monteuuis, 1995a), *Anacardium occidentale* (Mnoney e

Mantell, 2001), *Persea americana* (Raharjo e Litz, 2005) e *Prunus dulcis* (Yildirim *et al.*, 2010).

Respecto da posición da púa (sobre o epicotilo ou sobre o hipocotilo), nun estudo realizado sobre anacardo (Mneney e Mantell, 2001), aínda que a porcentaxe de prendemento non varía, os enxertos realizados sobre o hipocotilo medraron con máis vigor que os realizados sobre o epicotilo.

En xeral, canto maior é o tamaño da púa (dentro dun rango que varía normalmente de 0 a 15 mm) a porcentaxe de éxito aumenta (Pierik, 1990b). Nun estudo feito en plantas de algodón (Luo e Gould, 1999), pasouse dunha porcentaxe de prendemento dun 40 %, con púas de 1-2 mm, a un 95 %, con púas de 8-10 mm. Segundo Thimmappaiah *et al.* (2002), a porcentaxe de prendemento en *Anacardium occidentale* varía dende un 0,5 % con púas de 0-5 mm ata un 79,5 %, con púas de 6-15 mm. Onay *et al.* (2004), traballando con *Pistachia vera* determinan o tamaño óptimo entre 4-6 mm, diminuíndo notablemente a porcentaxe de éxito cando a púa é maior de 10 mm. Nun estudo feito en castiñeiro (Fernández-Lorenzo e Fernández-López, 2005) empregáronse púas de 15-20 mm constituídas por brotes apicais de dous clons adultos cultivados *in vitro*, obténdose unha porcentaxe de prendemento en torno ó 80 %. Amiri (2006) obtivo, na especie *Prunus avium*, os mellores resultados de prendemento con púas de 6-15 mm, fronte a outras de 3-6 mm.

Con respecto ó grao de maduración do material, en certos casos, a porcentaxe de enxertos que prenden é maior canto máis xuvenil é o material que se enxerta, o que se comprobou en *Prunus avium* e *Prunus persica* (Deogratias *et al.*, 1986). Probablemente por iso, cando se pretende levar a cabo un programa de enxerto en cascada, o éxito do enxerto adoita aumentar despois do primeiro paso (Siniscalco e Pavolettoni, 1988; Fraga *et al.*, 2002a). No entanto, noutras casos isto non sucede, por exemplo en *Larix laricina* (Greenwood *et al.*, 1989) ou en *Faidherbia albida* (Danthu *et al.*, 2002).

Outro dos factores que inflúe no prendemento é a rapidez durante a execución dos enxertos (Navarro, 1988). A maior rapidez, haberá menores problemas asociados coa oxidación de compostos fenólicos, sendo este factor máis efectivo que a utilización de antioxidantes.

### 3.3 - O microenxerto como método de rexuvenecemento

#### 3.3.1 - Introducción

Sen dúbida, un aspecto importante do microenxerto, vinculado á micropropagación *in vitro*, é a súa posible utilidade como método de rexuvenecemento de material adulto (Greenwood, 1987). A realización de un ou varios microenxertos de material adulto sobre plántulas procedentes de semente parece provocar a recuperación das capacidades morfoxenéticas perdidas no proceso de maduración (Champagnat, 1980; Bonga e Von Aderkas, 1992). Esta recuperación pode evidenciarse de forma sinxela no aumento da velocidade de crecemento dos explantos e, sobre todo, na mellora da capacidade de enraizamento dos brotes.

Existen múltiples exemplos dos posibles efectos de rexuvenecemento do microenxerto en distintas especies. Nalgúns casos o efecto é nulo (Sánchez, 1991), noutros prodúcese unha revigorización transitoria (Tranvan *et al.*, 1991; Ewald e Naujoks, 1997) e, nalgunha ocasión parece acadarse verdadeiro rexuvenecemento (Huang *et al.*, 1992a, 1992b). Isto pon de manifesto, sobre todo, a importancia do factor especie no éxito da técnica. Nos casos nos que se produce rexuvenecemento, este adoita ser gradual, observándose un comportamento máis xuvenil a medida que aumenta o número de enxertos en serie realizados (Huang *et al.*, 1992a; Huang *et al.*, 1992b).

#### 3.3.2 - Microenxertos *in vitro* vs Microenxertos *in vivo*

Os microenxertos pódense realizar tanto *in vitro* como *in vivo*. A efectos comparativos, os microenxertos *in vitro* son máis difíciles de realizar que os realizados *in vivo*, entre outros motivos, pola necesidade de traballar en condicións asépticas e con púas de moi pequeno tamaño, que xeralmente esixen o uso dunha lupa binocular para a súa realización. A maior dificultade de realización vese compensada pola vantaxe de que o material xa está adaptado ás condicións *in vitro*. Os microenxertos *in vivo* son máis fáciles de realizar, xa que se usan púas de maior tamaño e non se precisa traballar en condicións de asepsia. No entanto, cando se precisa realizar microenxertos en serie, os ciclos de enxerto adoitan ser máis longos e, se a finalidade é a introdución *in vitro*, o material necesita dun proceso previo de desinfección e establecemento *in vitro*, no que se poden producir contaminacións, e require dun período máis ou menos prolongado de estabilización *in vitro*. Neste senso, os microenxertos *in vitro* son máis vantaxosos.

Respecto ó efecto como técnica de rexueneamento, en función do uso de un ou outro tipo de microenxerto, Franclet *et al.* (1987) afirman que o rexueneamento mediante microenxerto *in vivo* é máis lento que *in vitro*.

### 3.3.3 - Uso do microenxerto *in vitro* na micropropagación

Os estudos que se citan a continuación evidencian a utilidade do microenxerto *in vitro* na mellora da micropropagación (Táboa 5).

Misson e Giot-Wirgot (1985), despois de reenxertar tres veces púas de *Thuja plicata* Donn., procedentes de árbores de 10 anos de idade, sobre patróns xuvenís *in vitro*, obtiveron brotes con follaxe xuvenil e que medraban máis rapidamente que o material non enxertado.

Noutro estudo, tratando de rexueneacer material adulto de *Persea americana* Mill., Pliego-Alfaro e Murashige (1987) fixeron tres microenxertos *in vitro* de xemas de material adulto sobre sementes xerminadas *in vitro*. Unha vez que os microenxertos prenderon, os brotes producidos utilizáronse para ensaios de enraizamento. O enraizamento do material enxertado aumentou do 0 %, correspondente ó material adulto non enxertado, ó 30 %. Pola contra, o feito de realizar tres microenxertos en serie non mellorou os resultados con respecto a facer soamente un. Utilizando a mesma especie, Barceló-Muñoz (1995) foi capaz de obter un 90 % de enraizamento dos brotes adultos tras 16 microenxertos sucesivos en material xuvenil.

Huang *et al.* (1992a) observaron un aumento das porcentaxes de enraizamento en microbrotes de *Citrus reticulata* e *Citrus sinensis* tras realizar 5 microenxertos sucesivos (sobre un total de 7) de ápices de 0,2 cm sobre plántulas *in vitro* de *Poncirus trifoliata* x *C.sinensis*. Así mesmo, en *Hevea brasiliensis*, o microenxerto de ápices sobre plántulas de 3 semanas de idade permitiu aumentar a porcentaxe de enraizamento de dous xenotipos adultos ó nivel do material xuvenil (Perrin *et al.*, 1994).

En *Sequoia sempervirens*, o microenxerto *in vitro* de ápices de brotes procedentes dunha árbore de 500 anos de idade sobre brotes enraizados *in vitro* procedentes dunha planta de 1 ano permitiu que o material procedente dos brotes microenxertados, unha vez enraizado e aclimatado, recuperase o crecemento ortotrópico, característico do material xuvenil. Este hábito perdurou durante varias semanas, pero finalmente o crecemento volveu a ser plaxiotrópico (Tranvan *et al.*,

1991). Nesta mesma especie, Huang *et al.* (1992b) realizaron catro microenxertos consecutivos de ápices de material adulto de 1,5 cm sobre brotes procedentes de sementes establecidas *in vitro*, cun intervalo de 2 meses entre enxertos. Conseguiuse que o material adulto recobrase a capacidade de enraizamento, aumentando igualmente o número de raíces por brote enraizado, a elongación dos brotes, e a emisión de brotes laterais. Este incremento foi progresivo en función do número de microenxertos, superando nalgún dos parámetros, como a elongación dos brotes e a emisión de brotes laterais, ó material xuvenil. O material procedente dos microenxertos multiplicouse *in vitro*, e a mellora da porcentaxe de enraizamento mantívose ata 3 anos despois de realizar os microenxertos. Nun artigo máis recente (Chang *et al.*, 2010), facendo referencia ó mesmo material, asegúrase que as características xuvenís do material rexuvenecido mediante microenxerto poden ser mantidas *in vitro* ata despois de 30 anos de multiplicación *in vitro*. No material rexuvenecido prodúcese unha serie de modificacións respecto do material adulto, como a variación do contido de certas enzimas (Huang *et al.*, 1996), o aumento da fosforilación proteica (Huang *et al.*, 2003c), unha maior liberación de etileno (Huang *et al.*, 2000) ou un incremento dos niveis da respiración e da fotosíntese (Huang *et al.*, 2003b).

Ewald e Kretschmar (1996) estudaron a influencia do microenxerto *in vitro* de brotes de *Larix decidua* de 140 anos de idade sobre patróns procedentes de semente. Comprobaron que unha vez reallados os brotes procedentes dos microenxertos, estes multiplicábanse e enraizaban mellor que o mesmo material sen enxertar, que non enraizaba.

Revilla *et al.* (1996) practicaron o microenxerto *in vitro* de árbores adultas de cultivares de *Olea europaea* L. sobre microbrotes xuvenís (sen raíces). Como resultado, obtiveron unha recuperación da capacidade de enraizamento do material adulto. O feito de facer dous microenxertos en serie non modificou os resultados respecto de facer soamente un.

Noutro estudo, Mneney e Mantell (2001) realizaron microenxerto de material adulto de *Anacardium occidentale* sobre patróns xuvenís. Mentres que o material adulto non enraizaba e os brotes de material xuvenil enraizaban nun 67 %, os procedentes do microenxerto enraizaban entre un 13,3 e un 34 %, o que indicaba un certo grao de rexuvenecemento.

En *Faidherbia albida* conseguiu-se rexuvenecer material adulto logo de 5 microenxertos consecutivos *in vitro*, realizados a intervalos de 5 semanas, en plántulas de 3 semanas de idade. Isto verificouse polo maior crecemento dos brotes e polo aumento da porcentaxe de enraizamento e do número de raíces, similar ó das plantas xuvenís, logo do terceiro microenxerto (Danthu *et al.*, 2002).

Traballando coa especie *Ziziphus mauritiana*, Danthu *et al.* (2004) fixeron 3 microenxertos en serie de microbrotes de material adulto sobre sementes xerminadas *in vitro*. As probas de enraizamento demostraron un incremento progresivo da porcentaxe de enraizamento dende o 1º ó 3º microenxerto, pero mantívose sempre por debaixo da do material xuvenil.

Por outra parte, Chabukswar e Deodhar (2006) utilizaron o microenxerto en serie co obxectivo de aumentar as porcentaxes de enraizamento de material adulto de *Garcinia indica*. Como patróns, empregaron plántulas de 2 meses de idade e, como púas, microbrotes (0,5-1 cm de longo) cultivados *in vitro*, procedentes dunha árbore de 20 anos de idade. Unha vez que os enxertos produciron novos brotes (6-8 semanas despois da unión do enxerto), estes foron utilizados para facer probas de enraizamento e para reenxertar nunha nova plántula, repetíndose o proceso ata chegar a facer 5 microenxertos en serie. O material procedente dos 4 primeiros microenxertos non enraizou, mentres que o procedente do 5º microenxerto acadou un 75 % de enraizamento, preto dos valores obtidos para árbores de un mes e un ano de idade, que acadaron o 100 %, mentres que as microestacas procedentes de árbores de 5 e 20 anos non enraizaron.

Padilla e Encina (2011) realizaron 3 microenxertos en serie en tres cultivares da especie *Annona cherimola* Mill. sobre sementes xerminadas *in vitro*. O material microenxertado amosou un incremento progresivo da porcentaxe de enraizamento *in vitro* tras os microenxertos en serie. Máis de tres microenxertos non aumentaron as porcentaxes de enraizamento e cando os microbrotes se multiplicaron *in vitro* perderon a capacidade de enraizamento, o que denota soamente unha recuperación temporal da capacidade morfoxenética do material microenxertado.

**Táboa 5.** Resumo dos estudos nos que o microenxerto *in vitro* tivo algunha influencia positiva sobre a micropropagación.

Especie	Tipo de púa	Idade da púa	Patrón	Técnica enxerto	Nº series x tempo entre elas	Resultados	Referencia
<i>Anacardium occidentale</i>	Brotos <i>in vitro</i>	Adulta	Plántulas <i>in vitro</i>	Fendedura e lateral	1	Mellora enraizamento respecto ó material control	Mnoney e Mantell (2001)
<i>Annona cherimola</i>	Brotos nodais de estacas de material adulto	Adulta	Plántulas <i>in vitro</i>	Fendedura	3 x 42 días	Mellora enraizamento <i>in vitro</i> progresivamente	Padilla e Encina (2011)
<i>Castanea sativa</i>	Brotos apicais <i>in vitro</i>	50-70 anos	Brotos xuvenís enraizados <i>in vitro</i>	Fendedura	3 x 45 días	Mellora as taxas de multiplicación nun xenotipo e mantéñense 18 subcultivos	Fdez-Lorenzo e Fdez-López (2005)
<i>Citrus reticulata</i> ; <i>Citrus sinensis</i>	Brotos apicais de 0,2 cm, da árbore	Adulta	Plántulas de <i>Poncirus trifoliata in vitro</i>	Lateral sobre epicotilo	7 x 2 meses	Mellora enraizamento <i>in vitro</i> dende o 5º microenxerto	Huang <i>et al.</i> (1992b)
<i>Faidherbia albida</i>	Brotos de estacas de raíz	40 anos	Plántulas de 3 semanas	Sobre hipocotilo	5 x 35 días	Mellora enraizamento progresivamente ata o 3º microenxerto	Danthu <i>et al.</i> (2002)
<i>Garcinia indica</i>	Microbrotos cultivados <i>in vitro</i>	20 anos	Plántulas de 2 meses de idade		5 x	Mellora enraizamento <i>in vitro</i> tras 5 microenxertos	Chabukswar e Deodhar (2006)
<i>Larix decidua</i>	Brotos terminais	140 anos	Plántulas <i>in vitro</i>	Fendedura	1	Aumenta a taxa de multiplicación e enraizamento <i>in vitro</i>	Ewald e Kretzsmar (1996)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Brotos terminais	Adulta	Plántulas de 3 semanas		1	Mellora enraizamento	Perrin <i>et al.</i> (1994)
<i>Olea europaea</i>	Brotos terminais de estacas de 12 anos procedentes de árbores adultas	Adulta	Brotos <i>in vitro</i>	Fendedura	2 x 8 semanas	Mellora enraizamento <i>in vitro</i>	Revilla <i>et al.</i> (1996)
<i>Persea americana</i>	Xemas	Adulta	Plántulas <i>in vitro</i>	De xema	3 x 6-8 semanas	Mellora da porcentaxe de enraizamento tras un microenxerto	Pliego-Alfaro e Murashige (1987)
					16 x 6-8 semanas	Mellora da porcentaxe de enraizamento	Barceló-Muñoz (1995)

**Táboa 5.** (Continuación)

<i>Pinus radiata</i>	Brotos terminais de árbores enxertados <i>in vivo</i>	1, 4, 30 e 32 anos	Brotos <i>in vitro</i> de 1 ano	Fendedura	1 x 45 días	Mellora taxas de establecemento e multiplicación tras 6 meses <i>in vitro</i>	Fraga <i>et al.</i> (2002)
<i>Sequoia sempervirens</i>	Brotos apicais <i>in vitro</i>	Adulta	Brotos xuvenís enraizados <i>in vitro</i>	Fendedura	4 x 2 meses	Rexuvenecemento gradual e permanente <i>in vitro</i>	Huang <i>et al.</i> (1992a)
	Brotos terminais	500 anos	Brotos enraizados <i>in vitro</i> procedentes dunha planta de 1 ano		1	Recuperación temporal do crecemento ortotrópico tras aclimatación	Travan <i>et al.</i> (1991)
<i>Thuja plicata</i>		Adulta			3	Brotos con follaxe xuvenil e con maior velocidade de crecemento que o material control	Misson e Giot-Wirgot (1985)
<i>Quercus robur</i>	Xemas terminais de un clon <i>in vitro</i>	Adulta	Plántulas <i>in vitro</i> de 4 semanas	Fendedura	1 x 5-12 meses	Mellora taxas de multiplicación nos primeiros subcultivos	Ewald e Naujoks (1997)
<i>Ziziphus mauritiana</i>	Brotos <i>in vitro</i> de 5-10 mm	Adulta	Plántulas <i>in vitro</i> de 4 semanas	Fendedura	3 x 1 mes	Mellora progresiva da porcentaxe de enraizamento <i>in vitro</i>	Danthu <i>et al.</i> (2004)

### 3.3.4 - Uso de enxertos e microenxertos *in vivo* con fins de micropropagación

Respecto dos enxertos e microenxertos feitos en condicións *in vivo* con fins de micropropagación, na bibliografía atópanse diversos traballos (Táboa 6).

Francllet (1981) menciona o rexueneamento de brotes de *Pseudotsuga menziesii*, orixinarios dunha árbore adulta, a través do reenxerto dos brotes en patróns xuvenís. Observou un rexueneamento gradual despois de cada reenxerto.

O enxerto sucesivo sobre plántulas xuvenís (6-12 meses de idade) permitiu inducir condicións de xuvenilidade en estacas de árbores de eucalipto de 10 anos de idade; o fenómeno foi gradual, a través de 6 enxertos sucesivos realizados cada 6 meses (Siniscalco e Pavolettoni, 1988). Aínda así, as características do material adulto foron expresadas de novo nas estacas ó pouco tempo, polo que neste caso só se pode esperar un proceso de revigorización en curtos períodos de tempo.

Moon e Yi (1993) estudaron a propagación de clons adultos de *Quercus acutissima* logo de enxertar brotes con 2 ou 3 xemas, 2 veces seguidas, sobre plantas de 2 anos de idade, con un intervalo entre enxertos de un ano. As porcentaxes de enraizamento das estacas obtidas do crecemento dos enxertos foron superiores logo do segundo enxerto. No entanto, nalgúns clons o enxerto non tivo efecto de revigorización, o que pon de manifesto a importancia das diferenzas clonais na eficacia do prendemento.

Na especie *Fagus sylvatica*, o feito de enxertar material adulto sobre patróns xuvenís permitiu introducir *in vitro* dito material, multiplicalo e enraizalo, mentres que o material adulto, introducido directamente, nin sequera se conseguiu establecer *in vitro* (Meier e Reuther, 1994).

Nun estudo realizado en *Quercus suber* (Freitas, 2002), obtívose unha mellora na porcentaxe de enraizamento de estacas logo de realizar un enxerto de xemas adultas sobre plántulas menores de 2 anos.

Por outra banda, Husen e Pal (2003) conseguiron obter estacas parcialmente rexueneadas logo de enxertar xemas axilares de material adulto de *Santalum album* sobre plántulas de 2 anos de idade, facendo 2 enxertos en serie con intervalos de 1 ano.

Zaczek *et al.* (2006) conseguiron aumentar a porcentaxe de enraizamento de estacas de material adulto de *Quercus rubra* realizando microenxertos de xema sobre plántulas menores de 3 anos. O feito de realizar 3 enxertos consecutivos, con intervalos de 1 ano, non influíu na mellora do enraizamento respecto de utilizar soamente 1 ou 2.

Rache-Cardenal *et al.* (2008) obtiveron unha revigorización de material adulto de oliveira logo de enxertar púas, con tres pares de xemas axilares, sobre plantas de 2 anos de idade en condicións de invernadoiro. Os novos brotes procedentes dos enxertos foron utilizados como fonte de novas púas para realizar microenxerto *in vitro*. Os microenxertos *in vitro* feitos con púas procedentes dos enxertos feitos en invernadoiro prenderon e desenvolveron novos brotes, mentres que aqueles feitos con púas procedentes da copa da árbore non foron viables.



**Táboa 6.** Resumo dos estudos nos que o microenxerto *in vivo* tivo algunha influencia positiva na propagación vexetativa.

Espece	Tipo de púa	Idade da púa	Patrón	Técnica enxerto	Nº series x tempo entre elas	Resultados	Referencia
<i>Eucalyptus x trabutii</i>	Brotos semiherbáceos	10 anos	Plántulas de 6-12 meses	Fendedura	6 x 6 meses	Mellora enraizamento de estacas	Siniscalco e Pavolettoni (1988)
<i>Fagus sylvatica</i>	Xemas en repouso vexetativo	Adulta	Patróns xuvenís	De xema	1	Posibilita a introdución <i>in vitro</i> , o material control non se dá establecido	Meier e Reuther, 1994
<i>Olea europaea</i>	Segmentos nodais e apicais	Adulta	Plantas de 2 anos	Fendedura	1	Mellor reactividade dos novos brotes para funcionar como púa en microenxertos <i>in vitro</i> respecto ó material sen enxertar	Rache-Cardenal <i>et al.</i> (2008)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>		Adulta	Patróns xuvenís			Rexuvenecemento gradual despois de cada reenxerto	Franclet (1981)
<i>Tectona grandis</i>	Xemas axilares de 2 clons	Adulta	Plántulas de 2 anos	De xema	2 x 1 ano	En combinación con etiolación, estacas parcialmente rexuvenecidas	Husen e Pal (2003)
<i>Quercus acutissima</i>	Brotos do ano	Adulta	Plántulas de 2 anos		2 x 1 ano	Mellora enraizamento de estacas nalgúns xenotipos	Moon e Yi (1993)
<i>Quercus rubra</i>	Xemas	Xuvenís e adultas	Plántulas menores de 3 anos	De xema	3 x 1 ano	Mellora enraizamento de estacas adultas, independentemente do número de enxertos	Zaczeck <i>et al.</i> (2006)
<i>Quercus suber</i>	Xemas	Adulta	Plántulas menores de 2 anos	De xema	1	Mellora enraizamento de estacas	Freitas (2002)

### 3.3.5 - (Micro)enxerto de carballo e castiñeiro

A continuación menciónanse os estudos existentes sobre microenxerto en *Quercus robur* e *Castanea sativa*.

En carballo, Ballester e Meier-Dinkel (1990) observaron que o establecemento *in vitro* de clons adultos melloraba tralo enxerto.

En castiñeiro (Ballester *et al.*, 1990), estudouse o efecto do enxerto sobre hipocotilo de castaña xerminada de dúas semanas de idade no establecemento de material adulto seleccionado de castiñeiro híbrido *in vitro*. Mentres que o material non enxertado se perdeu totalmente, o enxerto permitiu o establecemento dun 22 % dos explantos. A combinación do enxerto coa pulverización de BA (dúas veces á semana, durante dúas semanas) permitiu o establecemento do 100 % dos explantos.

Máis tarde, Sánchez (1991) realizou enxerto *in vivo* de púas da copa de carballo e castiñeiro (de madeira dun ano, recollidas no período de repouso e almacenadas en frío antes de seren enxertadas) sobre plántulas de 2 semanas cultivadas en invernadoiro, combinándoo con pulverizacións de BA, obtendo valores de reactividade *in vitro* semellantes ós do material procedente de rebentos basais. Anos máis tarde, traballando en condicións *in vitro*, Ewald e Naujoks (1997) comprobaron unha revigorización transitoria de material adulto de carballo microenxertando xemas sobre patróns procedentes de semente cultivadas *in vitro*.

O enxerto en cascada foi practicado en *Castanea sativa* por Giovannelli e Giannini (2000), sobre plántulas de 10 meses, utilizándoo como método de revigorización de material adulto. No primeiro enxerto utilizaron brotes procedentes directamente da copa da árbore, recollidos no inverno e almacenados en frío. Unha vez prenderon, os novos brotes reenxertáronse 4 veces consecutivas, con intervalos de 1 ano. Os autores comprobaron que se producía revigorización, expresada pola mellora da reactividade dos explantos na introdución *in vitro* e polo número e lonxitude dos brotes novos.

No noso laboratorio tamén se empregou o enxerto como método de rexuvenecemento para introducir *in vitro* un clon de carballo de máis de 150 anos (Soto, 2003). O material que fora enxertado mantívose máis tempo *in vitro* que o material

control (sen enxertar) que se perdeu rapidamente. Finalmente, tras 8 subcultivos, o material enxertado tamén se acabou perdendo.

Máis recentemente (Fernández-Lorenzo e Fernández-López, 2005), estudouse o efecto do microenxerto de dous clons adultos seleccionados de castiñeiro sobre un patrón xuvenil cultivado e enraizado *in vitro*. Observouse un efecto de revigorización logo do primeiro microenxerto, evidenciado polo aumento das taxas de multiplicación, manténdose estes resultados durante máis de dous anos. Un segundo e terceiro microenxerto non melloraron os resultados. Pola contra, non se obtivo mellora nas porcentaxes de enraizamento.

### 3.3.6 - Fundamentos do microenxerto como método de rexuvenecemento

Actualmente, aínda non se coñece a razón pola cal o microenxerto de material adulto sobre patróns xuvenís pode inducir procesos de rexuvenecemento ou revigorización (Monteuuis, 2012). A hipótese máis aceptada afirma que un “factor de rexuvenecemento” (reguladores do crecemento, poliaminas, ácidos nucleicos, etc.) é transmitido dende as raíces do patrón á púa e produce modificacións epixenéticas a nivel dos meristemas desta.

Diversos estudos reforzan a hipótese de que o factor de rexuvenecemento pode ser unha hormona vexetal. Por exemplo, o feito de que a achega esóxena de GA<sub>3</sub> produza rexuvenecemento de exemplares adultos de *Hedera* conduce á idea de que dita hormona xoga un papel importante no proceso de maduración (Robbins, 1957). Segundo Valdés *et al.* (2003), os niveis de AIA das xemas terminais de material enxertado son superiores ós do mesmo material sen enxertar. O proceso de enxerto modifica o patrón de crecemento da púa, que reverte a unha estrutura lonxitudinal, na cal o crecemento das xemas axilares é inhibido polos altos niveis de AIA da xema apical. Esta inhibición maniféstase nunha menor ramificación canto máis revigorización se produce, o cal está en concordancia cos altos niveis de AIA encontrados nas xemas terminais despois dun proceso de revigorización. No entanto, segundo Greenwood (1995), os cambios nas concentracións relativas de hormonas poderían, ó igual que as características morfolóxicas, ser soamente consecuencias, máis que causas, da maduración.

No tocante ó papel de factores xenéticos no proceso de rexuvenecemento, Huang *et al.* (2003a) observaron a reaparición de moléculas de ADN mitocondrial en brotes rexuvenecidos, o que podería suxerir a translocación de ditas moléculas dende o patrón á púa, e a súa replicación no meristema adulto. Os autores aceptan como a hipótese máis estendida que sexa unha hormona a molécula transmitida, e que sexa esta a responsable da reaparición da síntese de ADN mitocondrial no meristema adulto.

Fraga *et al.* (2002b, 2002c), utilizando como modelo *Pinus radiata* D. Don, determinaron que os individuos xuvenís tiñan un contido de metilcitosina do 30-35%, mentres que no material xenético de árbores adultas o contido de metilcitosina era do 60%. Asemade, tamén demostraron que ten lugar un descenso progresivo no grao de metilación como resposta a pasos consecutivos de revigorización a través do microenxerto en serie. Isto reforza a idea de que a metilación do ADN, particularmente en tecidos meristemáticos, podería estar fortemente relacionada co cambio de fase.

Está amplamente demostrado que a metilación do ADN é un proceso esencial para o desenvolvemento normal da planta, e que cambios nos patróns de metilación producen desenvolvementos anormais (Finnegan *et al.*, 1996). Asemade, o contido global de ADN metilado pode servir como marcador molecular de procesos específicos de desenvolvemento relacionados co envellecemento, a maduración e o de fase.

Fraga *et al.* (2002c) apuntan á existencia de procesos de demetilación como posible explicación ós procesos de revigorización, pero estes procesos non son ben coñecidos, xa que, aínda que hai evidencias do mecanismo (Zluvova *et al.*, 2001), non se identificou ningunha enzima de demetilación do ADN (Olszewska *et al.*, 1997; Finnegan *et al.*, 1998). A demetilación podería ser resultado dunha replicación do ADN que non fose seguida pola acción de metiltransferasas nas novas cadeas sintetizadas, ou, como foi demostrado en animais, podería tratarse dun proceso enzimático activo que non depende da replicación do ADN (Zhu *et al.*, 2000).

Algo innegable é que, sexa cal sexa o factor de interacción patrón-púa que modifica o estado ontoxenético do material adulto, este debe ser transmitido dende o patrón á parte aérea. Na última década estableceuse que, non soamente poden ser consideradas como substancias sinal dirixidas a puntos distantes da planta as pequenas moléculas coma hormonas ou metabolitos, senón tamén macromoléculas coma proteínas ou ARNs (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

Enlazando a idea dos factores de rexuvenecemento cos procesos de silenciamento xénico, un sinal capaz de silenciar os xenes podería transmitirse a través do enxerto. En certos experimentos, o silenciamento de xenes transmitiuse dende un patrón que tiña un xene inactivo a unha púa que o tiña activo (Palauqui *et al.*, 1997). Hai moitos estudos que verifican a transmisión de moléculas de ARNm dende o patrón á púa, principalmente en traballos con plantas hortícolas (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999; Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Haywood *et al.*, 2005; Kudo e Harada, 2007), e gran parte da evidencia de que a translocación de ARNi (ARN de interferencia) induce o silenciamento de xenes baseouse en experimentos nos que se empregou o enxerto (Brosnan *et al.*, 2007; Haque *et al.*, 2007; Harada, 2010; Kasai *et al.*, 2011). De tódolos xeitos, o mecanismo polo que o silenciamento se inicia en tecidos específicos e posteriormente se expande a toda a planta, así como o sinal que o transmite, é aínda obxecto de debate (Liang *et al.*, 2011).

Estudos recentes propoñen a posibilidade de que pequenas moléculas móbiles de ARN poderían ter a función de transporte dunha mensaxe de modificación epixenética dentro da estrutura da planta (Dunoyer *et al.*, 2010; Molnar *et al.*, 2010). De feito, análises moleculares de plantas transxénicas revelaron unha relación moi alta entre a metilación de ADN do transxene e o silenciamento mediante ARN (Ingelbrecht *et al.*, 1994), suxerindo que a metilación do ADN podería ter un papel no desencadeamento ou no mantemento da ruta de silenciamento por ARN.

O mecanismo polo cal un patrón modifica o desenvolvemento que tería o material da púa medrando independentemente non se coñece aínda, incluso no caso de patróns enanizantes, utilizados con frecuencia en fruticultura (Webster, 1994).

O mantemento do silenciamento mediante ARN, despois de que a fonte esóxena do sinal é eliminada, depende da natureza da secuencia diana. Isto indica que a degradación do ARN mediante o sistema de silenciamento pode ter lugar aínda en ausencia da capacidade de perpetuar o sinal, sendo entón independente da produción da mesma (Palauqui e Vaucheret, 1998).

Os estudos mencionados permiten formular a hipótese de que un patrón pode transmitir un sinal que modifique a expresión xénica a nivel da púa, actuando a nivel da represión-activación de xenes, que desemboca nun proceso de rexuvenecemento do material adulto enxertado sobre patróns xuvenís.



## II - OBXECTIVOS

O obxectivo xeral deste traballo é desenvolver estratexias de mellora do establecemento *in vitro* e da micropropagación de material adulto de *Quercus robur* L. e *Castanea sativa* Mill. a partir de xemas axilares.

Os obxectivos específicos son os seguintes:

- Estudar as repercusións do uso do calo basal na multiplicación *in vitro* de *Quercus robur* L. e *Castanea sativa* Mill., avaliando a súa incidencia sobre os coeficientes de multiplicación.
- Estudar o efecto do microenxerto *in vitro* de material adulto de carballo e castiñeiro sobre patróns xuvenís (ou de comportamento xuvenil).
- Estudar o efecto do microenxerto en serie *in vivo*, en ciclos curtos, de material adulto de *Quercus robur* L. e *Castanea sativa* Mill. sobre patróns xuvenís.



### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### 1 - Material vexetal

##### 1.1 - Material vexetal de *Quercus robur* L.

###### 1.1.1 - Ensaio de recultivo do calo basal

Nos ensaios de recultivo de calo basal en *Quercus robur* utilizáronse dous clons adultos e un clon ‘adolescente’ (4 anos). Os clons adultos son TROBO e MUÍÑOS (Figura 6), establecidos a partir de árbores cunha boa aptitude forestal, baseándose na rectitude do fuste e na escasa ramificación do tronco dende a base. O material foi establecido *in vitro* en 1998 e subcultivado ata a actualidade. As condicións de establecemento e multiplicación *in vitro* cítanse no traballo de Fernández *et al.* (2001).

O material ‘adolescente’ procede da semente dunha árbore adulta de hábito fastixiado. Esta semente xerminou en cámara de crecemento e estableceuse no campo co fin de avaliar o seu posible hábito fastixiado. Ós 4 anos verificouse o hábito fastixiado, e procedeuse a realizar unha introdución *in vitro* do material. O clon establecido denominouse QRF73. Pódese considerar que o clon presenta un elevado grao de xuvenilidade, polo que se fará referencia a el como xuvenil, para diferencialo dos clons adultos.



**Figura 6.** Plantas nai do clon “TROBO” (esquerda) e “MUÍÑOS” (dereita).

### 1.1.2 - Ensaio de microenxerto

Nos ensaios de microenxerto utilizouse igualmente material adulto e xuvenil. O material adulto obtívose: 1) dunha árbore de hábito fastixiado de máis de 100 anos (Figura 7), situada en Arzúa (A Coruña) e seleccionada pola súa aptitude ornamental, á que denominamos clon QRFa. 2) Os clons TROBO e MUÍÑOS, descritos no apartado precedente, 3) un clon adulto non seleccionado, ó que denominamos clon MIÑO, procedente dunha árbore situada en Castro de Rei (Lugo).

Como material xuvenil (que foi usado de patrón no microenxerto), utilizáronse plántulas de carballo obtidas de sementes recollidas nos meses de outubro e novembro, estratificadas en frío previamente á sementeira e postas a xerminar en cámara de cultivo.

Na Táboa 7 resúmense as características dos clons de carballo utilizados en cada ensaio e indícase o seu estado ontoxenético.



**Figura 7.** Planta nai do clon de *Q. robur* 'fastigiata' (QRFa), ubicada no Pazo de Santa Cruz (Arzúa - A Coruña).

**Táboa 7.** Clons de *Quercus robur* utilizados neste traballo. Indícase a súa condición ontoxenética (A: adulto; X: xuvenil; AD: adolescente) e o tipo de ensaios ó que foron sometidos.

Clon	Condición	Ensaio calor basal	Ensaio microenxerto
TROBO	A	+	+
MUIÑOS	A	+	+
QRF73	AD	+	-
QRFa	A	-	+
MIÑO	A	-	+
SEMENTES XERMINADAS	X	-	+

## 1.2 - Material vexetal de *Castanea sativa* Mill.

### 1.2.1 - Ensaio de recultivo do calor basal

O material vexetal de castiñeiro procede de dous clons denominados EPS e SISTO, pertencente a árbores adultas. O material do clon EPS foi recollido en Lugo, nas inmediacións da Escola Politécnica Superior, e o do clon SISTO en Castro de Rei (Lugo).

Estableceuse *in vitro* material da copa dos dous xenotipos, así como material de rebentos basais do clon EPS (no ano 2008).

### 1.2.2 - Ensaio de microenxerto

O material adulto de castiñeiro utilizado nos ensaios de microenxerto procede da copa dos clons EPS (en diante EPS<sub>copa</sub>) e SISTO, así coma doutros dous clons adultos seleccionados por ser variedades tradicionais de produción de castaña en Galicia, coñecidos como LOURA e PAREDE, e establecidos *in vitro* en traballos previos no noso laboratorio no ano 1994.

Como patróns xuvenís para os microenxertos *in vivo* utilizáronse plántulas procedentes de sementes, colleitadas en Castro de Rei (Lugo), e postas a xerminar en cámara de crecemento.

Para os microenxertos *in vitro* utilizouse material establecido *in vitro* a partir de rebentos basais do clon EPS (en diante EPS<sub>base</sub>) e dun clon xuvenil establecido no ano 1995 a partir dunha semente (clon XUV9).

Na Táboa 8 resúmense as características dos clons de castiñeiro utilizados en cada ensaio, e indícase o seu estado ontoxenético.

**Táboa 8.** Clons de *Castanea sativa* utilizados neste traballo. Indícase a súa condición ontoxenética (A: adulto; X: xuvenil; A<sub>x</sub>: adulto con características xuvenís) e o tipo de ensaios ó que foron sometidos.

Clon	Condición	Ensaio calo basal	Ensaio microenxerto
EPS <sub>copa</sub>	A	+	+
EPS <sub>base</sub>	A <sub>x</sub>	+	+
SISTO	A	+	+
LOURA	A	-	+
PAREDE	A	-	+
XUV 9	X	-	+
SEMENTES XERMINADAS	X	-	+

## 2 - Métodos

### 2.1 - Condicións xerais de cultivo

Os medios de cultivo utilizados, cos que se levaron a cabo os ensaios *in vitro*, foron o medio GD (Gresshof e Doy, 1972), constituído polos sales e vitaminas de GD, 3 % de sacarosa e 0,7 % de Difco-Bacto agar como axente xelificante; e o medio WPM, constituído polos sales e vitaminas de WPM (Lloyd e McCown, 1981), e a mesma concentración de sacarosa e agar.

O medio WPM utilizouse na multiplicación dos clons QRFa, MIÑO, LOURA, PAREDE, EPS e SISTO, mentres que o medio GD se utilizou nos clons TROBO e MUIÑOS.

O pH do medio de cultivo axustouse a 5,5-5,6 con HCl ou NaOH 1 N, segundo o caso, antes da esterilización en autoclave, que se realizou a 121 °C e 1 atm durante 20 minutos.

Todos os ensaios foron establecidos en cámara de crecemento (Figura 8) coas seguintes condicións ambientais: D.F.R. (densidade de fluxo radiante)  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , con tubos fluorescentes OSRAM® L. 40 W de luz branca fría, un fotoperíodo de 16 horas de luz a 25 °C e 8 horas de escuridade a 20 °C e unha humidade relativa superior ó 70%.

Como recipientes utilizáronse tubos (160 mm de altura x 25 mm de diámetro) e botes (90 mm de altura x 100 mm de diámetro) de vidro, contendo cada tubo un explanto e cada bote oito explantos. O intervalo entre subcultivos foi de 30-35 días.



**Figura 8.** Ubicación dos ensaios na cámara de crecemento.

## 2.2 - Introducción *in vitro* do material vexetal

### 2.2.1 - Material vexetal introducido *in vitro*

Para levar a cabo os distintos ensaios propostos neste traballo foi necesario introducir *in vitro* por primeira vez material vexetal dos clons de carballo QRFa e MIÑO, e dos clons de castiñeiro EPS (material da copa e de rebentos basais) e SISTO.

O material vexetal do resto de clons utilizados fora establecido *in vitro* en traballos precedentes, dos cales se dispuña dun stock no laboratorio de micropropagación.

O material vexetal procedente dos ensaios de microenxerto *in vivo* tamén foi introducido *in vitro*. Deste aspecto falarase máis adiante.

### 2.2.2 - Obtención de brotes

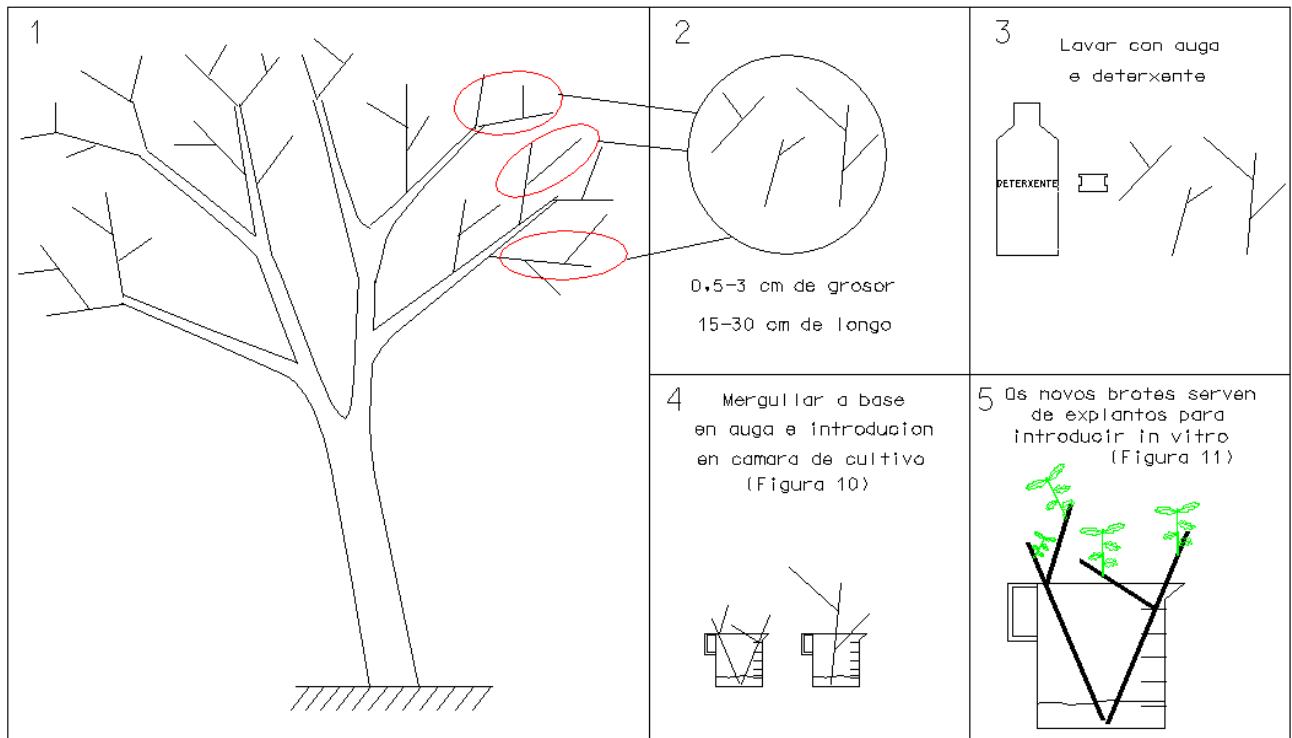
O material vexetal para introducir *in vitro* foi obtido por dúas vías:

- Directa: a partir da recollida de brotes da árbore no período de crecemento vexetativo (clon EPS).
- Por forzado: a partir de segmentos de rama (segundo a metodoloxía de Viéitez *et al.*, 1994), obtidos no período de repouso vexetativo, que foron forzados a brotar en cámara de crecemento (clons QRFa, MIÑO e SISTO).

Para obter brotes de forzado de segmentos de rama séguese o proceso mostrado na Figura 9 (ver asemade Figuras 10 e 11).

No caso do clon QRFa diferenciáronse tres tipos de varas para o forzado (Figura 12):

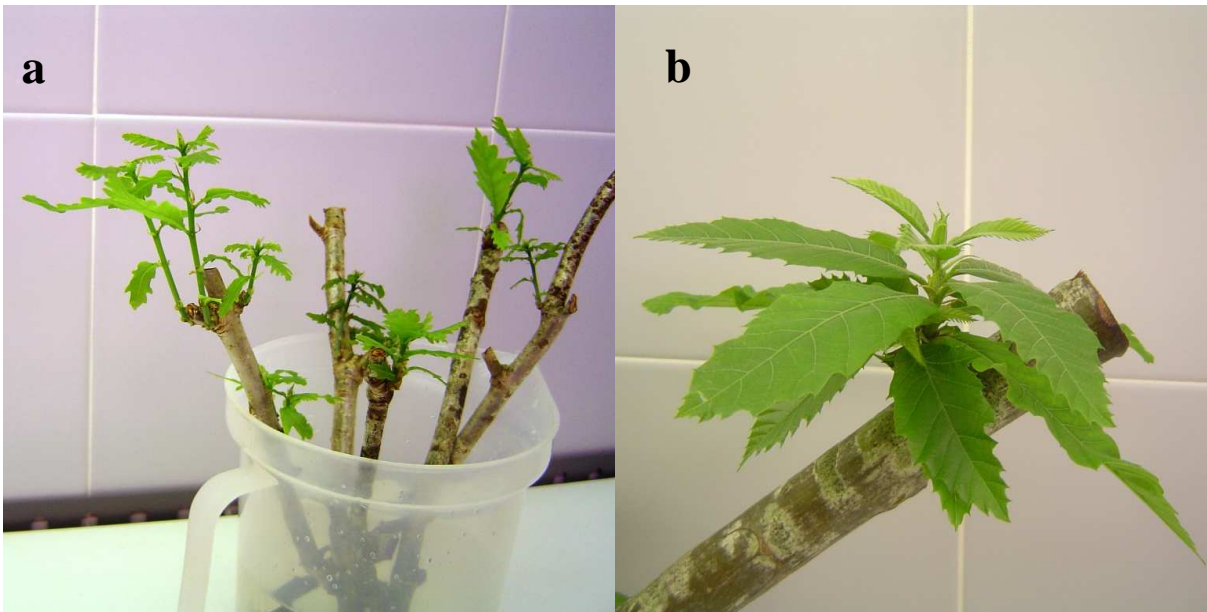
- Procedentes de ramas de máis de un ano (0,5-1 cm grosor).
- Procedentes de ramas de máis de un ano con partes de ramas do último ano de crecemento (0,5-1 cm grosor).
- Procedentes de madeira do último ano de crecemento (<0,5 cm grosor).



**Figura 9.** Pasos de forzado de segmentos de rama para a obtención de explantos.



**Figura 10.** Segmentos de rama de castiñeiro en fase de 'forzado' da brotación.



**Figura 11.** Brotes de forzado en (a) carballo e (b) castiñeiro.



**Figura 12.** Tipos de varas utilizadas no forzado do clon QRFa. (a) Procedentes de ramas de máis de un ano (0,5-1 cm grosor); (b) Procedentes de ramas de máis de un ano con partes de ramas do último ano de crecemento (0,5-1 cm grosor); (c) Procedentes de madeira do último ano de crecemento (<0,5 cm grosor).

### 2.2.3 - Proceso de desinfección

Ambas vías de introducción *in vitro* (directa e mediante forzado) precisan dun proceso previo de desinfección superficial dos explantos, para eliminar os posibles microorganismos que os brotes leven na superficie. O proceso de desinfección que se levou a cabo neste traballo represéntase esquematicamente na Figura 13.

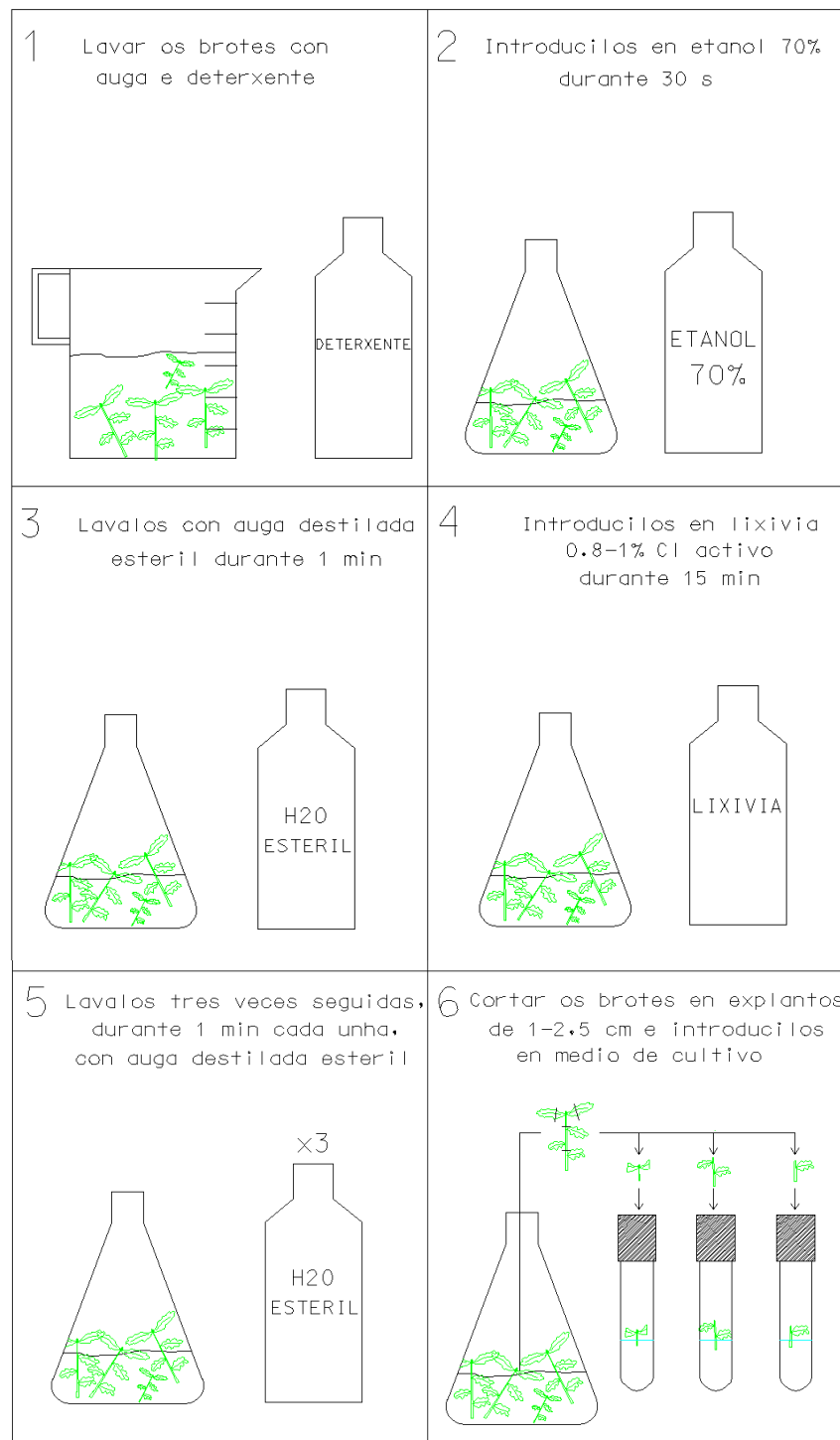


Figura 13. Proceso de desinfección de explantos na introducción *in vitro*.

#### 2.2.4 - Medio de cultivo utilizado

O medio de cultivo utilizado no momento da introdución, ben fose GD ou WPM, levou unha concentración de BA de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , para estimular que as xemas agromasen. Os explantos permaneceron nese medio durante 20-30 días, pasándose máis tarde a medio fresco cunhas concentracións de BA de  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , no caso do castiñeiro, e de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  no caso do carballo, sendo estas últimas as usadas posteriormente na fase de multiplicación.

#### 2.2.5 - Ensaio realizados

Os ensaios realizados nas fases de obtención de explantos e de introdución *in vitro* foron os seguintes:

1. Caracterización da produción de brotes a partir de forzado de segmentos de rama no clon QRFa, en función do tipo de rama (Figura 12).
2. Determinación da porcentaxe de contaminación e reactividade dos explantos ós 30 días da introdución *in vitro*, nos clons QRFa, MIÑO, SISTO e EPS. No clon QRFa fixéronse tres introducións consecutivas, utilizando dous tratamentos de desinfección diferentes. En dúas delas utilizouse o procedemento de desinfección xeral (30 s en etanol ó 70 % e 15 minutos en lixivia ó 0,8 % de Cl activo) e na outra un tratamento máis feble (10 s en etanol ó 50 % e 10 minutos en lixivia ó 0,8 % de Cl activo).
3. Avaliación da taxa de multiplicación no clon QRFa en función do medio base, GD ou WPM.

## 2.3 - Ensaio de recultivo do calo basal

### 2.3.1 - Tipos de explantos con calo

Para os ensaios feitos en **carballo**, nos clons TROBO e MUÍÑOS, diferenciáronse tres tipos de explantos con calo basal en función da súa morfoloxía externa (Figura 14):

- Tipo 1: calos nos que non se aprecian visualmente nin xemas nin brotes.
- Tipo 2: calos nos que se aprecian xemas axilares.
- Tipo 3: calos nos que se aprecian brotes menores de 1 cm de lonxitude (e ás veces tamén xemas axilares).

Tomouse como referencia a lonxitude mínima de 1 cm para poder subcultivar un brote, polo que os calos tipo 3 se recultivan sen retirárselles os brotes.

Debe aclararse que un calo dun determinado tipo pode clasificarse dentro de outro tipo diferente cando é recultivado de novo.

No caso do castiñeiro, nos clons SISTO e EPS (copa e base), non se diferenciaron tipos de calo.



**Figura 14.** Calo tipo 1, non se aprecian xemas nin brotes. Calo tipo 2, con xemas axilares visibles . Calo tipo 3, con brotes menores de 1 cm (e xemas axilares).

### 2.3.2 - Descrición do recultivo do calo basal

A técnica estándar de micropropagación a partir de xemas preexistentes consiste en aproveitar os microbrotes que proceden dun explanto orixinal como fonte de novos explantos nodais e apicais, obtendo así unha multiplicación progresiva do material.

O recultivo do calo basal consiste en volver a introducir en medio de cultivo o conxunto formado polo calo basal e pola parte do microbrote que non acada o tamaño mínimo para ser subcultivada, co obxectivo de que as xemas axilares ou brotes (<1cm) que posúe se desenvolvan e produzan novos microbrotes. Na Figura 15 móstrase un esquema da micropropagación a partir de xemas preexistentes que inclúe o recultivo do calo basal.



## Material e métodos

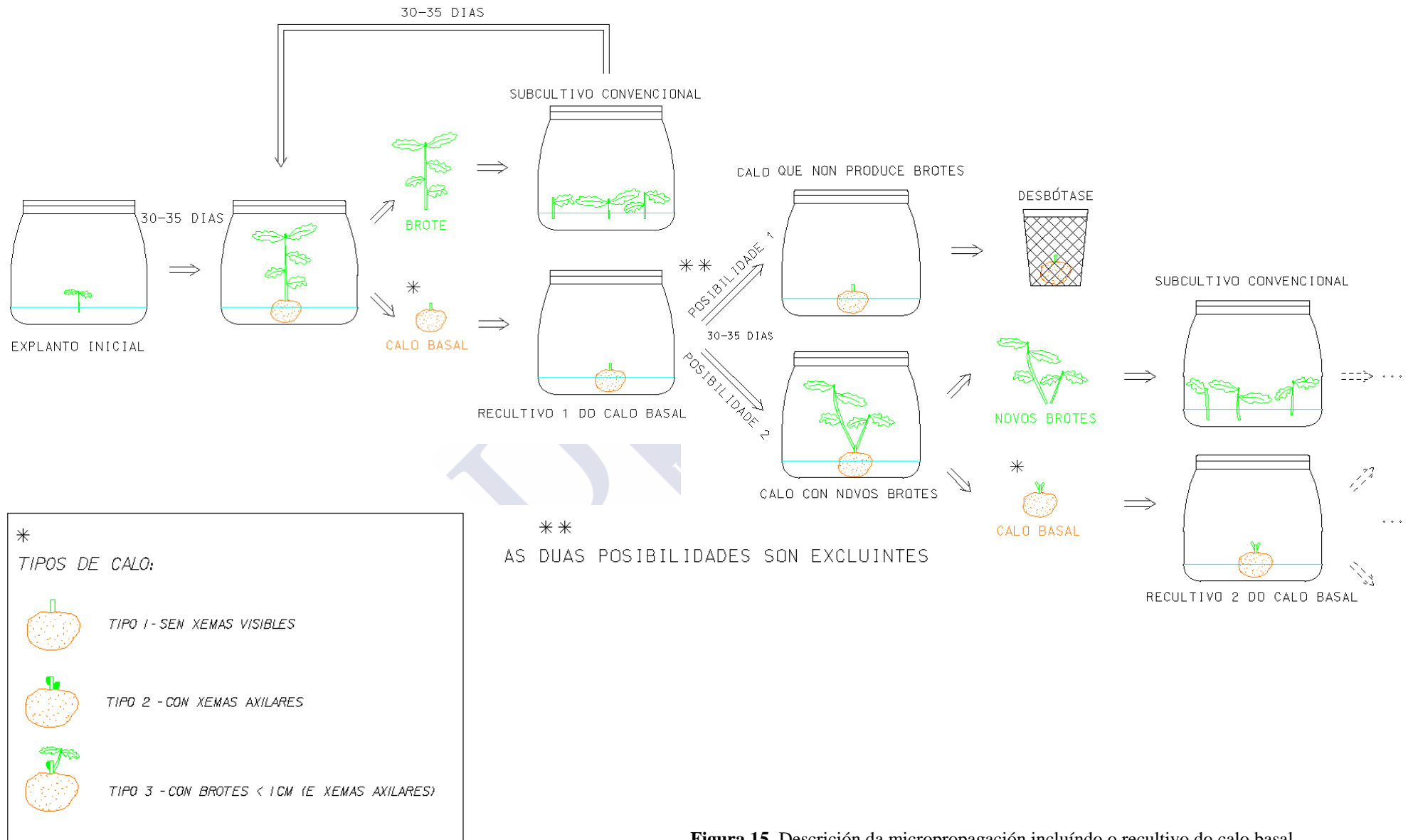


Figura 15. Descripción da micropropagación incluíndo o recultivo do calo basal.

### 2.3.3 - Variables estudadas

Nos ensaios de recultivo de calos medíronse as seguintes variables:

- **Taxa de multiplicación:** é o cociente entre o número de explantos obtidos nun subcultivo e o número de explantos dos que proceden (expl. finais/expl. iniciais).

- **Número de brotes maiores de 1 cm por explanto subcultivado:** consiste en determinar o número de brotes máis longos de 1 cm que produce cada tipo de explanto (nodal, apical e calo). Cando un calo teña só brotes vitrificados ou necrosados, este dato tomará o valor 0, xa que a efectos de multiplicación non son útiles.

- **Lonxitude do brote máis longo:** do mesmo xeito que no caso anterior, este dato toma o valor 0 se os brotes están vitrificados ou necrosados. Se o brote máis longo ten necrosado soamente unha parte, a lonxitude mídese ata que empeza a zona necrosada.

- **Porcentaxe de calos que se obteñen de cada tipo:** este dato representa a porcentaxe de calos de cada tipo que hai nun determinado recultivo, é dicir, qué porcentaxe de calos de cada tipo dan os microbrotes no recultivo 1, qué porcentaxe de calos de cada tipo dan os calos do recultivo 1 no recultivo 2 e así sucesivamente.

- **Porcentaxe de calos que se desbotan:** representa a porcentaxe de calos que se desbotan en cada recultivo, de forma global ou para cada tipo de calo (tipo 1, 2 ou 3). Transcorridos 30-35 días dende o recultivo, hai dúas posibilidades:

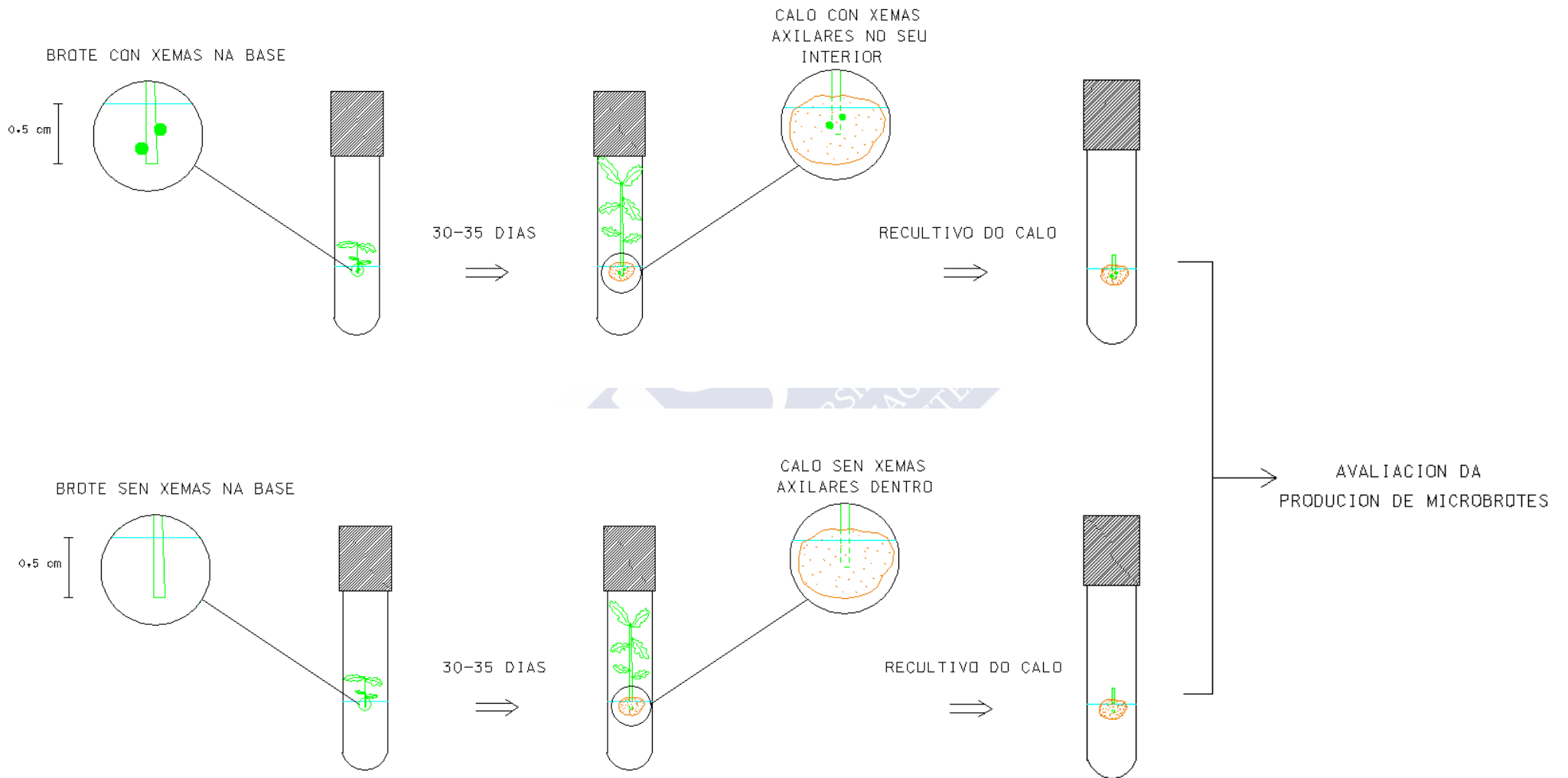
- Que o calo produza brotes: neste caso os brotes subcultívanse pasando a un novo medio de multiplicación e o calo vólvese a recultivar.
- Que o calo non produza brotes, entón elimínase, xa que ou ben non portaba xemas ou as que levaba non se desenvolveron, considerándose que perdeu a capacidade de producir brotes.

### 2.3.4 - Ensaio realizados

1. En tódolos clons utilizados nos ensaios de recultivo de calos, recultiváronse os calos sucesivas veces, ata que deixaron de producir novos microbrotes. Nos clons de carballo avaliáronse, nos sucesivos recultivos do calo, as taxas de multiplicación, o número de brotes maiores de 1 cm, a lonxitude do brote máis longo, a porcentaxe de calos que se obteñen de cada tipo e a porcentaxe de calos que se desbotan en cada recultivo. Nos clons de castiñeiro, tomáronse datos das taxas de multiplicación e da porcentaxe de calos que se desbotan en cada recultivo. Nos clons TROBO, MUIÑOS e SISTO fixéronse varias repeticións de cada recultivo, mentres que no material da base ( $EPS_{base}$ ) e da copa ( $EPS_{copa}$ ), do clon EPS, partiuse de tres repeticións de 8 calos que se foron recultivando progresivamente.
2. Hai certos casos nos que os microbrotes procedentes do recultivo de calos parecen xurdir do interior do calo, sobre todo nos calos tipo 1, o cal fai dubidar se proceden de xemas axilares que quedaron envoltas polo calo, ou se pode tratarse de brotes adventicios, o que representaría un risco de variación somaclonal. Para resolver a dúbida, no material procedente dos clons QRFa e  $EPS_{(base)}$  recultiváronse 3 grupos de 8 calos procedentes de explantos que non tiñan xemas ó longo de 1 cm dende a parte basal, e a súa evolución comparouse con outros 3 grupos de 8 calos que procedían de microbrotes que si posuían xemas na parte basal (Figura 16). Desta forma preténdese determinar se os microbrotes que emerxen a través do tecido do calo ó final do ciclo de multiplicación proceden, ou non, de xemas preexistentes.

A toma de datos realizouse ós 30-35 días dende o momento de subcultivar.

## Material e métodos



**Figura 16.** Esquema do ensaio realizado para determinar a procedencia axilar ou adventicia dos microbrotes que emerxen a través do tecido do calo basal.

## 2.4 - Ensaio de microenxerto

### 2.4.1 - Obtención de plántulas *in vitro*

#### 2.4.1.1 - Obtención de plántulas de carballo *in vitro*

Para a obtención de plántulas de carballo *in vitro* faise unha introdución *in vitro* de landras e, unha vez que estas xerminan, son utilizadas como patróns. O proceso detállase a continuación:

✓ *Desinfección das sementes*

Unha vez colleitadas as sementes foi necesario un proceso de desinfección superficial das mesmas previamente á introdución *in vitro*. Para levar a cabo a desinfección, inicialmente elimínase a cuberta externa da semente (exocarpo) e, posteriormente, baixo a cámara de fluxo laminar, realizouse a desinfección (ensaiáronse dous tratamentos) seguindo os mesmos pasos que na posta en cultivo do material vexetal dos diferentes clons (ver apartado 2.2.3).

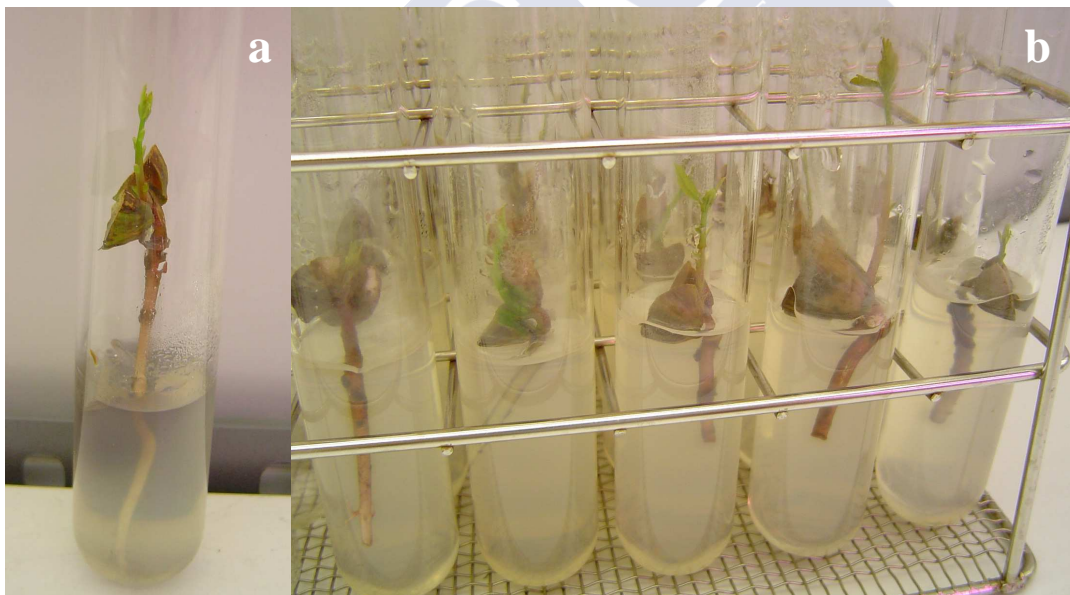
✓ *Introdución *in vitro* das sementes, xerminación e preparación das plántulas para o uso como patróns*

Despois da desinfección procédese á eliminación parcial dos cotiledóns (Figura 17) (deixando unha parte dos mesmos sen cortar, xunto co eixo embrionario) para que a semente teña o tamaño axeitado para introducila nun tubo de vidro de 25 × 150 mm, contendo 15 mL de medio de cultivo. Unha vez feita a introdución *in vitro*, os ensaios dispóñense na cámara de crecemento.

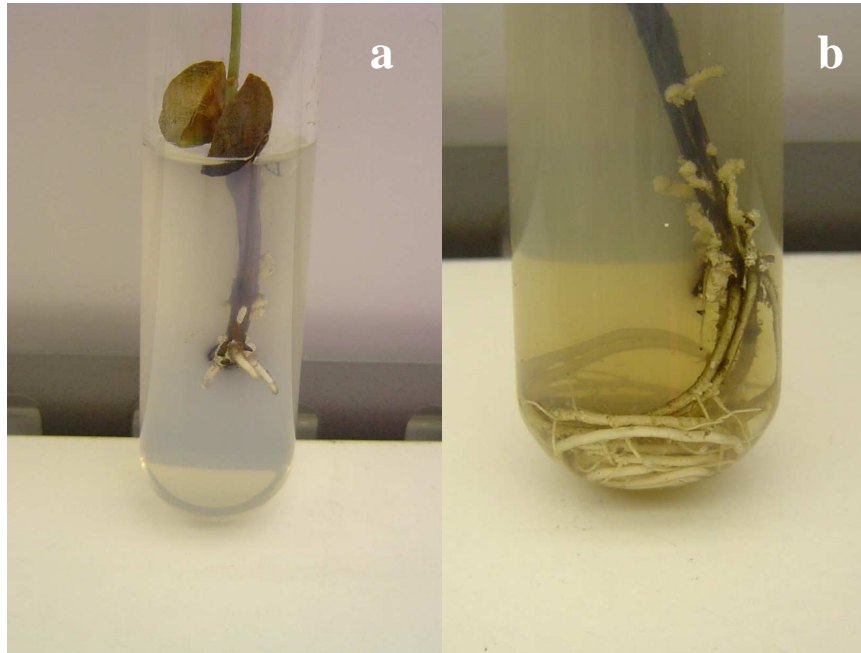
Cando a semente xermina (na primeira semana da súa introdución *in vitro*), produce unha raíz pivotante moi vigorosa, que cando acadar o fondo do tubo “empurra” a plántula cara arriba, alonxándoa do medio de cultivo (Figura 17a). Para evitar isto, procedeuse á poda da raíz principal (Figura 17b). A poda, ou “repicado” favorece a emisión de raíces secundarias (Figura 18a), obténdose un sistema radical máis ramificado. As novas raíces, ó chegar ó fondo do tubo, tenden a enrolarse (Figura 18b), non acadando o vigor suficiente para sacar de novo a plántula do medio.

- Ensaio realizado: na obtención de plántulas *in vitro* de carballo, leváronse a cabo dous tratamentos de desinfección, en función do tempo de permanencia nas solucións desinfectantes:
  - 1º tratamento: 30 segundos en 70 % etanol e 15 minutos en lixivia (0,8 % Cl activo).
  - 2º tratamento: 120 segundos en 70 % etanol e 20 minutos en lixivia (1 % Cl activo).

Ós 30 días da introdución *in vitro*, tomáronse datos da porcentaxe de landras contaminadas e non contaminadas. Sobre as non contaminadas tomáronse datos da porcentaxe de xerminación. Realizáronse 10 repeticións de 24 landras por cada tratamento.



**Figura 17.** Introducción *in vitro* de landras. (a) Apréciase o corte dos cotiledóns e a tendencia da plántula a saírse do medio a medida que medra a raíz principal. (b) Aspecto das plántulas tras a poda da raíz principal.



**Figura 18.** (a) Emisión de raíces secundarias despois do repicado e (b) posterior enrolamento no fondo do tubo.

#### 2.4.1.2 - Obtención de plántulas de castiñeiro *in vitro*

Nos microenxertos *in vitro* de castiñeiro utilizáronse dous tipos de patróns con comportamento xuvenil, que proceden do establecemento *in vitro* de rebentos basais do clon EPS (EPS<sub>base</sub>) e do clon XUV 9 (ambos con taxas de enraizamento *in vitro* por encima do 90 %):

- Plántulas obtidas por enraizamento *in vitro* de microbrotes de material xuvenil.
- Explantos con calo basal, sen raíces: neste caso o patrón está conformado por un segmento de caule do mesmo material xuvenil, que, en lugar de raíces, ten un calo basal. Outros autores tamén teñen usado patróns sen raíces no microenxerto *in vitro*, por exemplo Rache-Cardenal *et al.* (2008) nun estudo en oliveira, coa diferenza de que estes autores eliminan o calo e realizan o microenxerto directamente sobre o microbrote.

Para enraizar os microbrotes que serviron como patróns, mergullouse a súa base nunha disolución acuosa de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AIB durante 2 minutos, sendo transferidos de inmediato a medio GD 1/3 (cun terzo da concentración de macronutrientes).

Os microbrotes enraizados utilizáronse para enxertar ós 30-35 días da indución ó enraizamento. Os patróns sen raíces (con calo basal) utilizáronse 30-35 días despois do subcultivo en medio de multiplicación dos microbrotes dos que proceden.

#### **2.4.2 - Obtención de plántulas *in vivo***

Para a obtención de plántulas *in vivo* fixéronse sementeiras en bandexas con alveolos troncocónicos de plástico termoconformado de 300 cm<sup>3</sup> de capacidade, recheos cun substrato constituído por unha mestura turba:perlita (3:1). Empregáronse sementes estratificadas previamente en area e conservadas en frío, moitas das cales xa tiñan prexerminado (emitindo a radícula) no momento da sementeira, o cal permitiu unha xerminación rápida e uniforme. A xerminación tivo lugar nunha cámara de crecemento coas condicións citadas previamente (ver apartado 2.1).

Considerouse o momento óptimo para utilizar os patróns aquel no que as plántulas rematan o primeiro crecemento, antes de que o grao de lignificación dificulte a introdución da púa. Isto sucede ás 2-3 semanas dende a xerminación, no caso do carballo, e ás 3-4 semanas, no caso do castiñeiro.

#### **2.4.3 - Obtención de púas de material adulto para o microenxerto *in vitro***

Como púas para os microenxertos *in vitro* empregáronse microbrotes cultivados *in vitro* de 1,5-2,5 cm de lonxitude. Estes brotes foron obtidos ó final dun ciclo de multiplicación (30-35 días dende o último subcultivo).

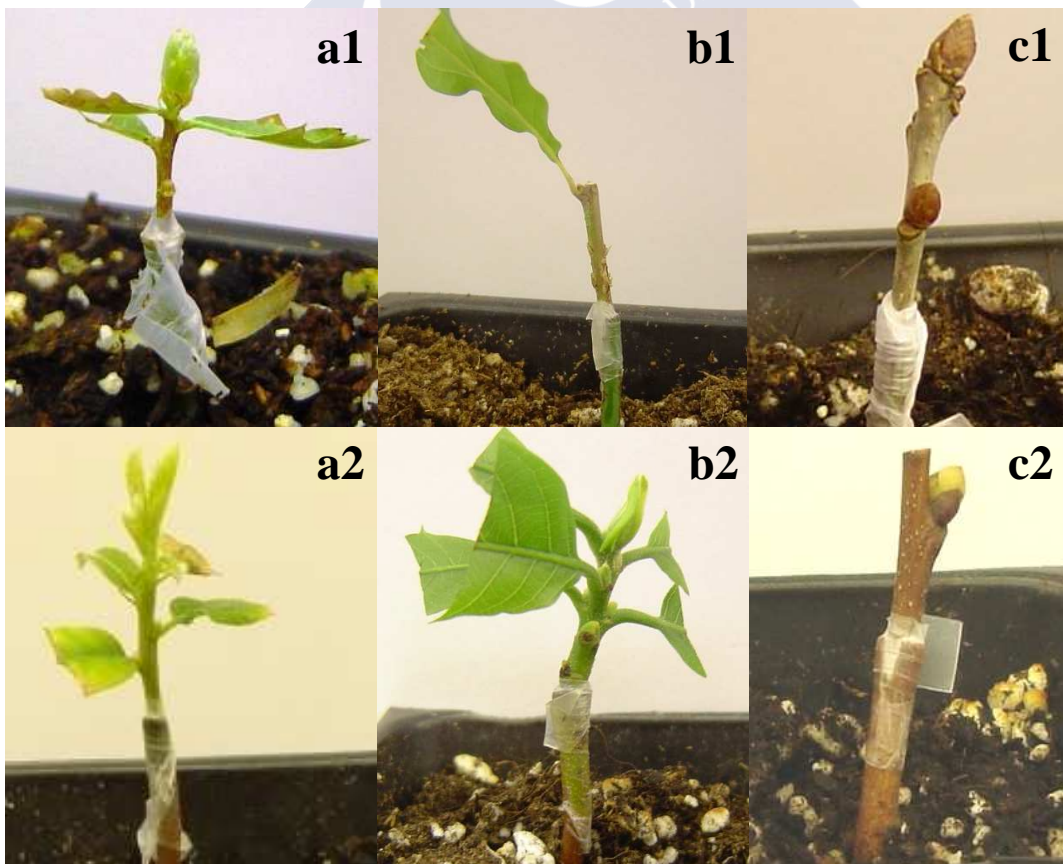
No caso do carballo utilizáronse púas de microbrotes obtidos de explantos nodais e apicais e de calos basais recultivados dos clons TROBO e MUÍÑOS.

No castiñeiro utilizáronse microbrotes procedentes da multiplicación *in vitro* de explantos nodais e apicais dos clons SISTO e EPS (copa).

#### 2.4.4 - Obtención de púas de material adulto para o microenxerto *in vivo*

Para os microenxertos *in vivo*, utilizáronse como púas brotes de 1,5-2,5 cm de longo, obtidos das seguintes fontes (Figura 19):

- Microbrotes procedentes de cultivo *in vitro*.
- Brotes procedentes de forzado de segmentos de rama en cámara de crecemento.
- Brotes en repouso vexetativo procedentes de madeira dun ano, recollidos das ramas da árbore nai uns días antes de realizar os microenxertos.
- Brotes procedentes de microenxertos precedentes que prenderon (cando se realizan microenxertos en serie, a partir do 2º microenxerto, este incluído).



**Figura 19.** (a) Púas de microenxertos *in vivo* procedentes de microbrotes cultivados *in vitro*, (b) de forzado de segmentos de rama e (c) de brotes en repouso vexetativo, (1) en carballo e (2) castiñeiro. Pódese observar a utilización de parafilm para protexer e manter firme a zona do microenxerto.

### 2.4.5 - Realización de microenxertos *in vitro*

Unha vez que a plántula que será utilizada como patrón se encontra no momento óptimo (3-4 semanas despois da introdución *in vitro*, no caso das landras; ó final dun ciclo de multiplicación, no caso dos microbrotes enraizados *in vitro*) e os microbrotes cultivados *in vitro* dos que se obterán as púas se encontran ó final dun ciclo de multiplicación, procédese á realización do microenxerto. Para levalo a cabo utilízanse (baixo cámara de fluxo laminar) unha lupa binocular e escalpelos moi afiados, que son desinfectados superficialmente con etanol 96°.

O tipo de enxerto empregado é como un enxerto de fendadura a pequena escala. Consiste na preparación da base da púa en forma de cuña ou V, a cal se introduce nunha fendadura vertical realizada lonxitudinalmente no patrón (Figura 20).

O patrón secciónse transversalmente a unha altura de 5-15 mm por encima do colo da raíz e posteriormente realízase a fendadura, a cal se debe facer no centro do patrón, afondando 3-5 mm na vertical dende a superficie seccionada. O microbrote cultivado *in vitro* extráese do recipiente de cultivo, prepárase a púa en forma de cuña, e a súa base introdúcese o máis rapidamente posible na fendadura do patrón, co fin de diminuír o risco de desecamento da mesma. No caso do carballo, para manter a unión do microenxerto emprégase un aro de silicona (Figura 21), mentres que nos microenxertos de castiñeiro non se utiliza ningún elemento de unión. Despois de realizar o microenxerto, a plántula microenxertada vólvese a introducir nun recipiente con medio de cultivo, asegurándose de que o sistema radicular quede ben introducido no medio. Os medios de cultivo utilizados para os microenxertos foron os mesmos que para a multiplicación (WPM + 0,1 mg·L<sup>-1</sup> BA en castiñeiro e GD + 0,2 mg·L<sup>-1</sup> BA en carballo).

Nos clons de castiñeiro fixéronse 4 microenxertos en serie. O microenxerto en serie consiste en microenxertar consecutivamente, cada certo tempo, o mesmo material vexetal sobre un novo patrón. Unha vez que se desenvolve un novo crecemento a partir da púa microenxertada, obtéñense novas púas que se enxertan sobre outro patrón.

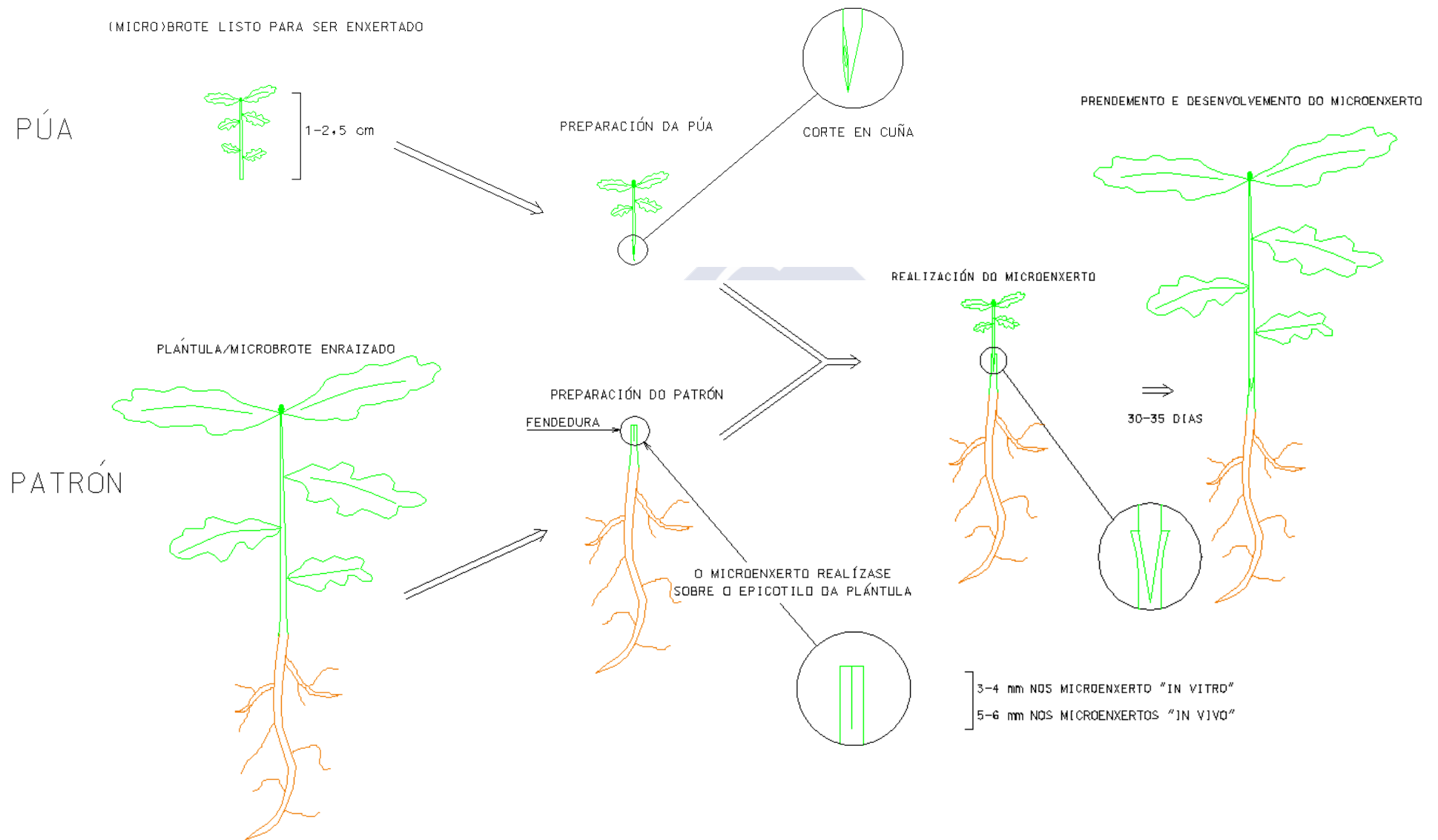
Como xa se indicou, os microenxertos *in vitro* realizados en castiñeiro fanse sobre microbrotes enraizados ou sobre microbrotes con calo basal (Figura 22).

Ó longo do proceso de prendemento do microenxerto elimínanse os brotes que ás veces emerxen das xemas axilares do patrón, para evitar a competencia coa púa (Figura 21). A necesidade desta operación xa foi mencionada noutros estudos de microenxerto (Kato *et al.*, 2004).

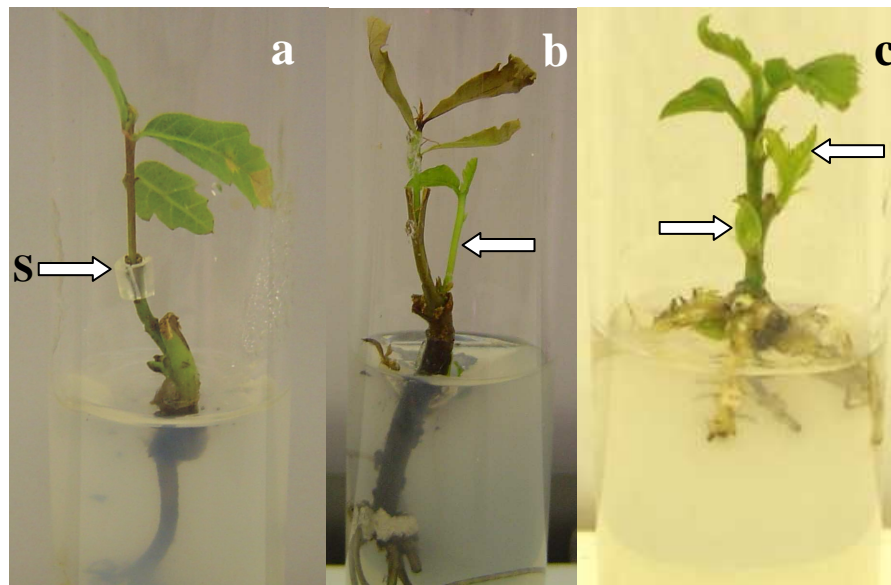
O número de microenxertos feitos por clon, tipo de púa e tipo de patrón resúmense na Táboa 9. Nas distintas probas de microenxerto *in vitro* avalíase a porcentaxe de contaminación e a porcentaxe de prendemento ós 30 días da realización dos microenxertos.



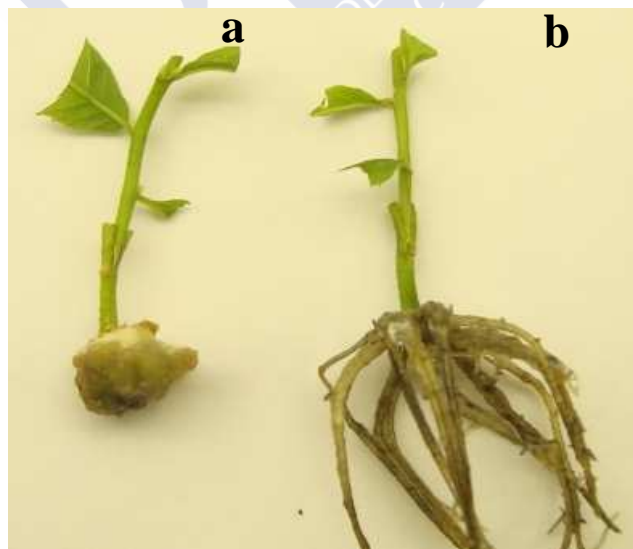
## Material e métodos



**Figura 20.** Microenxerto de fenedura utilizado no estudo.



**Figura 21.** (a) Microenxerto *in vitro* de carballo onde se observa o aro de silicona utilizado como suxeición (S). (b e c) Brotes procedentes de xemas remanentes nos patróns *in vitro* en carballo (b) e castiñeiro (c), que serán eliminados.



**Figura 22.** Microenxertos *in vitro* de castiñeiro feitos sobre microbrotes con (a) calo basal e (b) sobre microbrotes enraizados.

**Táboa 9.** Condicións dos ensaios de microenxerto ( $\mu\text{enx}$ ) *in vitro* realizados ó longo do estudo.

Especie	Púa		Patrón		Medio de cultivo	Series de microenxerto	Nº microenxertos	
	Clon	Orixe	Clon	Orixe				
<i>Quercus robur</i>	TROBO	Microbrotes <i>in vitro</i> ó final dun ciclo de multiplicación	Varios	Semente	GD + 0,1 mg·L <sup>-1</sup> BA	-	3x12	
	MUIÑOS							
<i>Castanea sativa</i>	EPS <sub>copa</sub>		EPS <sub>base</sub>	XUV 9	Microbrotes enraizados <i>in vitro</i>	WPM + 0,1 mg·L <sup>-1</sup> BA	4	1º $\mu\text{enx}$ : 19 2º $\mu\text{enx}$ : 13 3º $\mu\text{enx}$ : 18 4º $\mu\text{enx}$ : 19
					Microbrotes con calo basal ó final dun ciclo de multiplicación			1º $\mu\text{enx}$ : 19 2º $\mu\text{enx}$ : 13 3º $\mu\text{enx}$ : 15 4º $\mu\text{enx}$ : 12
	SISTO	EPS <sub>base</sub>	EPS <sub>base</sub>	Microbrotes enraizados <i>in vitro</i>	1º $\mu\text{enx}$ : 39 2º $\mu\text{enx}$ : 24 3º $\mu\text{enx}$ : 24 4º $\mu\text{enx}$ : 22			
				Microbrotes enraizados <i>in vitro</i>	1º $\mu\text{enx}$ : 32 2º $\mu\text{enx}$ : 12 3º $\mu\text{enx}$ : 5 4º $\mu\text{enx}$ : 9			

#### 2.4.6 - Realización de microenxertos *in vivo*

Definimos os microenxertos *in vivo* coma aqueles que se realizan sobre plántulas procedentes de sementes xerminadas en substrato vexetal, ubicadas na cámara de crecemento, non utilizando condicións ambientais estériles.

O proceso é moi semellante ó descrito para o microenxerto *in vitro*: córtase a base da púa en forma de V (Figura 23) e introdúcese nunha fendedura vertical feita no patrón a uns 2-3 cm de altura dende o epicotilo da plántula (Figura 24). Neste caso, a zona da unión protéxese con parafilm (Figura 19), tratando de evitar o desecamento da zona do microenxerto e de facilitar o prendemento. Ademais, colócase sobre a planta enxertada un recipiente de plástico boca abaixo, para manter unha alta humidade relativa e reducir a transpiración, diminuindo o risco de desecamento.

Logo de realizar os microenxertos no laboratorio, as plantas lévanse á cámara de crecemento. Do mesmo xeito que no caso dos microenxertos *in vitro*, débense eliminar regularmente os brotes procedentes das xemas axilares que quedan no patrón.

Realizáronse diversos ensaios de microenxertos en serie, segundo o procedemento esquematizado na Figura 25. O número de microenxertos feitos por clon, e o tipo de púa e tipo de patrón empregados resúmense na Táboa 10.

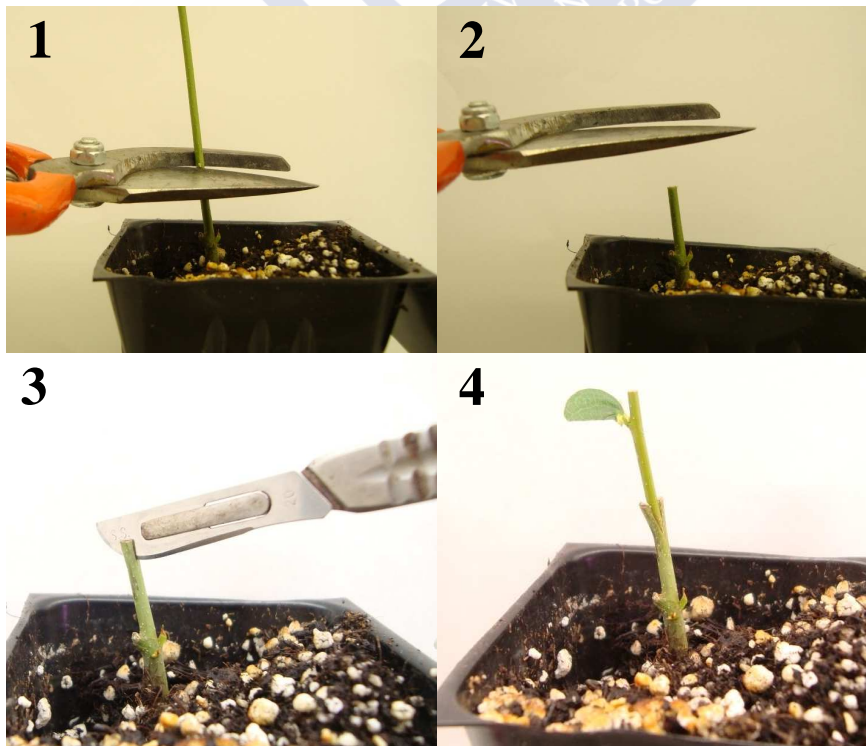
Nos microenxertos realizados *in vivo* avalíouse:

1. A porcentaxe de prendemento.
2. A influencia da idade do patrón (1 ou 2 semanas dende a xerminación da semente) no prendemento dos microenxertos *in vivo* no clon TROBO. As púas empregadas foron microbrotes apicais procedentes do recultivo do calo basal. Fixéronse 3 repeticións de 8 microenxertos en función da idade do patrón.
3. O efecto da aplicación de GA<sub>3</sub> no desenvolvemento das púas tras o microenxerto *in vivo* de castiñeiro. Nos clons LOURA e PAREDE, a unha parte dos microenxertos que prenderon aplicóuselhes un tratamento con GA<sub>3</sub>, utilizando unha disolución acuosa cunha concentración 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub>. O tratamento con GA<sub>3</sub> consistiu en aplicar (2-4 veces) no ápice da púa en crecemento unha gota da disolución. Mediuse a lonxitude dos novos crecementos a partir dos

microenxertos prendidos, tratados ou non con  $GA_3$ , ós 30 días dende o inicio do agromo das xemas da púa.



**Figura 23.** Preparación da base da púa en forma de “V” para a realización dos microenxertos *in vivo*.



**Figura 24.** (1-3) Preparación do patrón e (4) introdución da púa nun microenxerto *in vivo* de castiñeiro.

## Material e métodos



**Figura 25.** Processo de microenxerto em serie *in vivo* realizado no estudo.

Material e métodos

Táboa 10. Resumo dos diferentes ensaios de microenxerto ( $\mu$ enx) *in vivo* realizados ó longo do estudo.

Especie	Púa		Patrón		Series de microenxerto	Nº de microenxertos
	Clon	Orixe	Clon	Orixe		
<i>Quercus robur</i>	TROBO	1 $\mu$ enx: microbrotes procedentes do recultivo do calo basal ó final dun ciclo de multiplicación 2°-4° $\mu$ enx: nós e ápices dos microenxertos precedentes	Varios	Semente	4	1° $\mu$ enx: 39    2° $\mu$ enx: 11 3° $\mu$ enx: 14    4° $\mu$ enx: 15
	MUIÑOS	1 $\mu$ enx: microbrotes procedentes do recultivo do calo basal ó final dun ciclo de multiplicación 2°-4° $\mu$ enx: nós e ápices dos microenxertos precedentes			4	1° $\mu$ enx: 39    2° $\mu$ enx: 23 3° $\mu$ enx: 28    4° $\mu$ enx: 24
	QRFa	1° $\mu$ enx: brotes procedentes de forzado (1) e brotes en repouso vexetativo (2) 2-12°: $\mu$ enx: nós e ápices dos microenxertos precedentes			12	1° $\mu$ enx(1): 16 1° $\mu$ enx(2): 3x24 2°-4° $\mu$ enx: 3x12 5° $\mu$ enx: 21    9° $\mu$ enx: 3x8 6° $\mu$ enx: 10    10° $\mu$ enx: 3x10 7° $\mu$ enx: 16    11° $\mu$ enx: 3x12 8° $\mu$ enx: 21    12° $\mu$ enx: 3x8
	MIÑO	1° $\mu$ enx: brotes procedentes de forzado 2° $\mu$ enx: nós do microenxerto precedente			2	1° $\mu$ enx: 3x8 2° $\mu$ enx: 3x12
<i>Castanea sativa</i>	LOURA	1° $\mu$ enx: microbrotes procedentes de cultivo <i>in vitro</i> 60 días despois de ser subcultivados 2° $\mu$ enx: nós e ápices do microenxerto precedente	Varios	Semente	2	1° $\mu$ enx: 22 2° $\mu$ enx: 18 3° $\mu$ enx: 18
	PAREDE	1° $\mu$ enx: microbrotes procedentes de cultivo <i>in vitro</i> 60 días despois de ser subcultivados 2° $\mu$ enx: nós e ápices do microenxerto precedente			2	1° $\mu$ enx: 23 2° $\mu$ enx: 18 3° $\mu$ enx: 18
	EPS <sub>copa</sub>	1° $\mu$ enx: brotes procedentes de forzado 2°-4° $\mu$ enx: nós dos microenxertos precedentes			4	1° $\mu$ enx: 3x8    2° $\mu$ enx: 11 3° $\mu$ enx: 2    4° $\mu$ enx: 6
	SISTO	1° $\mu$ enx: brotes procedentes de forzado (1) e brotes en repouso vexetativo (2) 2° $\mu$ enx: nós e ápices do microenxerto precedente			3	1° $\mu$ enx(1): 3x8 1° $\mu$ enx(2): 3x8 2° $\mu$ enx: 18 3° $\mu$ enx: 6

## 2.4.7 - Multiplicación *in vitro* dos explantos procedentes dos microenxertos

### 2.4.7.1 - Desenvolvemento dos microenxertos e reallamento de explantos

No caso dos microenxertos realizados *in vitro*, cando o enxerto prende, a púa desenvólvese e deixase medrar ata uns 3-4 cm de longo. Posteriormente divídese en explantos apicais e nodais de 1-2 cm, que se subcultivan de xeito convencional.

Respecto ós microenxertos *in vivo*, unha vez que prenden e se desenvolven as púas, é preciso facer unha introdución *in vitro* dos explantos obtidos destas. Previamente á reintrodución *in vitro*, os brotes procedentes das púas divídense en fragmentos que son desinfectados superficialmente seguindo o mesmo esquema indicado no apartado 2.2.3.

Unha vez acabado o proceso de desinfección, os fragmentos divídense en explantos con unha ou dúas xemas axilares, cunha lonxitude de 1-2,5 cm.

No medio de introdución emprégase unha concentración de BA de 1 mg·L<sup>-1</sup>. Unha vez que as xemas dos explantos comezan a agromar (Figura 26a), o que ten lugar ós 20-30 días dende a introdución no medio de cultivo, faise unha transferencia a medio de multiplicación convencional (ver apartado 2.2.4), e ós 30-35 días realízase o primeiro subcultivo (Figura 26b).

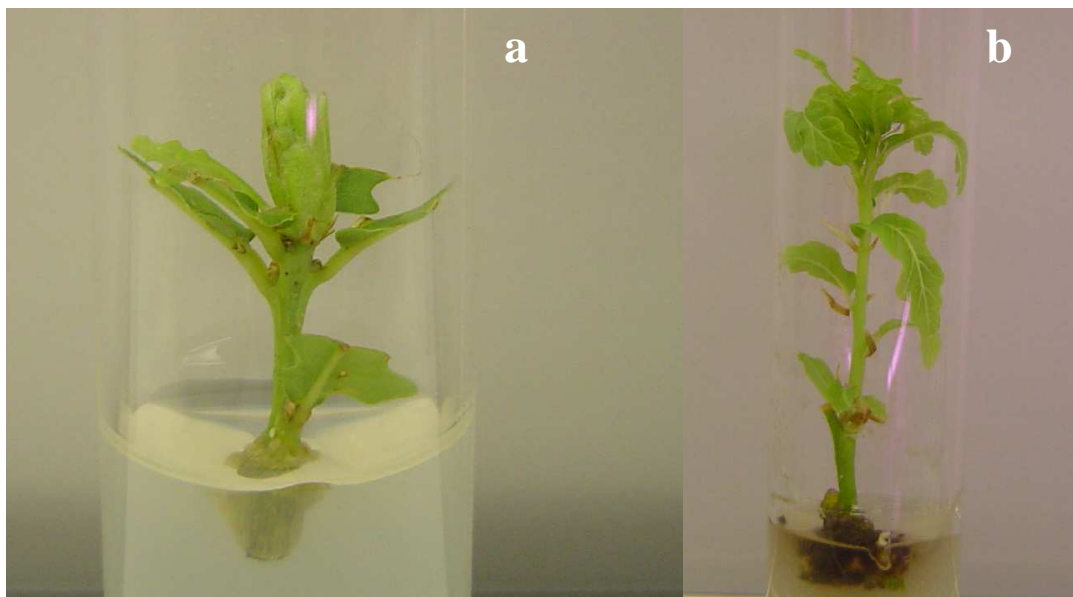
### 2.4.7.2 - Ensaio realizados *in vitro* sobre explantos reallados

No caso do carballo, nos ensaios de introdución *in vitro*, tómanse datos da porcentaxe de contaminación e reactividade, unha vez que se realiza a transferencia ó medio de multiplicación.

Unha vez que o material microenxertado se establece e multiplica *in vitro*, avalíanse as taxas de multiplicación do material microenxertado tanto *in vitro* como *in vivo*, así como as do material que non foi sometido a microenxerto. Cómpre destacar que os valores das taxas de multiplicación do material procedente dos microenxertos *in vivo* son comparados cos do material control dende a súa introdución *in vitro* (SC1-SCn) xa que ambos pasan de condicións *ex vitro* a *in vitro*. No entanto, no caso dos microenxertos *in vitro*, as púas obtidas do material control obtivéronse cando dito material xa acadou un certo grao de estabilización *in vitro*, polo que os valores comparáronse a partir do momento de realizar os microenxertos *in vitro* (SCx-Scy,

sendo SCx o subcultivo no que se encontra o material control no momento de realizar os microenxertos *in vitro*, e SCy o subcultivo ata o que se toman datos da taxa de multiplicación, sendo os subcultivos neste caso coetáneos).

En cada subcultivo tómanse datos de 3 repeticións de 8 ou 12 microbrotes por cada tipo de material e por cada clon. Cando non houbo material dabondo (nos primeiros subcultivos) non se fixeron repeticións, tomándose datos absolutos.



**Figura 26.** (a) Aspecto de explantos de carballo procedentes de púas enxertadas *in vivo* ós 20-30 días tras a posta en cultivo, en medio con  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, e (b) ós 28-35 días da transferencia a medio con  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, no momento previo ó primeiro subcultivo.

#### 2.4.8 - Avaliación do enraizamento *in vitro*

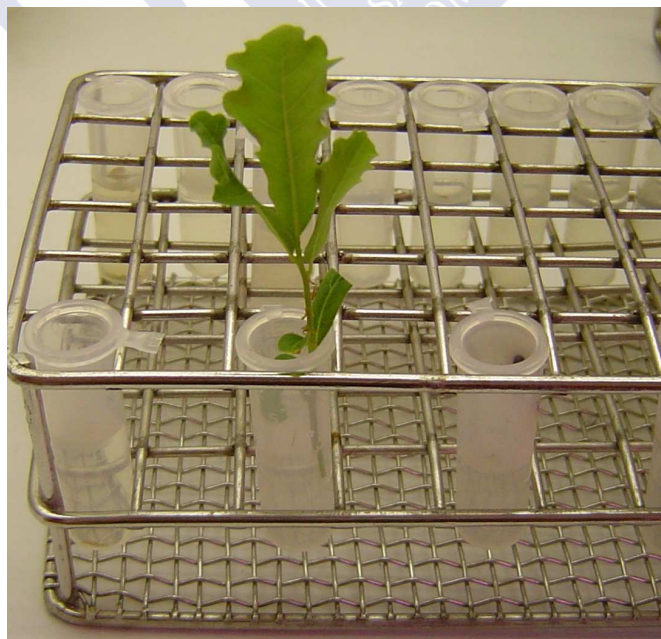
Para avaliar o enraizamento *in vitro* fanse ensaios comparativos entre o material procedente dos microenxertos e o material que non se microenxertou.

Para facer os ensaios de enraizamento utilízanse microestacas procedentes de microbrotes obtidos ó final dun ciclo de multiplicación. As microestacas teñen unha lonxitude entre 5 e 30 mm e poden ter, ou non, unha xema apical.

As variables analizadas nos ensaios de enraizamento son a porcentaxe de enraizamento, o número de raíces por micropúa enraizada e a lonxitude da raíz máis longa por micropúa enraizada. Estas variables mídense ós 7, 14, 21, 28 e 35 días da indución do enraizamento.

A indución do enraizamento consistiu nunha inmersión basal (Figura 27) durante un período de tempo variable (45-120 s), nunha disolución acuosa de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AIB e a posterior introdución en medio GD 1/3 (medio de expresión).

Na Táboa 11 resúmense as probas de enraizamento realizadas.



**Figura 27.** Inmersión basal dun microbroto de carballo nunha disolución  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de AIB, antes de ser establecido en medio de enraizamento.

## Material e métodos

**Táboa 11.** Ensaio de enraizamento realizados no estudo (EPS base raíz: microbrotes enraizados de EPS<sub>base</sub>; EPS base calo: explantos con calo basal de EPS<sub>base</sub>; A: apical; N: nodal; µnx: microenxerto).

Especie	Clon púa	Clon patrón	Material empregado no ensaio		Tempo inmersión (s)	Microestaquilla		Nº µnx
			Series µnx <i>in vitro</i>	Series µnx <i>in vivo</i>		Tipo explanto	Lonxitude (mm)	
<i>Quercus robur</i>	TROBO	Varios - semente	1º	1º, 2º	120	A	15-30	3x8
	MUÍÑOS		1º	1º	120	A	15-30	3x8
	QRFa		-	1º, 3º, 5º, 8º, 12º	120	A	15-30	3x12
			-	-	45	N	< 10	3x12
	MIÑO		-	1º, 2º	120	A	15-30	3x12
			-	-	-	N	15-30	3x12
<i>Castanea sativa</i>	EPScopa	Varios - semente	-	1º, 2º, 4º	120	N	< 10	3x12
	EPScopa	EPS base raíz	1º, 3º, 4º	-	60	A	15-30	3x10
		EPS base calo	4º	-	-	-	-	-
	EPScopa	XUV 9 raíz	1-2º, 3º, 4º	-	60	A	15-30	3x8
		XUV 9 calo	1º	-	-	-	-	-
	SISTO	Varios - semente	-	1º, 2º	45 e 120	N	15-30	3x12
	SISTO	EPS base raíz	1º	-	120	N/A	15-30	3x12
		EPS base calo	1º	-	-	-	-	-
SISTO	EPS base raíz	1º, 3º, 4º	-	60	A	15-30	3x8	

## 2.5 - Tratamento estatístico

No caso dos tratamentos que se fixeron en tres repeticións, os datos establecéronse en bloques ó azar. Os datos foron tratados estatisticamente mediante análise de varianza e tests de comparación de medias (t de Student ou LSD), utilizando o paquete estatístico SPSS.

Os valores en porcentaxes transformáronse para a súa análise mediante transformación angular ou arcoseno, do xeito que se relata a continuación:

Chamemos  $y$  ó número de micropúas enraizadas, microenxertos prendidos, microbrotes contaminados, etc.,  $p$  a expresión das porcentaxes en tanto por un e  $n$  o número de observacións realizadas por repetición. Entón:

- Se  $y = 0$  —————→  $p = 1/4n$
- Se  $1 \leq y \leq n-1$  —————→  $p = y/n$
- Se  $y = n$  —————→  $p = (n - 1/4)/0,98n$

A fórmula do arcoseno empregada na transformación será:

$$\text{Valor transformado} = \arcsen \sqrt{p}$$

En táboas e gráficas exprésanse os valores sen transformar.



## IV - RESULTADOS

### 1 - Introducción *in vitro* do material vexetal

#### 1.1 - Clons introducidos *in vitro*

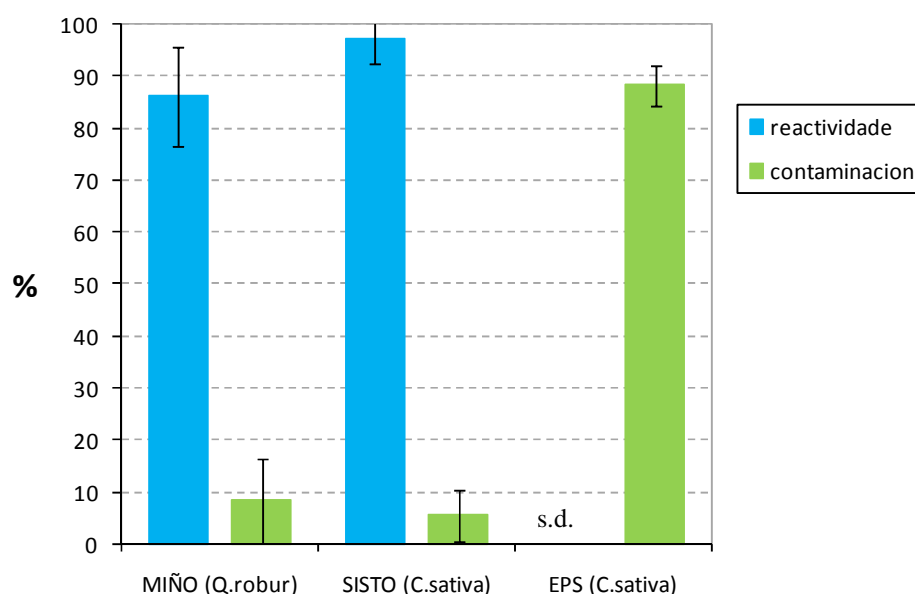
Para levar a cabo os distintos ensaios propostos neste traballo foi necesario establecer *in vitro* algúns clons de carballo (MIÑO e QRFa) e castiñeiro (SISTO e EPS). Os clons TROBO, MUÍÑOS e QRF73 (*Quercus robur*), e XUV 9, LOURA e PAREDE (*Castanea sativa*) xa foran introducidos en traballos previos e dispúñase de stocks *in vitro* en fase de multiplicación.

#### 1.2 - Introducción *in vitro* dos clons MIÑO, SISTO e EPS

Na Figura 28 móstranse os resultados da porcentaxe de contaminación e da reactividade *in vitro* do material procedente de forzado dos clons MIÑO e SISTO, e da introdución directa de brotes procedentes da árbore do clon EPS.

Compróbase que a porcentaxe de contaminación é moito máis elevada cando introducimos material directamente do exterior que cando se realiza forzado de segmentos de rama. No primeiro caso contamináronse preto do 90 % dos explantos, mentres que no material procedente de forzado non se supera o 10 %.

Por outra banda, o material procedente de forzado ten unha reactividade inicial elevada, encontrándose arredor do 86 % no clon MIÑO e do 97 % no clon SISTO.



**Figura 28.** Contaminación e reactividade (en %) dos explantos procedentes de forzado dos clons MIÑO e SISTO, e contaminación dos explantos tomados da árbore do clon EPS. s.d.: sen datos.

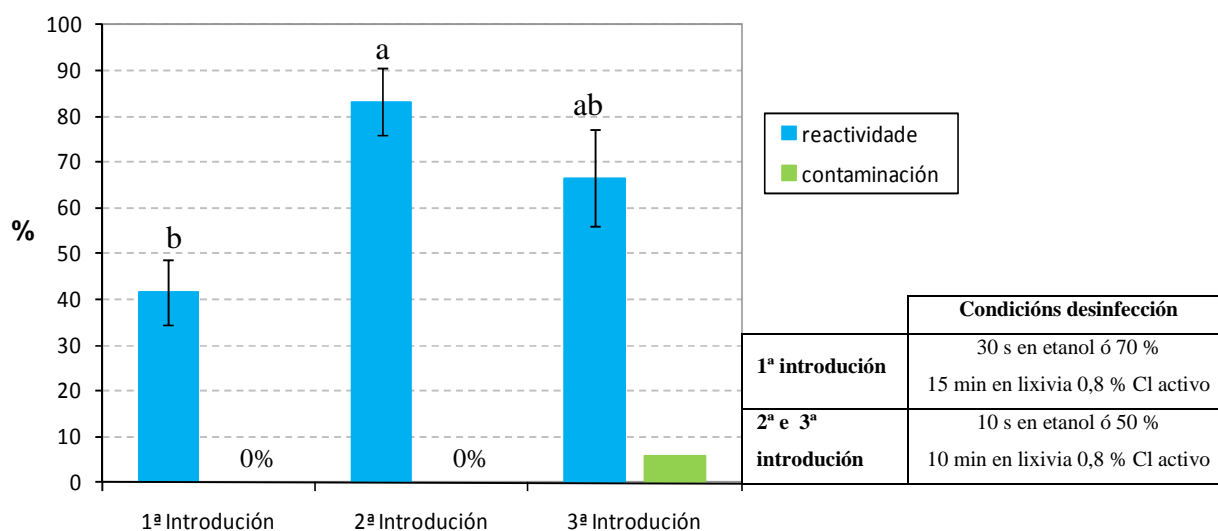
### 1.3 - Introducción *in vitro* do clon QRFa

No forzado do clon QRFa utilizáronse tres tipos de varas (Figura 12). As varas procedentes de madeira do último ano de crecemento non produciron brotes aproveitables, mentres que as que tiñan madeira de máis de un ano si.

As varas produciron unha media de 3-4 brotes aproveitables como explantos para introducir *in vitro*. Os brotes foron agromando progresivamente, saíndo os primeiros ós 15 días de introducir as varas en auga, producíndose un máximo arredor dos 25 días e descendendo logo progresivamente, non saíndo máis brotes despois de 35-40 días.

Na Figura 29 pódense apreciar os resultados da porcentaxe de contaminación e da reactividade *in vitro* do material procedente do forzado do clon QRFa. Como se pode comprobar, a reactividade é maior cando se emprega o proceso de desinfección máis suave que cando se emprega o máis forte.

Usando o tratamento máis suave, a porcentaxe de contaminación non aumenta, ou faino lixeiramente, polo que parece o tratamento máis axeitado para desinfectar os brotes procedentes de forzado antes da súa introdución *in vitro*.

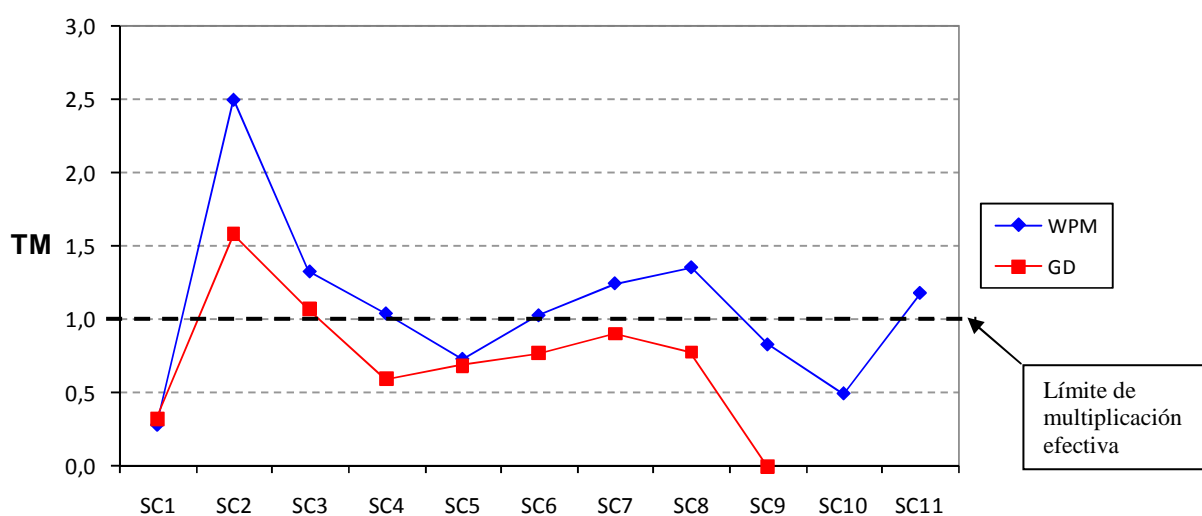


**Figura 29.** Contaminación e reactividade (en %) dos explantos procedentes de forzado do clon QRFa, para as tres introducións *in vitro*. Letras diferentes indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,01$ ).

#### 1.4 - Ensaio de medio base no clon QRFa

Na Figura 30 pódese apreciar a evolución das taxas de multiplicación no clon QRFa, ó longo dos 11 primeiros subcultivos, empregando os medios GD ou WPM. Obsérvase como sempre acada maiores valores de multiplicación o material cultivado en medio WPM; asemade, o material cultivado en medio GD perdeuse no noveno subcultivo, mentres que o material cultivado en WPM se mantivo ata a actualidade. Deste xeito, pódese concluír que, para este clon, o medio máis axeitado é o WPM, polo que foi o utilizado en posteriores ensaios.

Os valores de multiplicación son, en todo caso, bastante baixos, xa que en moitos subcultivos toman valores por debaixo de 1, que se considera o mínimo valor para que exista unha multiplicación efectiva. Esta baixa taxa de multiplicación está relacionada, con toda seguridade, co alto grao de madurez deste clon, o que adoita ter unha relación negativa coa micropropagación en xeral, e coa facilidade de multiplicación en particular (Bonga e Von Aderkas, 1982).



**Figura 30.** Evolución da taxa de multiplicación (TM), ó longo de 11 subcultivos (SC1-SC11), do material do clon QRFa procedente de forzado, empregando os medios WPM e GD. Letras diferentes indican diferenzas significativas segundo a proba t de Student mediante observación por pares ( $P < 0,01$ ).

## 2 - Recultivo do calo basal

### 2.1 - Recultivo do calo en *Quercus robur* L.

#### 2.1.1 - Taxa de multiplicación

Representáanse a continuación, para os clons TROBO, MUÍÑOS e QRF73, os resultados da taxa de multiplicación dos distintos tipos de calos en cada recultivo, en comparación coas taxas de multiplicación dos explantos nodais e apicais. Cómpre recordar que denominamos ‘calo’ ó conxunto formado polo explanto nodal, cun tamaño demasiado pequeno para ser subcultivado independentemente, e polo calo que se forma na súa base. Así, distinguimos calos tipo 1: aqueles nos que non se aprecian visualmente xemas nin brotes; calos tipo 2: aqueles nos que se aprecian visualmente xemas axilares; calos tipo 3: aqueles nos que se aprecian visualmente brotes < 1 cm (e xemas axilares).

#### Clon TROBO

**Táboa 12.** Taxa de multiplicación dos tres tipos de calos (fronte ó nº de recultivo - Nº REC) e dos nós e ápices no clon TROBO. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

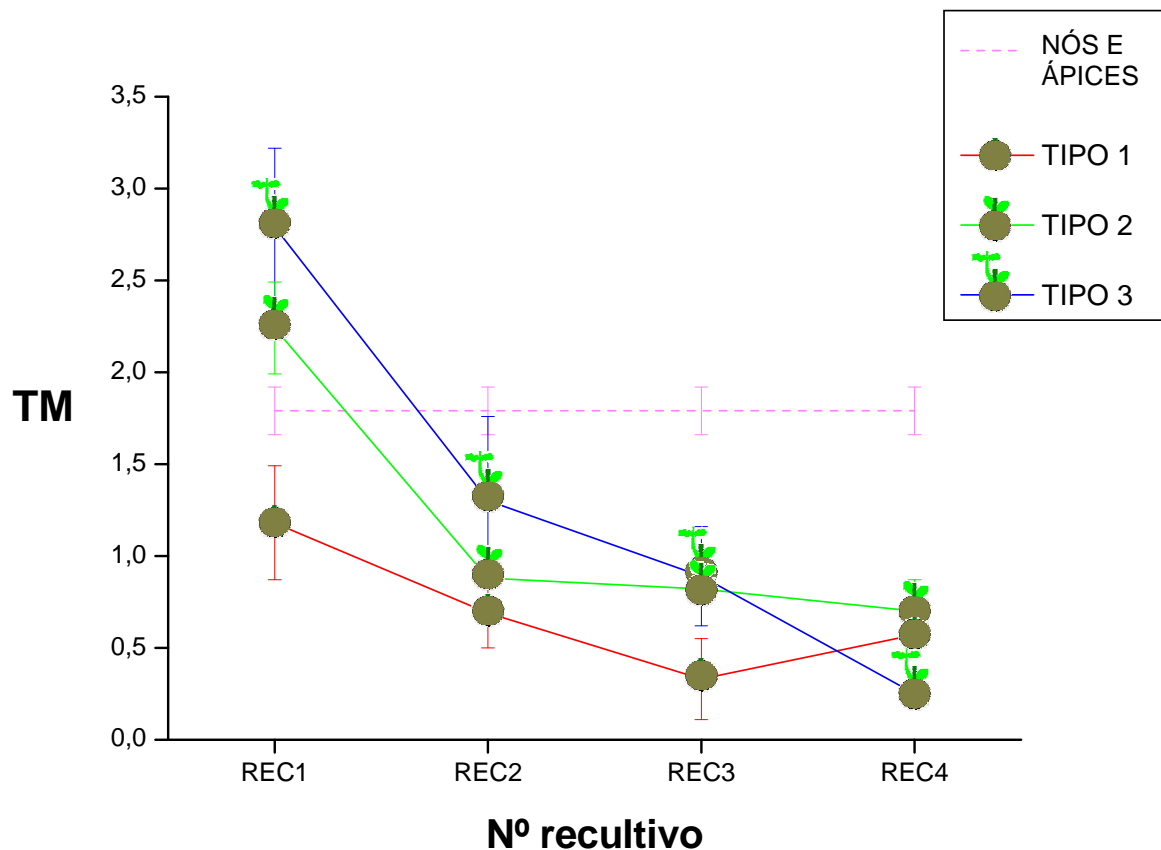
Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	NÓS E ÁPICES
1	1,18 ± 0,31D-a	2,24 ± 0,25B-a	2,79 ± 0,43A-a	1,79 ± 0,13C
2	0,69 ± 0,19C-b	0,88 ± 0,04BC-b	1,30 ± 0,46B-b	1,79 ± 0,13A
3	0,33 ± 0,22C-b	0,82 ± 0,06B-b	0,89 ± 0,27B-b	1,79 ± 0,13A
4	0,57	0,70 ± 0,17B-b	0,25	1,79 ± 0,13A

Na Táboa 12 pódese observar como, no primeiro recultivo, os calos tipo 2 e 3 mostran unha taxa de multiplicación significativamente maior á taxa de multiplicación dos nós e ápices, mentres que a partir deste a media é menor. No caso dos calos tipo 1, a taxa de multiplicación é menor cá dos nós e ápices dende o primeiro recultivo.

Tamén se poden observar diferenzas na taxa de multiplicación entre tipos de calos para un mesmo recultivo (o maior valor obsérvase nos tipo 3 e o menor nos tipo 1), máis marcado no primeiro recultivo que nos seguintes. Todos os tipos de calo perden a súa produtividade progresivamente con sucesivos recultivos.

Á vista dos resultados, só achegaría unha taxa de multiplicación maior cá dos nós e ápices o primeiro recultivo dos calos tipo 2 e 3.

Os datos pódense observar de forma gráfica na Figura 31.



**Figura 31.** Taxa de multiplicación (TM) dos diferentes tipos de calo (TIPO 1, TIPO 2, TIPO3), ó longo dos sucesivos recultivos (REC1, REC2, REC3, REC4), e dos nós e ápices no clon TROBO. As barras verticais representan a desviación típica das medias calculadas nas sucesivas repeticións. Cando non se representa a desviación típica, os datos proceden dunha soa repetición.

No noso traballo verificouse que ó aumentar o número de recultivo non só diminúe a taxa de multiplicación, senón que tamén diminúe a calidade xeral dos nós e ápices obtidos do calo, facéndose máis grosos, con aspecto hiperhídrico e amosando con maior frecuencia necrose apical.

*Clon MUÍÑOS*

**Táboa 13.** Taxa de multiplicación dos tres tipos de calos (fronte ó nº de recultivo - Nº REC) e dos nós e ápices no clo MUÍÑOS. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

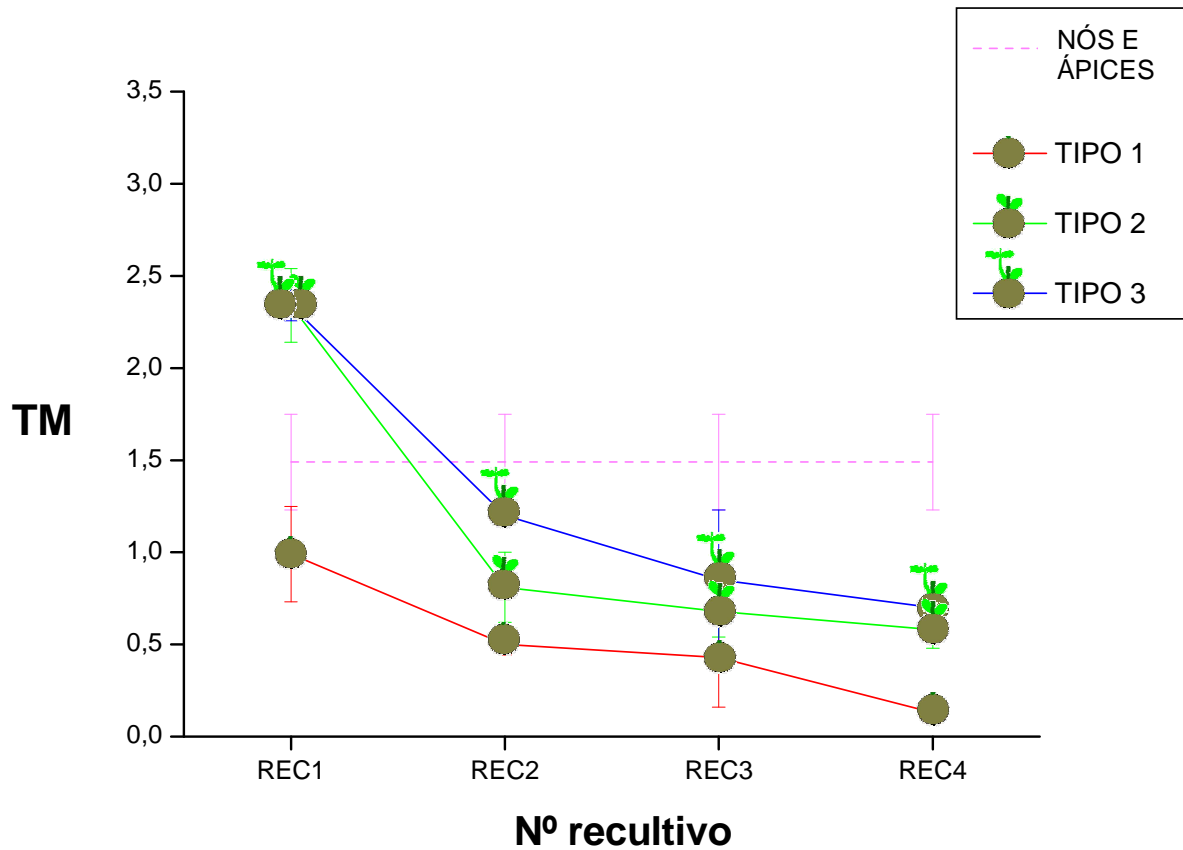
Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	NÓS E ÁPICES
1	0,99 ± 0,26C-a	2,34 ± 0,20A-a	2,34 ± 0,083A-a	1,49 ± 0,26B
2	0,50 ± 0,058B-b	0,81 ± 0,19B-b	1,20 ± 0,055A-b	1,49 ± 0,26A
3	0,43 ± 0,27C-b	0,68 ± 0,14BC-b	0,85 ± 0,38B-c	1,49 ± 0,26A
4	0,13	0,58 ± 0,10B-b	0,70	1,49 ± 0,26A

Neste clon, igual que no anterior, os calos recultiváronse ata catro veces.

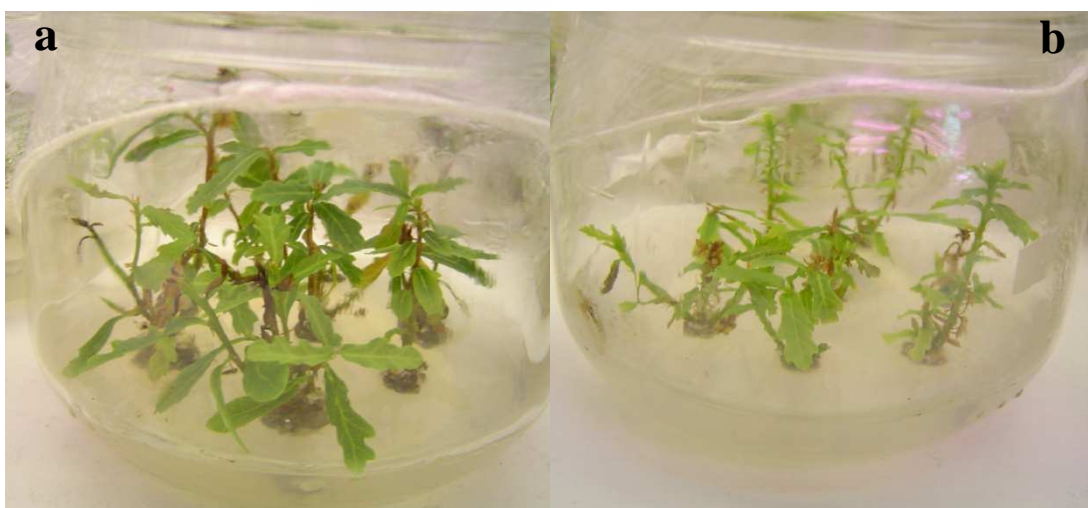
Os resultados obtidos neste clon son moi semellantes ós do clon anterior en canto á evolución da taxa de multiplicación. Os valores das taxas de multiplicación son, en xeral, máis baixas que no clon TROBO, o que pon de manifesto (aínda procedendo de plantas nai de idade semellante) a diferente resposta en función do xenotipo.

Á vista dos resultados amosados na Táboa 13, e expresados graficamente na Figura 32, pódese observar que, de novo, no primeiro recultivo, os calos tipo 2 (Figura 33) e 3 son máis produtivos que os nós e ápices. Agora ben, neste clon, os calos tipo 2 e 3 non amosan diferenzas significativas entre eles.

O primeiro recultivo é o máis produtivo para os tres tipos de calos, diminuíndo significativamente a taxa de multiplicación no segundo recultivo. Nos recultivos 3 e 4 o descenso atenúase.



**Figura 32.** Taxa de multiplicación (TM) dos diferentes tipos de calo (TIPO 1, TIPO 2, TIPO3), ó longo dos sucesivos recultivos (REC1, REC2, REC3, REC4), e dos nós e ápices no clon MUÍÑOS. As barras verticais representan a desviación típica das medias calculadas nas sucesivas repeticións. Cando non se representa a desviación típica, os datos proceden dunha soa repetición.



**Figura 33.** (a) Brotes procedentes de calos tipo 2 (ós 30 días de recultivar por primeira vez) e (b) de explantos nodais e ápiceis (ós 30 días de subcultivar), no clon MUÍÑOS. Obsérvese o maior crecemento dos primeiros.

*Clon QRF73*

A continuación preséntanse os resultados obtidos no clon xuvenil de carballo. Na Táboa 14 represéntanse os resultados da taxa de multiplicación (expresados graficamente na Figura 34), cos correspondentes resultados da análise estatística.

**Táboa 14.** Taxa de multiplicación dos tres tipos de calos (fronte ó nº de recultivo - Nº REC) e dos nós e ápices no clon QRF73. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

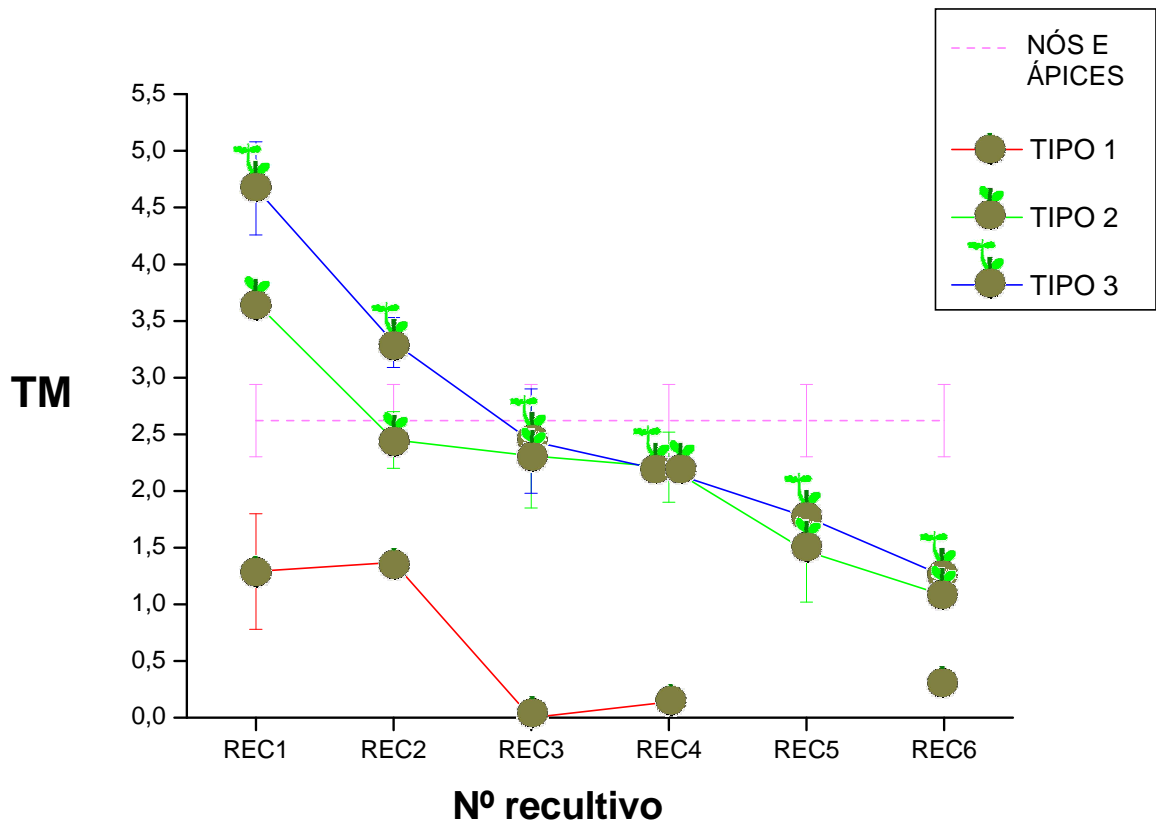
Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	NÓS E ÁPICES
<b>1</b>	1,29 ± 0,51D	3,66 ± 0,055B-a	4,67 ± 0,41A-a	2,62 ± 0,32C
<b>2</b>	1,37	2,45 ± 0,25B-b	3,31 ± 0,22A-b	2,62 ± 0,32B
<b>3</b>	0,00	2,31 ± 0,46A-b	2,44 ± 0,46A-c	2,62 ± 0,32A
<b>4</b>	0,14	2,21 ± 0,31A-b	2,17	2,62 ± 0,32A
<b>5</b>	-	1,47 ± 0,45B-c	1,77	2,62 ± 0,32A
<b>6</b>	0,33	1,08	1,25	

Pódese observar claramente que no primeiro recultivo os calos tipo 3 amosan unha taxa de multiplicación significativamente superior á dos calos tipo 2, e ámbolos dous superior á taxa de multiplicación dos nós e ápices.

Os calos tipo 1 presentan xa no primeiro recultivo unha taxa de multiplicación significativamente inferior á dos nós e ápices.

Os valores de multiplicación dos calos tipo 2 e 3 descenden paulatinamente cos sucesivos recultivos (Figura 35), pero, a diferenza dos clons adultos, a taxa de multiplicación dos calos tipo 2 e 3 do clon xuvenil mantense durante un maior número de recultivos ó mesmo nivel ou superior que a dos nós e ápices, pois nos adultos, a partir do segundo recultivo, os calos xa mostran valores significativamente inferiores ós dos nós e ápices.

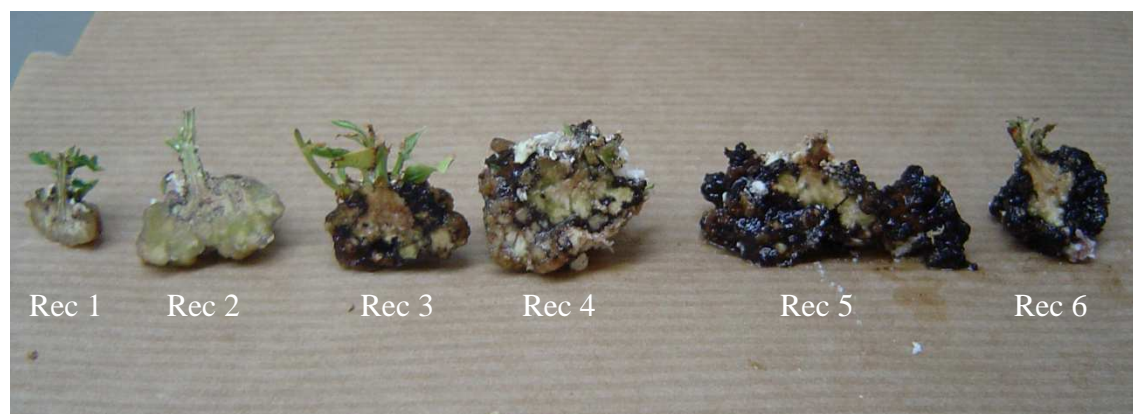
A perda da capacidade para producir brotes, a medida que se incrementa o número de veces que se recultiva un calo, pode estar relacionada con un aumento da necrose do tecido que forma o calo basal, o que se aprecia visiblemente porque o calo vai tornando dunha cor clara a unha cor escura e perdendo consistencia (fai máis ‘friable’) ó recultivalo sucesivamente (Figura 36).



**Figura 34.** Taxa de multiplicación (TM) dos diferentes tipos de calo (TIPO 1, TIPO 2, TIPO3), ó longo dos sucesivos recultivos (REC1, REC2, REC3, REC4, REC 5, REC 6), e dos nós e ápices no clon QRF73. As barras verticais representan a desviación típica das medias calculadas nas sucesivas repeticións. Cando non se representa a desviación típica, os datos proceden dunha soa repetición.



**Figura 35.** Aspecto dos microbrotes procedentes de calos, en función do número de recultivo, no clon xuvenil QRF73.



**Figura 36.** Sección de calos do clon xuvenil QRF73 en diferentes recultivos, onde se aprecia a progresión da necrose.

### 2.1.2 - Número de brotes maiores de 1 cm

Na Táboa 15 preséntanse os datos, para os diferentes clons, do número de brotes maiores de 1 cm que achegan os diferentes tipos de calo nos diferentes recultivos, ó final dun ciclo de multiplicación, así coma o valor medio que achegan nós e ápices.

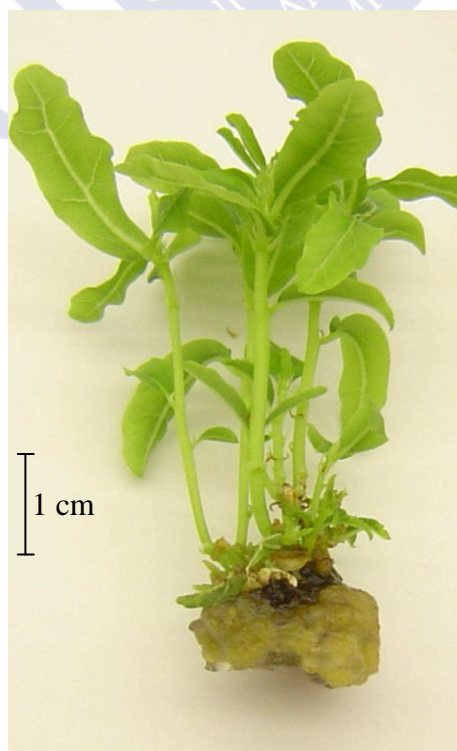
**Táboa 15.** Número de brotes maiores de 1 cm para os tres tipos de calos (TIPO 1, TIPO 2 e TIPO 3), en cada recultivo (Nº REC), e para os nós e ápices, nos clons de carballo TROBO, MUÍÑOS e QRF73. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna, dentro de cada clon) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

CLON	Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	NÓS E ÁPICES
TROBO	1	1,51 ± 0,56A-a	1,85 ± 0,04A-a	1,68 ± 0,20A-a	1,51 ± 0,09A
	2	0,91 ± 0,20B-b	0,88 ± 0,12B-b	1,06 ± 0,58AB-b	1,51 ± 0,09A
	3	0,53 ± 0,21B-b	0,80 ± 0,031B-b	0,76 ± 0,25B-b	1,51 ± 0,09A
	4	0,77	0,64 ± 0,16B-b	0,25	1,51 ± 0,09A
MUÍÑOS	1	1,64 ± 0,77AB-a	1,97 ± 0,042A-a	1,62 ± 0,17AB-a	1,20 ± 0,22B
	2	0,59 ± 0,07B-b	0,86 ± 0,11AB-b	1,04 ± 0,03AB-b	1,20 ± 0,22A
	3	0,59 ± 0,29B-b	0,63 ± 0,05B-b	0,72 ± 0,24B-b	1,20 ± 0,22A
	4	0,50	0,67 ± 0,16B-b	0,50	1,20 ± 0,22A
QRF73	1	2,35 ± 0,70BC	2,97±0,29AB-a	3,57 ± 0,37A-a	1,66 ± 0,37C
	2	2,71	2,20 ± 0,32AB-b	2,79 ± 0,24A-b	1,66 ± 0,37B
	3	0,00	2,28 ± 0,60A-b	2,23 ± 0,20A-b	1,66 ± 0,37A
	4	1,00	1,99 ± 0,39A-bc	2,07	1,66 ± 0,37A
	5	--	1,31 ± 0,37A-c	1,55	1,66 ± 0,37A
	6	0,33	1,08	1,25	1,66 ± 0,37

Como se pode observar, o número de brotes maiores de 1 cm diminúe significativamente do primeiro ós seguintes recultivos, para os tres tipos de calo, nos tres clons estudados. A partir do segundo recultivo, os valores tamén baixan, pero de forma máis progresiva.

Nos clons adultos os valores dos calos soamente chegan a superar ós dos explantos convencionais no primeiro recultivo, mentres que nos posteriores son menores ou non difiren significativamente con eles. Pola contra, non clon xuvenil, os valores dos calos acadan valores semellantes ós dos nós e ápices durante máis recultivos (ata o 5º nos calos tipo 2), o que indica a maior capacidade deste clon para desenvolver as xemas remanentes no calo. De feito, no clon xuvenil, a diferenza no número de brotes  $> 1$  cm dos calos (Figura 37) con respecto ós nós e ápices foi moi marcada nos primeiros recultivos, polo que, neste caso, este parámetro é, polo menos en parte, responsable do elevado valor das taxas de multiplicación.

Comparando os distintos tipos de calo, os valores non amosan grandes diferenzas entre eles, polo que se pode deducir que o número de brotes maiores de 1 cm non se ve influído de xeito determinante polo tipo de calo que se recultiva.



**Figura 37.** Aprécianse, no clon xuvenil QRF73, cinco brotes maiores de 1 cm sobre un calo recultivado unha vez.

### 2.1.3 - Lonxitude do brote máis longo

Este dato corresponde ós valores da lonxitude do brote máis longo para cada tipo de explanto ó final dun ciclo de multiplicación. Os valores móstranse na Táboa 16, para os diferentes clons, en sucesivos recultivos. Tamén se mostra o valor medio de varios subcultivos de nós e ápices.

**Táboa 16.** Lonxitude do brote máis longo (en cm) para os tres tipos de calos (TIPO 1, TIPO 2 e TIPO 3), en cada recultivo (Nº REC), e a media dos nós e ápices, para os clons de carballo TROBO, MUÍÑOS e QRF73. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna, dentro de cada clon) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

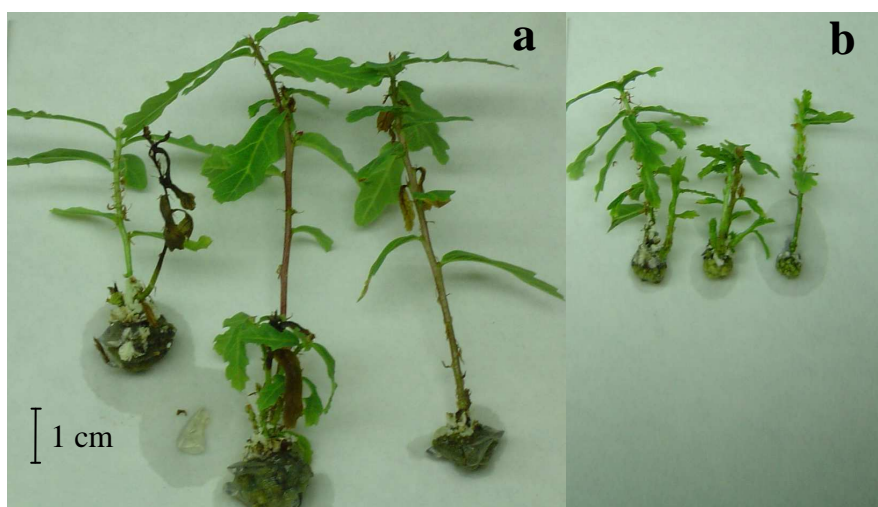
CLON	Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3	NÓS E ÁPICES
TROBO	1	2,06 ± 0,39B-a	2,57 ± 0,05B-a	3,65 ± 0,49A-a	2,63 ± 0,19B
	2	1,64 ± 0,28B-ab	1,57 ± 0,20B-b	1,80 ± 0,55B-b	2,63 ± 0,19A
	3	1,33 ± 0,35B-b	1,39 ± 0,19B-b	1,52 ± 0,59B-b	2,63 ± 0,19A
	4	1,53	1,22 ± 0,47B-b	0,40	2,63 ± 0,19A
MUÍÑOS	1	2,10 ± 0,37B-a	2,72 ± 0,17A-a	3,17 ± 0,28A-a	2,18 ± 0,28B
	2	1,17 ± 0,36C-b	1,45 ± 0,26BC-b	1,78 ± 0,10AB-b	2,18 ± 0,28A
	3	1,17 ± 0,25B-b	1,16 ± 0,08B-b	1,53 ± 0,59B-b	2,18 ± 0,28A
	4	0,75	1,09 ± 0,32B-b	1,10	2,18 ± 0,28A
QRF73	1	2,42 ± 0,53B	2,73 ± 0,29B-a	3,41 ± 0,31A-a	3,21 ± 0,18A
	2	2,77	2,24 ± 0,15B-b	2,79 ± 0,34A-b	3,21 ± 0,18A
	3	0,00	2,18 ± 0,13B-b	2,26 ± 0,20B-c	3,21 ± 0,18A
	4	1,5	2,32 ± 0,25B-ab	2,25	3,21 ± 0,18A
	5	--	1,94 ± 0,14B-b	1,86	3,21 ± 0,18A
	6	1,06	1,52	1,42	3,21 ± 0,18

Do mesmo xeito que o parámetro do epígrafe anterior, os valores da lonxitude do brote máis longo diminúen de forma brusca no segundo recultivo, producíndose posteriormente unha diminución menos acusada.

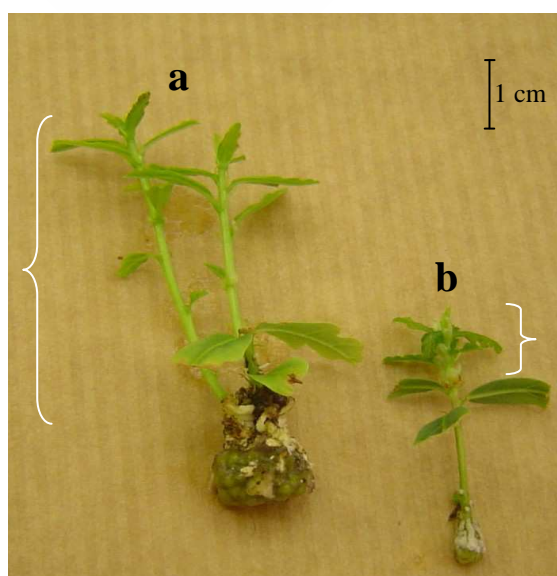
No primeiro recultivo, os explantos que presentan os brotes máis longos son sempre os calos tipo 3. A diferenza de lonxitude entre os microbrotes procedentes dos calos tipo 3 e os que achegan nós e ápices, no clon TROBO, pódese apreciar na Figura 38.

Nos seguintes recultivos, as diferenzas entre tipos de calos tenden a desaparecer, presentando os nós e ápices os valores máis elevados.

A diferenza neste parámetro seguramente se debe a que, no caso dos explantos convencionais, o desenvolvemento visible comeza ós 10-15 días dende o momento de realizar o subcultivo, mentres que no caso dos calos o crecemento comeza ó pouco tempo da introdución en medio fresco, producíndose unha diferenza moi notable no desenvolvemento dos explantos ós 15 días de subcultivar (Figura 39).



**Figura 38.** Diferenza de lonxitude entre os microbrotes producidos por (b) explantos nodais e apicais e (a) os producidos polo primeiro recultivo de calos tipo 3, no clon TROBO, ós 30 días de subcultivar.



**Figura 39.** Diferenza de crecemento entre os microbrotes producidos por (a) un calo recultivado unha vez e (b) un explanto apical, ós 15 días de realizar o subcultivo, no clon MUÍÑOS.

### 2.1.4 - Porcentaxe de calos que se obteñen de cada tipo

Este dato representa a porcentaxe media de calos de cada tipo (1, 2 ou 3) que hai nun determinado recultivo. Os valores obtidos móstranse na Táboa 17.

**Táboa 17.** Porcentaxe dos tres tipos de calos (TIPO 1, TIPO 2 e TIPO 3), en cada recultivo (Nº REC), para os clons de carballo TROBO, MUÍÑOS e QRF73. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna, dentro de cada clon) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

CLON	Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3
TROBO	1	9,38 ± 1,83C-a	49,86 ± 3,47A-b	40,74 ± 5,31B-a
	2	16,00 ± 1,81B-a	66,54 ± 7,11A-a	16,91 ± 7,53B-b
	3	13,64 ± 0,33B-a	67,91 ± 5,70A-a	18,43 ± 5,36B-b
	4	20,89	73,13	5,98
MUÍÑOS	1	9,82 ± 3,90C-a	59,16 ± 5,90A-a	30,99 ± 1,99B-a
	2	12,81 ± 5,54B-a	67,88 ± 7,71A-a	19,30 ± 2,17B-a
	3	14,57 ± 9,01B-a	67,28 ± 9,65A-a	18,14 ± 0,64B-a
	4	10,52	76,31	13,17
QRF73	1	13,33 ± 6,33C-a	34,62 ± 0,88B-d	52,04 ± 5,04A-a
	2	8,32 ± 5,15C-ab	52,10 ± 11,16A-c	39,57 ± 1,75B-b
	3	4,08 ± 3,34C-ab	64,22 ± 2,63A-b	31,69 ± 0,71B-bc
	4	7,85 ± 5,87C-ab	55,78 ± 0,31A-bc	36,37 ± 6,18B-b
	5	0,00 ± 0,00C-b	76,19 ± 6,73A-a	23,81 ± 6,73B-c
	6	15,79	63,16	21,05

De forma xeral, obsérvase que os calos tipo 1 son sempre os que se obteñen en menor proporción, non existindo diferenzas entre recultivos nos clons adultos, e sendo estas pouco marcadas no clon xuvenil. Respecto ós calos tipo 2 e 3, os valores máis elevados correspóndenlles ós tipo 2 (salvo no primeiro recultivo do clon QRF73), os cales tenden a aumentar nos sucesivos recultivos, a costa de diminuír os calos tipo 3.

Pódese considerar normal que a porcentaxe de calos tipo 3 diminúa despois do primeiro recultivo, xa que se o número de brotes maiores de 1 cm se reduce con cada recultivo, é lóxico pensar que o número de brotes menores de 1 cm tamén o faga, e con eles o número de calos tipo 3. Esta redución expresaría a perda da capacidade de multiplicación dos calos ó avanzar o número de recultivos.

### 2.1.5 - Porcentaxe de calos que se deixan de recultivar

Cando un calo non produce explantos nodais ou apicais ó final dun ciclo de multiplicación, este non volve a recultivarse, considerándose que perde a capacidade de produción de novos explantos. Na Táboa 18 móstranse os resultados deste parámetro para os diferentes tipos de calo, nos sucesivos recultivos, nos tres clons estudados.

**Táboa 18.** Porcentaxe de calos que se deixan de recultivar, en función do calo do que proceden (TIPO 1, TIPO 2 e TIPO 3), en cada recultivo (Nº REC), para os clons de carballo TROBO, MUÍÑOS e QRF73. Letras diferentes (maiúsculas en cada fila e minúsculas en cada columna, dentro de cada clon) indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,01$ ).

CLON	Nº REC	TIPO 1	TIPO 2	TIPO 3
TROBO	1	23,07 ± 15,38A-a	2,05 ± 3,55B-a	0,00 ± 0,00B-a
	2	33,33 ± 0,00A-a	3,15 ± 2,76B-a	0,00 ± 0,00B-a
	3	47,61 ± 8,25A-b	3,26 ± 5,64B-a	0,00 ± 0,00B-a
	4	35,71	1,93 ± 0,35a	0,00
MUÍÑOS	1	44,73 ± 7,77A-a	2,65 ± 2,64B-a	0,00 ± 0,00B-a
	2	24,60 ± 11,02A-b	1,71 ± 2,96B-a	0,00 ± 0,00B-a
	3	36,57 ± 13,91A-a	2,78 ± 4,81B-a	0,00 ± 0,00B-a
	4	75,00	7,32 ± 7,15a	0,00
QRF73	1	42,13 ± 11,81A	1,85 ± 3,21B-a	0,00 ± 0,00B-a
	2	56,25	1,19 ± 2,06A-a	1,85 ± 3,21A-a
	3	100	7,9 ± 0,37A-a	0,00 ± 0,00A-a
	4	85,71	2,08 ± 3,61a	0,00
	5	--	3,03 ± 5,25a	0,00
	6	0,00	0,00	0,00

A porcentaxe de calos que se deixan de recultivar no caso dos calos tipo 1 é sempre significativamente maior que no caso dos tipo 2 e 3. Entre os calos tipo 2 e 3 non se encontran diferenzas significativas.

A porcentaxe de calos tipo 2 e 3 que non se reaproveitan é sempre moi baixa, non variando nos sucesivos recultivos. Estes valores son de esperar, xa que os calos tipo 2 e 3 se recultivan con xemas ou brotes menores de 1 cm, polo que sempre portan puntos meristemáticos que se poden desenvolver.

## 2.2 - Recultivo do calo en *Castanea sativa* Mill.

### 2.2.1 - Taxa de multiplicación

Na Figura 40 pódense observar os valores da taxa de multiplicación dos calos, para os clons EPS (copa e base) e SISTO, nos sucesivos recultivos, comparados co valor medio da taxa de multiplicación dos nós e ápices.

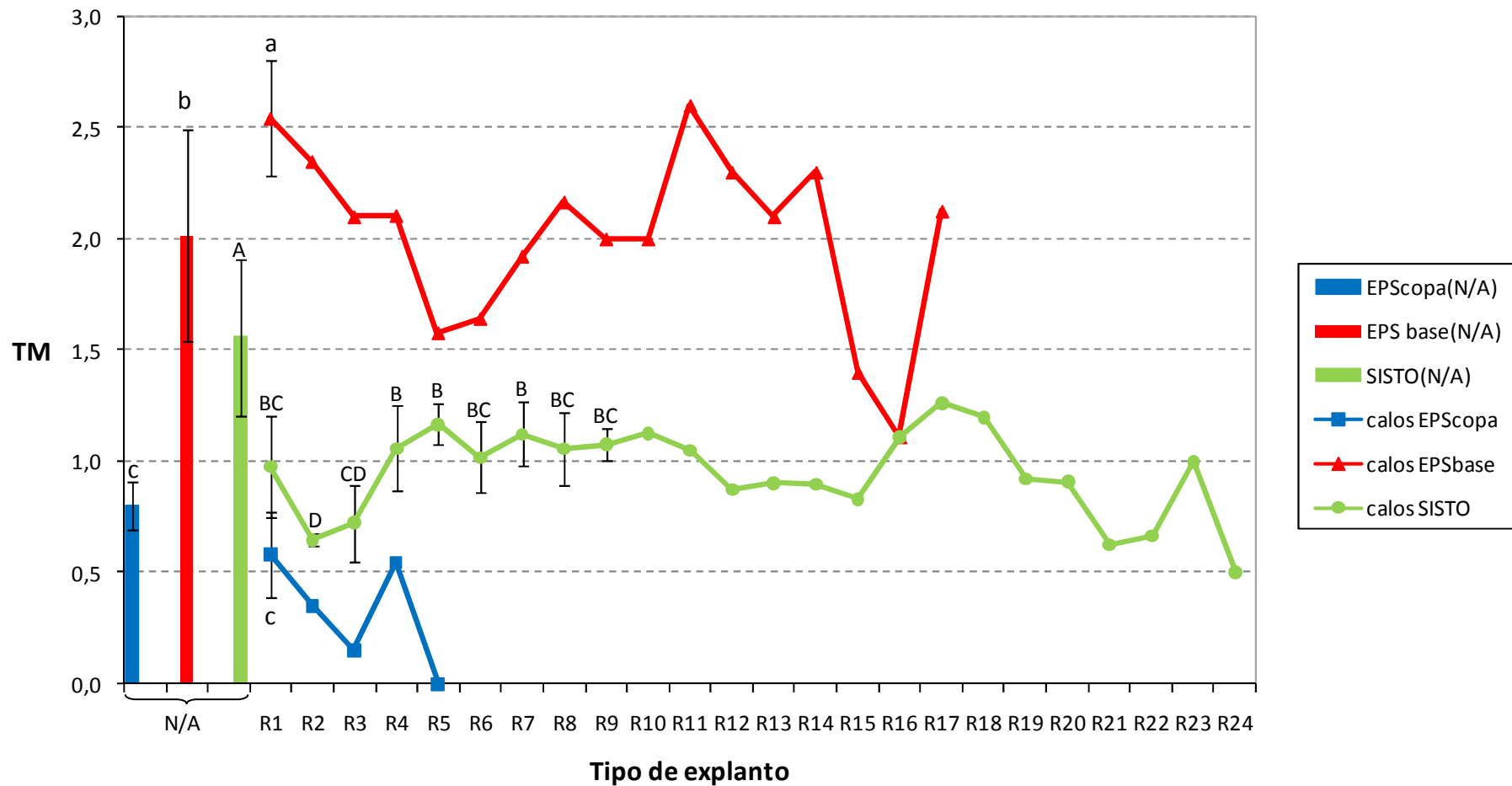
Os datos revelan diferentes comportamentos en función do material ensaiado. No material EPS<sub>copa</sub>, en tódolos recultivos a taxa de multiplicación dos calos é menor que a taxa de multiplicación media de nós e ápices, a excepción do primeiro recultivo, no que as diferenzas non son significativas. Os valores máximos nos diferentes recultivos encóntranse en torno a 0,5. Todos os calos tórnanse improdutivos no quinto recultivo.

Pola contra, no caso do material EPS<sub>base</sub>, os resultados son totalmente diferentes. As taxas de multiplicación nos sucesivos recultivos de calos mantéñense en valores próximos ós valores de multiplicación dos nós e ápices durante moitos recultivos, sendo significativamente superiores no primeiro recultivo. Os calos producen novos explantos nos 17 recultivos analizados. Unha contaminación microbiana dos cultivos no recultivo 18 impediu recultivos posteriores (nese momento quedaban 7 calos dos 24 iniciais).

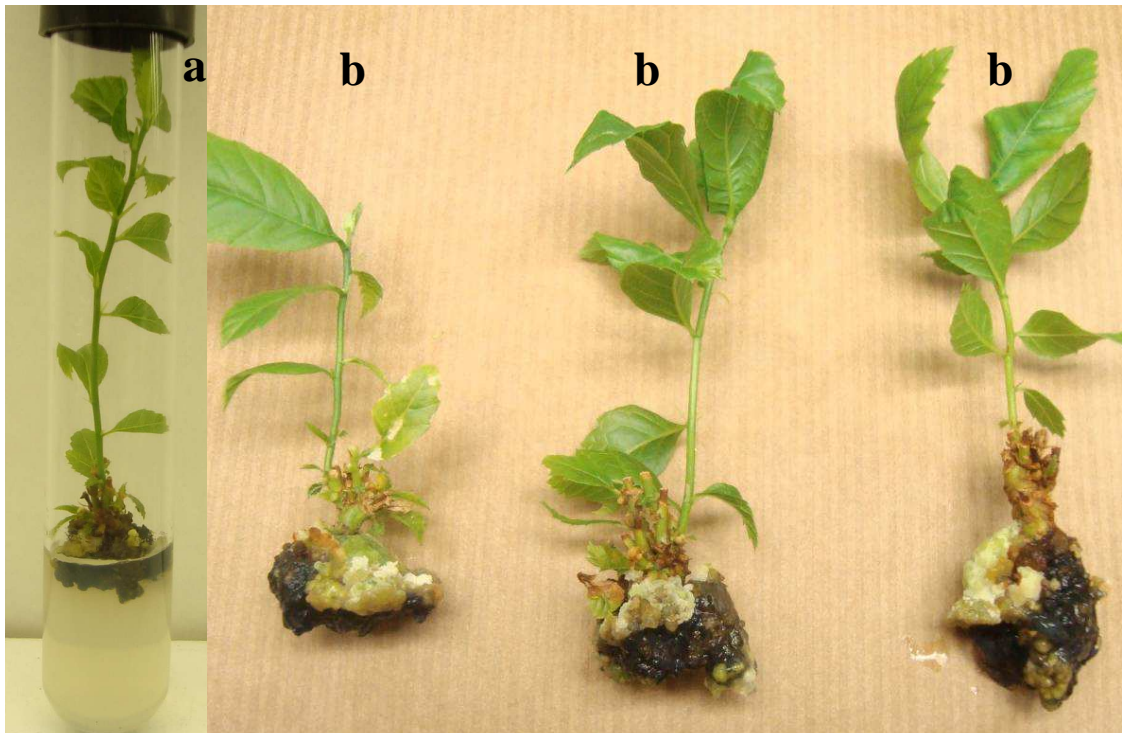
Esta diferenza tan notable co material EPS<sub>copa</sub> pon de manifesto que o estado ontoxenético inflúe decisivamente na capacidade produtiva dos explantos con calo, dun xeito semellante a como o fai na multiplicación dos nós e ápices.

Respecto do clon SISTO, a taxa de multiplicación dos nós e ápices é, igual que no clon EPS<sub>copa</sub>, significativamente superior á taxa de multiplicación dos calos. No entanto, salvo no segundo e terceiro recultivos, os valores das taxas de produción encóntranse, case de forma constante, por encima de 1. O número de recultivos no que os calos son produtivos tamén é moito maior que no material de EPS<sub>copa</sub>, chegándose ata o recultivo número 24, en que, a causa da contaminación do material se detivo o ensaio.

Nos clons de castiñeiro, unha diferenza moi importante a ter en conta respecto ós de carballo é que a calidade dos microbrotes non descende a medida que avanza os recultivos de calo (Figura 41).



**Figura 40.** Taxa de multiplicación (TM) dos calos, para os diferentes tipos de material de castiñeiro (EPScopa, EPSbase e SISTO), ó longo dos sucesivos recultivos (Rn). Representase a media da taxa de multiplicación (TM) dos nós e ápices (N/A) durante o período de recultivo de calos. As barras verticais representan a desviación típica das medias calculadas en sucesivas repeticións. Letras diferentes, minúsculas no clon EPS e maiúsculas no clon SISTO, indican diferenzas significativas segundo o teste LSD (P<0,05).



**Figura 41.** Microbrotes do recultivo (a) n° 15 no clon SISTO e (b) n° 12 no clon EPS<sub>base</sub>.

### 2.2.2 - Porcentaxe de calos que se deixan de recultivar

Na Táboa 19 inclúense os resultados da porcentaxe de calos que se desbotan, en cada recultivo, para cada un dos clons de castiñeiro estudados.

Neste aspecto, tamén se observa como o estado ontoxenético inflúe decisivamente, xa que a diferenza entre o material procedente da copa e da base do clon EPS é patente. Partindo de 24 calos en cada caso, os que proceden da copa soamente producen brotes ata o 4° recultivo, non producindo nada no 5° recultivo, polo que son desbotados. No caso do material procedente da base, a porcentaxe de calos que se tiran é sempre menor, chegando a producir brotes ata o 17° recultivo.

No caso do clon SISTO, a porcentaxe de calos que se desbotan oscila entre o 0 % e o 36 % ó longo dos diferentes recultivos. Esta porcentaxe é significativamente máis elevada nos primeiros recultivos, e a partir do 4° recultivo diminúe notablemente. Chegáronse a recultivar calos 24 veces consecutivas.

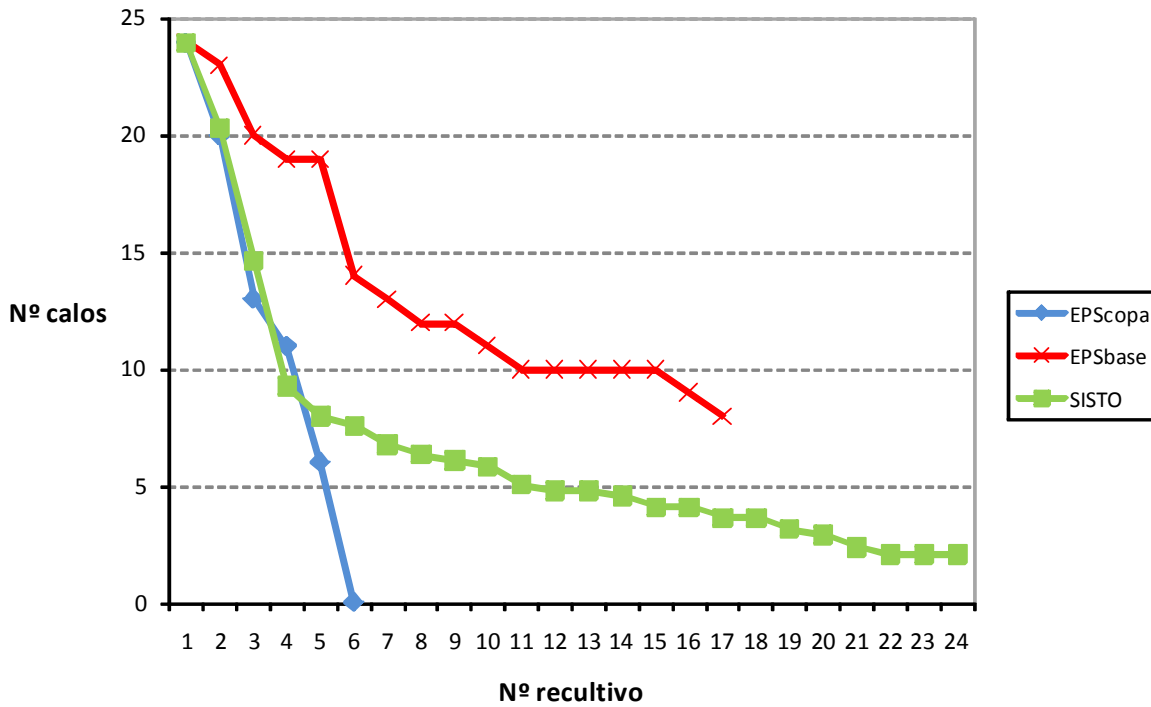
**Táboa 19.** Porcentaxe de calos que se desbotan (fronte ó nº de recultivo - Nº REC) nos clons de castiñeiro EPS (copa e base) e SISTO. Letras diferentes na mesma columna indican diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

Nº REC	EPS copa	EPS base	SISTO
1	16,67 ± 14,43	4,17 ± 7,21	15,22 ± 12,25 ab
2	35,00	4,35	27,98 ± 8,94 bc
3	15,38	5,00	36,40 ± 7,88 c
4	45,45	0,00	13,92 ± 10,90 ab
5	100*	26,32	5,00 ± 10,00 a
6		7,14	10,66 ± 13,24 a
7		7,69	6,25 ± 12,50 a
8		0,00	4,17 ± 7,22 a
9		8,33	4,17 ± 7,22 a
10		9,09	13,04
11		0,00	5,26
12		0,00	0,00
13		0,00	4,76
14		0,00	10,00
15		10,00	0,00
16		11,11	11,11
17		12,50*	0
18			13,33
19			7,69
20			18,18
21			12,50
22			0
23			0
24			50*

\* Remate do ensaio

Na Figura 42 pódese apreciar o grao de diminución do número de calos no material  $EPS_{\text{copa}}$  e  $EPS_{\text{base}}$ , tendo en conta que se parte inicialmente de 24 calos por cada tipo de material, e como o faría (extrapolación teórica) no clon SISTO se se comezase a recultivar co mesmo número de calos.

Obsérvase como no material de características adultas se produce un importante descenso inicial do número de calos produtivos, mentres que no de características xuvenís ( $EPS_{base}$ ) o descenso é máis suave. Pola contra, mentres que en  $EPS_{copa}$  o material se perde rapidamente, no clon SISTO permanece moitos máis recultivos, poñendo de manifesto unha vez máis as diferenzas interclonais na micropropagación en xeral (San José *et al.*, 1988; Juncker e Favre, 1989), e no recultivo de calos en particular.



**Figura 42.** Número de calos que se recultivan para os diferentes tipos de material de castiñeiro ( $EPS_{copa}$ ,  $EPS_{base}$  e SISTO), ó longo de sucesivos recultivos, partindo de 24 calos iniciais.

### 2.3 - Natureza (axilar ou adventicia) dos brotes que emerxen a través do calo

Cando se recultivan calos tipo 1 (sen semas axilares visibles), e producen microbrotes, estes parecen ter a súa orixe, en moitas ocasións, no propio tecido do calo (Figura 43). Nestes casos, xorde a dúbida de se estes brotes proceden de xemas axilares preexistentes, que emerxen dende a fracción de caule do interior do calo, ou de meristemas neoformados a partir do tecido do calo. Neste último caso, aumentaría o risco de perda da fidelidade clonal por mutación somaclonal.

Unha vez realizado o ensaio proposto na Figura 16 (Material e métodos), nos calos que procedían de fragmentos de caule sen xemas axilares visibles, non apareceron microbrotes en ningún caso. Pola contra, cando a parte do caule que queda no interior do calo levaba xemas axilares, unha certa porcentaxe destes calos tipo 1 produciron microbrotes, un 55 % no clon de castiñeiro EPS<sub>base</sub> (Figura 44) e un 38 % no clon de carballo QRFa.

Estes resultados inducen a pensar, loxicamente, que os microbrotes que emerxen a través dos calos, proceden de xemas preexistentes sobre o caule, que quedaron ocultas polo desenvolvemento do calo, e non son produto dun fenómeno organoxenético, polo que o risco de variación somaclonal practicamente desaparece.



**Figura 43.** Brote que xorde do calo no clon QRFa.



**Figura 44.** (a) Grupo de calos procedentes de fragmentos de caule sen xemas axilares ou (b) con xemas axilares, no clon  $EPS_{base}$ , ó final dun ciclo de multiplicación.

## 2.4 - Cálculo de produción estimada

### 2.4.1 - Taxa de multiplicación utilizando o recultivo do calo basal

Para calcular as taxas de multiplicación cando se utiliza o recultivo do calo basal cómpre utilizar a seguinte expresión:

$$TM = \frac{a_n + b_n}{a_{n-1} + b_{n-1}}$$

Sendo,  $a_n$ : número de nós e ápices no subcultivo n

$b_n$ : número de calos no subcultivo n

Por outra banda, se se desexa planificar a produción de nós e ápices para enraizar ó final dun determinado subcultivo, cómpre excluír os calos da ecuación, pois non se poden enraizar directamente. Definimos entón unha taxa de multiplicación  $TM'$ , que será diferente á taxa de multiplicación se só se subcultivaran nós e ápices. Dita  $TM'$  defínese como o cociente entre os nós e ápices que se producen nun subcultivo dado (procedentes tanto de nós e ápices como de calos) entre os nós e ápices obtidos no subcultivo precedente.

$$\text{Deste xeito, } TM' = \frac{a_n}{a_{n-1}}$$

Sendo,  $a_n$ : número de nós e ápices no subcultivo n

Aínda así, compróbase experimentalmente que os valores da taxa de multiplicación tenden a acadar o mesmo valor incluíndo ou non os calos no cociente.

O número de nós e ápices que se obteñen nun subcultivo 'n' son:

- Subcultivo convencional:  $a_n = a_{n-1} \times TM$

- Con recultivo do calo:  $a_n = a_{n-1} \times TM_a + b_{n-1} \times TM_b$

Sendo,  $TM_a$ : taxa de multiplicación de nós e ápices

$TM_b$ : taxa de multiplicación dos calos

$b_{n-1}$ : número de calos nun determinado subcultivo, incluíndo calos recultivados varias veces, tendo cada recultivo a súa correspondente taxa de multiplicación. Este último termo incluiría:

$b_{1n-1} = a_{n-2} \times C_1$ , calos de primeiro recultivo no subcultivo n-1

$b_{2n-1} = a_{n-3} \times C_1 \times C_2$ , calos de segundo recultivo no subcultivo n-1

$b_{3n-1} = a_{n-4} \times C_1 \times C_2 \times C_3$ , calos de terceiro recultivo no subcultivo n-1

⋮

$b_{in-1} = a_{n-i+1} \times C_1 \times C_2 \times C_3 \dots \times C_i$ , calos recultivados i veces no subcultivo n-1

$C_i$ : porcentaxe de calos que non se desbotan no recultivo i

O valor de  $TM'$  dependerá, lóxicamente, do número de veces que se recultive un calo. A continuación móstrase o cálculo teórico de  $TM'$  recultivando os calos dende 1 ata 'n' veces.

Recultivando os calos 1 vez

Como xa se apuntou anteriormente:

$$a_n = a_{n-1} \times TM_a + b_{n-1} \times TM_b = a_{n-1} \times TM_a + a_{n-2} \times C_1 \times TM_b$$

Se,  $TM' = \frac{a_n}{a_{n-1}}$

Entón,  $TM' = \frac{a_n}{a_{n-1}} = \frac{a_{n-1} \times TM_a + a_{n-2} \times C_1 \times TM_b}{a_{n-1}} = TM_a + \frac{a_{n-2}}{a_{n-1}} \times C_1 \times TM_b$

Se chamamos  $\alpha_n = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{a_n}{a_{n-1}}$

Ese valor  $\alpha_n$  permitiranos coñecer o valor de  $TM'$  unha vez que se establezca a proporción de cada tipo de explanto no sistema.

Consideramos entón  $\alpha_{n-1} = \lim_{n \rightarrow \infty} \frac{a_{n-1}}{a_{n-2}}$

A fórmula anterior pódese escribir:  $TM' = \alpha_n = TM_a + C_1 \times TM_b \times \frac{1}{\alpha_{n-1}}$

Os valores de  $\alpha_n$  e  $\alpha_{n-1}$  pódense considerar iguais, xa que 'n' tende a infinito:

$$\alpha_n = TM_a + C_1 \times TM_b \times \frac{1}{\alpha_n} \Rightarrow \alpha_n - TM_a = C_1 \times TM_b \times \frac{1}{\alpha_n} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \alpha_n^2 - \alpha_n \times TM_a - C_1 \times TM_b = 0$$

Queda, polo tanto, unha ecuación de segundo grao, cuxa resolución é a seguinte:

$$\alpha_n = \frac{TM_a \pm \sqrt{TM_a^2 + 4 \times C_1 \times TM_b}}{2}$$

Compróbase experimentalmente que o signo da ecuación é positivo, xa que co signo negativo os valores da taxa de multiplicación son menores que 0, o cal non ten sentido. Tal como se definiu  $TM'$ , pódese deducir a partir desa fórmula que o seu valor aumentará recultivando calquera tipo de calo con calquera valor de TP e C.

Recultivando os calos 2 veces

Neste caso:

$$a_n = a_{n-1} \times TM + a_{n-2} \times C_1 \times TP_1 + a_{n-3} \times C_1 \times C_2 \times TP_2$$

Se,  $TM' = \frac{a_n}{a_{n-1}}$

Entón,  $TM' = \frac{a_n}{a_{n-1}} = \frac{a_{n-1} \times TM + a_{n-2} \times C_1 \times TP_1 + a_{n-3} \times C_1 \times C_2 \times TP_2}{a_{n-1}} =$

$$= TM + \frac{a_{n-2}}{a_{n-1}} \times C_1 \times TP_1 + \frac{a_{n-3}}{a_{n-1}} \times C_1 \times C_2 \times TP_2$$

Considerando de novo os valores  $\alpha_n$  e  $\alpha_{n-1}$ , cando  $n$  tende a infinito  $a_{n-1} = a_{n-3} \times \alpha_n^2$

Entón,

$$\alpha_n = TM + \frac{1}{\alpha_n} \times C_1 \times TP_1 + \frac{1}{\alpha_n^2} \times C_1 \times C_2 \times TP_2$$

Desenvolvendo a ecuación anterior, obtemos unha nova ecuación de terceiro grao:

$$\alpha_n^3 - \alpha_n^2 \times TM - \alpha_n \times C_1 \times TP_1 - C_1 \times C_2 \times TP_2 = 0$$

Dita ecuación soamente ten unha solución real e positiva, a cal será a solución para o valor de  $TM'$ .

Seguindo o razoamento anterior:

Recultivando os calos 3 veces:

$$\alpha_n^4 - \alpha_n^3 \times TM - \alpha_n^2 \times C_1 \times TP_1 - \alpha_n \times C_1 \times C_2 \times TP_2 - C_1 \times C_2 \times C_3 \times TP_3 = 0$$

....

Recultivando os calos “i” veces:

$$\alpha_n^{i+1} - \alpha_n^i TM - \alpha_n^{i-1} C_1 TP_1 - \alpha_n^{i-2} C_1 C_2 TP_2 - \alpha_n^{i-3} C_1 C_2 C_3 TP_3 - \dots$$

$$- \dots - \alpha_n^2 C_1 C_2 \dots C_{i-2} TP_{i-2} - \alpha_n C_1 C_2 \dots C_{i-1} TP_{i-1} - C_1 C_2 \dots C_i TP_i = 0$$

A solución da ecuación que proporciona o valor de  $TM'$  é a única raíz real e positiva.

#### 2.4.2 - Producción anual estimada

Coa axuda das fórmulas anteriores calculouse o efecto do recultivo do calo basal sobre o rendemento da micropropagación. Na análise considérase, a efectos de simplificar os cálculos, que se parte dun microbrote inicial, comparándose a produción mediante subcultivo convencional (utilizando soamente nós e ápices) coa produción utilizando o recultivo do calo (Táboa 20). Distínguese a posibilidade de recultivar os calos unha ou varias veces. Se desexásemos coñecer a produción anual, e a principios de ano tivésemos un número “A” de brotes, debería calcularse o produto dos valores da Táboa 20 polo valor “A”.

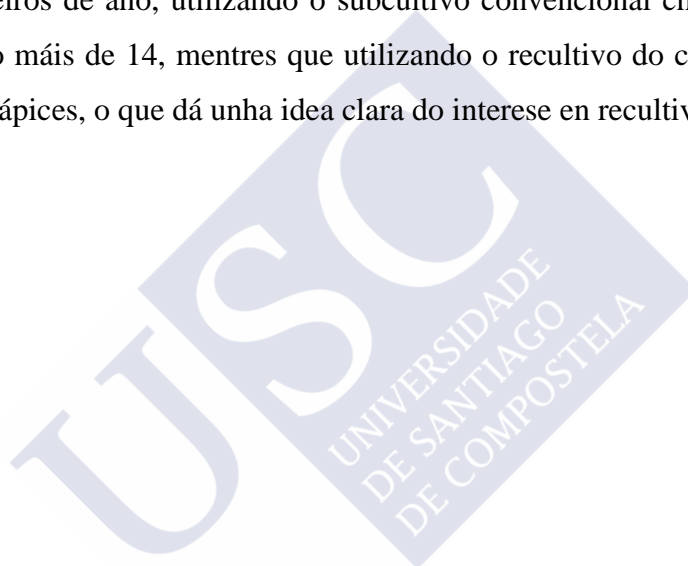
Como se observa, nos clons TROBO e MUÍÑOS prodúcese, cando se utiliza o recultivo do calo basal, e ata o cuarto recultivo, un aumento de produción anual respecto da técnica convencional, de 144 e 388 veces respectivamente. A taxa de multiplicación aumenta un punto ou máis en ambos clons. Como se pode observar, a taxa de multiplicación  $TM'$  tende a estabilizarse a medida que aumenta o número de veces que recultivamos os calos, debido a que a proporción de calos a partir dun certo número de recultivos, con respecto ó total de explantos, é tan pequena que ten unha influencia mínima sobre as taxas de multiplicación do conxunto.

No clon xuvenil QRF73 a produción aumenta, respecto do subcultivo convencional, ata 70 veces ou máis a partir do 3º recultivo. A taxa de multiplicación pasa de 2,62 a 3,84.

No clon SISTO, de castiñeiro, sucede algo parecido ós clons de carballo, o valor de  $TM'$  é practicamente o mesmo con 5 que con 10 recultivos, e pásase de obter 34 microbrotes a finais de ano a cerca de 3500 empregando o calo basal.

No material da base do clon EPS, a taxa de multiplicación co recultivo do calo estabilízase co 5º recultivo, incrementando a produción máis de 100 veces.

No material de  $EPS_{copa}$  é no que máis incidencia ten o uso do recultivo do calo de todos os clons ensaiados, xa que mentres que a taxa de multiplicación do subcultivo convencional é próxima a 1, co que practicamente non habería multiplicación efectiva, utilizando o recultivo do calo obtense un valor próximo a 1,58. Se se partise de 10 nós e ápices a primeiros de ano, utilizando o subcultivo convencional chegaríase a finais de ano con pouco máis de 14, mentres que utilizando o recultivo do calo obteríanse cerca de 1566 nós e ápices, o que dá unha idea clara do interese en recultivar os calos.



## Resultados

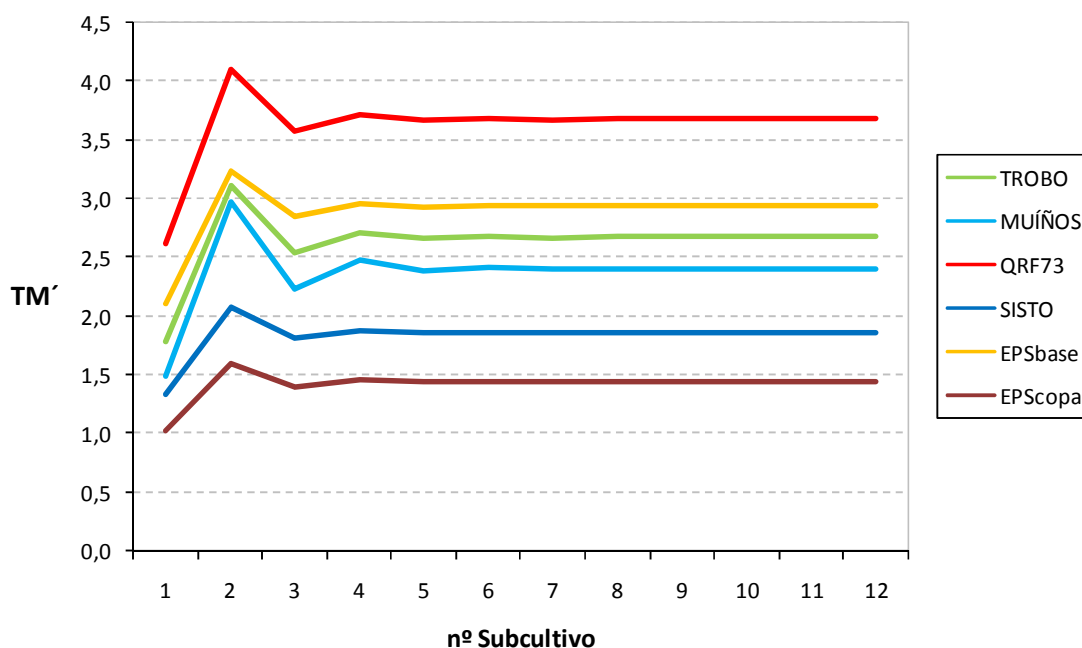
**Táboa 20.** Produción de nós e ápices ó final dun ano de multiplicación, nos clons TROBO, MUÍÑOS, QRF73, SISTO, EPS<sub>base</sub> e EPS<sub>copa</sub>, partindo dun único explanto, comparando o subcultivo sen recultivo e con recultivo do calo basal, recultivando os calos unha (rec1) ou máis veces (rec2-rec10). TM': taxa de multiplicación utilizando o recultivo do calo; Δ: número de veces que se incrementa a produción, recultivando os calos, respecto ó subcultivo de nós e ápices. Representábase o número de nós e ápices ó final dun ano de produción.

Especie	Clon	Variable	Subcultivo convencional	Con recultivo do calo basal						
				rec1	rec2	rec3	rec4	rec5	rec6	rec10
<i>Quercus robur</i>	TROBO	Nós e ápices	1082	100483	141473	153198	156163			
		TM'	1,79	2,67	2,76	2,78	2,79			
		Δ	-	92,87	130,75	141,58	144,33			
	MUÍÑOS	Nós e ápices	120	27367	40956	45294	46488			
		TM'	1,49	2,41	2,5	2,53	2,53			
		Δ	-	228,55	342,04	378,27	388,24			
	QRF73	Nós e ápices	104620	4690836	6888320	7354067	7444549	7459128	7461214	
		TM'	2,62	3,67	3,81	3,84	3,84	3,84	3,84	
		Δ	-	44,84	65,84	70,29	71,16	71,30	71,32	
<i>Castanea sativa</i>	SISTO	Nós e ápices	34	1387	2554	3100	3339	3439	3475	3498
		TM'	1,34	1,87	1,98	2,02	2,03	2,04	2,04	2,05
		Δ	-	41,38	76,21	92,52	99,65	102,64	103,7	104,39
	EPS <sub>base</sub>	Nós e ápices	6189	316527	596429	682568	706692	711776	712848	713271
		TM'	2,07	2,94	3,12	3,16	3,17	3,18	3,18	3,18
		Δ	-	51,14	96,36	110,28	114,18	115,00	115,17	115,24
	EPS <sub>copa</sub>	Nós e ápices	1,43	60	120,6	133,4	156,6			
		TM'	1,03	1,44	1,53	1,55	1,58			
		Δ	-	41,96	84,34	93,29	109,51			

Utilizando o recultivo do calo basal, a taxa de multiplicación ( $TM'$ ) tarda en estabilizarse varios subcultivos. Isto débese a que se introducen progresivamente novos calos, con distintas capacidades produtivas segundo o número de veces que foron recultivados, mentres que no cultivo de nós e ápices a proporción relativa de ambos tipos de explanto se estabiliza rapidamente, e ademais presentan taxas de multiplicación máis homoxéneas ó longo dos subcultivos.

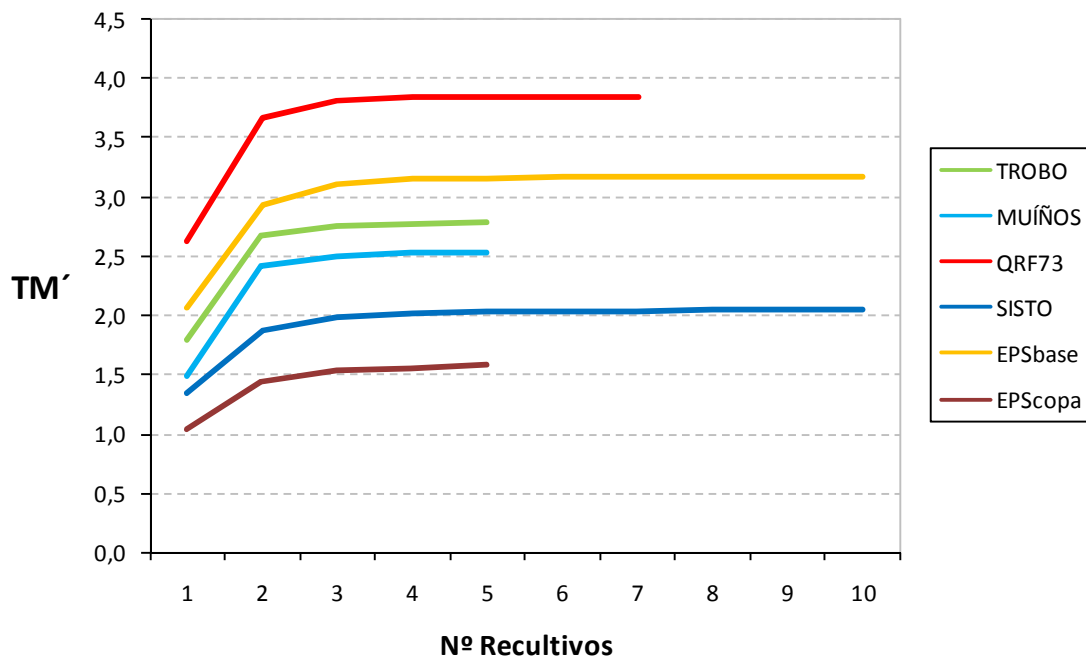
Supoñendo que os calos fosen recultivados unha soa vez, a  $TM'$  dos clons estudados evolucionaría segundo se representa na Figura 45.

Os valores de  $TM'$  no primeiro subcultivo coinciden coa taxa de multiplicación dos nós e ápices, xa que previamente non existen calos basais. Os valores de  $TM'$  tenden a estabilizarse arredor do 5º subcultivo, cando se estabiliza a proporción relativa de cada tipo de explanto no sistema.



**Figura 45.** Taxa de multiplicación ó longo de 12 subcultivos incluíndo o recultivo do calo basal ( $TM'$ ), para os diferentes clons estudados, considerando que os calos basais se recultivan unha soa vez.

Como se observa na Táboa 18, canto máis se recultivan os calos, maior é o valor de  $TM'$ , tendendo este a aproximarse a un valor estable. A evolución do valor de  $TM'$  recultivando os calos ata dez veces móstrase na Figura 46. Na maioría dos clons, cando os calos se recultivan 4-5 veces acádase un valor moi próximo ó de estabilización, xa que é arredor dese número de recultivo cando se acada unha proporción fixa de cada tipo de explanto (nós e ápices, e calos basais). Entón, de xeito intuitivo, en termos de máxima produción non merecería a pena recultivar os calos máis de 4-5 veces, pois o valor de  $TM'$  non aumenta de forma significativa.



**Figura 46.** Valor de estabilización da taxa de multiplicación incluíndo o recultivo do calo basal ( $TM'$ ), para os diferentes clons estudados, recultivando os calos dende unha ata dez veces.

### 2.4.3 - Estudio de rendibilidade

Se nun sistema de micropropagación pretendemos obter a máxima produción ó menor custo posible, cómpre determinar qué tipo de explantos se deben utilizar, pois a rendibilidade pode variar en función dos valores de multiplicación que aporte cada un. Como o calo basal non deixa de ser un explanto máis, a continuación faise unha pequena análise da súa influencia nos custos e produción, ben sexa recultivando diferentes tipos de calo ou recultivando varias veces un mesmo calo.

Xa que os diferentes tipos de calo soamente se distinguiron nos clons de carballo, analizarase nestes qué tipos de calo é máis rendible recultivar. Debido a que nos clons adultos só o primeiro recultivo achega elevadas taxas de multiplicación, con brotes de calidade, a análise farase para o primeiro recultivo. Nos clons de castiñeiro analizarase cantas veces se deben recultivar os calos.

De forma estándar farase un estudio de produción dun ano de duración partindo dun só explanto inicial. A produción medirase en explantos enraizables (nós e ápices) a finais de ano.

Se chamamos “y” ó custo de subcultivar e manter un explanto en cultivo, para obter o custo total na produción anual, haberá que sumar tódolos explantos (nós, ápices e calos) que durante o ano estiveron en cultivo e multiplicalo por ese valor “y”.

Para saber o prezo ó que nos sae cada explanto enraizable, haberá que dividir a suma anterior entre o número de nós e ápices obtidos a finais de ano.

A relación sería a seguinte:

- Subcultivo convencional: 
$$\frac{\sum_1^{12} a_i \times y}{a_{13}}$$

- Con recultivo do calo basal: 
$$\frac{[\sum_1^{12} a_i + \sum_1^{12} b_i] \times y}{a_{13}}$$
 , sendo:

$a_i$ : número de nós e ápices ó inicio do subcultivo i

$b_i$ : número de calos ó inicio do subcultivo i

$a_{13}$ : número de nós e ápices (explantos enraizables) ó final do subcultivo número 12.

Os cálculos coas expresións anteriores, para cada un dos clons de carballo (TROBO, MUÍÑOS e QRF73), pódense observar na Táboa 21.

Compróbase que a mellor opción para acadar a maior produción a un menor custo unitario conséguese recultivando soamente os calos tipo 2 e 3. Isto sucede nos tres clons estudados.

**Táboa 21.** Custo unitario de cada explanto a finais de ano recultivando distintas combinacións de calos tipo 1, 2 e 3, para os clons TROBO, MUÍÑOS e QRF73.

TIPO DE CALO	CUSTO UNITARIO		
	TROBO	MUÍÑOS	QRF73
Sen recultivo do calo	1,265× y	2,024× y	0,617× y
Tipo 1	1,236× y	1,914× y	0,623× y
Tipo 2	0,952× y	1,122× y	0,547× y
Tipo 3	0,917× y	1,329× y	0,492× y
Tipo 1,3	0,919× y	1,320× y	0,499× y
Tipo 1,2	0,952× y	1,126× y	0,554× y
Tipo 2,3	<b>0,819</b> × y	<b>1,001</b> × y	<b>0,470</b> × y
Tipo 1,2,3	0,823× y	1,005× y	0,476× y

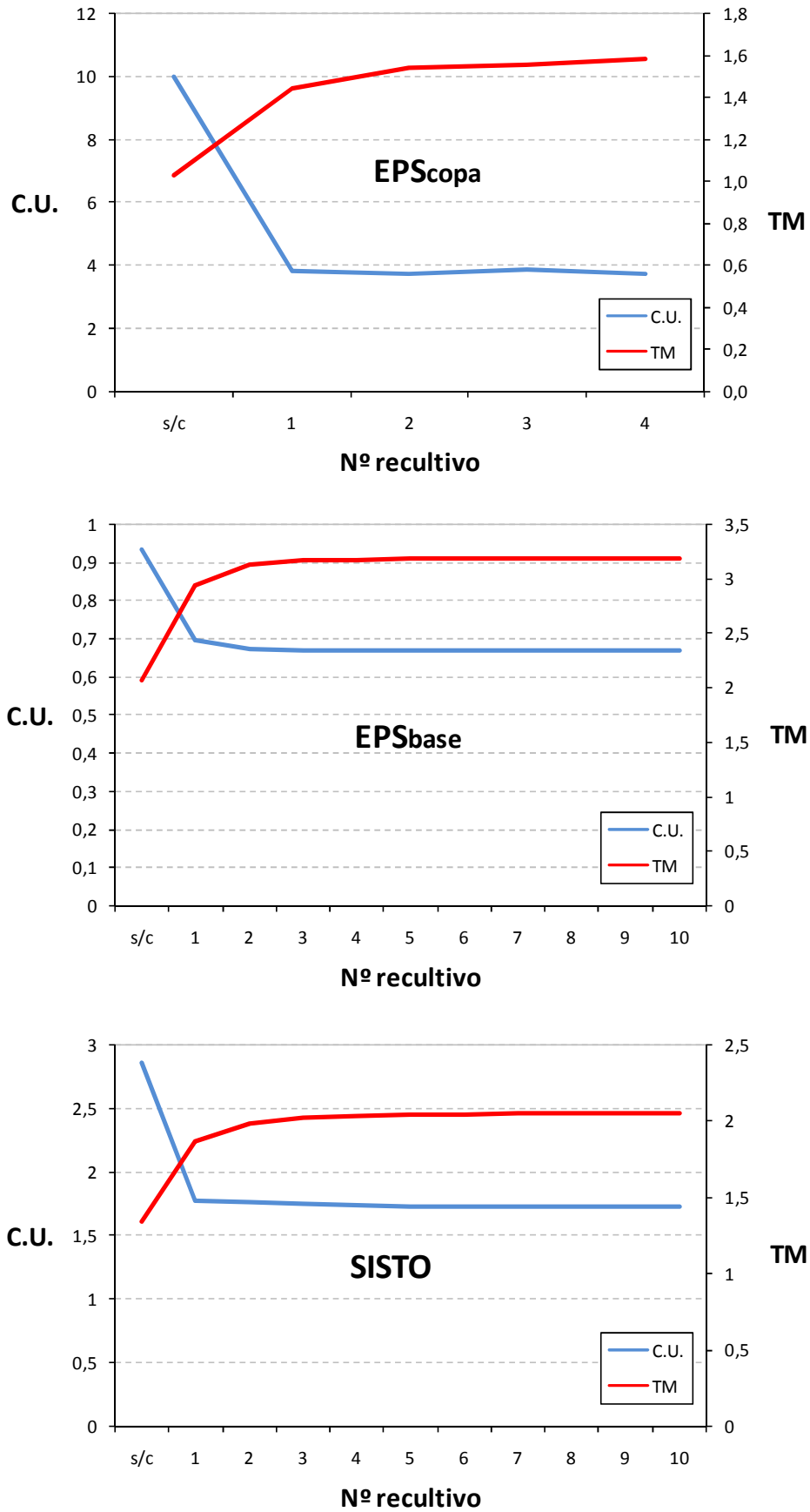
Por outra banda, nos clons de castiñeiro analízase como varía o custo unitario recultivando os calos unha ou varias veces (Táboa 22).

Segundo a análise da Táboa 22 o custo unitario tamén tende a acadar un valor estable a medida que aumenta o número de veces que se recultiva un mesmo calo. No entanto, non sempre é aconsellable recultivalos moitas veces, pois en EPScopa soamente sería recomendable, dende o punto de vista económico, recultivar os calos dúas veces. No resto do material, o custo unitario é practicamente o mesmo nos últimos recultivos (ata o décimo), polo que o máis aconsellable é recultivar todos os calos, pois obteremos a máxima produción.

A evolución do custo unitario, recultivando os calos unha ou varias veces, varía de forma inversamente proporcional á evolución da taxa de multiplicación do sistema, segundo se observa na Figura 47. Compróbase, polo tanto, que o custo unitario de cada explanto producido depende altamente da taxa de multiplicación do sistema, polo que o recultivo do calo basal será unha vía de obter máis produción a menor custo

**Táboa 22.** Custo unitario de cada explanto a finais de ano recultivando os calos dende 1 ata 10 veces, para os clons EPS (copa e base) e SISTO.

Número recultivos	CUSTO UNITARIO		
	EPS <sub>copa</sub>	EPS <sub>base</sub>	SISTO
Sen recultivo do calo	$9,954 \times y$	$0,934 \times y$	$2,853 \times y$
1	$3,834 \times y$	$0,693 \times y$	$1,763 \times y$
2	<b><math>3,729 \times y</math></b>	$0,671 \times y$	$1,763 \times y$
3	$3,859 \times y$	$0,667 \times y$	$1,751 \times y$
4	$3,750 \times y$	$0,666 \times y$	$1,735 \times y$
5		$0,666 \times y$	$1,728 \times y$
6		$0,666 \times y$	$1,726 \times y$
7		$0,666 \times y$	$1,724 \times y$
8		$0,666 \times y$	$1,723 \times y$
9		$0,666 \times y$	$1,723 \times y$
10		<b><math>0,666 \times y</math></b>	<b><math>1,723 \times y</math></b>



**Figura 47.** Taxa de multiplicación (TM) e custo unitario (C.U.), nos clons SISTO e EPS (copa e base), sen recultivar os calos basais (s/c) e recultivando os calos dende unha ata dez veces.

### 3 - Ensaio de microenxerto

#### 3.1 - Desinfección de landras (patróns) e xerminación

Como se apuntou en ‘Material e métodos’, para preparar os patróns necesarios para realizar os microenxertos *in vitro* dos clons TROBO e MUÍÑOS, foi preciso a introdución *in vitro* de landras cos cotiledóns parcialmente seccionados e desprovistas das cubertas externas.

Resumidamente, os tratamentos para o proceso de desinfección foron:

- Desinfección 1: 30 s en 70 % etanol e 15 min en lixivia (0,8 % Cl activo).
- Desinfección 2: 120 s en 70 % etanol e 20 min en lixivia (1 % Cl activo).

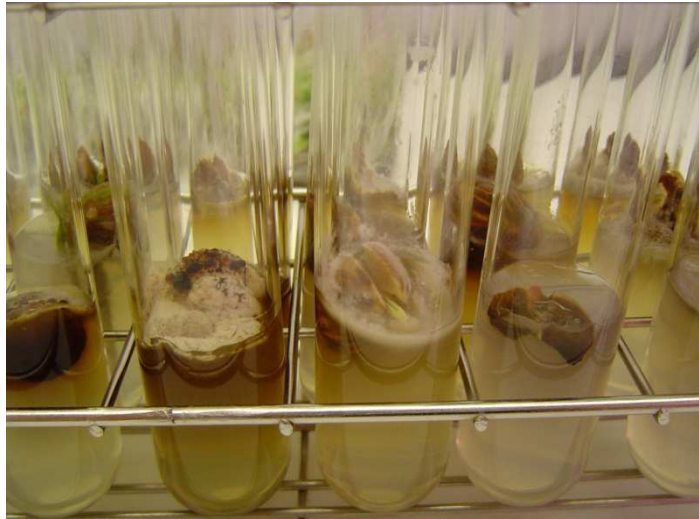
**Táboa 23.** Porcentaxe de contaminación, landras útiles e landras non xerminadas logo do proceso de desinfección mediante dous tratamentos diferentes (ver texto) e posterior introdución *in vitro*. Letras diferentes nas columnas indican diferenzas significativas segundo o test t de Student cunha significación  $P < 0,05$ . Móstrase o valor de P para cada análise.

Parámetro	Desinfección 1	Desinfección 2	P
% Contaminación	36 a	41 a	0,3
% Landras útiles	53 a	37 b	0,002
% Landras non xerminadas	10 a	22 b	0,4

Os resultados pódense observar na Táboa 23, onde se pode comprobar que unhas condicións de desinfección máis estritas (2ª tratamento) non provocaron un descenso da porcentaxe de contaminación. A maior parte da contaminación microbiana foi patente ós poucos días de introducir as sementes *in vitro* (Figura 48). A xerminación das landras tivo lugar entre 7 e 15 días tras a introdución *in vitro*.

Outro dato que resulta interesante é a porcentaxe de landras que non xermina. Este valor foi maior no segundo tratamento. Isto pode ser debido a que as condicións de desinfección, ó ser máis fortes, produzan danos no embrión. Segundo Benson (1999) hai certos tecidos, coma óvulos inmaturos ou embrións, que tenden a ser facilmente danados polos desinfectantes.

O uso de patróns de 3-4 semanas implica un risco de que apareza contaminación tras a realización dos microenxertos (Figura 49), mesmo se estes se fan en condicións de esterilidade, pois nun período tan curto de tempo non se pode asegurar que non haxa esporas presentes nos patróns xerminados, podendo estas permanecer latentes sobre o patrón (Leifert e Cassells, 2001).



**Figura 48.** Contaminación de landras ós 7 días dende a introdución *in vitro*.



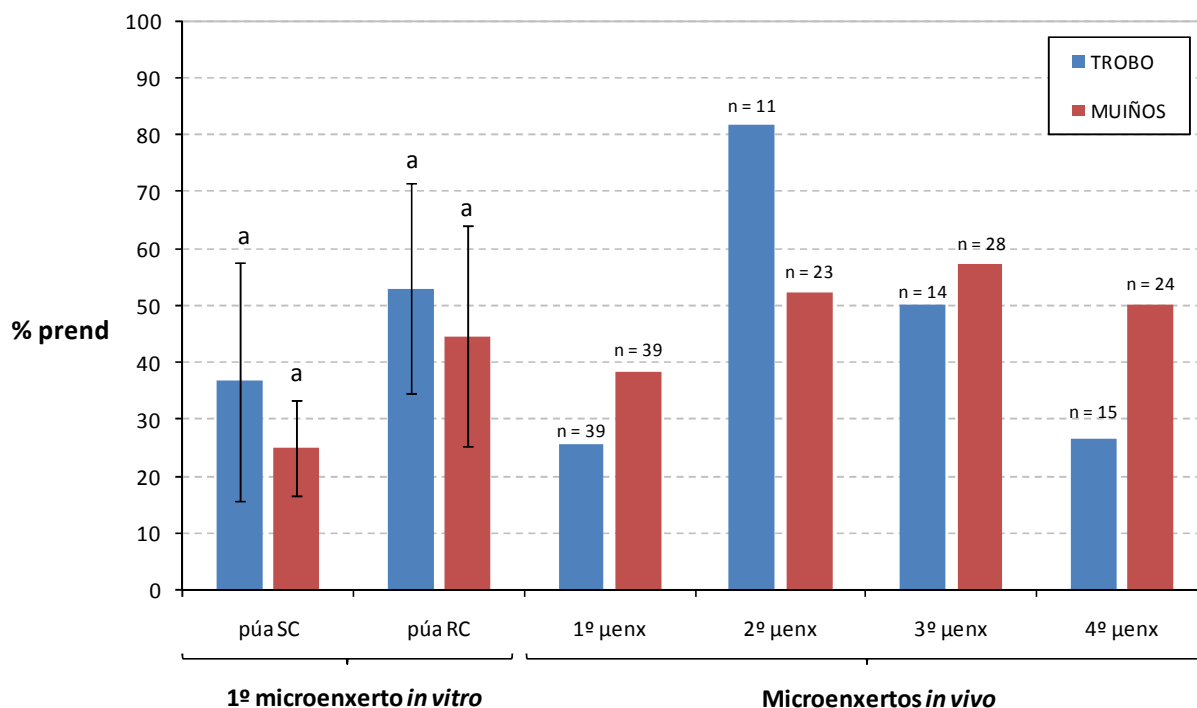
**Figura 49.** Microenxerto *in vitro* no que o patrón está contaminado por fungos.

### 3.2 - Prendemento dos microenxertos

#### 3.2.1 - Clons de *Quercus robur* (TROBO, MUÍÑOS, QRFa e MIÑO)

##### Clons TROBO e MUÍÑOS

Na Figura 50 móstranse os resultados do prendemento dos microenxertos nos clons TROBO e MUÍÑOS.



**Figura 50.** Porcentaxe de prendemento (% prend) dos microenxertos realizados nos clons TROBO e MUÍÑOS. Nos microenxertos *in vitro* diferénciase o clon e o tipo de púa empregada: SC (procedente do subcultivo convencional), RC (procedente de recultivo do calo basal). Dentro dos microenxertos *in vivo* diferéncianse os distintos microenxertos en serie para cada clon, indicando na parte superior das barras o número (n) de microenxertos realizados en cada serie. As barras con liñas de dispersión representan a desviación típica de 3 repeticións. Letras diferentes dentro dun mesmo clon indican diferenzas significativas segundo o test t de Student, cunha significación  $P < 0,05$ .

A porcentaxe de prendemento dos microenxertos varía, en xeral, entre un 25 e un 55 %, non apreciándose grandes diferenzas entre os microenxertos *in vitro* e *in vivo*.

Nos microenxertos *in vitro*, o prendemento non varía significativamente, para ningún dos dous clons, en función do tipo de púa empregada. Aínda así, o prendemento

medio é maior, para ambos clons, utilizando púas procedentes de microbrotes de calos basais recultivados.

Tamén se tomaron datos da porcentaxe de contaminación unha vez realizados os microenxertos *in vitro*. Fixéronse 144 microenxertos dos que 13 se contaminaron (en torno a un 9 %).

Nos microenxertos *in vivo*, a porcentaxe de prendemento non depende, aparentemente, do número de serie do microenxerto. Aínda así, parece aumentar lixeiramente do primeiro ós seguintes microenxertos. No primeiro microenxerto, os brotes utilizados como púas (microbrotes procedentes de cultivo *in vitro*, en concreto, do recultivo do calo basal) foron diferentes ós utilizados nos seguintes microenxertos da serie (brotes procedentes do prendemento dos microenxertos precedentes).

No primeiro microenxerto utilizáronse microbrotes procedentes do recultivo do calo basal, e non do subcultivo convencional de nós e ápices, xa que se comprobou previamente que o microenxerto é máis efectivo empregando ese material e non os microbrotes convencionais, que teñen unha consistencia máis herbácea, que fai máis difícil a inserción da púa no patrón.

O cuarto microenxerto *in vivo* do clon TROBO amosa unha porcentaxe de prendemento moi baixa. Isto pode ser debido, entre outras cousas, a que no momento de realizalo, as xemas da púa que se desenvolveu logo do terceiro microenxerto comezaban a agromar por segunda vez. O estado de crecemento activo da púa fixo que, ante a alta demanda de nutrientes, o período transcorrido ata o prendemento resultara crítico, pois o patrón non estaba en condicións de proporcionarllos. Isto fixo que gran parte das xemas secasen tras a realización do microenxerto.

O prendemento efectivo dos microenxertos detéctase claramente pola presenza de calo de cicatrización a nivel da fendedura (Figura 51) e polo desenvolvemento da púa (Figura 52). Asemade, as púas que non prenden, deseguida se necrosan. Nos microenxertos realizados con brotes apicais, non sempre é a xema apical a que brota, senón que ás veces é unha das xemas axilares da púa (Figura 52).

Aínda que non se fixo ningún ensaio específico para avaliar o tempo de prendemento, pódese dicir de forma xeral que entre 1-3 semanas despois de microenxertar se produce o prendemento, denotado polo agromo das xemas e o

crecemento da púa; e aproximadamente entre 30-45 días dende o momento do enxerto remata a elongación dos entrenós. Este é o momento escollido para proceder a reenxertar ou a introducir *in vitro* o material da púa.



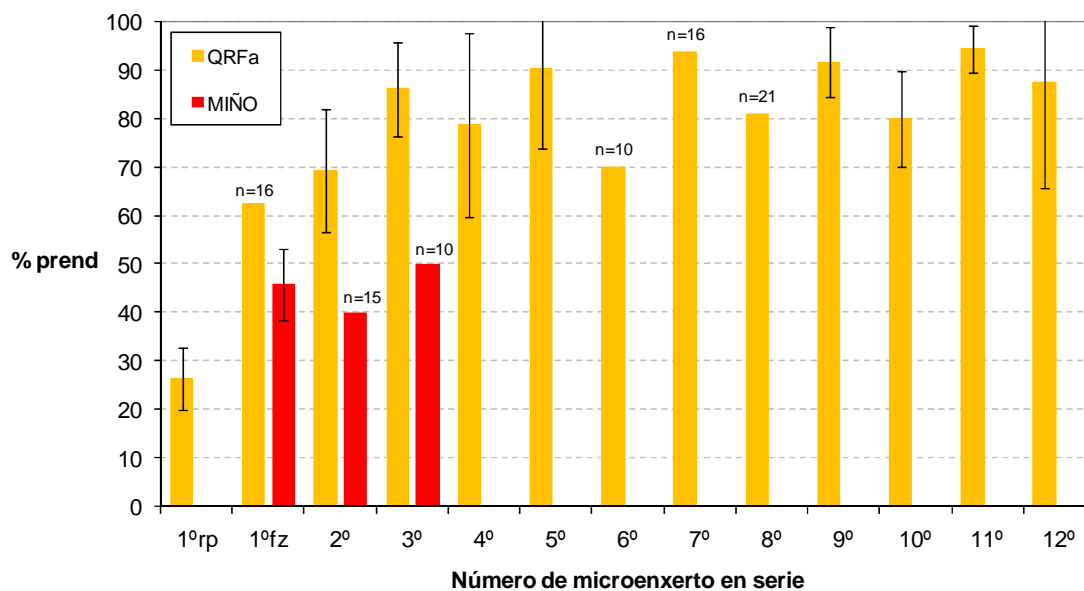
**Figura 51.** Calo de cicatrización a nivel da fendedura realizada no patrón.



**Figura 52.** Desenvolvemento da púa en dous microenxertos *in vitro* que prenderon, no clon TROBO, utilizando landras xerminadas *in vitro* como patrón. No microenxerto da dereita é unha xema axilar a que brota, aínda que a púa proceda dun explanto apical.

## Clons QRFa e MIÑO

Na Figura 53 pódense observar os resultados da porcentaxe de prendemento dos microenxertos *in vivo* realizados nos clons de carballo QRFa e MIÑO.



**Figura 53.** Porcentaxe de prendemento (% prend) dos sucesivos ciclos de microenxerto *in vivo* nos clons QRFa (1°-12°) e MIÑO (1°-3°). No caso do primeiro microenxerto do clon QRFa diferéncianse os realizados con púas procedentes de repouso (1°rp) dos realizados con púas procedentes de forzado (1° fz). Nos casos nos que se realizou unha soa repetición, indícase na parte superior das barras o número (n) de microenxertos realizados.

Os datos de prendemento do clon QRFa permiten comprobar, como era de esperar, que o éxito do primeiro ciclo de microenxertos realizado con púas procedentes de brotes en repouso vexetativo foi menor ca nos enxertos realizados con brotes procedentes de forzado. Agora ben, cómpre indicar que o 26 % de prendemento obtido utilizando como púas brotes en repouso vexetativo é un resultado aceptable se soamente se dispón deste tipo de material.

A porcentaxe media de prendemento, a partir do segundo microenxerto, é sempre elevada (69-94%), o cal se pode considerar un resultado moi positivo, semellante ó obtido noutros estudos (Kothencz *et al.*, 2001). A partir do 1° microenxerto non existen diferenzas de prendemento entre os sucesivos ciclos da serie.

De forma xeral, os ciclos de enxerto realizáronse a intervalos de 40 días (o que corresponde a uns 9 ciclos anuais. Ó final de cada ciclo, a partir do desenvolvemento da púa (Figura 54), foi posible dispoñer de  $4,22 \pm 1,25$  segmentos apicais e nodais, que poden ser usados ben como púas para reenxertar ou ben como explantos para introducir *in vitro*.

No clon MIÑO, a porcentaxe de prendemento é menor que no QRFa, encontrándose en valores comprendidos entre o 40 e o 50 %. Non se observan diferenzas entre o 1º microenxerto, utilizando como púas brotes de forzado, e o segundo e terceiro microenxertos da serie.

Nos microenxertos *in vivo* realizados neste traballo non se aprecian fenómenos de incompatibilidade, producíndose na zona de enxerto unha unión limpa, sen proliferación excesiva de calo (Figura 55).



**Figura 54.** Desenvolvemento da púa unha vez prende un microenxerto *in vivo* do clon QRFa.



**Figura 55.** Sección da zona de enxerto nun microenxerto *in vivo* no clon QRFa, onde se aprecia a unión entre púa e patrón, sen existir excesiva proliferación de calo.

### 3.2.2 - Clons de *Castanea sativa* (EPS, SISTO, LOURA e PAREDE)

#### *Clons EPS e SISTO*

Nas Figuras 56 e 57 móstranse os resultados da porcentaxe de prendemento dos microenxertos realizados nos clons EPS e SISTO.

Segundo se pode observar, o prendemento dos microenxertos feitos *in vitro* foi netamente maior que o dos realizados *in vivo*, pasando de valores superiores ó 80 % no clon EPS e ó 65 % no clon SISTO, a practicamente non superar o 30 % nos microenxertos *in vivo*.

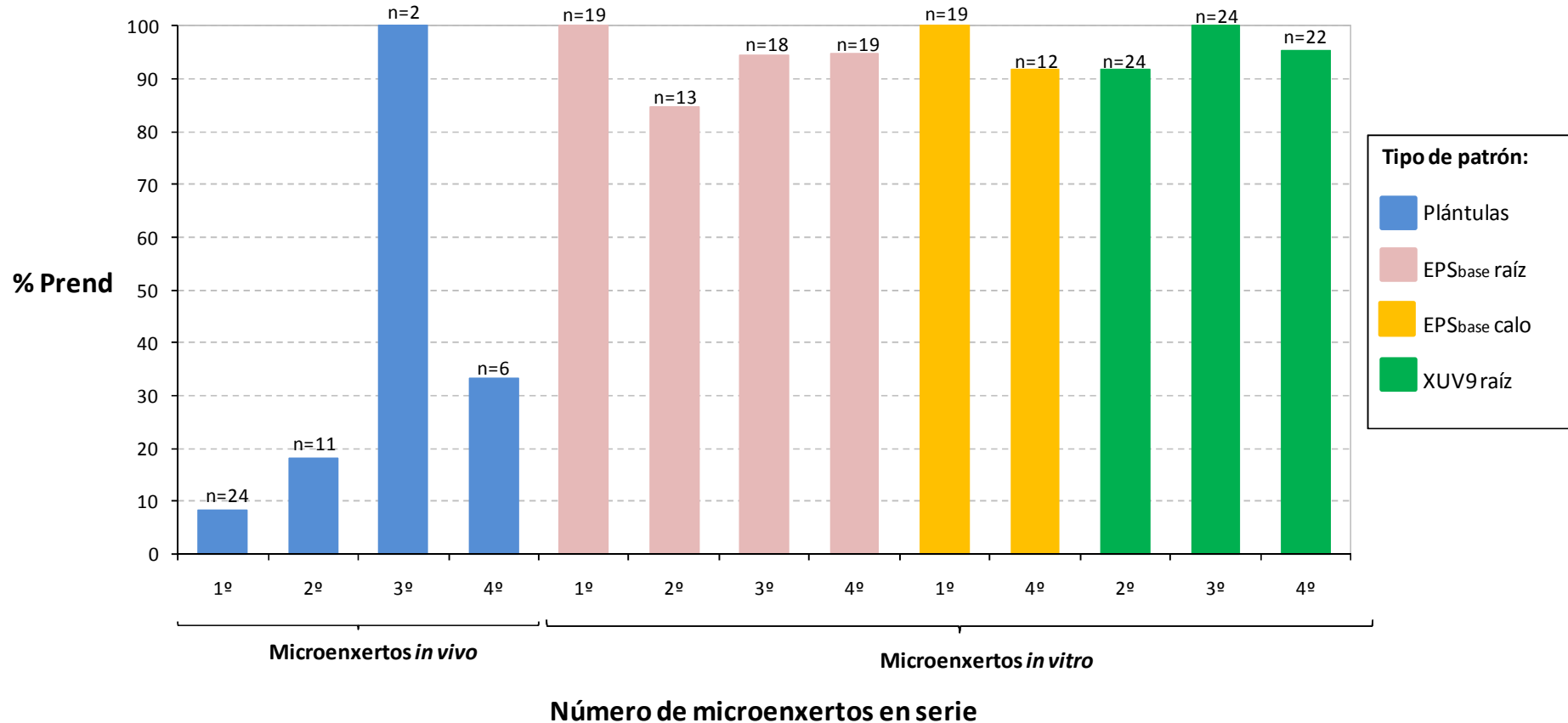
Respecto ó tipo de patrón utilizado nos microenxertos *in vitro*, non parece haber diferenza en canto ás taxas de prendemento entre utilizar segmentos de caule con calo basal ou microbrotes enraizados.

Unha vez realizados, os microenxertos *in vitro* prenderon rapidamente e as primeiras xemas xa se puideron ver agromando ós 7 días, chegándose a reaiñar os primeiros explantos ós 30-35 días (Figura 58), aínda que nalgún caso houbo que cambiar os microenxertos a medio fresco e esperar outros 30-35 días.

Nos microenxertos *in vivo*, os valores de prendemento do 1º microenxerto son os máis baixos, tanto utilizando como fonte de púas brotes de forzado ou brotes en repouso vexetativo.

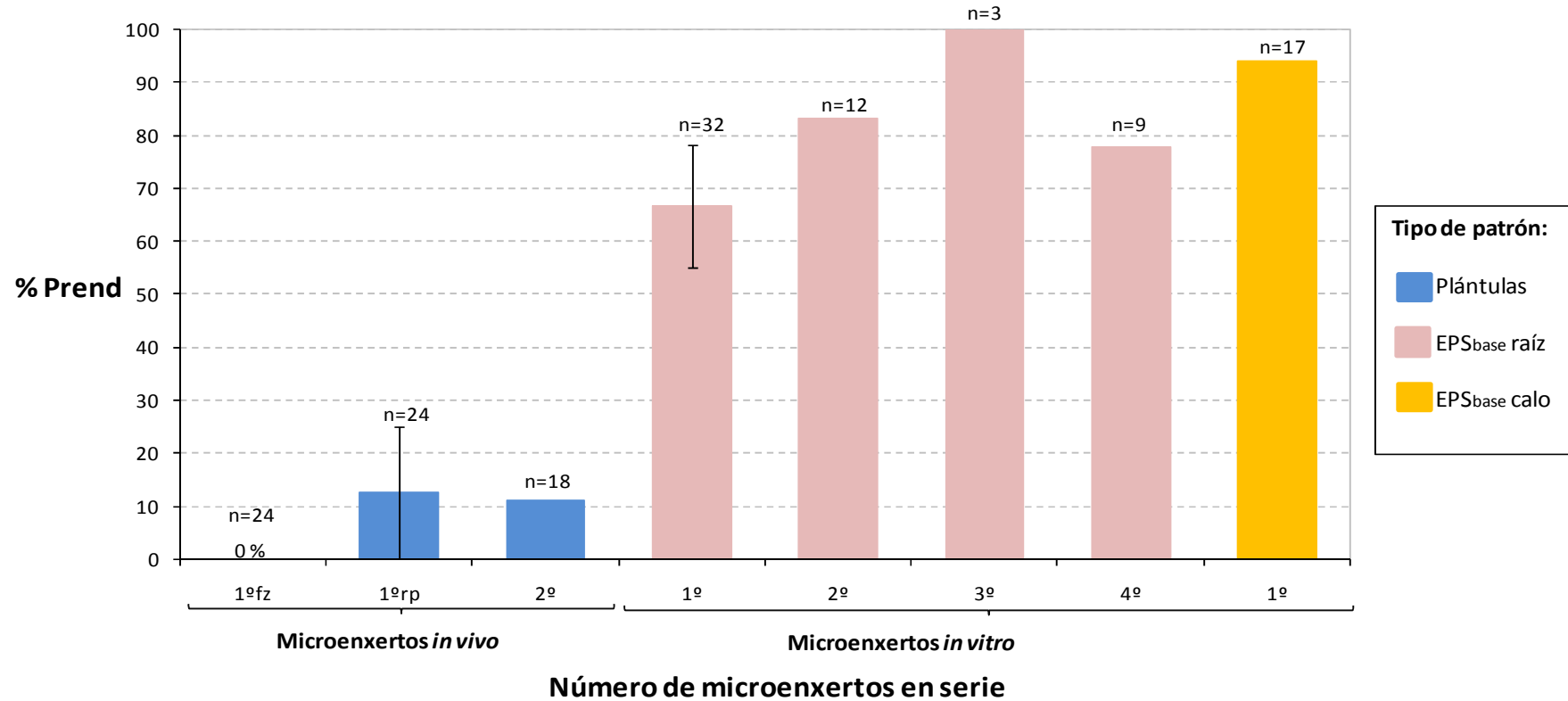
A duración dos ciclos de microenxerto en serie foi, nos casos de menor duración, duns 60 días. Debido á baixa porcentaxe de prendemento, nalgún caso non foi posible obter unha cantidade de material suficiente para reenxertar e introducir *in vitro* ó mesmo tempo, polo que os primeiros brotes illados foron utilizados para facer o seguinte microenxerto da serie, e esperouse ó rebrote do fragmento de púa remanente sobre o patrón no microenxerto para poder introducir material *in vitro*, co que a duración do ciclo se alongou aínda máis. Nestes dous clons o microenxerto *in vivo* foi menos exitoso que nos clons de carballo, principalmente polo reducido desenvolvemento da púa (Figura 59), que ralentiza o proceso de microenxerto en serie.

### Microenxertos utilizando o material EPS<sub>copa</sub> como púa sobre diferentes patróns

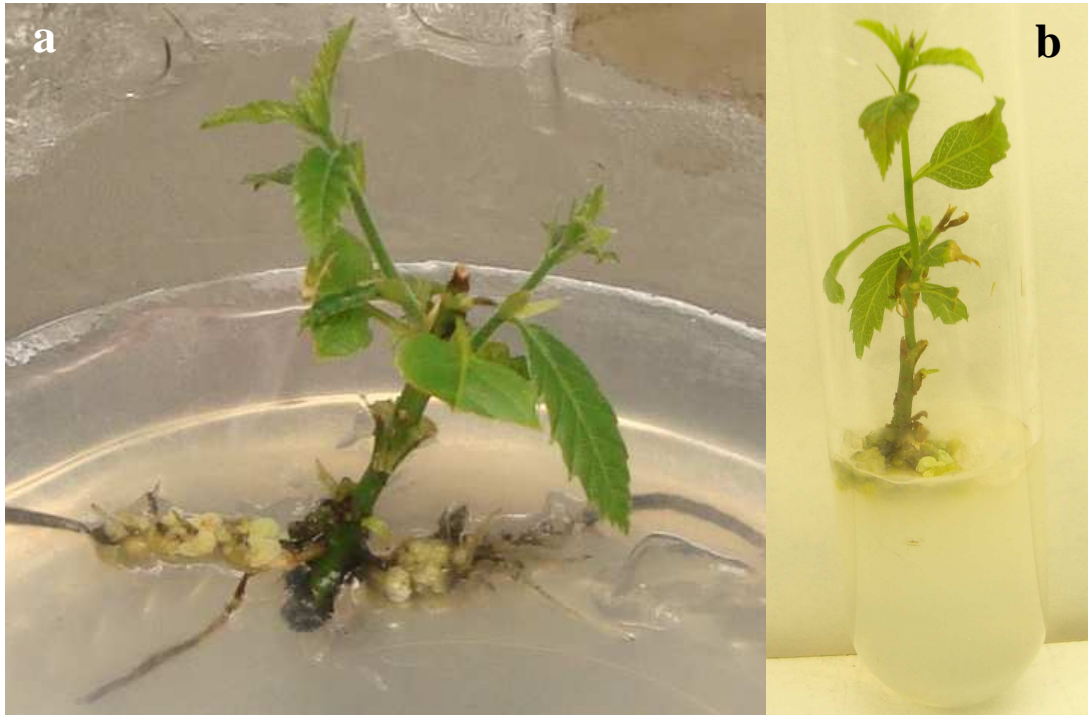


**Figura 56.** Porcentaxe de prendemento (%Prend) dos microenxertos en serie realizados utilizando como púa material de EPS<sub>copa</sub>. As cores das barras diferencian o tipo de patrón (Plántulas: plántulas procedentes de semente de 3 semanas de idade; EPS<sub>base</sub> raíz: brotes enraizados de EPS<sub>base</sub>; EPS<sub>base</sub> calo: calos basais de EPS<sub>base</sub>; XUV9 raíz: brotes enraizados do clon XUV9). Na parte superior de cada barra móstrase o número de microenxertos realizados en cada un dos pasos da serie.

### Microenxertos utilizando o clon SISTO como púa sobre diferentes patróns



**Figura 57.** Porcentaxe de prendemento (%Prend) dos microenxertos en serie realizados utilizando como púa material do clon SISTO. As cores das barras diferencian o tipo de patrón (Plántulas: plántulas procedentes de semente de 3 semanas de idade; EPS<sub>base</sub> raíz: brotes enraizados de EPS<sub>base</sub>; EPS<sub>base</sub> calo: calos basais de EPS<sub>base</sub>; XUV9 raíz: brotes enraizados do clon XUV9). Na parte superior de cada barra móstrase o número de microenxertos realizados en cada un dos pasos da serie. No 1º microenxerto *in vivo* do clon SISTO diferéncianse os que se fixeron con púas procedentes de brotes de forzado (1ºfz) e de brotes en repouso vexetativo (1ºrp).



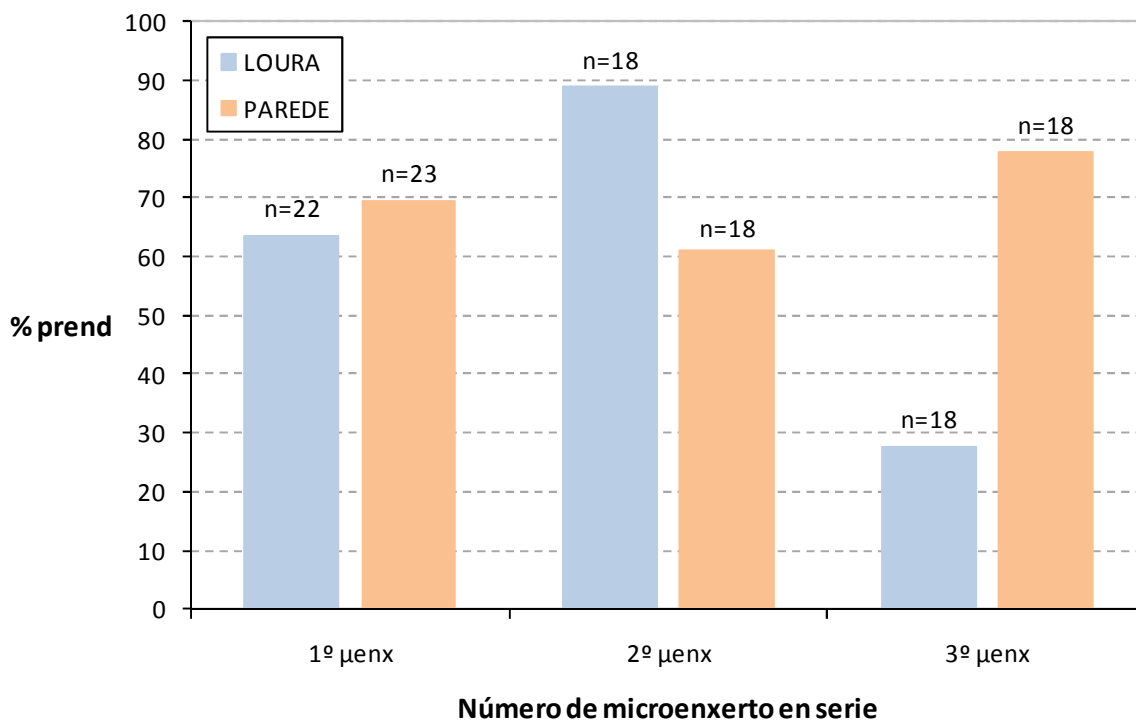
**Figura 58.** Desenvolvemento de dous microenxertos *in vitro* ós 35 días da súa realización. Un microenxerto realizado sobre (a) un brote enraizado e outro (b) sobre un calo basal.



**Figura 59.** Crecemento da púa 60 días despois da realización dos microenxertos *in vivo* (a) no clon EPS<sub>copa</sub> e (b) SISTO.

## Clons LOURA e PAREDE

As porcentaxes de prendemento dos microenxertos *in vivo* dos clons de castiñeiro LOURA e PAREDE aparecen reflectidas na Figura 60.



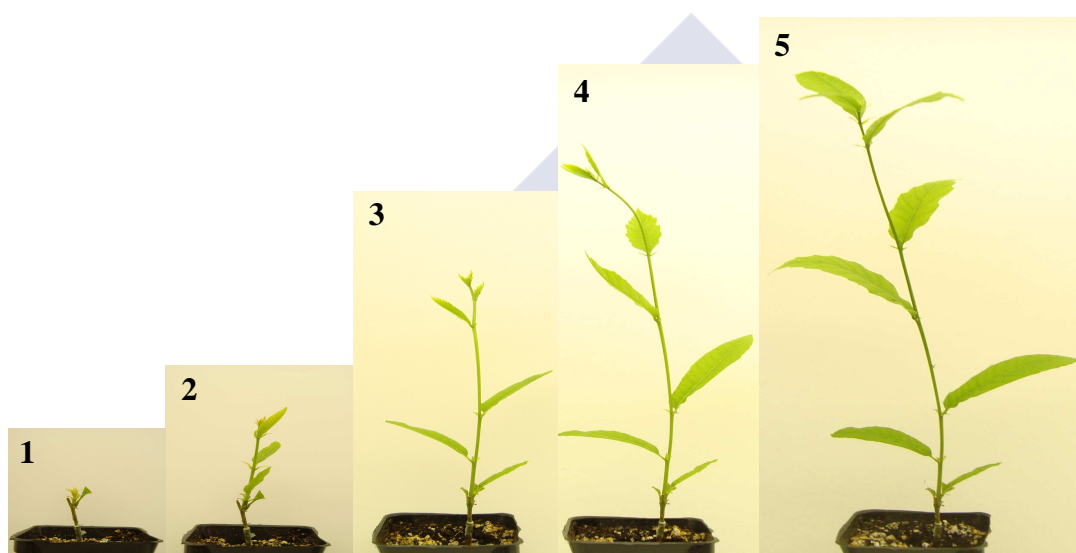
**Figura 60.** Porcentaxe de prendemento (% prend) dos sucesivos microenxertos en serie *in vivo* dos clons LOURA e PAREDE sobre patróns xuvenís. Indícase na parte superior das barras o número de microenxertos realizados. No primeiro microenxerto da serie utilizáronse como púas microbrotes cultivados *in vitro*.

Respecto ó 1º microenxerto, antes de seren utilizados como material para obter púas, os microbrotes *in vitro* permaneceron no mesmo medio durante un período correspondente a dous ciclos de multiplicación (60 días fronte ós 30 convencionais). Isto permitiu que os microbrotes acadasen un maior grao de lignificación que no subcultivo convencional, o que facilitou a inserción das púas nos patróns *in vivo*.

A porcentaxe de prendemento móvese en torno a un 60 %, que se pode considerar un valor alto comparado cos resultados obtidos nos clons EPS e SISTO, tamén de castiñeiro. O prendemento do 3º microenxerto no clon LOURA foi baixo se temos en conta o resto dos valores. Puido existir algún factor que influíse neste

parámetro, probablemente unha falta de homoxeneidade no estado de lignificación do patrón e da púa.

Aínda que non foi avaliado directamente neste traballo, un factor que ten influencia no prendemento é a compatibilidade entre o grao de lignificación dos brotes que se utilizan como púas e o dos patróns. Neste sentido, unha vez que un microenxerto *in vivo* de castiñeiro prende, aínda que o primeiro fluxo de desenvolvemento da púa remata sobre os 20-35 días (Figura 61), son necesarios 2-3 meses para que se acade o momento óptimo para obter novas púas e facer o seguinte microenxerto da serie.



**Figura 61.** Evolución do crecemento dun microenxerto *in vivo* do clon LOURA, dende o momento en que a púa inicia a brotación (1) ata que remata o primeiro crecemento en altura (5). (2): 5 días, (3): 10 días, (4): 15 días, (5): 20 días. Neste caso aplicouse GA<sub>3</sub> na xema apical para estimular a elongación dos entrenós.

O crecemento dos microenxertos unha vez que prenderon foi reducido, do mesmo xeito que nos clons EPS e SISTO. Así, aplicouse GA<sub>3</sub> (ver Material e métodos) coa intención de que os brotes desenvolvidos acadasen unha lonxitude suficiente para realizar os microenxertos da serie en intervalos máis curtos. A aplicación de GA<sub>3</sub> sobre a púa tivo un notable efecto sobre o crecemento (Figura 62). Na Táboa 24 exprésase o efecto do GA<sub>3</sub> no crecemento dos microenxertos e no número de púas que se poden obter de cada un.

O feito de aplicar GA<sub>3</sub> permite aumentar, tanto no clon LOURA como no PAREDE, a lonxitude media do crecemento das púas en máis de 10 cm. Isto débese principalmente ó alongamento dos entrenós, o que facilita a preparación das novas púas e o aproveitamento de todos os nós obtidos.



**Figura 62.** Diferenza de crecemento entre dous microenxertos *in vivo*, no clon PAREDE, en función da (a) aplicación ou (b) non de GA<sub>3</sub>, ós 40 días da realización dos microenxertos.

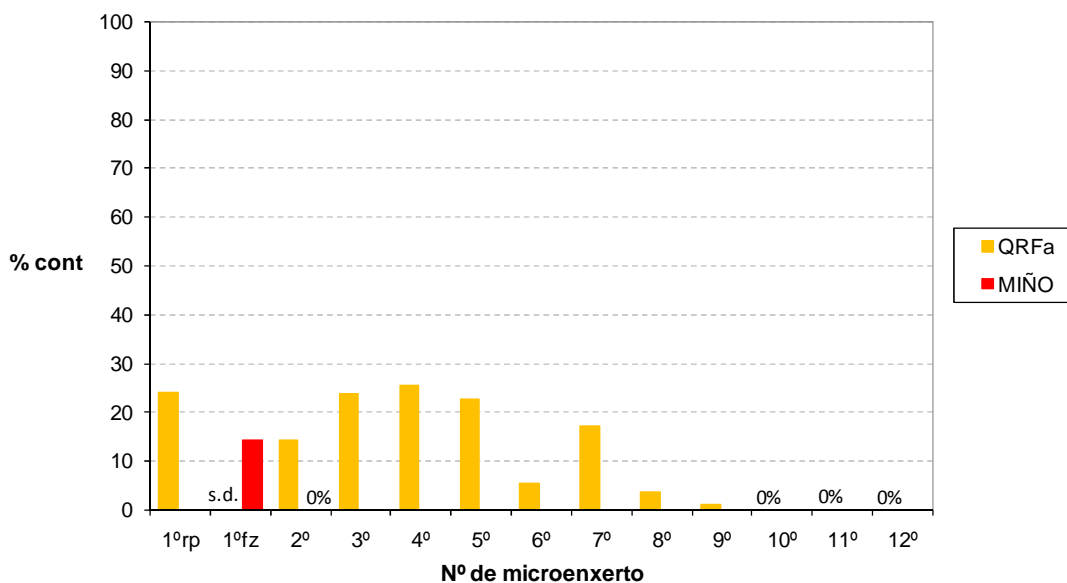
**Táboa 24.** Lonxitude das púas (L) e número de novas púas obtidas (N), aplicando ou non un tratamento con GA<sub>3</sub>, para os microenxertos *in vivo* realizados nos clons LOURA e PAREDE, ós 40 días da realización dos microenxertos.

CLON	GA <sub>3</sub>	L (cm)	N
LOURA	+	17,06 ± 5,88	6,20 ± 1,40
	-	5,67 ± 3,13	4,50 ± 1,29
PAREDE	+	17,61 ± 5,82	5,91 ± 1,22
	-	6,35 ± 3,07	3,67 ± 1,97

### 3.3 - Efecto do microenxerto sobre a multiplicación *in vitro*

#### 3.3.1 - Introducción *in vitro* dos explantos procedentes de microenxertos *in vivo*

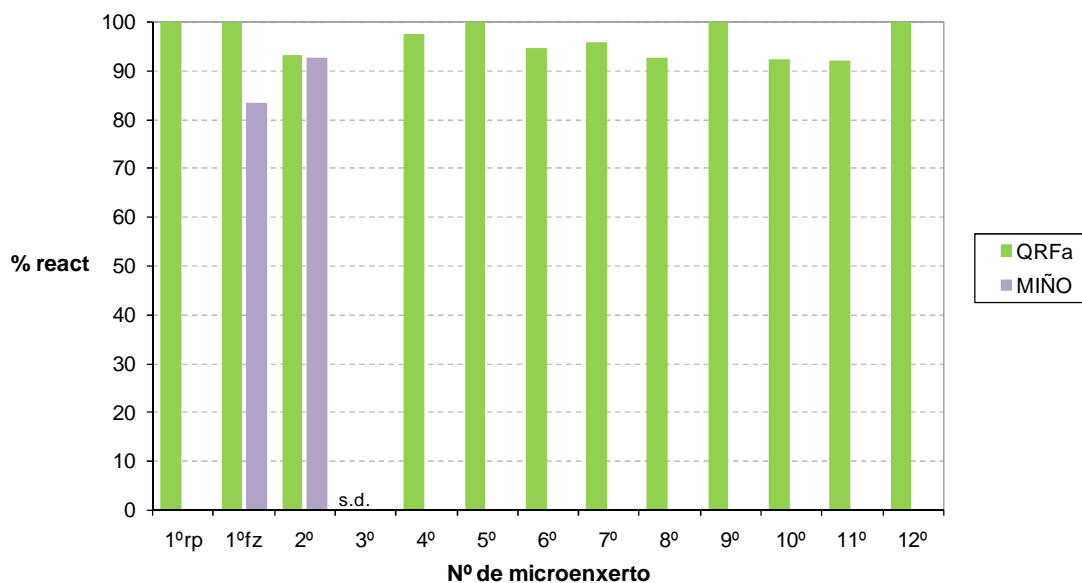
Na Figura 63 e 64 represéntanse, respectivamente, os resultados da porcentaxe de contaminación e da reactividade dos explantos introducidos *in vitro* a partir dos microenxertos *in vivo* dos clons de carballo.



**Figura 63.** Contaminación (% cont), ós 35 días da introdución *in vitro*, dos explantos obtidos das púas que se desenvolveron a partir dos microenxertos *in vivo* dos clons QRFa (1º-12º microenxertos) e MIÑO (1º e 2º microenxertos). Nos explantos do 1º microenxerto do clon QRFa diferéncianse os explantos procedentes de microenxertos feitos con púas obtidas de brotes de forzado (1ºfz) dos de microenxertos feitos con púas obtidas de brotes en repouso (1ºrp). s.d.: sen datos.

A porcentaxe de contaminación foi, no peor dos casos, dun 25 %, e en varias ocasións foi nula, o que se pode considerar un resultado positivo, tendo en conta que se introducen explantos procedentes de brotes que se desenvolveron en cámara de crecemento, onde non existen condicións de esterilidade.

As condicións de desinfección resultan igualmente axeitadas en canto a que non afectaron á viabilidade dos explantos.



**Figura 64.** Reactividade (% react), ós 35 días da introdución *in vitro*, dos explantos obtidos de púas que se desenvolveron a partir dos microenxertos *in vivo* dos clons QRFa (1°-12° microenxertos) e MIÑO (1° e 2° microenxertos). Nos explantos do 1° microenxerto diferéncianse os explantos procedentes de microenxertos feitos con púas obtidas de brotes de forzado (1°fz) dos de microenxertos feitos con púas obtidas de brotes en repouso (1°rp). s.d.: sen datos.

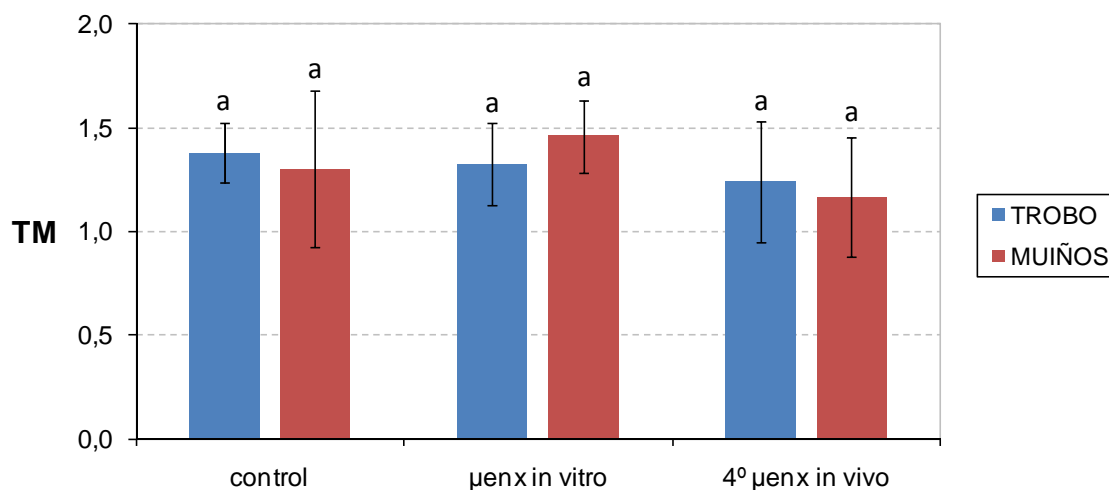
A reactividade dos explantos *in vitro* foi elevada, superando sempre o 80 %. No caso do clon QRFa, os explantos procedentes dos microenxertos presentaron unha reactividade superior ós brotes procedentes de forzado de segmentos de rama, que se introduciron como material control (ver apartado 1). Ó contrario do que sucede cos brotes procedentes de forzado, que debe introducirse *in vitro* en estado herbáceo, ó material enxertado pódesele deixar acadar un certo grao de lignificación antes de introduci-lo *in vitro*, o que permite que os explantos soporten mellor as condicións de desinfección.

### 3.3.2 - Taxa de multiplicación *in vitro* do material procedente de microenxerto

#### 3.3.2.1 - Clons de *Quercus robur*

##### Clons TROBO e MUIÑOS

Na Figura 65 pódese observar que os explantos procedentes do material dos clons TROBO e MUIÑOS microenxertado *in vitro* unha vez sobre un patrón procedente de semente non melloran significativamente as taxas de multiplicación respecto ós explantos procedentes de material sen enxertar (control). O mesmo sucede cos explantos que proceden de material microenxertado 4 veces *in vivo*.



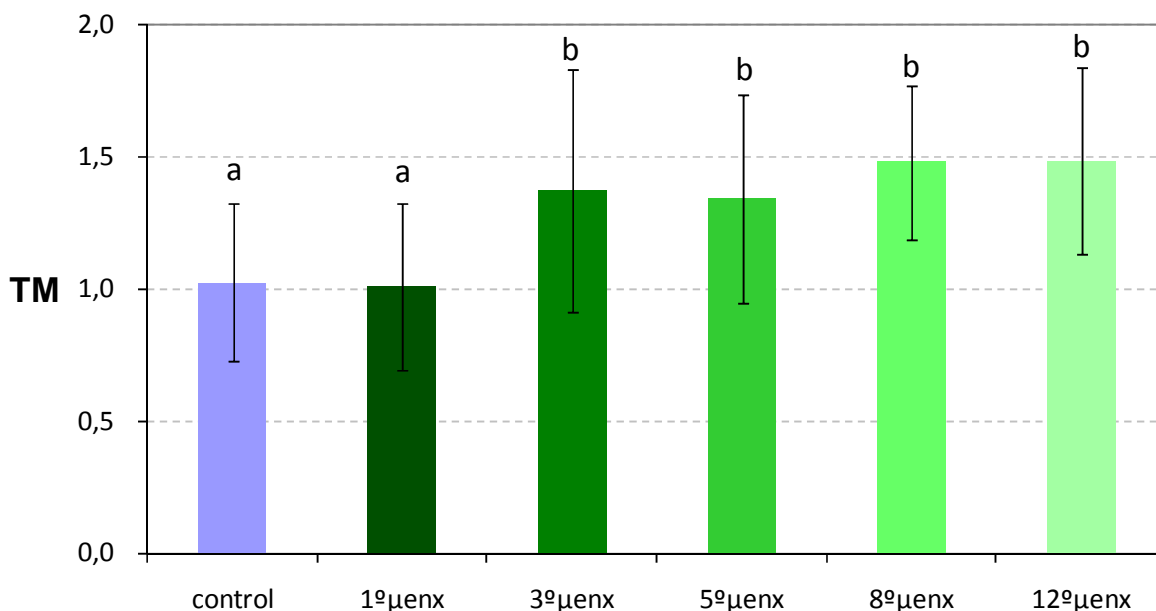
**Figura 65.** Taxa de multiplicación media de 7 subcultivos, para os clons TROBO e MUIÑOS, do material control (sen enxertar), do procedente de microenxerto *in vitro* (1º µenx *in vitro*) e do procedente do 4º microenxerto en serie *in vivo* (4º µenx *in vivo*). Letras iguais, dentro de cada clon, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

## Clons QRFa e MIÑO

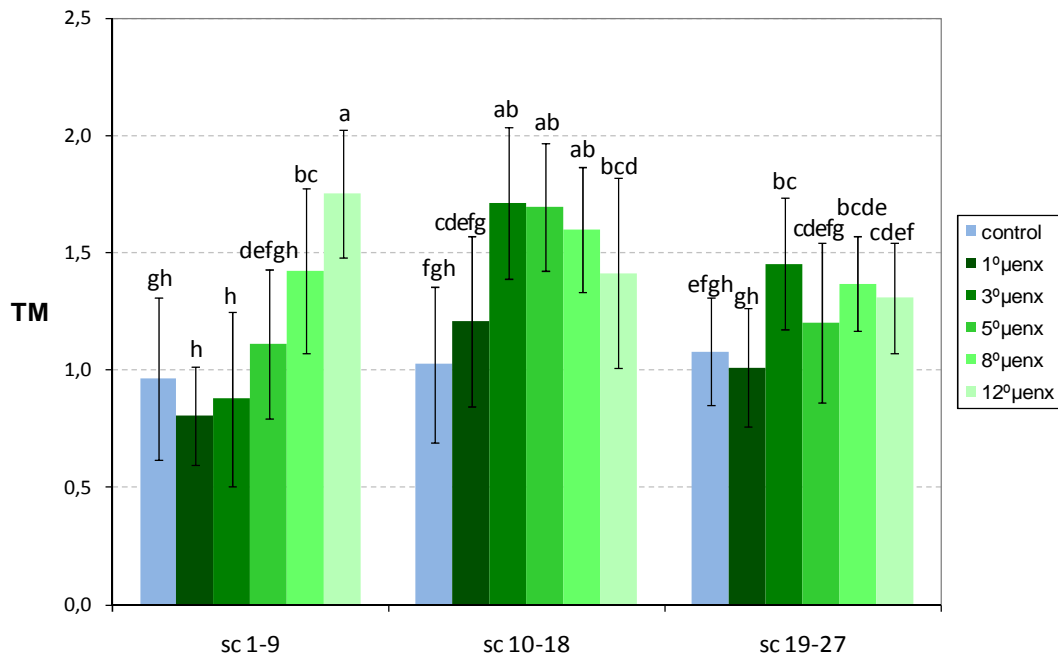
Na Figura 66 obsérvase que a taxa de multiplicación media (tras 27 subcultivos), no clon QRFa, dos explantos control (procedentes de material sen enxertar) é significativamente menor que a dos explantos procedentes de material microenxertado de 3 a 12 veces. No entanto, isto non sucede cos explantos do material microenxertado unha vez, nos que os valores non difiren significativamente respecto do control.

Se agrupamos as medias da taxa de multiplicación en grupos de 9 subcultivos (Figura 67) pódese observar que as diferenzas co material control prodúcense principalmente nos 18 primeiros subcultivos, mentres que nos 9 últimos tenden a desaparecer. Aínda así, os valores medios dos explantos control e dos procedentes do material microenxertado unha soa vez son sempre iguais ou menores que os dos explantos procedentes do material microenxertado de 3 a 12 veces.

Estes resultados parecen amosar un efecto de revigorización mediado polo microenxerto, que se manifesta, principalmente, nos 18 primeiros subcultivos, atenuándose nos 9 seguintes subcultivos, de xeito que na maior parte dos casos xa non hai diferenzas significativas co material control. Considérase que dita revigorización ten polo tanto carácter temporal, aínda que o seu efecto perdura durante un longo período.

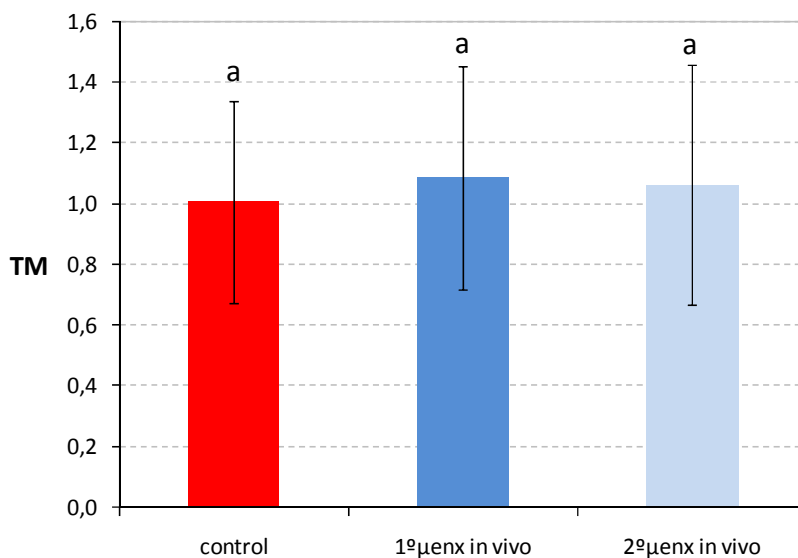


**Figura 66.** Taxa de multiplicación media, para o clon QRFa, dos explantos procedentes do material control (sen enxertar) e dos procedentes do material microenxertado *in vivo* 1, 3, 5, 8 e 12 veces, para os 27 primeiros subcultivos tras a introdución *in vitro*. Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).



**Figura 67.** Taxa de multiplicación media, para o clon QRFa, dos explantos procedentes do material control (sen enxertar) e dos procedentes do material microenxertado *in vivo* 1, 3, 5, 8 e 12 veces, para tres grupos de 9 subcultivos (1-9, 10-18 e 19-27) tras a introdución *in vitro*. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

No clon MIÑO, os valores da taxa de multiplicación, para os 11 primeiros subcultivos, dos explantos procedentes do material sen enxertar e do material microenxertado *in vivo* unha e dúas veces, non difiren significativamente (Figura 68).



**Figura 68.** Taxa de multiplicación media, para o clon MIÑO, dos explantos procedentes do material control (sen enxertar) e dos procedentes do 1º e 2º microenxerto *in vivo* (µenx), para os 11 primeiros subcultivos tras a introdución *in vitro*. Letras iguais indican non que existen diferencias significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2.2 - Clons de *Castanea sativa*

#### 3.3.2.2.1 - Microenxertos *in vivo*

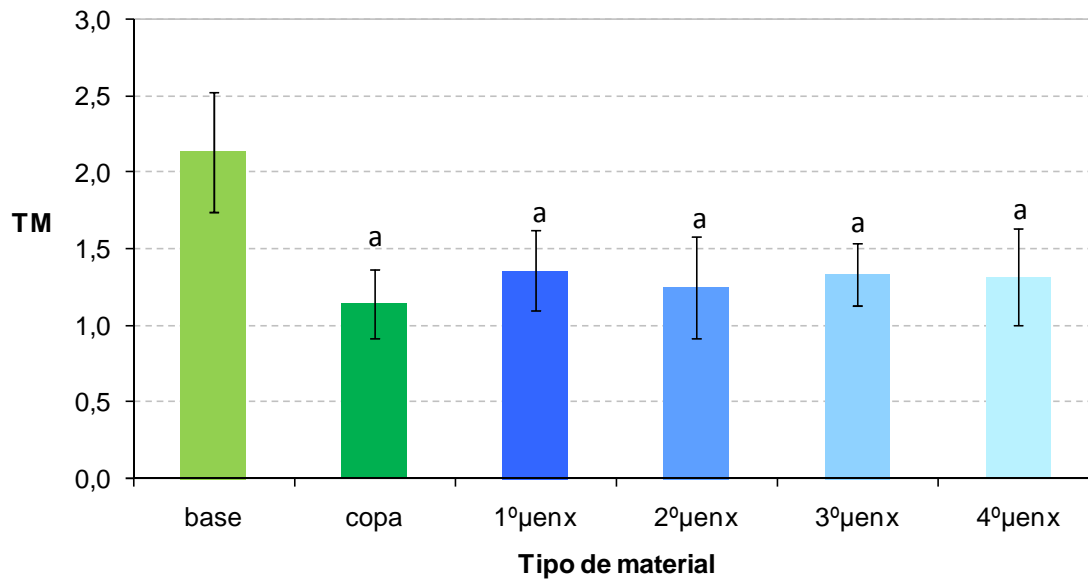
O material de castiñeiro no que se avaliou a taxa de multiplicación corresponde ós clons EPS e SISTO. En ambos clons realizáronse microenxertos *in vivo* e *in vitro*, e comparouse a taxa de multiplicación dos explantos procedentes do material microenxertado coa dos explantos control (de material sen enxertar).

Na Figura 69 móstranse os resultados das taxas de multiplicación no clon EPS. En primeiro lugar, cómpre facer referencia a que a taxa de multiplicación do material obtido de rebentos basais no clon EPS (EPS<sub>base</sub>) amosa un valor significativamente maior que o do material da copa (o valor medio case se duplica), o que pon de manifesto o efecto da topófise. Estes resultados son parecidos ós obtidos por Sánchez e Viéitez (1991), que compararon o comportamento de material da base e da copa de cinco clons de castiñeiro.

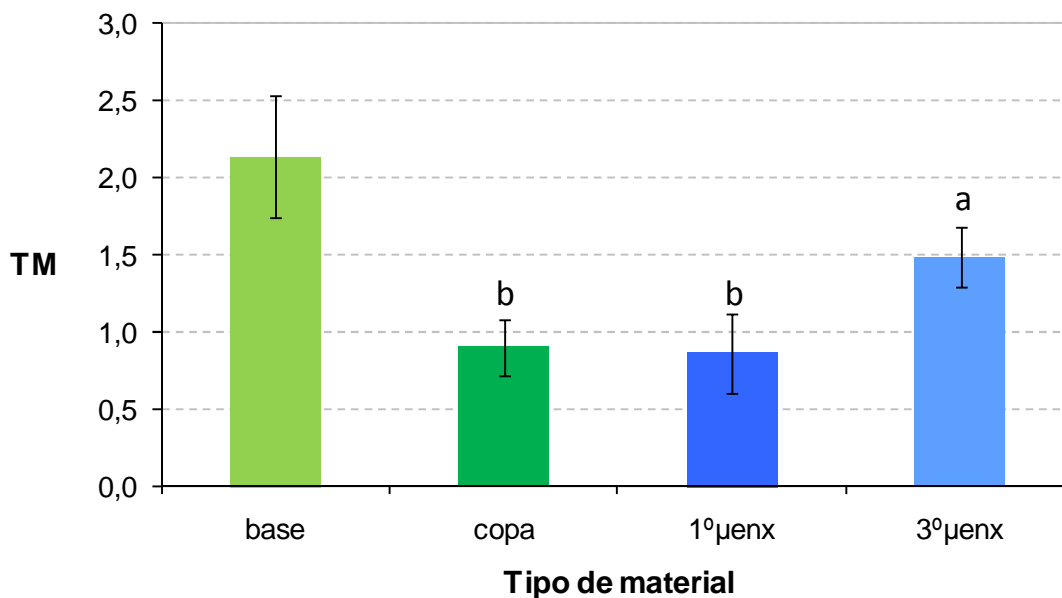
Se atendemos ós valores da taxa de multiplicación dos explantos obtidos do material que foi microenxertado *in vivo*, obsérvase que non hai efecto do microenxerto sobre a taxa de multiplicación durante os 14 primeiros subcultivos. No entanto, para os subcultivos 21-26, a taxa de multiplicación media é significativamente superior no material microenxertado 3 veces que no control e no material microenxertado 1 vez, que non presentan diferenzas entre eles (Figura 70).

Aínda así, a taxa de multiplicación mantense en valores significativamente menores que os do material da base.

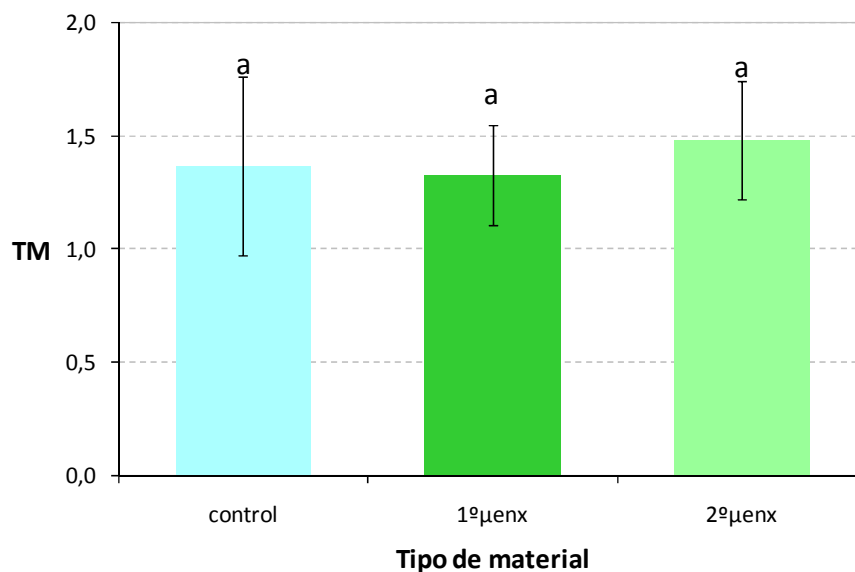
No caso do clon SISTO (Figura 71), aínda que o valor da taxa de multiplicación aumenta nos explantos procedentes de material microenxertado *in vivo* dúas veces, as diferenzas non son significativas con respecto ós explantos control, polo que non se observan síntomas de revigorización no que respecta a este parámetro.



**Figura 69.** Taxa de multiplicación media de explantos procedentes do material da copa e da base do clon EPS (copa, base) e dos procedentes do material da copa sometido a 1-4 microenxertos en serie *in vivo* (1º-4º µenx), durante os 14 primeiros subcultivos. Letras iguais indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P<0,05$ ).



**Figura 70.** Taxa de multiplicación media do material procedente da copa e da base do clon EPS (copa, base) e do material da copa sometido a 1 e 3 microenxertos en serie *in vivo* (1º-3º µenx), durante os subcultivos 21-29. Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P<0,001$ ).



**Figura 71.** Taxa de multiplicación media, no clon SISTO, de explantos procedentes de material da copa (control) e dos procedentes de material sometido a 1-2 microenxertos *in vivo* (1º e 2º µenx), durante os 15 primeiros subcultivos. Letras iguais indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

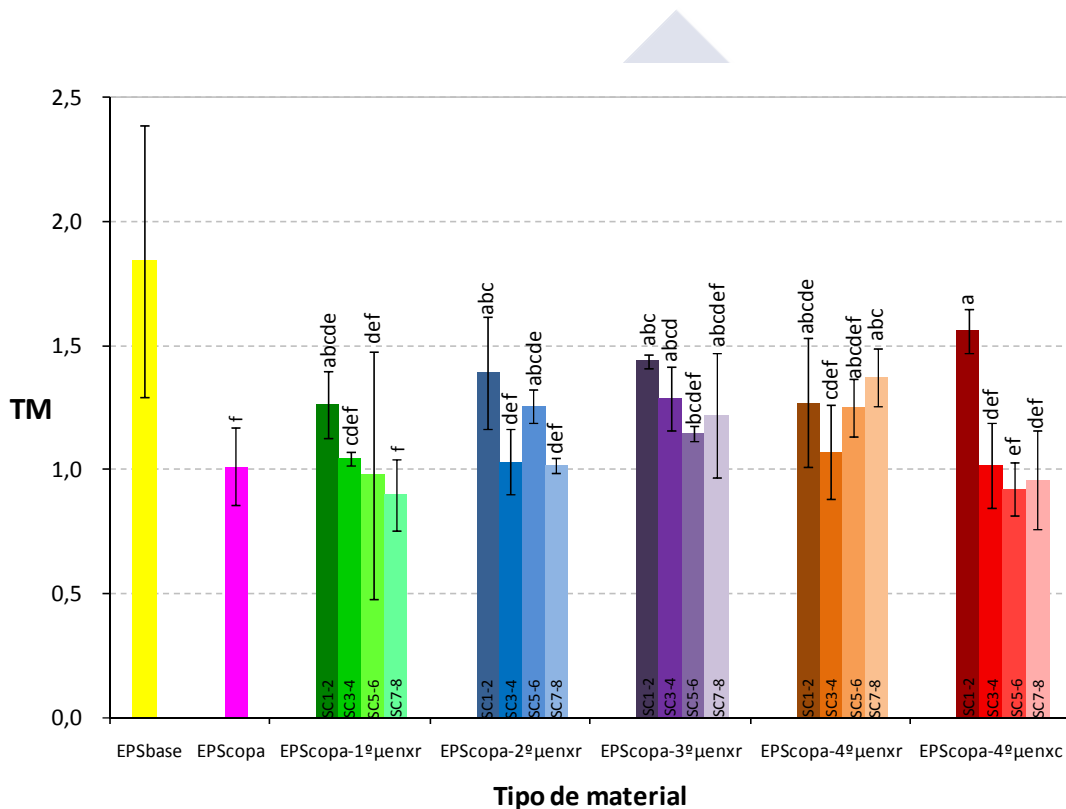
### 3.3.2.2.2 - Microenxertos *in vitro*

#### 3.3.2.2.2.1 - Microenxerto *in vitro* de $EPS_{\text{copa}}$ sobre $EPS_{\text{base}}$

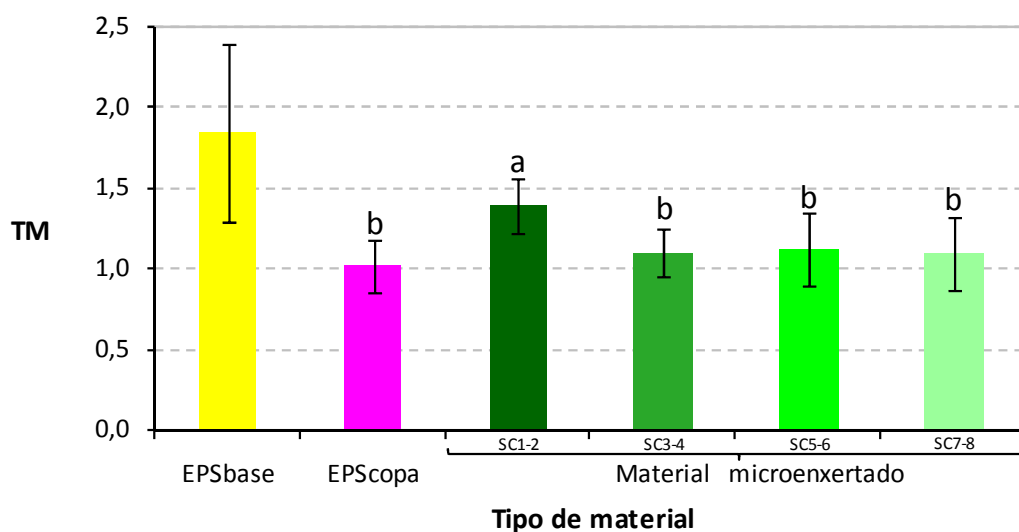
No que atinxe ás taxas de multiplicación dos explantos procedentes de material microenxertado en serie *in vitro* de  $EPS_{\text{copa}}$  sobre  $EPS_{\text{base}}$  (Figura 72), se os valores se agrupan de dous en dous subcultivos, obsérvase un incremento temporal das taxas de multiplicación dos explantos procedentes de material microenxertado respecto do material control, prolongándose este efecto tan só dous subcultivos tras o reallamento do material microenxertado. O efecto de revigorización faise máis patente agrupando os valores de todo o material microenxertado (Figura 73). Este aumento puntual da taxa de multiplicación non parece depender de que o patrón posúa raíces, xa que non existen diferenzas entre explantos procedentes de material microenxertado sobre patróns enraizados e os procedentes de material microenxertado sobre patróns con calo basal. Tampouco se observan diferenzas significativas en función do número de microenxertos ó que se someteu o material, polo que, neste caso, o microenxerto en serie non tivo efecto positivo algún.

A razón da mellora transitoria das taxas de multiplicación nos dous primeiros subcultivos podería explicarse pola transmisión puntual de nutrientes e/ou reguladores do crecemento por parte do patrón xuvenil mentres que o microenxerto se desenvolve, o que permitiría mellorar temporalmente o estado fisiolóxico do material adulto. Ó separar o patrón e a púa, estas substancias permanecerían no material adulto pouco tempo, desaparecendo o seu efecto tras dous subcultivos.

En calquera caso, incluso nos primeiros subcultivos, a taxa de multiplicación dos explantos procedentes do material microenxertado está moi por baixo da do material  $EPS_{base}$ .



**Figura 72.** Taxa de multiplicación media dos explantos procedentes do material da copa e da base do clon EPS ( $EPS_{copa}$  e  $EPS_{base}$ ), dos procedentes do material de  $EPS_{copa}$  microenxertado de 1 a 4 veces *in vitro* sobre patróns enraizados de  $EPS_{base}$  ( $EPS_{copa-1^\circ\mu enxr}$ - $EPS_{copa-4^\circ\mu enxr}$ ) e dos procedentes do material de  $EPS_{copa}$  microenxertado *in vitro* 4 veces sobre patróns con calo de  $EPS_{base}$  ( $EPS_{copa-4^\circ\mu enxc}$ ), durante os 8 primeiros subcultivos (SC) tras o reallamento, agrupados de 2 en 2 (indicados no interior das barras). Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

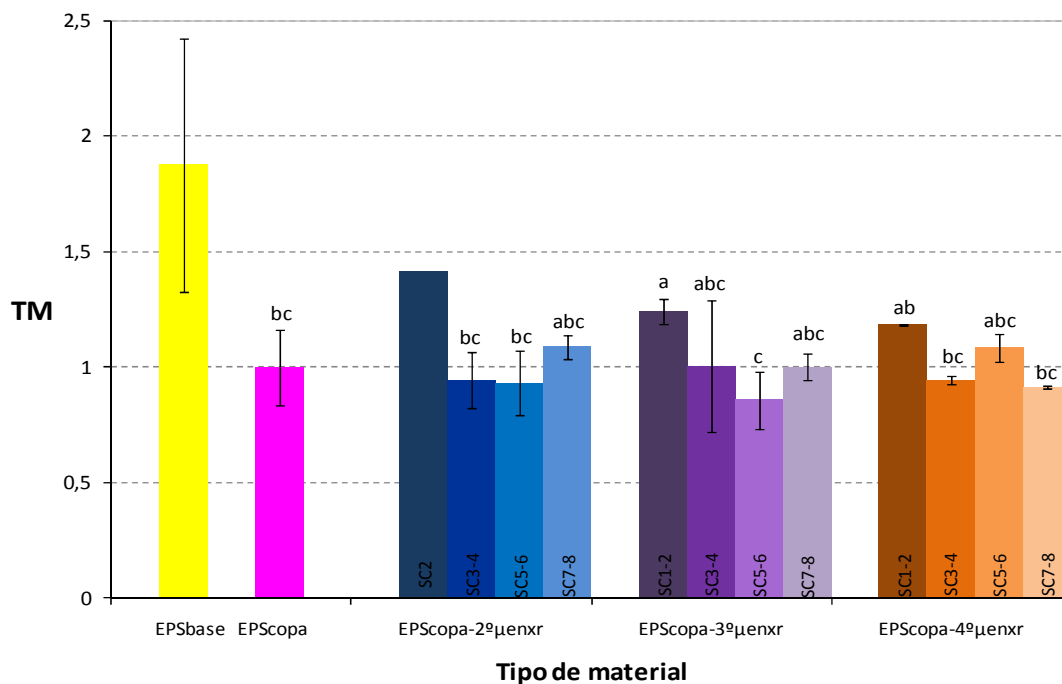


**Figura 73.** Taxa de multiplicación media dos explantos procedentes de material da copa e da base do clon EPS ( $EPS_{\text{copa}}$  e  $EPS_{\text{base}}$ ), e dos explantos procedentes de material microenxertado (agrupando o material procedente do 1º, 2º, 3º e 4º microenxertos *in vitro* de  $EPS_{\text{copa}}$  sobre patróns enraizados de  $EPS_{\text{base}}$  e o material procedente do 4º microenxerto *in vitro* de  $EPS_{\text{copa}}$  sobre patróns con calo de  $EPS_{\text{base}}$ ), durante os 8 primeiros subcultivos (SC) tras o reallamento, agrupados de 2 en 2. Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

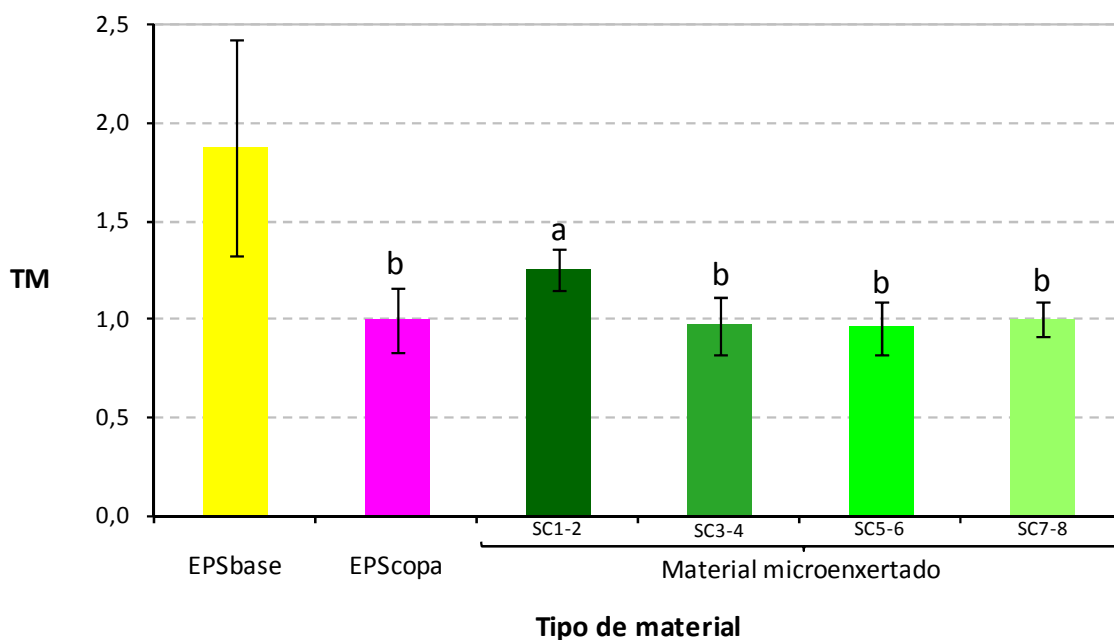
### 3.3.2.2.2.2 - Microenxerto *in vitro* de $EPS_{\text{copa}}$ sobre XUV9

Respecto ó material procedente dos microenxertos en serie de  $EPS_{\text{copa}}$  sobre o clon XUV9 (Figura 74), obsérvase un comportamento semellante ó do material procedente de microenxertos utilizando como patrón material de  $EPS_{\text{base}}$ . O efecto de revigorización obsérvase durante dous subcultivos tras o reallamento, non apreciándose diferenzas en función do número de microenxertos realizados en serie.

Agrupando de novo os valores da taxa de multiplicación de todos os explantos procedentes do material microenxertado, de dous en dous subcultivos (Figura 75), a distribución é moi parecida á que se aprecia na Figura 73, desaparecendo o efecto do microenxerto tras dous subcultivos.



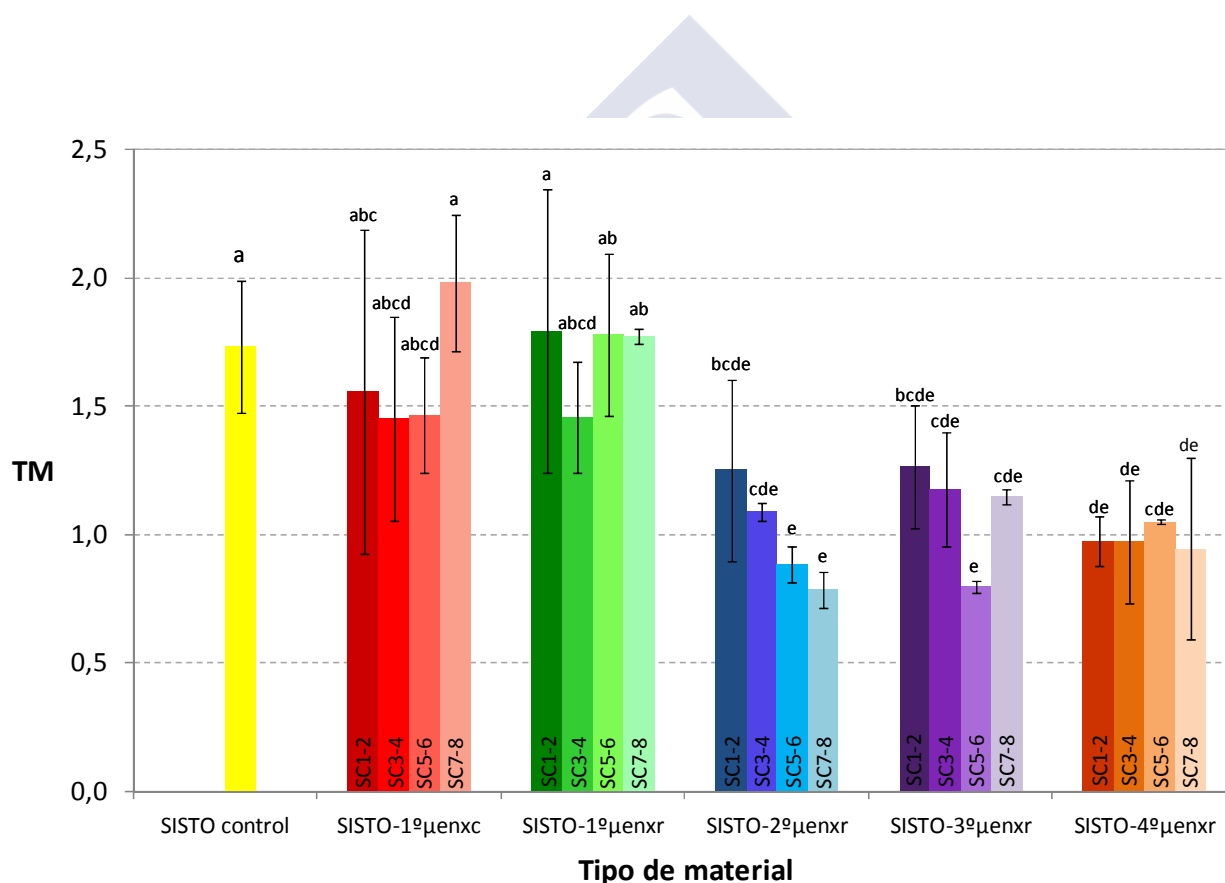
**Figura 74.** Taxa de multiplicación media dos explantos procedentes do material da copa e da base do clon EPS ( $EPS_{\text{copa}}$  e  $EPS_{\text{base}}$ ) e dos procedentes do material de  $EPS_{\text{copa}}$  microenxertado de 2 a 4 veces sobre patróns enraizados do clon XUV9 ( $EPS_{\text{copa-2}^\circ\mu\text{enxr}}$ - $EPS_{\text{copa-4}^\circ\mu\text{enxr}}$ ) durante os 8 primeiros subcultivos (SC) agrupados de 2 en 2 (indicados no interior das barras). Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).



**Figura 75.** Taxa de multiplicación media dos explantos procedentes de material da copa e da base do clon EPS ( $EPS_{\text{copa}}$  e  $EPS_{\text{base}}$ ) e dos procedentes de material microenxertado (agrupando o material procedente do 2º, 3º e 4º microenxertos *in vitro* de  $EPS_{\text{copa}}$  sobre patróns enraizados do clon XUV9), durante os 8 primeiros subcultivos (SC) agrupados de 2 en 2. Letras diferentes indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

### 3.3.2.2.3 - Microenxerto *in vitro* de SISTO sobre EPS<sub>base</sub>

Finalmente, no clon SISTO, o microenxerto *in vitro* non produciu mellora con respecto á taxa de multiplicación do material control, nin sequera nos primeiros subcultivos (Figura 76). De feito, sorprendentemente, excepto para os explantos procedentes de material microenxertado 1 vez, a taxa de multiplicación dos explantos obtidos de material microenxertado 2, 3 e 4 veces é significativamente menor que a do material control. Neste caso, o feito de enxertar sucesivamente o material adulto sobre o patrón xuvenil produciu un empeoramento nas taxas de multiplicación. Descoñecemos cal puido ser o factor que provocou esta resposta negativa do material microenxertado varias veces.



**Figura 76.** Taxa de multiplicación media dos explantos procedentes do material sen enxertar do clon SISTO (SISTO control), dos procedentes de material microenxertado *in vitro* de 1 a 4 veces (1º-4ºµenxr) e do material microenxertado *in vitro* 1 vez sobre patróns con calo de EPS<sub>base</sub> (1ºµenxc), durante os 8 subcultivos que seguen ó reallamento, agrupados de 2 en 2. Letras distintas indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,05$ ).

### 3.4 - Enraizamento *in vitro* do material procedente de microenxerto

#### 3.4.1 - Clons de *Quercus robur*

##### *Clons TROBO e MUÍÑOS*

Na Táboa 25 móstranse os resultados da porcentaxe de enraizamento *in vitro*, número de raíces por brote enraizado e lonxitude da raíz máis longa de microestacas de material adulto dos clons TROBO e MUÍÑOS (control), comparándoos cos de microestacas obtidas de material microenxertado *in vitro* e *in vivo* dos mesmos clons.

Segundo se observa, a porcentaxe de enraizamento do material control do clon TROBO non difire significativamente da das microestacas procedentes do material microenxertado *in vitro* ou *in vivo* dúas veces. De forma global, obtéñense uns valores medios de enraizamento, ós 28 días, que varían entre un 17 % e un 37,5 %. Os brotes non amosaron raíces ata os 21 días dende o estímulo auxínico.

O número de raíces por brote enraizado varía dende 1,50 ata 2,77, e a lonxitude da raíz máis longa dende 1,53 ata 2,17 cm, tomándose ambos valores ós 28 días do tratamento de enraizamento.

No clon MUÍÑOS tampouco existen diferenzas significativas entre as microestacas control e as procedentes do material microenxertado. Neste clon, as primeiras raíces detéctanse dende os 14 días tras o tratamento de indución do enraizamento.

En canto ó número de raíces por brote enraizado e á lonxitude da raíz máis longa, o primeiro varía entre 1,11 e 1,74, e a media da raíz máis longa varía, ós 28 días, entre 3,69 e 4,65 cm.

**Táboa 25.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende o tratamento de indución do enraizamento, nos clons TROBO e MUÍÑOS. Compáranse microestacas de material sen enxertar (control) con microestacas de material microenxertado *in vivo* e *in vitro*. A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 120 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas apicais de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna e do mesmo clon, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,01$ ).

Clon	Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
TROBO	Control	71	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	33,33	2,10	1,03
			28	<b>37,5a</b>	<b>2,22</b>	<b>2,17</b>
	1º µenx <i>in vitro</i>	10	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	16,66	1,66	0,71
			28	<b>16,66a</b>	<b>1,50</b>	<b>2,03</b>
	1º µenx <i>in vivo</i>	4	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	29,16	2,44	1,00
			28	<b>29,16a</b>	<b>2,77</b>	<b>1,66</b>
	2º µenx <i>in vivo</i>	4	7	0	-	-
14			0	-	-	
21			4,16	0,77	1,20	
28			<b>16,66a</b>	<b>1,93</b>	<b>1,53</b>	
MUÍÑOS	Control	70	7	0	-	-
			14	54,16	1,75	1,09
			21	60,83	1,84	2,56
			28	66,66	1,77	4,65
			35	<b>70,83a</b>	<b>1,74</b>	<b>6,57</b>
	1º µenx <i>in vitro</i>	10	7	0	-	-
			14	62,5	1,49	0,78
			21	70,83	1,45	2,41
			28	70,83	1,51	4,13
			35	<b>70,83a</b>	<b>1,55</b>	<b>6,02</b>
	1º µenx <i>in vivo</i>	4	7	0	-	-
			14	20,83	1,16	0,78
			21	25	1,16	2,62
			28	33,33	1,11	3,69
			35	<b>33,33a</b>	<b>1,11</b>	<b>5,39</b>

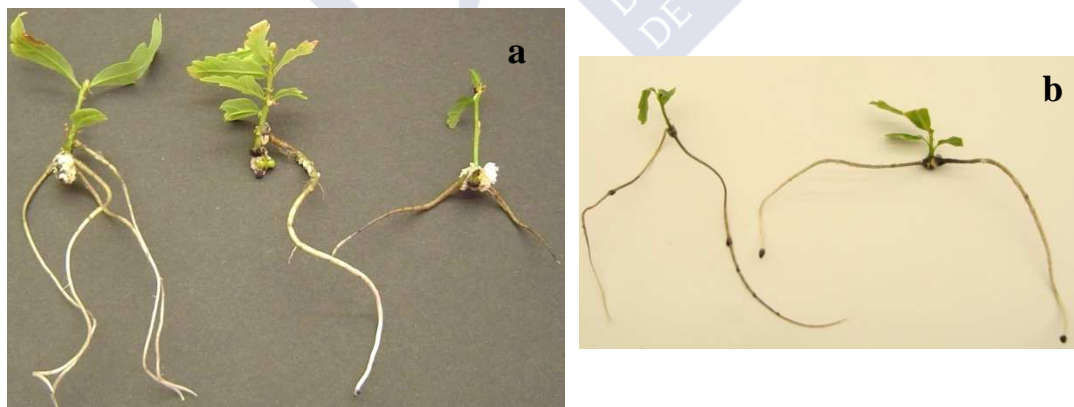
*Clons QRFa e MIÑO*

Nas Táboas 26 e 27 amósanse os resultados dos distintos ensaios de enraizamento realizados no clon QRFa.

De forma xeral, cómpre resaltar a baixa porcentaxe de enraizamento que se obtén nas diferentes probas realizadas (sempre por debaixo do 25%), tanto para o material control, coma para o material procedente dos microenxertos en serie.

No ensaio cuxos resultados se mostran na Táboa 26 utilizáronse microestacas apicais de 1,5-3 cm de longo (Figura 77a), mentres que no ensaio cuxos resultados se mostran na Táboa 27 utilizáronse microestacas nodais de < 1 cm de longo (Figura 77b). En ningún dos dous casos se detectan diferenzas significativas en función do número de microenxertos realizados, nin en función do número de subcultivo, dentro do mesmo tipo de material.

Respecto ó número de raíces por brote enraizado, os valores varían, ós 35 días, entre 1 e 2, e a lonxitude da raíz máis longa toma valores, de forma xeral, entre 3 e 5 cm.



**Figura 77.** Microestacas enraizadas do clon QRFa, (a) procedentes de microestacas apicais de 1,5-3 cm de longo, e (b) de microestacas nodais menores de un cm, ós 35 días da indución do enraizamento.

**Táboa 26.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon QRFa. Compáranse microestacas de material sen enxertar (control) con microestacas do material microenxertado en serie *in vivo* (1º, 3º, 5º e 12º  $\mu$ enx *in vivo*). A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 120 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse **microestacas apicais de 1,5-3 cm de longo**. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
Control	26	14	8,33	1,25	0,72
		21	11,11	1,50	2,15
		28	13,89	1,41	3,99
		35	<b>13,89a</b>	<b>1,41</b>	<b>5,03</b>
1º $\mu$ enx <i>in vivo</i>	23	14	8,33	1,50	1,00
		21	8,33	1,50	2,65
		28	8,33	1,50	4,55
		35	<b>8,33a</b>	<b>1,50</b>	<b>5,00</b>
3º $\mu$ enx <i>in vivo</i>	15	14	8,33	1,00	0,25
		21	13,89	1,25	1,71
		28	16,67	1,40	3,05
		35	<b>16,67a</b>	<b>1,50</b>	<b>4,18</b>
	20	14	2,77	1,00	0,40
		21	13,89	1,00	1,55
		28	13,89	1,00	3,51
		35	<b>13,89a</b>	<b>1,00</b>	<b>4,05</b>
5º $\mu$ enx <i>in vivo</i>	11	14	0	-	-
		21	5,55	1,00	1,15
		28	5,55	1,00	3,00
		35	<b>5,55a</b>	<b>1,00</b>	<b>4,75</b>
	15	14	2,77	1,00	0,60
		21	2,77	1,00	3,10
		28	2,77	1,00	4,80
		35	<b>2,77a</b>	<b>1,00</b>	<b>7,50</b>
8º $\mu$ enx <i>in vivo</i>	7	14	2,77	1,00	0,30
		21	2,77	2,00	2,50
		28	5,55	1,50	2,55
		35	<b>5,55a</b>	<b>1,50</b>	<b>5,10</b>
	10	14	5,55	1,00	0,15
		21	11,11	1,00	1,66
		28	11,11	1,16	3,70
		35	<b>13,88a</b>	<b>1,44</b>	<b>3,23</b>
12º $\mu$ enx <i>in vivo</i>	3	14	8,33	1,00	0,27
		21	16,67	1,00	2,49
		28	16,67	1,00	4,00
		35	<b>16,67a</b>	<b>1,00</b>	<b>5,92</b>
	5	14	13,88	1,50	0,64
		21	16,67	1,80	2,03
		28	19,44	1,60	2,21
		35	<b>22,22a</b>	<b>1,43</b>	<b>3,18</b>
10	14	2,77	1,00	0,30	
	21	5,55	1,00	0,90	
	28	11,11	1,00	2,07	
	35	<b>11,11a</b>	<b>1,00</b>	<b>2,97</b>	

**Táboa 27.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon QRFa. Compáranse microestacas do material sen enxertar (control) con microestacas do material microenxertado en serie *in vivo* (1°, 3°, 5° e 12° *µenx in vivo*). A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 45 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse **microestacas nodais menores de 1 cm de longo**. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras distintas, dentro da mesma columna, indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
Control	34	14	0,00	-	-
		21	0,00	-	-
		28	0,00	-	-
		35	<b>0,00a</b>	-	-
1° <i>µenx in vivo</i>	31	14	2,77	2,00	1,50
		21	2,77	2,00	3,20
		28	2,77	2,00	5,70
		35	<b>2,77a</b>	<b>2,00</b>	<b>7,00</b>
3° <i>µenx in vivo</i>	28	14	13,89	1,33	0,60
		21	13,89	1,58	2,01
		28	13,89	1,75	4,59
		35	<b>16,67a</b>	<b>1,66</b>	<b>5,02</b>
5° <i>µenx in vivo</i>	26	14	5,55	1,50	1,00
		21	8,33	1,25	1,80
		28	13,89	1,11	3,07
		35	<b>13,89a</b>	<b>1,11</b>	<b>4,24</b>
8° <i>µenx in vivo</i>	22	14	2,77	1,00	1,00
		21	2,77	1,00	3,10
		28	2,77	1,00	6,50
		35	<b>2,77a</b>	<b>1,00</b>	<b>8,20</b>
12° <i>µenx in vivo</i>	18	14	2,77	1,00	1,30
		21	2,77	2,00	3,00
		28	2,77	2,00	4,30
		35	<b>2,77a</b>	<b>2,00</b>	<b>7,00</b>

Na Táboa 28 móstranse os resultados de enraizamento do clon MIÑO. A porcentaxe de enraizamento é menor do 30 % en tódolos casos, e en ningún dos ensaios se detectaron diferenzas significativas entre as microestacas do material control e as do material microenxertado, polo que o microenxerto, nas condicións ensaiadas, non permitiu mellorar a capacidade de enraizamento adventicio do material adulto.

**Táboa 28.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon MIÑO. Compáranse microestacas do material sen enxertar (control) con microestacas do material microenxertado en serie *in vivo* dúas veces (1º e 2º *µenx in vivo*). A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 120 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas nodais e apicais de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,01$ ).

Micropúas	Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
Nodais	Control	13	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	8,33	1,00	1,50
			28	12,50	1,00	2,18
			35	<b>12,50a</b>	<b>1,25</b>	<b>4,53</b>
	1º <i>µenx in vivo</i>	11	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	16,67	1,00	1,28
			28	16,67	1,17	2,05
			35	<b>20,83a</b>	<b>1,11</b>	<b>1,76</b>
	2º <i>µenx in vivo</i>	11	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	20,83	1,17	1,43
			28	20,83	1,17	1,97
			35	<b>20,83a</b>	<b>1,17</b>	<b>2,27</b>
Apicais	Control	16	7	0	-	-
			14	4,17	2,00	0,20
			21	8,33	2,00	0,70
			28	12,50	1,67	1,80
			35	<b>12,50a</b>	<b>1,67</b>	<b>2,57</b>
	1º <i>µenx in vivo</i>	14	7	0	-	-
			14	20,83	1,44	0,28
			21	25,00	1,83	1,03
			28	29,17	1,67	1,24
			35	<b>29,17a</b>	<b>2,00</b>	<b>1,40</b>
	2º <i>µenx in vivo</i>	14	7	0	-	-
			14	8,33	1,50	0,30
			21	20,83	1,33	0,70
			28	20,83	1,56	0,98
			35	<b>20,83a</b>	<b>1,56</b>	<b>1,23</b>

### 3.4.2 - Clons de *Castanea sativa*

#### *Clon EPS*

Na Táboa 29 móstranse os resultados do ensaio de enraizamento realizado no clon EPS, utilizando microestacas do material control e do material microenxertado en serie *in vivo*. Inicialmente, comparando a capacidade de enraizamento do material control en función do estado ontoxenético ( $EPS_{\text{copa}}$  vs  $EPS_{\text{base}}$ ), obsérvase que o material ontoxeneticamente máis xuvenil ( $EPS_{\text{base}}$ ) enraiza significativamente mellor que o máis maduro ( $EPS_{\text{copa}}$ ) ( $P < 0,01$ ).

Unha vez feitos os ensaios con microestacas procedentes de microenxerto, se se comparan os valores de enraizamento de  $EPS_{\text{copa}}$  control co material procedente de microenxerto *in vivo*, non se observan diferenzas na porcentaxe de enraizamento, independentemente do número de ciclos de microenxerto en serie realizados.

As primeiras raíces aparecen, na maior parte dos casos, ós 14 días da indución do enraizamento. O número e lonxitude das raíces acadan valores relativamente baixos, incluso para o material de  $EPS_{\text{base}}$ , que amosa uns valores moi semellantes ó material  $EPS_{\text{copa}}$ .

Por outra banda, no que atinxe ós ensaios de microenxerto *in vitro*, na Táboa 30 móstranse os datos do ensaio de enraizamento no que se compara o material control ( $EPS_{\text{copa}}$  e  $EPS_{\text{base}}$ ) co material de  $EPS_{\text{copa}}$  microenxertado en serie *in vitro* sobre  $EPS_{\text{base}}$ . Neste novo experimento, a diferenza entre o material da copa e o da base segue a ser significativa. No entanto, o microenxerto en serie *in vitro* non tivo efecto no enraizamento adventicio. Tampouco se observaron diferenzas en función de se o microenxerto foi realizado sobre patróns enraizados ou sobre patróns con calo basal.

Neste segundo experimento, os valores dos parámetros analizados son algo máis elevados que os do primeiro experimento, seguramente debido a que se utilizaron microestacas apicais, mentres que no outro se utilizaron microestacas nodais. Moore (1984) demostrou que as auxinas son sintetizadas no meristema apical, polo que a produción de auxina endóxena nos ápices puido ter influencia no mellor enraizamento.

Finalmente, na Táboa 31 pódense observar os resultados comparativos de enraizamento de microestacas procedentes do material control de EPS<sub>copa</sub> e do material EPS<sub>copa</sub> microenxertado en serie *in vitro*, esta vez sobre o clon XUV9. Do mesmo xeito que no experimento anterior, o microenxerto en serie *in vitro* non produce mellora no enraizamento. Tampouco se observaron diferenzas en función do tipo de patrón empregado (patróns enraizados ou patróns con calo basal).

**Táboa 29.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon EPS. Compáranse microestacas do material control (EPS<sub>base</sub> e EPS<sub>copa</sub>) (sen enxertar) con microestacas procedentes de material de EPS<sub>copa</sub> microenxertado en serie *in vivo* (1º, 2º e 4º µenx *in vivo*). A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante **120 s** nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas **nodais** de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras distintas, dentro da mesma columna, diferenciando maiúsculas (test t de Student) e minúsculas (test LSD), indican que existen diferenzas significativas (P<0,01).

Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
EPS <sub>copa</sub>	26	7	0,00	-	-
		14	11,11	1,25	0,40
		21	16,67	1,83	0,97
		28	22,22	1,83	1,66
		35	<b>27,78aB</b>	<b>2,18</b>	<b>2,18</b>
EPS <sub>base</sub>	30	7	0,00	-	-
		14	41,67	2,47	1,08
		21	63,89	2,83	1,83
		28	66,67	2,85	2,34
		35	<b>72,22A</b>	<b>2,83</b>	<b>2,48</b>
1º µenx <i>in vivo</i>	17	7	0,00	-	-
		14	2,78	1,00	0,20
		21	2,78	1,00	1,00
		28	5,55	1,00	1,35
		35	<b>5,55a</b>	<b>1,00</b>	<b>3,05</b>
2º µenx <i>in vivo</i>	5	7	0,00	-	-
		14	0,00	-	-
		21	5,55	1,00	0,65
		28	16,67	1,50	1,20
		35	<b>27,78a</b>	<b>1,36</b>	<b>1,58</b>
4º µenx <i>in vivo</i>	5	7	0,00	-	-
		14	5,55	1,00	0,40
		21	11,11	2,33	1,70
		28	13,89	2,00	3,19
		35	<b>16,67a</b>	<b>1,50</b>	<b>3,87</b>

**Táboa 30.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon EPS. Compáranse microestacas do material control (EPS<sub>base</sub> e EPS<sub>copa</sub>) (sen enxertar), con microestacas procedentes do material EPS<sub>copa</sub> microenxertado en serie *in vitro* sobre patróns enraizados (1º, 2º e 4º µenx *in vitro*) e sobre patróns con calo basal (4º µenx *in vitro*) do material EPS<sub>base</sub>. A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 60 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas **apicais** de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras distintas, dentro da mesma columna, diferenciando maiúsculas e minúsculas, indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Material	Patrón	SC	D	E (%)	N	L (cm)
EPS <sub>copa</sub>	-	36	7	0,00	-	-
			14	27,78	4,92	1,09
			21	41,66	5,20	2,12
			28	47,22	5,33	3,05
			35	<b>47,22aB</b>	<b>5,78</b>	<b>3,67</b>
	-	45	7	0,00	-	-
			14	20,00	3,94	0,58
			21	33,33	3,58	1,43
			28	36,67	3,87	2,43
			35	<b>43,33aB</b>	<b>3,72</b>	<b>3,21</b>
EPS <sub>base</sub>	-	49	7	0,00	-	-
			14	70,00	4,50	1,28
			21	100	4,97	2,29
			28	100	5,37	3,19
			35	<b>100A</b>	<b>5,43</b>	<b>4,20</b>
1º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de EPS <sub>base</sub>	4	7	0,00	-	-
			14	19,45	2,67	1,17
			21	44,44	2,60	1,71
			28	44,44	2,85	2,67
			35	<b>44,44a</b>	<b>3,08</b>	<b>3,49</b>
	-	12	7	0,00	-	-
			14	0,00	-	-
			21	12,50	2,00	0,60
			28	16,67	2,00	1,32
			35	<b>25,00a</b>	<b>3,17</b>	<b>2,05</b>
3º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de EPS <sub>base</sub>	4	7	0,00	-	-
			14	13,33	1,67	0,45
			21	26,67	2,50	1,04
			28	33,33	2,30	1,31
			35	<b>40,00a</b>	<b>2,19</b>	<b>1,60</b>
4º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de EPS <sub>base</sub>	1-2	7	0,00	-	-
			14	16,67	4,25	1,07
			21	36,67	3,82	1,60
			28	36,67	4,15	2,55
			35	<b>36,67a</b>	<b>4,02</b>	<b>3,88</b>
4º µenx <i>in vitro</i>	Calos de EPS <sub>base</sub>	4	7	0,00	-	-
			14	0,00	-	-
			21	8,33	6,50	1,85
			28	16,67	3,50	1,29
			35	<b>20,83a</b>	<b>2,88</b>	<b>1,90</b>

**Táboa 31.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon EPS. Compáranse microestacas do material control (EPS<sub>copa</sub>) (sen enxertar), con micropúas procedentes do material EPS<sub>copa</sub> microenxertado en serie *in vitro* sobre patróns enraizados (1º-2º, 3º e 4º µenx *in vitro*) e sobre patróns con calo basal (1º µenx *in vitro*) do clon XUV9. A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante **60 s** nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas **apicais** de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Material	Patrón	SC	D	E (%)	N	L(cm)
EPS <sub>copa</sub>	-	45	7	0,00	-	-
			14	20,00	3,94	0,58
			21	33,33	3,58	1,43
			28	36,67	3,87	2,43
			35	43,33a	3,72	3,21
1º-2º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de XUV9	25-6	7	0,00	-	-
			14	4,17	1,00	sd
			21	16,67	1,00	sd
			28	25,00	3,28	1,65
			35	25,00a	3,94	2,38
3º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de XUV9	5	7	0,00	-	-
			14	4,17	3,00	sd
			21	12,50	2,25	sd
			28	16,67	2,17	1,97
			35	16,67a	2,17	3,38
4º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de XUV9	3	7	0,00	-	-
			14	8,33	1,00	sd
			21	12,50	1,50	sd
			28	16,67	2,00	2,08
			35	16,67a	2,00	2,73
1º µenx <i>in vitro</i>	Calos de XUV9	25	7	0,00	-	-
			14	12,50	6,00	sd
			21	25,00	5,67	sd
			28	37,50	3,97	2,23
			35	41,67a	4,25	3,14

*Clon SISTO*

Na Táboa 32 móstranse os resultados dos ensaios de enraizamento no clon SISTO, comparando os valores do material control cos do material microenxertado en serie *in vivo* dúas veces. Nos ensaios de enraizamento analizáronse dous tempos de inmersión diferentes na disolución auxínica.

Dun xeito semellante ó que sucede no clon EPS, o microenxerto *in vivo* en serie non produce mellora na porcentaxe de enraizamento.

Respecto ó microenxerto *in vitro* do clon SISTO sobre patróns do material EPS<sub>base</sub>, nun primeiro experimento (Táboa 33), non se atoparon diferenzas no enraizamento do material control e do material microenxertado unha vez, tanto nos microenxertos feitos sobre patróns enraizados coma os realizados sobre patróns con calo basal.

Nun segundo experimento, realizando microenxerto en serie *in vitro* (Táboa 34), o material procedente do 4º microenxerto en serie amosa unha porcentaxe de enraizamento significativamente superior á do material control e á do material procedente do 1º microenxerto *in vitro*. Aínda así, trátase de valores de enraizamento que se poden considerar moi baixos, non superándose o 17% de media no 4º microenxerto da serie. Esta última proba foi repetida (datos non mostrados), non atopándose diferenzas significativas entre o material control e o microenxertado.

**Táboa 32.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon SISTO. Compáranse microestacas do material control (sen enxertar) con micropúas do material microenxertado en serie *in vivo* dúas veces (1º e 2º *µenx in vivo*). A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante **45 e 120 s** nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse microestacas nodais de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna e de cada tempo de inmersión basal, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD ( $P < 0,01$ ).

Ti	Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
45 s	Control	9	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	11,11	1,00	1,30
			28	11,11	1,00	2,35
			35	<b>11,11a</b>	<b>1,00</b>	<b>4,44</b>
	1º <i>µenx in vivo</i>	5	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	0	-	-
			28	0	-	-
			35	<b>2,78a</b>	<b>1,00</b>	<b>0,70</b>
	2º <i>µenx in vivo</i>	3	7	0	-	-
			14	0	-	-
21			0	-	-	
28			0	-	-	
35			<b>0a</b>	-	-	
120 s	Control	16	7	0	-	-
			14	0	-	-
			21	2,78	1,00	2,50
			28	8,33	1,00	3,15
			35	<b>11,11a</b>	<b>1,00</b>	<b>3,15</b>
	1º <i>µenx in vivo</i>	12	7	0	-	-
			14	4,17	1,00	0,70
			21	4,17	1,00	3,10
			28	8,33	1,50	3,85
			35	<b>8,33a</b>	<b>1,50</b>	<b>4,85</b>
	2º <i>µenx in vivo</i>	10	7	0	-	-
			14	0	-	-
21			0	-	-	
28			0	-	-	
35			<b>2,78a</b>	<b>1,00</b>	<b>1,50</b>	

**Táboa 33.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon SISTO. Compáranse micropúas do material control (sen enxertar), con micropúas do material microenxertado *in vitro* (µenx *in vitro*) sobre patróns enraizados enraizadas e sobre patróns con calo basal do material EPS<sub>base</sub>. A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante 120 s nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse micropúas nodais e apicais de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras iguais, dentro da mesma columna e de cada tempo de inmersión basal, indican que non existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Microestacas	Material	Patrón	SC	D	E (%)	N	L (cm)
Nodais	Control	-	16	7	0	-	-
				14	0	-	-
				21	2,78	1,00	2,50
				28	8,33	1,00	3,15
				35	11,11a	1,00	3,15
	1º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de EPS <sub>base</sub>	3	7	0	-	-
				14	2,78	1,00	0,40
				21	5,56	1,00	1,00
				28	13,89	1,67	1,98
				35	13,89a	1,67	3,06
	1º µenx <i>in vitro</i>	Calos de EPS <sub>base</sub>	2	7	0	-	-
				14	0	-	-
21				0	-	-	
28				0	-	-	
35				0a	-	-	
Apicais	Control	-	18	7	0	-	-
				14	8,33	1,75	0,60
				21	16,67	1,33	1,68
				28	19,45	1,28	2,56
				35	19,45a	1,28	3,91
	1º µenx <i>in vitro</i>	Micropúas enraizadas de EPS <sub>base</sub>	5	7	0	-	-
				14	16,67	1,50	0,56
				21	16,67	1,78	1,87
				28	22,22	1,73	2,78
				35	22,22a	1,80	4,76
	1º µenx <i>in vitro</i>	Calos de EPS <sub>base</sub>	4	7	0	-	-
				14	8,33	1,75	0,63
21				11,11	1,75	2,18	
28				11,11	1,75	4,40	
35				11,11a	1,75	5,43	

**Táboa 34.** Porcentaxe de enraizamento (E), número de raíces por brote enraizado (N) e lonxitude da raíz máis longa (L), ós 7, 14, 21, 28 e 35 días (D) dende a indución do enraizamento, no clon SISTO. Compáranse microestacas do material control (sen enxertar), con micropúas do material microenxertado en serie *in vitro* sobre patróns enraizados (1º, 3º e 4º µenx *in vitro*) do clon EPS<sub>base</sub>. A indución do enraizamento realizouse mediante inmersión basal durante **60 s** nunha disolución de 1 mg/mL de AIB, e posterior introdución en medio GD 1/3. Utilizáronse micropúas **apicais** de 1,5-3 cm de longo. Indícase o número de subcultivo (SC) para cada tipo de material no momento de realizar o ensaio de enraizamento. Letras diferentes, dentro da mesma columna, indican que existen diferenzas significativas segundo o test LSD (P<0,01).

Material	SC	D	E (%)	N	L (cm)
Control	31	7	0	-	-
		14	0	-	-
		21	0	-	-
		28	0	-	-
		35	0b	-	-
1º µenx <i>in vitro</i>	19	7	0	-	-
		14	0	-	-
		21	0	-	-
		28	0	-	-
		35	0b	-	-
3º µenx <i>in vitro</i>	7	7	0	-	-
		14	0	-	-
		21	4,17	1,00	1,90
		28	4,17	1,00	4,30
		35	8,33ab	1,50	3,40
4º µenx <i>in vitro</i>	5	7	0	-	-
		14	8,33	1,50	0,40
		21	12,50	1,50	1,45
		28	16,67	1,33	1,28
		35	16,67a	1,33	1,48

### 3.5 - Utilidade teórica do microenxerto en serie *in vivo* en ciclos curtos

Independentemente do posible efecto de rexuvenecemento estudado no presente traballo, o microenxerto *in vivo* en serie en ciclos curtos pode ter outras utilidades prácticas de interese. En primeiro lugar, esta técnica permite aumentar de forma considerable a dispoñibilidade de material para introducir *in vitro* con respecto ó simple forzado de segmentos de rama. Se tomamos, por exemplo, o caso do microenxerto *in vivo* en serie do clon de carballo QRFa, tendo en conta que a porcentaxe media de prendemento dos enxertos, incluíndo os feitos con brotes procedentes de forzado, se encontra arredor dun 80 %, que cada enxerto achega unha media de 4,22 novos explantos e que cada ciclo de microenxerto se realiza cada 40 días, poderíase expresar o número de explantos (E) obtidos tras ‘n’ ciclos do seguinte xeito:

$$E = G \times (0,8 \times 4,22)^n = G \times 3,376^n$$

, sendo G o número de enxertos iniciais cos que partimos.

Por exemplo, se se realizasen 10 enxertos iniciais, e se propuxese a produción para un ano ( $n = 9$ ), conseguiríase obter preto de 570.000 explantos. Obter ese número de explantos simplemente a partir de forzado esixiría un número moi elevado de segmentos de rama, o que implicaría en moitos casos a destrución total da planta nai.

O número mínimo de ciclos necesario para obter un determinado número de explantos calcularíase seguindo a seguinte fórmula:

$$n = \frac{\text{Ln}\left(\frac{T}{R}\right)}{\text{Ln}(3,376)}$$

Outra utilidade práctica é a produción directa de planta enxertada. No caso de utilizar a técnica para este fin, ás plántulas obtidas no último dos ciclos de microenxerto planificados engadiranse as que se foron obtendo nos sucesivos ciclos, xa que as plantas que foron enxertadas e que se utilizaron como fonte de púas para os seguinte microenxertos adoitan rebrotar a partir de xemas dos restos remanentes de púa que quedaron sobre o patrón. Incluíndo estas plantas que rebrotan, a expresión matemática que permitiría calcular o número total de plantas enxertadas e prendidas no clon QRFa é a seguinte:

$$0,8 \times R + 0,8 \times R \times (0,8 \times 4,22) + 0,8 \times R \times (0,8 \times 4,22)^2 + \dots + 0,8 \times R \times (0,8 \times 4,22)^{n-1} =$$

$$= 0,8 \times R \times (1 + (3,376) + (3,376)^2 + \dots + (3,376)^{n-1}) = 0,8 \times R \times \left( \frac{(3,376)^{(n-1)+1} - 1}{3,376 - 1} \right) =$$

$$= 0,8 \times R \times \left( \frac{3,376^n - 1}{2,376} \right) [1]$$

Coa expresión [1] pódese calcular o número de plantas que, teoricamente, teríamos dispoñibles, en función do número de ciclos de enxerto e do número de microenxertos iniciais. Na Táboa 35 exemplifícase a obtención de planta enxertada ó longo de un ano partindo de 10 microenxertos iniciais.

**Táboa 35.** Número de plantas enxertadas obtidas en función do número de ciclos de enxerto, partindo de 10 enxertos iniciais (G).

Nº de ciclos	Nº de plantas totais
	G = 10
1	8,00
2	35,01
3	126,19
4	434,01
5	1473,21
6	4981,55
7	16825,72
8	56811,64
9	<b>191.804,09</b>



## V - DISCUSIÓN

### 1 - Consideracións sobre a introdución *in vitro* do material vexetal utilizado neste traballo

Nalgúns dos clons utilizados neste estudo foi necesario facer unha introdución *in vitro*, pois non se dispuña dun stock dese material no laboratorio. Nos experimentos realizados en dita fase, comprobouse que a porcentaxe de contaminación foi moito máis elevada cando se introduciu material directamente do exterior que cando se obtivo de forzado de segmentos de rama. No primeiro caso, contamináronse preto do 90 % dos explantos, mentres que no material procedente de forzado a contaminación non superou en ningún dos dous casos o 10 %. Asemade, cando se fixeron introducións *in vitro* de brotes procedentes de microenxertos *in vivo* a porcentaxe de contaminación foi sempre baixa, non superando en ningún caso o 25 % dos explantos contaminados. Estes resultados son de esperar, tendo en conta que os brotes obtidos mediante forzado de segmentos de rama e mediante microenxerto *in vivo* xorden en condicións de cámara de cultivo, onde a concentración de microorganismos activos ou as súas formas de resistencia é moito menor que no campo, onde se recolleu o material para introducir brotes directamente da árbore. Resultados semellantes foron obtidos en castiñeiro por Ferrador *et al.* (2005) comparando material introducido procedente do campo e de invernadoiro. Segundo Skirvin *et al.* (1999), unha porcentaxe de contaminación do 90-100 % é bastante común cando se introduce material directamente do exterior.

Respecto ó forzado de segmentos de rama, no caso do clon centenario de carballo QRFa, os segmentos de rama do último ano de crecemento non produciron brotes aproveitables, mentres que os segmentos de rama de madeira de máis de un ano, e os de madeira de máis de un ano con ramificacións de madeira do último ano si o fixeron. Nestes últimos, a madeira do último ano nunca produciu brotes. Os brotes procederon sempre de xemas dormentes de anos precedentes ou de xemas epicórmicas, situadas normalmente nas ramas máis grosas. Isto seguramente sexa así porque estas teñen máis reservas de nutrientes, o que favorece un mellor desenvolvemento das xemas máis próximas, en detrimento das situadas nas ramas máis finas. Noutros estudos en carballo chegouse mesmo a usar seccións do tronco para forzar o desenvolvemento de brotes epicórmicos que serviron para obter explantos para introducir *in vitro* (Evers *et al.*, 1996a).

En canto á reactividade dos explantos en relación coa desinfección, esta foi máis elevada cando se empregou o proceso de desinfección con menos tempo de inmersión nos desinfectantes (etanol e lixivia con 0,8 % Cl activo). Isto pode deberse, entre outras razóns, a que o material procedente de forzado presenta un baixo grao de lignificación, polo que o contacto tanto co etanol como co hipoclorito sódico deteriora de xeito importante os tecidos, o cal pode afectar á supervivencia dos explantos e, en consecuencia, á súa reactividade. Usando o tratamento menos agresivo, a porcentaxe de contaminación apenas aumentou, polo que parece o máis axeitado para desinfectar os brotes procedentes de forzado antes da súa introdución *in vitro*. Dun xeito semellante, en microbrotes de *Pinus radiata*, Fraga *et al.* (2002a) estudaron a contaminación e a necrose de explantos desinfectados con distintas concentracións de NaClO (1; 5; 12,5 e 25 g·L<sup>-1</sup>) durante 15 min, obtendo os mellores resultados con 5 g·L<sup>-1</sup>. Concentracións máis altas aumentaban moito a porcentaxe de explantos necrosados, mentres que coa concentración máis baixa aumentaba moito a porcentaxe de explantos contaminados.

Para rematar, no que atinxe ós experimentos realizados na etapa de introdución *in vitro*, no ensaio de medio base, o medio WPM foi claramente máis efectivo que o GD. Xa noutros estudos se ten indicado a mellor adecuación do WPM para o cultivo *in vitro* de clons de carballo (Chalupa, 1993), aínda que se sabe que a resposta ó tipo de medio depende, en gran medida, do xenotipo.

## **2 - O recultivo do calo basal e as súas implicacións na multiplicación *in vitro***

### **2.1 - Modificación dos parámetros produtivos mediante o recultivo do calo basal**

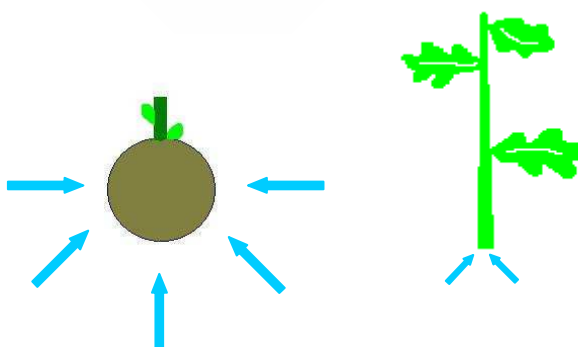
O aumento que se consegue nas taxas de multiplicación recultivando os segmentos nodais con calo basal prodúcese, evidentemente, porque se incorpora ó sistema un tipo de explanto que no subcultivo convencional, e seguindo o costume de subcultivar soamente explantos nodais e apicais de máis de 1 cm de lonxitude, sería desbotado.

Por outra banda, a alta produtividade deste tipo de explanto débese, probablemente, a que as xemas ou brotes que permanecen neste están recibindo achegas nutritivas durante máis tempo e en maior cantidade que no caso dos explantos convencionais. Cando un explanto é introducido nun medio de cultivo, este inicia a formación de calo basal como resposta ó corte. Dito calo exercerá a función de “raíz”,

absorbendo os nutrientes do medio con maior eficiencia que se o calo non se tivese formado. Durante boa parte do período entre subcultivos, mentres se forma o calo, prodúcese un lapso de tempo no que o brote apenas medra, sendo en xeral na segunda metade deste período cando se produce o maior grao de desenvolvemento. No caso dos explantos con calo basal, as xemas ou brotes son alimentados de forma máis eficaz dende o inicio do subcultivo, debido a que o calo xa está presente, achegando unha superficie de absorción relativamente elevada (Figura 78).

Isto sucede nos primeiros recultivos dun calo, pero a medida que o número de recultivos aumenta, a taxa de multiplicación descende de forma progresiva, principalmente nos clons adultos. É posible que este descenso se deba a unha perda progresiva da capacidade de absorción da masa de células do calo, a consecuencia do avance da necrose do tecido que o conforma, o que se aprecia visiblemente porque o calo vai tornando dunha cor clara a unha cor negruzca ó recultivalo sucesivamente. Este proceso dexenerativo obsérvase, igualmente, no feito de que ó aumentar o número de recultivos os calos comezan a desprender progresivamente pequenas porcións superficiais (é dicir, fanse friables), que se separan facilmente.

No entanto, nos clons xuvenís as taxas de multiplicación mantéñense a niveis altos durante un maior número de recultivos. Neste material tamén se produce unha dexeneración progresiva, con necrose do calo, pero esta é menos acusada debido, seguramente, á súa condición xuvenil.



**Figura 78.** Ilustración esquemática da diferenza na capacidade de absorción de nutrientes dun calo basal e dun explanto apical ó inicio dun ciclo de multiplicación.

Centrándonos inicialmente nos resultados obtidos nos clons de carballo TROBO, MUÍÑOS (adultos) e QRF73 (xuvenil), analizáronse nos explantos con calo o número

de brotes maiores de 1 cm, a lonxitude do brote máis longo e a porcentaxe de calos que se desbotan, como parámetros descritivos da produción de microbrotes. En canto ó número de brotes maiores de 1 cm, aprécianse valores máis elevados no clon xuvenil que nos clons adultos, manténdose elevados durante máis subcultivos. Isto permite pensar que nos explantos con calo do clon xuvenil as xemas remanentes brotan con maior facilidade, o que pode ser atribuído ó seu estado ontoxenético.

Adicionalmente, no primeiro recultivo, os brotes máis longos obtéñense a partir de calos tipo 3 (con microbrotes menores de 1 cm), o que fai que estes calos presenten xeralmente taxas de produción máis elevadas que os outros tipos de calo. Estes resultados son de esperar, xa que cando un calo deste tipo é introducido no medio de cultivo, o microbrote presenta un meristemo apical activo, mentres que nos outros calos, as xemas deben ser inducidas a agromar antes de iniciar o seu desenvolvemento.

Finalmente, outro parámetro que resulta relevante na produción de novos explantos é a porcentaxe de calos que se aproveitan en cada recultivo. O dato máis importante a extraer da análise deste parámetro é que as taxas de produción dos calos sen xemas visibles (tipo 1) son máis baixas, principalmente, pola elevada porcentaxe de calos deste tipo que se desbotan por non seren produtivos, e isto é así tanto nos clons adultos coma no xuvenil.

De forma xeral, os calos con xemas (tipo 2) aprovéitanse nunha porcentaxe moi alta e os calos con microbrotes menores de 1 cm (tipo 3) aprovéitanse sempre. Isto resulta lóxico, xa que os calos con xemas visibles e os calos con microbrotes menores de 1 cm teñen sempre puntos meristemáticos con capacidade de desenvólense, polo que é frecuente que produzan novos explantos.

Como xa se apuntou, nos calos sen xemas visibles, a produción de novos explantos vencéllese á existencia de xemas axilares remanentes que non son visibles, polo feito de atopárense na parte do brote rodeada polo tecido do calo. Isto dá lugar a que neste tipo de calos soamente se produzan brotes se ten lugar a condición anterior, o cal reduce a súa capacidade de produción simplemente pola probabilidade de que na parte do caule oculta polo calo non haxa xemas, ou porque estas vexan diminuída a súa capacidade de desenvolvemento por estaren rodeadas pola masa de calo.

No que atinxe ós resultados obtidos nos clons de castiñeiro, nos clons SISTO e EPS<sub>base</sub> (material procedente de rebentos basais do clon EPS) a capacidade de produción de brotes por parte dos explantos con calo parece depender máis da presenza ou non de xemas que do número de recultivos, xa que a calidade dos explantos producidos apenas se resinte nos sucesivos recultivos, ó contrario do que sucede no material de EPS<sub>copa</sub> (como ocurría nos clons de carballo). No material EPS<sub>copa</sub>, a diminución do número de calos ó longo dos sucesivos recultivos (sen diferenciar tipos de calo) é practicamente lineal, cunha pendente moi acusada.

A maior capacidade de recultivo que presentan os explantos con calo en castiñeiro con respecto ós de carballo foi tamén observada noutros estudos, nos que se utilizaban explantos recultivados de forma horizontal no medio de cultivo, como método para aumentar a taxa de multiplicación, realizándose os recultivos dun xeito semellante ó que se practica neste traballo cos calos basais (San José *et al.*, 1988; Sánchez *et al.*, 1997).

## **2.2 - Sobre a natureza (axilar ou adventicia) dos brotes que emerxen a través do calo**

No interior do calo dos explantos con calo que non presentan xemas visibles (tipo 1) poden existir xemas axilares ocultas. Se todos os brotes producidos polos calos sen xemas visibles procedesen de xemas axilares, entón, se a parte do explanto envolta polo calo é un entrenó (e polo tanto non leva xemas), un calo sen xemas visibles formado a partir dese fragmento non producirá novos brotes. Se o fíxese, os brotes terían que ser de natureza adventicia, co que habería que considerar o risco de mutación somaclonal derivado deste feito.

Os resultados obtidos no ensaio levado a cabo co clon de castiñeiro EPS (base) e co clon de carballo QRFa parecen confirmar que a orixe dos brotes que emerxen a través do calo é axilar, xa que en todos os casos nos que o calo rodeaba un entrenó nunca se observou produción de microbrotes.

Baseándose nestas observacións, é moi posible que o motivo polo cal no clon xuvenil de carballo a porcentaxe de calos sen xemas visibles que se aproveitan é menor cá nos clons adultos, sexa que neste clon os entrenós son máis longos, o que fai que exista maior probabilidade de que o fragmento de explanto que se introduce no medio

de cultivo, e ó redor do cal se desenvolve o calo basal, non leve xemas axilares, e polo tanto non produza brotes e sexa desbotado.

Pódese concluir que os microbrotes que emerxen a través do calo proceden con unha probabilidade moi alta de xemas de orixe axilar que quedan ocultas dentro do mesmo, non debendo existir problemas derivados da aparición de brotes adventicios, polo feito de recultivar calos sen xemas visibles. En todo caso, se se decidise prescindir do recultivo deste tipo de calos, a produción practicamente non se resentiría, xa que estes calos son os menos frecuente e teñen unha taxa de multiplicación moi reducida. Por outra parte, nos calos con xemas visibles ou con xemas e brotes menores de 1 cm, raramente aparecen brotes que emerxen a través do calo.

### **2.3 - Implicacións produtivas e económicas do uso dos explantos con calo basal**

O uso de explantos con calo permite, en tódolos clons utilizados neste estudo (tanto de carballo como de castiñeiro), aumentar de forma notable a produtividade do sistema de micropropagación por cultivo *in vitro*, como tamén foi observado noutros estudos semellantes (Sánchez, 1991).

Para ilustralo dun xeito práctico, se considerásemos un período de produción de un ano de duración, recultivando os calos varias veces, a produción de explantos enraizables sería, en practicamente tódolos clons estudados, da orde de 100 veces maior que usando soamente explantos convencionais. Dende o punto de vista estritamente produtivo sería aconsellable recultivar os calos basais o máximo número de veces posible mentres produzan novos explantos nodais e apicais. Tendo en conta o aspecto económico, o recultivo do calo basal permite obter explantos nodais e apicais a un menor custo unitario, por canto o custo está relacionado de forma inversa co número de plantas producidas (Pachauri e Dhawan, 1989), aínda que non sempre é aconsellable recultivar tódolos tipos de calo nin tódalas veces posible.

### 3 - Microenxerto *in vitro* e *in vivo* en carballo e castiñeiro

#### 3.1 - Contaminación de patróns procedentes de landras obtidos *in vitro*

Como patróns para o microenxerto *in vitro* dos clons adultos de carballo utilizáronse landras que foron inicialmente sometidas a un proceso de desinfección. Os resultados mostran que, incluso tras o tratamento de desinfección, se contamina unha porcentaxe relativamente elevada de landras, sendo útiles pouco máis do 50 % do total. Estes resultados son parecidos ós obtidos por Canan *et al.* (2006) ó introducir sementes de pistacho para utilizar como patróns *in vitro*, onde tamén obtiveron porcentaxes de contaminación elevadas e de xerminación relativamente baixas.

O uso de patróns *in vitro* de 3-4 semanas conleva o risco de aparición de contaminación microbiana tras a realización do microenxerto, mesmo se este se fai en condicións de esterilidade. Noutros estudos tamén se mencionan altos niveis de contaminación na realización de microenxertos *in vitro* con material procedente do exterior tras un proceso de desinfección (Amiri, 2006).

O tratamento de desinfección de sementes utilizando NaClO (0,5-1% de Cl activo) durante 15-20 minutos para a súa utilización na realización de microenxertos *in vitro* é habitual (Abousalim e Mantell, 1992; Huang *et al.*, 1992b; Katoh *et al.*, 2004). Noutros casos, a concentración de NaClO aumenta, chegando ata o 2% de Cl activo durante 20 min (Amiri, 2006) ou incluso ó 5% durante 15 min (Bandeira *et al.*, 2006). En todo caso, cómpre resaltar que, igual que sucedeu neste traballo, pequenas variacións nos tipos de desinfectantes e no tempo de permanencia neles conducen a unha notable variación nos resultados de contaminación e/ou xerminación (Canan *et al.*, 2006).

#### 3.2 - Prendemento dos microenxertos

##### 3.2.1 - Consideracións xerais

De xeito práctico, cando as xemas da púa dun microenxerto comezan a desenvolverse e dan novos brotes, confírmase o prendemento do mesmo. Previamente pódese intuír se un microenxerto prende cando se observa na zona de unión a formación de calo, pois é a primeira vía de subministración de auga para a púa antes de que se forme a conexión vascular entre a púa e o patrón (Hartmann *et al.*, 1997).

Ás veces as xemas da púa non se desenvolven, permanecendo sen agromar durante un tempo máis ou menos prolongado; isto seguramente sucede porque a conexión vascular entre a púa e o patrón é inicialmente débil, o que impide a suficiente achega de nutrientes para que as xemas se desenvolvan, pero que é dabondo para que a púa non se deseque. En todo caso, cando un microenxerto non prende, a púa desécase e/ou necrócase rapidamente.

De forma xeral, neste estudo observouse o inicio do desenvolvemento dos microenxertos entre 1 e 3 semanas tras a realización dos mesmos. Hsina e El Mtili (2009), traballando coa especie *Ceratonia siliqua*, observaron que despois de dúas semanas de realizar microenxertos *in vitro* os cortes histolóxicos demostran a iniciación da unión mediante o desenvolvemento de calo de cicatrización, a través da división celular dos tecidos do patrón e da púa. Varios días máis tarde, a diferenciación celular comeza nas células do parénquima da púa e do patrón, localizadas preto dos tecidos vasculares danados. A unión totalmente funcional obsérvase un mes despois de enxertar, cando as xemas da púa comezan a desenvolverse, momento no que se aprecian vasos e traqueidas como elementos vasculares formados *de novo* tras o microenxerto. A dinámica do proceso de prendemento descrito seguramente sexa moi semellante á que ten lugar no noso estudo, pois o aillamento dos primeiros brotes realizouse ós 30-45 días tras a realización do microenxerto.

Cando os microenxertos non prenden, isto pode deberse principalmente a un contacto deficiente entre o cambium da púa e do patrón, ou a un mal manexo do material á hora de realizar o microenxerto, que afecta principalmente á púa, aínda que tamén pode ter influencia, nalgúns casos, a produción de fenóis por parte das superficies cortadas (Ramanayake e Koor, 1999; Dobránszki *et al.*, 2000). Finalmente, aínda que non é habitual, tamén se poden producir fenómenos de incompatibilidade, a cal pode ter lugar dentro dun mesmo xénero (Canan *et al.*, 2006) ou incluso dentro da mesma especie (Oraguzie *et al.*, 1999).

De forma global, a porcentaxe de prendemento dos microenxertos realizados neste traballo pode considerarse elevada. Aínda así, en certos casos, como no microenxerto *in vivo* de castiñeiro a partir de brotes de forzado ou de repouso vexetativo, a porcentaxe de prendemento foi baixa (10-30%). Seguramente, o manexo inadecuado do material á hora de realizar os microenxertos ou un estado fisiolóxico non

óptimo teñen sido as principais razóns da baixa porcentaxe de prendemento observada nestes casos, pois non se observou excesiva produción de fenois nas superficies cortadas, e os fenómenos de incompatibilidade intraespecífica non adoitan ser comúns en castiñeiro (Oraguzie *et al.* 1999).

### **3.2.2 - Prendemento dos microenxertos *in vitro*. Importancia da natureza do patrón e da púa**

#### **3.2.2.1 - Sobre os patróns**

Unha observación importante é que a porcentaxe de prendemento dos microenxertos *in vitro* variou notablemente en función da especie, pois se no carballo se obtiveron medias do 25-53 %, no castiñeiro foron do 67-100 %. Cómpre ter en conta que os patróns utilizados para cada especie foron obtidos de forma diferente, pois en carballo introducíronse directamente landras *in vitro* e no castiñeiro utilizáronse microbrotes enraizados ou explantos con calo xa establecidos *in vitro*.

As plántulas de carballo obtidas *in vitro* para servir de patróns son relativamente grandes e difíciles de manipular na cámara de fluxo laminar, ademais de constituír un material non adaptado plenamente ás condicións *in vitro*. Estes factores puideron ter influído no menor prendemento dos clons de carballo. Así mesmo, manipular as plántulas sen danar o seu sistema radicular require certa destreza, o cal xa mencionou Monteuuis (1994) na realización de microenxertos de *Picea abies*.

Nos microenxertos *in vitro* de castiñeiro, pola contra, os patróns son máis pequenos e fáciles de manipular, ademais de estar xa adaptados ás condicións *in vitro* e cultivados en condicións idénticas ás do material que se utiliza como púa. Dentro dos patróns *in vitro*, os patróns con calo e sen raíces son de máis fácil manexo, xa que nos patróns con raíces estas adoitan romper con certa frecuencia durante o proceso de microenxerto. Debido a isto, nalgúns traballos o microenxerto faise en patróns sen raíces, provocándose o enraizamento adventicio cando o microenxerto xa foi realizado (Huang *et al.*, 1992b; Nunes *et al.*, 2005).

Na maior parte dos estudos de microenxerto *in vitro* utilízanse sementes introducidas *in vitro* que, unha vez xerminadas, se empregan como patrón (Pliego-Alfaro e Murashige, 1987; Monteuuis, 1995b; Luo e Gould, 1999; Thimmappaiah *et al.*, 2002; Katoh *et al.*, 2004; Onay *et al.*, 2004; Can *et al.*, 2006; Chabukswar e Deodhar,

2006; Wu *et al.*, 2007; Farahani *et al.*, 2011; Padilla e Encina, 2011, entre outros); nun menor número de traballos empréganse microbrotes cultivados *in vitro* e enraizados (Misson e Giot-Wirgot, 1986; Huang *et al.*, 1992b; Fraga *et al.*, 2002a; Lê, 2004). Aínda que os patróns do primeiro tipo aforran o proceso de introducir e multiplicar *in vitro* o material xuvenil, no presente traballo, coas especies e técnicas de microenxerto utilizadas, a segunda opción proporcionou mellores resultados de prendemento.

Asemade, como xa foi dito, o feito de realizar os microenxertos sobre plántulas procedentes de semente complica o proceso en canto a que se traballa con material que aínda pode presentar contaminación despois do proceso de desinfección, mentres que cando se utiliza material establecido *in vitro*, ese problema practicamente desaparece. En certos casos, as plántulas requiren uns tratamentos intermedios antes de seren utilizadas como patrón, como por exemplo a sección da raíz principal, algo que sucedeu neste traballo e noutros estudos de microenxerto *in vitro* (Abousalim e Mantell, 1992; Huang *et al.*, 1992a; Khalafalla e Daffalla, 2008).

Outra diferenza importante entre utilizar patróns procedentes de semente ou patróns enraizados *in vitro* (estes últimos xeralmente do mesmo xenotipo) é que no primeiro caso estamos a utilizar moitos xenotipos diferentes. Tendo en conta que a capacidade dun patrón xuvenil para rexuenerar o material adulto podería estar relacionada co xenotipo do patrón, do mesmo xeito que outros factores inherentes ó xenotipo, como a capacidade de enraizamento adventicio ou de embrioxénese, as posibilidades de atopar un patrón adecuado para rexueneamento son maiores utilizando moitos clons que uns poucos.

Algo común a moitos estudos, e que tamén se menciona neste traballo, é que, unha vez feitos os microenxertos, se deben eliminar os brotes que xorden das xemas do patrón (Huang *et al.*, 1992a e 1992b; Revilla *et al.* 1996; Farahani *et al.*, 2011), para evitar a competencia en crecemento coas xemas da púa.

### 3.2.2.2 - Sobre as púas

Con respecto ás micropúas de material adulto, estas obtivéronse de material xa establecido *in vitro*, o que é común á maioría dos estudos de microenxerto *in vitro*. Aínda así, en certos estudos téñense usado brotes recollidos directamente do exterior e sometidos a un proceso de desinfección (Huang *et al.*, 1992b; Monteuis, 1995b;

Mnoney e Mantell, 2001; Danthu *et al.*, 2002; Fraga *et al.*, 2002a; Padilla e Encina, 2011). Esta soamente sería unha opción a escoller no caso de que non se poida dispoñer de material establecido *in vitro*, xa que a porcentaxe de contaminación usando púas obtidas no exterior aumenta considerablemente (Amiri, 2006) e, en condicións similares, a porcentaxe de prendemento é maior cando as púas proceden de microbrotes *in vitro* que cando estas son obtidas *in vivo* (Danthu *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2005; Aazami e Hassanpouraghdam, 2010).

Na maior parte dos estudos que utilizaron unha técnica de microenxerto *in vitro* comparable á deste traballo o prendemento foi elevado, como por exemplo en *Sequoia sempervirens* (Huang *et al.*, 1992b), *Pistacia vera* (Abousalim e Mantell, 1992; Onay *et al.*, 2004), *Gossypium hirsutum* (Luo e Gould, 1999), *Anacardium occidentale* (Thimmappaiah *et al.*, 2002), *Ziziphus mauritiana* (Danthu *et al.*, 2004), *Eucalyptus spp.* (Bandeira *et al.*, 2006), *Garcinia indica* (Chabukswar e Deodhar, 2006), *Protea cynaroides* (Wu *et al.*, 2007) e *Sterculia setigera* (Niang *et al.*, 2010), entre outros, obténdose porcentaxes de prendemento superiores ó 80 %. En principio, as condicións ambientais do cultivo *in vitro*, en canto a humidade, temperatura e iluminación, resultan adecuadas para unha óptima formación do calo de cicatrización a nivel da unión, así coma para o posterior desenvolvemento da púa.

Nalgúns estudos nos que se realizaron microenxertos en serie *in vitro*, o prendemento aumentou co número de ciclos de microenxerto, mentres que noutros casos (Danthu *et al.*, 2002) non foi así. No presente traballo, o número de ciclos de microenxerto non tivo influencia sobre as porcentaxes de prendemento. A duración dos ciclos de microenxerto en serie *in vitro* nos clons de carballo e castiñeiro estudados foi duns 35-40 días, moi parecida á citada noutros estudos similares (Danthu *et al.*, 2002; Chabukswar e Deodhar, 2006; Niang *et al.*, 2010).

Unha vez que prenden, os microenxertos *in vitro* poden necesitar, para o seu correcto desenvolvemento, un suplemento de BA. Isto foi posto de manifesto en estudos de microenxerto *in vitro* de pistacho (Onay *et al.*, 2004), onde o mellor desenvolvemento de brotes dos microenxertos se obtivo engadindo BA ó medio, mentres que en medio sen hormona non se produciron brotes. Neste traballo, concentracións de 0,1 mg·L<sup>-1</sup> e 0,2 mg·L<sup>-1</sup> de BA funcionaron ben en castiñeiro e carballo, respectivamente.

### 3.2.3 - Prendemento dos microenxertos *in vivo*. A orixe das púas, o estado fisiolóxico, a lignificación e os ciclos de enxerto

Ó contrario do que sucedía nos microenxertos *in vitro*, a porcentaxe de prendemento dos microenxertos *in vivo* foi maior, en xeral, nos clons de carballo que nos de castiñeiro.

Nalgúns clons de carballo, a porcentaxe de prendemento foi moi alta, como no clon QRFa, superando medias do 80 %, o cal non é doado de obter tendo en conta que o prendemento en especies leñosas non adoita ser superior ó 70 % (Dobránszki *et al.*, 2000), e que noutros estudos en carballo (Sánchez, 1991) as porcentaxes de prendemento obtidas foron moito menores (10%).

En castiñeiro, soamente se obtiveron bos resultados nos clons LOURA e PAREDE (65 % de prendemento medio), mentres que nos clons EPS e SISTO a porcentaxe de prendemento non superou como media o 30 %, sendo este valor moi similar ó obtido por Sánchez (1991) nesta mesma especie, con medias do 30-55 %. No entanto, noutros estudos con castiñeiro, utilizando plántulas de máis idade e púas de maior tamaño (Giovannelli e Giannini, 2000), o prendemento chegou a un 80 % e, noutras especies, como en *Acacia koa* (Nelson, 2006), utilizando unha técnica semellante, a porcentaxe de prendemento acadou o 70 %.

Nos nosos ensaios, a porcentaxe de prendemento variou en función de diferentes factores, coma o tipo e estado de lignificación dos brotes utilizados como púas, e o xenotipo da púa.

No presente estudo, os patróns utilizados nos microenxertos *in vivo* foron sempre plántulas procedentes de landras ou castañas, con 3-4 semanas dende a xerminación. Os patróns utilizados noutros estudos de (micro)enxerto *in vivo* con fins de rexuvenecemento adoitan ter máis idade, entre 6 e 12 meses (Siniscalco e Pavolettoni, 1988; Monteuis, 1995b; Giovannelli e Giannini, 2000) ou máis dun ano (Moon e Yi, 1993).

En canto á orixe da púa, en castiñeiro, os brotes de forzado non resultaron axeitados no noso caso para seren utilizados como púas no primeiro microenxerto, pois adoitan ter un diámetro excesivo e entrenós demasiado curtos. O crecemento dos microenxertos *in vivo* de castiñeiro foi irregular, acadando lonxitudes de crecemento

baixas (o que os fai pouco adecuados para obter novas púas), e necesitándose períodos de tempo excesivamente longos para completar os ciclos de microenxerto en serie, especialmente se se comparan coa duración do ciclos no microenxerto de carballo neste mesmo traballo. Parece que foi a inadecuación dos brotes utilizados como púas a principal causa do baixo prendemento, máis que fenómenos de incompatibilidade que non adoitan darse nin sequera entre diferentes especies do xénero *Castanea* (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2000) e que, cando se dan, non adoitan manifestarse ata pasado certo tempo tralo enxerto (Rutter *et al.*, 1990).

Como se dixo anteriormente, no castiñeiro, o microenxerto *in vivo* soamente funcionou ben nos clons LOURA e PAREDE, pero hai que ter en conta que a diferenza dos outros clons da mesma especie, nestes casos, para o primeiro microenxerto da serie se utilizaron micropúas procedentes de microbrotes cultivados *in vitro*, cunha morfoloxía que resultaba probablemente máis axeitada para servir de púas que os brotes de forzado utilizados nos outros clons. Outro factor que puido ter influído no maior prendemento é que o subcultivo continuo dos clons LOURA e PAREDE (que se prolonga dende o ano 1995) fixese que as súas condicións fisiolóxicas favorecesen, igualmente, o prendemento. Aínda así, o desenvolvemento dos microenxertos *in vivo* que prenderon foi, coma no caso dos outros clons de castiñeiro, bastante reducido. Con intención de solventar este problema aplicouse GA<sub>3</sub> sobre os ápices das púas en crecemento, xa que un dos efectos coñecidos das xiberelinas é a elongación dos entrenós (Métraux, 1987). Isto resultou un éxito, pois no noso caso permitiu aumentar significativamente a lonxitude dos entrenós, facilitando así a preparación de novas púas para continuar as series de microenxertos e para obter explantos para introducir *in vitro*. Deste xeito, en moitos casos, a aplicación de disolucións de GA<sub>3</sub> en microenxertos *in vivo* pode resultar de gran utilidade, como xa ocorreu noutros traballos (Bulley *et al.*, 2005; Cárdenas-Hernández *et al.*, 2010), Noutros estudos (Rache-Cardenal *et al.*, 2008) o GA<sub>3</sub> utilizouse para facer agromar as xemas da púa, non obténdose diferenzas cos microenxertos ós que non se lles aplicou a hormona.

O xenotipo da púa tamén pode afectar ó éxito dos microenxertos (Kato *et al.*, 2004; Aazami e Hassanpouraghdam, 2010), o que queda patente observando os resultados de prendemento dos microenxertos *in vivo* dos clons MIÑO e QRFa, pois en condicións idénticas a diferenza de prendemento é notable. Se no primeiro caso nunca se supera o 50 %, no segundo nunca se descende do 60 %, acadando neste último, case

sempre, valores por encima do 80 %. Aínda así, comparar xenotipos pode ser pouco fiable en plantas de idades diferentes, xa que a idade fisiolóxica do material utilizado como púa pode influír decisivamente no prendemento (Danthu *et al.*, 2002).

O estado fisiolóxico e de lignificación no momento de realizar o microenxerto poden ser cruciais. En canto ó estado fisiolóxico no momento de realizar o microenxerto, as xemas da púa non deben estar agromando, pois produciríase unha demanda de nutrientes que o patrón, ó non ser o prendemento instantáneo, non podería cubrir. De feito, en ocasións nas que o prendemento baixou sen coñecerse as causas (3º e 4º microenxertos *in vivo* nos clons LOURA e TROBO, respectivamente) dito descenso puido ser debido a este feito.

Tamén se observa que a porcentaxe de prendemento do primeiro ciclo de microenxertos, no clon QRFa, realizado con púas procedentes de brotes en repouso vexetativo foi menor ca nos microenxertos realizados con brotes procedentes de forzado. O estado fisiolóxico dos brotes en repouso vexetativo parece menos axeitado para o enxerto, mentres que no caso das púas procedentes de forzado (e nas que se obteñen nos seguintes ciclos), o estado de actividade vexetativa fai que a reacción á ferida e a velocidade de cicatrización sexan mellores, o que deriva nunha maior porcentaxe de prendemento. Como excepción, no caso do primeiro microenxerto *in vivo* do clon SISTO, obtivéronse valores de prendemento nulos ou moi baixos tanto utilizando brotes de forzado (0 %) como en repouso vexetativo (12 %).

Por outra banda, o grao de lignificación das púas e dos patróns é un factor a ter en conta á hora de realizar os microenxertos e ten, seguramente, unha influencia importante no éxito dos mesmos (Nelson, 2006). Se se utilizan púas nun estado moi herbáceo, estas dóbranse ó introducilas no patrón, e pódense romper, facendo a púa inutilizable. Un maior grao de lignificación non só facilita a preparación da púa e a súa inserción no patrón, senón que tamén pode diminuír o proceso de desecamento que se produce despois do corte e preparación da púa e antes do prendemento do microenxerto. No entanto, un grao de lignificación excesivo fai que o corte sexa máis complicado de facer, que sexa menos preciso, e que os tecidos tendan a quebrar, o que dificulta a fusión posterior de púa e patrón.

O grao de lignificación do patrón tamén pode influír no prendemento (Luo e Gould, 1999), pois un estado óptimo permite unha doada preparación da fendedura e

unha adecuada suxección da púa na mesma. Por exemplo, plántulas con 2 meses de idade xa se consideran excesivamente lignificadas para realizar microenxerto *in vivo* en *Acacia koa* (Nelson, 2006).

No que atinxe á influencia do ciclo de microenxerto sobre o prendemento, como ocorre no caso do microenxerto *in vitro*, nalgúns estudos de microenxerto en serie *in vivo* a porcentaxe de prendemento tende a aumentar co número de microenxertos (Siniscalco e Pavolettoni, 1988; Fraga *et al.*, 2002a). Noutros casos (Giovannelli e Giannini, 2000; Danthu *et al.*, 2002), esa porcentaxe non varía. No presente estudo, nos clons TROBO e MUÍÑOS, obsérvase que do primeiro ós seguintes microenxertos *in vivo* da serie, a porcentaxe de prendemento tende a aumentar. Débese ter en conta que as púas do primeiro microenxerto proceden de cultivo *in vitro*, mentres que nos seguintes microenxertos as púas proceden do desenvolvemento das púas de microenxertos precedentes que medraron *in vivo* na cámara de crecemento. Isto fai sospeitar que o estado fisiolóxico das púas procedentes de cultivo *in vitro* pode resultar menos adecuado para os microenxertos *in vivo* que as púas obtidas do crecemento de microenxertos anteriores. Segundo Bonga (1992), o material procedente de cultivo *in vitro* é difícil de aclimatar debido a que non posúe suficiente cera epicuticular e ten estomas anormais, o que pode resultar nunha excesiva deshidratación e nun mal control do intercambio gasoso. Asemade, as plantas cultivadas *in vitro* son parcialmente heterótrofas, posuíndo unha baixa capacidade de fixación de CO<sub>2</sub>. Estes desordes poden afectar, en certa medida, ás púas empregadas no primeiro microenxerto. As púas usadas nos seguintes microenxertos xa estarían adaptadas ás condicións da cámara de crecemento, polo que a súa condición fisiolóxica sería máis adecuada para o microenxerto.

No noso traballo, a duración dos ciclos do microenxerto en serie foi variable, duns 40 días no caso do carballo, e como mínimo de 60 días no do castiñeiro. Nos clons de castiñeiro LOURA e PAREDE a duración foi moi parecida, pero nos clons EPS e SISTO, da mesma especie, a duración aumentou moito, chegando a necesitarse, nalgunha ocasión, máis de 6 meses para poder facer o seguinte ciclo. Salvo nestes dous clons, a duración dos ciclos de microenxerto é moito máis reducida ca noutros estudos, onde os períodos entre enxertos sucesivos chegan a ter un ano de duración (Giovannelli e Giannini, 2000).

Pódese concluir que, de xeito global, utilizando a metodoloxía proposta neste estudo, o microenxerto *in vitro* de castiñeiro ofrece unhas porcentaxes de prendemento máis elevadas que *in vivo*, permitindo ademais reducir a duración dos ciclos de microenxerto. Resultados parecidos foron obtidos noutras especies, coma *Acacia mangium* (Monteuuis, 1995b).

### **3.3 - ¿Resulta efectivo o microenxerto como técnica de rexuvenecemento no material ensaiado?**

#### **3.3.1 - O efecto do microenxerto sobre a taxa de multiplicación *in vitro***

##### **3.3.1.1 - Nos clons de *Quercus robur***

A observación de que nos clons TROBO e MUÍÑOS o microenxerto, *in vitro* e *in vivo*, non teña afectado á taxa de multiplicación podería explicarse polo feito de que estes clons foron introducidos *in vitro* fai máis de dez anos, tendo acadado plenamente a estabilización *in vitro*, e presentando, posiblemente, antes dos experimentos de microenxerto, un certo grao de rexuvenecemento debido ó subcultivo continuo (Hackett 1987; Bonga e Von Aderkas, 1992). Existe a posibilidade de que se o microenxerto se tivese realizado ó pouco tempo da introdución *in vitro*, se observase un efecto de revigorización que no presente estudo non se apreciou porque o grao de rexuvenecemento provocado polo subcultivo continuo foi o suficientemente elevado como para levar ó material a un nivel de rexuvenecemento difícil de superar.

Pola contra, no clon QRFa si se aprecia un aumento da taxa de multiplicación a medida que aumenta o número de microenxertos da serie. Este efecto decae tras os primeiros subcultivos, tendendo a igualarse a taxa de multiplicación coa do material control a medida que transcorre o tempo, o cal parece indicar que o proceso de revigorización é transitorio, confirmando os resultados doutros estudos en *Quercus robur* (Ballester e Meier-Dinkel, 1990; Sánchez, 1991; Ewald e Najouks, 1997; Sánchez *et al.*, 1997).

O feito de que no clon MIÑO o microenxerto tampouco teña tido efectos sobre a taxa de multiplicación tras someter o material a dous microenxertos consecutivos *in vivo* podería deberse a que o número de microenxertos puido ter sido insuficiente para provocar efectos apreciáveis, xa que, por exemplo, no clon QRFa a mellora non foi patente ata o 3º microenxerto e, noutros estudos, os parámetros de micropropagación

tardan máis ciclos de microenxerto en presentar melloras respecto ó material control (Huang *et al.*, 1992b).

### 3.3.1.2 - Nos clons de *Castanea sativa*

No clon SISTO, como nos clons de carballo, a causa de que non se teña producido mellora algunha tras realizar dous microenxertos en serie pode ser debida a que o número de microenxertos resultou insuficiente para conseguir un efecto detectable sobre a taxa de multiplicación.

No entanto, no clon EPS (copa), aínda que o microenxerto *in vivo* non tivo efecto sobre a taxa de multiplicación durante os 14 primeiros subcultivos, si se observou que, nos subcultivos 21 a 29 a taxa de multiplicación media do material procedente de material microenxertado 3 veces *in vivo* era significativamente superior á do material control e ó microenxertado unha vez. Estes resultados son difíciles de atribuír a un efecto do microenxerto, que normalmente debería detectarse xa dende o aillamento e introdución *in vitro* do material da púa. Quizais, o proceso de estabilización *in vitro* que segue á introdución (non esquezamos que neste caso se parte de material introducido *in vitro* por primeira vez) puido ter enmascarado o efecto do microenxerto nos primeiros subcultivos, pois a taxa de multiplicación adoita flutuar de xeito importante na estabilización (McCown e McCown, 1987), o que dificultaría a detección dun posible efecto de revigorización. En todo caso, os valores máis altos da taxa de multiplicación dos explantos de EPS<sub>copa</sub> procedentes do material microenxertado distan moito dos valores medios obtidos no material procedente de rebentos basais do mesmo clon (EPS<sub>base</sub>), polo que a revigorización observada sería só parcial.

De xeito semellante, Giovannelli e Giannini (2000) obtiveron un aumento do número de microbrotes por explanto, e da lonxitude dos mesmos, ó aumentar o número de subcultivos, en material que tiña sido enxertado en serie *in vivo* 4 veces, obténdose os valores máximos de multiplicación só tras 12 subcultivos no primeiro parámetro e 24 no segundo. A partir do subcultivo 36, estes valores volveron diminuír de xeito significativo. Tanto no estudo mencionado como no noso traballo a taxa de multiplicación do material que foi sometido a enxerto non mellorou inmediatamente despois da súa introdución *in vitro*, senón que o fixo despois de transcurrido un certo número de subcultivos. Na nosa opinión, o estudo citado previamente presenta aspectos que fan discutibles as conclusións ás que chegan os autores. Por exemplo, os valores de

multiplicación do material que fora sometido a enxerto non se compararon cos do mesmo material sen enxertar, polo que o aumento dos valores dos parámetros de multiplicación podería ser debido en parte ó proceso de estabilización *in vitro*, acompañado do posible efecto de rexuvenecemento do subcultivo continuo, e non ó enxerto, como ditos autores afirman. Por outra banda, os autores non mencionan cal pode ser a causa de que os efectos do enxerto só sexan detectables tras ter transcorrido un bo número de subcultivos.

Respecto ós efectos do microenxerto *in vitro*, obsérvase que o microenxerto de material da copa do clon EPS ( $EPS_{\text{copa}}$ ) sobre patróns de material da base ( $EPS_{\text{base}}$ ) enraizados *in vitro* provoca un aumento significativo das taxas de multiplicación nos 2 primeiros subcultivos tras o reallamento. É dicir, neste caso, ó contrario do que ocurría co material microenxertado *in vivo*, o presumible efecto do microenxerto é inmediato. Agora ben, este efecto desaparece rapidamente, a partir do terceiro subcultivo. Noutros estudos (Siniscalco e Pavolettoni, 1988), a revigorización producida polo enxerto en serie desapareceu un ano despois de realizar os enxertos, polo que o efecto de revigorización se prolongou por un tempo notablemente máis longo que o conseguido no noso caso.

No que atinxe á importancia que a presenza de raíces nos patróns pode ter sobre o posible efecto do microenxerto, neste traballo, de forma xeral, non se encontraron diferenzas entre o material procedente de microenxertos realizados sobre patróns enraizados e o de microenxertos realizados sobre patróns con calo basal, o que induce a pensar que as raíces non son responsables do aumento transitorio da taxa de multiplicación, senón que dito efecto sería máis ben consecuencia da influencia dun factor non producido polas raíces do patrón, que permitiría aumentar o vigor de crecemento durante ó menos 2 subcultivos. Existen outros estudos onde o microenxerto sobre patróns xuvenís sen raíces (Revilla *et al.*, 1996) provocan igualmente revigorización gradual.

Algo semellante sucede cando se realiza microenxerto do material da copa do clon EPS sobre o clon xuvenil XUV9. Os explantos procedentes de material microenxertado presentan unha taxa de multiplicación máis elevada que o control durante os 2 primeiros subcultivos, que logo volve descender a valores non significativos en subcultivos posteriores.

Estes resultados contrastan cos obtidos por Huang *et al.* (1992a,b), onde o microenxerto produciu unha mellora persistente nos parámetros de multiplicación *in vitro*.

No outro clon de castiñeiro estudado, o clon SISTO, o microenxerto sobre patróns enraizados da base do clon EPS (EPS<sub>base</sub>) non produciu aumento da taxa de multiplicación respecto do material control. E mesmo rechamante que a realización de 2, 3 e 4 microenxertos en serie parece ter un efecto negativo sobre a multiplicación, pois os valores diminúen significativamente respecto dos do material control e do microenxertado unha soa vez. En vista da aparente incongruencia que representaría atribuír ó microenxerto este efecto negativo, inclinámonos pola hipótese de que algún factor non recoñecido, como por exemplo, algún tipo de contaminación endóxena non detectada, poida ser o responsable destes resultados.

### **3.3.2 - O efecto do microenxerto sobre o enraizamento *in vitro***

#### **3.3.2.1 - Nos clons de *Quercus robur***

A falta de efecto do microenxerto, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre o enraizamento nos clons adultos de carballo podería achacarse a distintas causas.

Nos clons TROBO e MUÍÑOS, como no caso das taxas de multiplicación, o microenxerto puido non ter efecto debido a que estes clons xa tiñan sido sometidos a un subcultivo continuo prolongado, o que puido levalos a acadar un grao de rexuvenecemento difícil de sobrepasar. De feito, no clon MUÍÑOS, a porcentaxe de enraizamento do material control pode considerarse elevada (70,83%) tendo en conta a capacidade de enraizamento adventicio que presenta xeralmente o material adulto de carballo. Agora ben, nos clons QRFa e MIÑO, que foron introducidos *in vitro* ó iniciárense ós experimentos de microenxerto, é dicir, que non foran sometidos a previamente a subcultivo continuo, tampouco melloraron significativamente as porcentaxes de enraizamento tras o microenxerto.

O clon MIÑO foi sometido unicamente a 2 microenxertos consecutivos, o que podería ser insuficiente para mellorar o enraizamento, se atendemos a outros estudos de microenxerto en serie (Mneney e Mantell, 2001; Husen e Pal, 2003). No clon QRFa, con todo, fixéronse 12 microenxertos *in vivo* en serie, sen terse acadado un aumento nas taxas de enraizamento do material procedente dos microenxertos. Polo tanto, ou ben o

microenxerto non foi quen de provocar rexuvenecemento e, como consecuencia, un aumento da capacidade de enraizamento, ou ben a baixa porcentaxe de enraizamento está intimamente ligada ó xenotipo do clon QRFa, de tal xeito que este manifestaría unha baixa capacidade de enraizamento adventicio mesmo nun estado ontoxenético máis xuvenil, polo que o efecto do microenxerto non sería apreciable.

### 3.3.2.2 - Nos clons de *Castanea sativa*

As causas polas que nos clons de castiñeiro o microenxerto en serie, realizado *in vivo* ou *in vitro*, tampouco provocou aumento das porcentaxes de enraizamento *in vitro* son probablemente da mesma natureza que as apuntadas para o carballo.

Deste xeito, no microenxerto *in vivo* do clon SISTO pode suceder algo parecido ó que sucedía co clon MIÑO de carballo, en que o número de microenxertos en serie puido ter sido insuficiente para obter unha resposta, aínda que neste caso o número de microenxertos en serie practicados foi maior (4).

Nalgúns estudos, 2 microenxertos son suficientes para conseguir un aumento nas porcentaxes de enraizamento, por exemplo en *Annona cherimola* (Padilla e Encina, 2011) e *Ziziphus mauritiana* (Danthu *et al.*, 2004); noutros casos fixeron falta 3 microenxertos, como en *Sequoia sempervirens* (Huang *et al.*, 1992b) e *Faidherbia albida* (Danthu *et al.*, 2002). No entanto, nas especies *Garcinia indica* (Chabukswar e Deodhar, 2006) e *Citrus reticulata* (Huang *et al.*, 1992a), non se obtivo enraizamento ata o 5º microenxerto, e na última, o rexuvenecemento foi parcial ata que se fixeron 10 microenxertos en serie. Os resultados mencionados indican que a resposta de distintas especies ó microenxerto é moi variable, polo que é posible que, como xa se dixo, o número de microenxertos necesarios para observar un efecto sobre a rizoxénese fose insuficiente nalgún dos nosos experimentos.

Outros autores (Danthu *et al.*, 2002) atribúen o efecto de revigorización do microenxerto á proximidade da púa ó sistema radicular do patrón, o que permitiría unha mellor achega de auga, minerais e reguladores do crecemento. Esta hipótese foi tamén apuntada noutros estudos (Franclet *et al.*, 1987; Arnaud *et al.*, 1993). No entanto, o microenxerto *in vitro* de material adulto de oliveira sobre patróns xuvenís non enraizados tamén permitiu recuperar temporalmente a capacidade de enraizamento do material adulto (Revilla *et al.*, 1996), polo que a hipótese de que son as raíces as

responsables de dita recuperación non se sostén neste caso. Nos nosos experimentos, non foi posible avaliar a importancia da presenza das raíces no efecto de rexuvenecemento, no que atinxe á recuperación da capacidade de enraizamento adventicio, pero si se determinou, como foi discutido precedentemente, que o aumento transitorio das taxas de multiplicación non estaba relacionado coa presenza de raíces no patrón.

O feito de que, en diversos traballos, o rexuvenecemento a través do microenxerto en serie sexa gradual fai pensar que, de existir un factor de rexuvenecemento producido polo patrón xuvenil, o efecto de reversión da maduración podería depender do grao de dilución de determinados factores, ou da creación dunha nova clase de células nos tecidos meristemáticos rexuvenecidos (Mneney e Mantell, 2001). O que é evidente é que, unha vez que o material procedente do novo crecemento da púa pasa a un proceso de multiplicación *in vitro*, e a mellora na taxa de enraizamento persiste no tempo (Huang *et al.*, 1992a, 1992b; Chang *et al.*, 2010), non pode ser debido simplemente a unha achega de promotores do enraizamento por parte do patrón, xa que o material enxertado deixaría de recibir esas achegas unha vez separado do mesmo, e a porcentaxe de enraizamento tendería a diminuír progresivamente. Polo tanto, naqueles estudos que avalían a capacidade de enraizamento inmediatamente despois de reaiñar explantos a partir das púas, o cal é común na maior parte de estudos de microenxerto (Pliego-Alfaro e Murashige, 1987; Greenwood *et al.*, 1989; Ewald e Kretschmar, 1996; Revilla *et al.*, 1996; Mneney e Mantell, 2001; Danthu *et al.*, 2002; Danthu *et al.*, 2004; Chabukswar e Deodhar, 2006; Zaczek *et al.*, 2006; Padilla e Encina, 2011), deberíase ter en conta que a achega puntual de posibles factores de rexuvenecemento (reguladores do crecemento, nutrientes, etc.) por parte do patrón xuvenil podería ter un efecto de aumento transitorio do enraizamento que non significaría, necesariamente, que se acadase un rexuvenecemento estable, o que xa apuntaban Pliego-Alfaro e Murashige (1987) ó estudar o microenxerto en *Persea americana*, e que máis tarde demostraron Padilla e Encina (2011) na especie *Annona cherimola*.

Neste traballo, o feito de que non se conseguise mellorar a capacidade rizoxénica do material adulto microenxertado tras sucesivos microenxertos sobre material xuvenil, podería deberse, adicionalmente ós factores discutidos previamente, a algún dos seguintes factores xerais:

- Que, sendo o cambio de fase máis estable nunhas especies que noutras, o que viría apoiado polo feito de que en certas especies se produce, polo menos, un rexuvenecemento relativamente permanente (Huang *et al.*, 1992a, 1992b), mentres que noutras non persiste no tempo (Padilla e Encina, 2011), as especies *Quercus robur* e *Castanea sativa* atoparíanse entre as especies que presentan unha maior resistencia á reversión do cambio de fase.
- Que o tamaño das púas empregadas teña sido excesivamente grande. A miniaturización parece ser un aspecto de bastante relevancia (Monteuuis, 2011), xa que canto maior é o illamento do domo meristemático, maior é o grao de independencia dos controis correlativos exercidos polos tecidos adultos. No entanto, púas de 1,5 cm foron suficientes para obter rexuvenecemento a través do microenxerto en serie nalgúns especies, como *Sequoia sempervirens* (Huang *et al.*, 1992b).
- Que a capacidade para inducir rexuvenecemento por parte do patrón sexa dependente do xenotipo. Esta hipótese ten sentido nos microenxertos *in vitro*, se se utilizan como patrón un número reducido de xenotipos. No entanto, no microenxerto *in vivo* sobre plántulas cada patrón ten un xenotipo único, polo que sería menos probable que a falta de efecto estivese relacionada cunha baixa capacidade do xenotipo do patrón para inducir rexuvenecemento no material adulto.

### 3.4 - Posibilidades prácticas do uso do microenxerto *in vivo* en ciclos curtos

O período entre series de microenxertos *in vivo* neste estudo pode considerarse curto no tempo (40 días en carballo, 60 días en castiñeiro), en comparación cos que se citan noutros traballos, nos que a duración adoita ser de un ano (Moon e Yi, 1993; Giovannelli e Giannini, 2000; Husen e Pal, 2003; Zaczek *et al.*, 2006).

Este feito fai que, independentemente do posible efecto de rexuvenecemento que poida provocar (previamente discutido), o microenxerto en serie en ciclos curtos desenvolvido neste traballo presente outras utilidades de interese. Por exemplo, nos casos en que os microenxertos prenden e se desenvolven de forma axeitada, permite aumentar de forma considerable a cantidade de material dispoñible para introducir *in vitro*, se o comparamos, por exemplo, co forzado de segmentos de rama.

Outro uso posible é a produción directa de planta enxertada en grandes cantidades e en pouco tempo. Se se utilizase a técnica para este fin, disporíase non só dos novos microenxertos realizados en cada serie, senón que a estes se sumarían as plantas que foron enxertadas nas series previas e que, tras seren utilizadas como fonte de púas para os seguintes microenxertos, adoitan rebrotar a partir de xemas que se atopan no resto de púa que queda, tras o reallamento dos brotes, na planta enxertada.

De xeito máis específico, no castiñeiro pode resultar interesante o microenxerto de variedades de froito sobre patróns resistentes á tinta. Neste caso, os patróns deben ser obtidos mediante propagación vexetativa, e a altura á que se fará o microenxerto debe ser maior que a indicada no sistema experimental desenvolvido no presente traballo, de modo que se poida asegurar a protección da púa perante a infección do fungo, pois a zona do enxerto podería quedar moi preto do chan e mesmo podería acabar entrando en contacto con este ó instalar a planta na súa localización definitiva.

No caso do carballo, como se indicou na introdución, a propagación de variedades ornamentais de *Quercus robur* 'Fastigiata' adóitase facer por enxerto sobre patróns de 1-2 anos de idade (Kothencz *et al.*, 2001; Obdržálek *et al.*, 2006), o que implica a necesidade de ter planificada a sementeira dos patróns como mínimo un ano antes de facer os enxertos. En cambio, empregando o microenxerto *in vivo* en ciclos curtos, proposto neste estudo, pódense tomar brotes de forzado como material de partida para o primeiro ciclo de enxertos e usar plántulas como patrón, sen ter que esperar un ano para iniciar a produción de planta enxertada. Para dispoñer de patróns de xeito regular é suficiente manter sementes estratificadas en frío e planificar as sementeiras en función do momento dos distintos ciclos de enxerto.

Finalmente, de xeito xeral, este sistema de produción de planta enxertada pode ser de gran utilidade cando se desenvolven programas nos que se pretende a rápida propagación de xenotipos *plus*, podendo mesmo prescindirse do uso da micropropagación, pois en poucos meses é posible unha cantidade de plantas moi elevada. Sirva como exemplo que no clon de carballo QRFa, empregado no presente traballo, se calculou unha produción potencial dunhas 20.000 plantas ó ano partindo dun só enxerto inicial.



## VI - CONCLUSIÓNS

### 1 - O recultivo do calo basal

- 1.1 O recultivo do calo basal en carballo e castiñeiro permite un aumento notable da produción a menor custo unitario por microbrote producido. Do punto de vista económico, os calos sen xemas visibles, nos tres clons de carballo estudados, non se deben recultivar.
- 1.2 O número de veces que se pode recultivar un calo depende do xenotipo e da idade ontoxénética. A perda de capacidade produtiva está relacionada coa necrose do calo e é máis rápida nos clons adultos que nos xuvenís.
- 1.3 A taxa de multiplicación que se obtén recultivando o calo basal estabilízase entre 5 e 8 subcultivos tras a introdución *in vitro*.
- 1.4 Os microbrotes procedentes do recultivo do calo basal garanten a fidelidade clonal. En tódolos casos analizados, os calos que rodean explantos sen xemas axilares non producen microbrotes.

### 2 - O microenxerto

- 2.1 Nas condicións ensaiadas neste traballo, en carballo, o microenxerto *in vivo* achega, en termos de porcentaxes de prendemento, mellores resultados que o microenxerto *in vitro*. En castiñeiro ocorre o contrario.
- 2.2 O grao de lignificación de púa e patrón é importante no éxito dos microenxertos *in vivo*. É mellor traballar con patróns pouco lignificados e púas algo lignificadas. O grao de lignificación dos microbrotes procedentes do recultivo do calo basal é máis axeitado que o daqueles obtidos por subcultivo convencional.

- 2.3 En castiñeiro, as púas de brotes de forzado son menos axeitadas para os microenxertos *in vivo* que os microbrotes de cultivo *in vitro*. En carballo, as púas de brotes de forzado son máis axeitadas que os brotes en repouso vexetativo.
- 2.4 Aínda que o microenxerto *in vivo* é máis doado de realizar, o microenxerto *in vitro* permite acelerar o microenxerto en serie (especialmente en castiñeiro) e a obtención de explantos. En xeral, o reallamento de explantos das púas nos microenxertos *in vitro* realízase ós 35-40 días da realización do microenxerto. A duración dos ciclos de microenxerto *in vivo* en carballo encóntrase arredor dos 40 días, prolongándose ata 60 días ou máis no caso do castiñeiro.
- 2.5 A aplicación de GA<sub>3</sub> no ápice da púa dos microenxertos *in vivo* de castiñeiro aumenta significativamente a lonxitude dos entrenós, reducindo a duración dos ciclos de microenxerto e facilitando a obtención de explantos para introdución *in vitro*.
- 2.6 O microenxerto *in vitro* permite aumentar temporalmente a taxa de multiplicación no clon EPS nos primeiros subcultivos. Neste mesmo clon, o microenxerto *in vivo* provoca tamén un aumento significativo da taxa de multiplicación, mais esta vez o aumento detéctase tras a fase de estabilización *in vitro*. O microenxerto resultou inefectivo nos outros clons ensaiados.
- 2.7 O microenxerto en serie, tanto *in vitro* como *in vivo*, resultou ineficaz para mellorar as porcentaxes de enraizamento *in vitro* do material adulto ensaiado.
- 2.8 O microenxerto *in vivo* en serie constitúe unha ferramenta útil para a obtención de planta enxertada en grandes cantidades e como alternativa ao forzado de segmentos de rama para a obtención de explantos para cultivo *in vitro*.

**VII - BIBLIOGRAFÍA**

- AAZAMI MA e HASSANPOURAGHDAM MB (2010). *In vitro* micro-grafting of some iranian grapevine cultivars. *Rom.Biotech. Let.*, 15 (5): 5576-5580.
- ABOUSALIM A e MANTELL SH (1992). Micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Mateur). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 29: 231-234.
- ALIZADEH M e SINGH SK (2009). Molecular assesment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis spp.*) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. *Iranian J. Biotech.*, 7 (1): 37-44.
- AMIRI ME (2006). *In vitro* techniques to study the shoot-tip grafting of *Prunus avium* L. (cherry) var. Seeyahe Mashad. *J. Food Agric. Env.* Vol. 4 (1): 151:154.
- ANDERSON WC (1984). A revised tissue culture medium for shoot multiplication of Rhododendron. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 109: 343.
- APPELGREN M (1997). Field trials with oak (*Quercus robur*). *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*. Ed. European Commission.
- APPELGREN M e VINTLAND AR (1997). Light quality effects on root induction of oak *in vitro*. *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*. Ed. European Commission.
- ARNAUD Y, FRANCIET A, TRANVAN H e JACQUES M (1993). Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (Lamb) Endl: a review. *Ann. Sci. For.*, 50: 273-295.
- ARNHOLDT-SCHMITT B, HERTERICH S e NEUMANN KH (1995). Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot genome (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 809-815.
- BALL EA (1978). Cloning *in vitro* of *Sequoia sempervirens*. En: *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. Ed.. K.W. Huger, R.; Henke e M. Constantin. Techn. Inf. Centre, Springfield, Virginia, U.S.A., 259 pp.

BALLESTER A, BOURRAIN L, CORREDOIRA E, GONÇALVES JC, LÊ C, MIRANDA-FONTAÍÑA ME, SAN-JOSÉ MC, SAUER U, VIEITEZ AM e WILHELM E (2001). Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. *For. Snow Landsc. Res.*, 76 (3): 460-467.

BALLESTER A e MEIER-DINKEL A (1990). Micropropagation of *Quercus* species. Bridge, *COST 87 Micropropagation of Betula and Quercus. Initial reports of the woody plant working group*. Ed. F. O. Riordain. 39-75.

BALLESTER A, SÁNCHEZ MC, SAN JOSÉ MC, VIEITEZ FJ e VIEITEZ AM (1990). Development of rejuvenation methods for *in vitro* establishment, multiplication and rooting of mature trees. En: *Plant Aging: Basic and Applied Approaches*. Edited by R. Rodríguez *et al.*, Plenum Press, New York., 43-49.

BALLESTER A, SAN-JOSÉ MC, VIDAL N, FERNÁNDEZ-LORENZO JL e VIEITEZ AM (1999). Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenil and mature phases of chestnut. *Ann. Bot.*, 83: 619-629.

BANDEIRA FS, XAVIER A, OTONI WC e DIAS JMM (2006). Enxertia *in vitro* na propagação de clones de *Eucalyptus urophylla* e *E. grandis*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41 (2): 223-232.

BARBA M, CUPIDI A, LORETI S, FAGGIOLI F e MARTINO L (1995). *In vitro* micrografting: a technique to eliminate peach latent mosaic viroid from peach. *Acta Hort.*, 386: 531-535.

BARCELÓ-MUÑOZ A (1995). Micropropagación de aguacate (*Persea americana* Mill.). Aspectos histológicos del proceso de vitrificación. *Tesis doctoral*. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Málaga, España.

BELLAROSA R (1989). Oak. (*Quercus spp.*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol.V. Trees II. Ed. YPS Bajaj, 387-401.

BENSON E (2000). *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 36: 141-148.

BENSON E (1999). *Plant Conservation Biotechnology*. Ed. By Erica E. Benson. 309 pp.

- BIONDI S, CANCIANI L, DE PAOLI G e BAGNI H (1981). Shoot formation from bud cultures of mature chestnut. En Colloq. Intern. sur La Culture *In vitro* des Essences Forestières. IUFRO, Fontainebleau, France, AFOCEL, 181-185.
- BISOGNIN C, CICCOTTI AM, SALVADORI A, MOSER M, GRANDO MS e JARAUSCH W (2007). Effect of different strains of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ in susceptible and resistant *Malus* genotypes inoculated by *in vitro* grafting. *Bull. Insect.*, 60 (2): 205-206.
- BOLSTAD PV e LIBBY WJ (1982). Comparison of radiata pine cuttings of hedge and tree-form origin after 7 growing seasons. *Silvae Genet.*, 31: 9-13.
- BON M (1988). J 16: An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiol.*, 4: 381-387.
- BONGA JM (1982). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity, and rejuvenation. *Tissue Culture in Forestry*. Ed., J.M. Bonga e D.J. Durzan, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague, 387-412.
- BONGA JM e VON ADERKAS P (1992). *In vitro Culture of Trees*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 236 pp.
- BORZAN Ž (1993). Grafting of oaks with variegated leaves. *Ann. Sci. For.*, 50 (1): 351-355.
- BROSNAN CA, MITTER N, CHRISTIE M, SMITH NA, WATERHOUSE PM e CARROLL BJ (2007). Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 14741-14746.
- BUENO SCS, TOKUNAGA T, BERTI AJ, COUTINHO EL, MAIA AH e YAMANISHI OK (2009). Grafting compatibility among eleven chestnut cultivars and hybrids. *Acta Hort.*, 844: 127-132.
- BULLEY SM, WILSON FM, HEDDEN P, PHILLIPS AL, CROKER SJ e JAMES DJ (2005). Modification of giberellin biosynthesis in the grafted apple scion allows control of tree height independent of the rootstock. *Plant Biotech. J.*, 3 (2): 215-223.

- CANAN C, ÖZASLAN M, TÖREMEN H, SARP KAYA K e ISKENDER E (2006). *In vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. var. Siirt, on wild pistachio rootstocks. *J. Cell Mol. Biol.*, 5: 25-31.
- CÁRDENAS-HERNÁNDEZ JF, ÁLVAREZ-HERRERA JG, BARRAGÁN E e RIVERA CM (2010). Efecto del ácido giberélico y la 6-bencilaminopurina sobre el desarrollo de yemas en injertos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Agron. Colomb.*, 28 (1): 19-27.
- CARVALHO LC e AMANCIO S (2002). Antioxidant defense system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO<sub>2</sub> concentration. *Plant Sci.*, 162: 33-40.
- CASTILLO DE MEIER GM e BOVO OA (1989). Propagation of plants from the *in vitro* cultivation of nodal segments from epirhizal shoots and shoots of an adult tree *Pithecellobium scalare* (tatane, leguminosae). *Phyton*, 50 (1-2): 155-164,
- CELIK H, SERDAR U e BEYHAN N (2009). Studies on chestnut grafting with hand and hand-manual grafting units. *Acta Hort.*, 815: 205-210.
- CHABUKSWAR MM e DEODHAR MA (2006). Restoration of rooting competence in a mature plant of *Garcinia indica* through serial shoot tip grafting *in vitro*. *Sci. Hort.*, 108: 194-199.
- CHALUPA V (1981). Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. *Comm. Inst. For. Czsch.* 12: 255-271.
- CHALUPA V (1984). *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biol. Plant.*, 26: 374-377.
- CHALUPA V (1988). Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol. Plant.*, 30: 414-421.
- CHALUPA V (1990). Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Plant Cell Rep.*, 9: 398-401.

- CHALUPA V (1993). Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture. *Ann. Sci. For.*, 50 (1): 295-307.
- CHALUPA V (2000). *In vitro* propagation of mature trees of pedunculate oak (*Quercus robur*). *J. Forest Sci. UZPI (Czech Republic)*, 46 (12): 537-542.
- CHAMPAGNAT P (1980). *La greffe végétale*. En: CHAUSSAT R e BIGOT C. *La multiplication végétative des plantes supérieures*. Gauthier-villars Publishers, Paris: 99-114.
- CHANG IF, CHEN PJ, SHEN CH, HSIEH TJ, HSU YW, HUANG BL, KUO CI, CHEN YT, CHU HA, YEH KW e HUANG LC (2010). Proteomic profiling of proteins associated with the rejuvenation of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Prot. Sci.*, 8: 64.
- CHAUVIN JE e SALESSES G (1988). Advances in chestnut micropropagation (*Castanea* sp.). *Acta Hort.*, 227: 340-345.
- CHEVRE AM, GILL SS, MOURAS A e SALESSES G (1983). *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58 (1): 23-29.
- CORREDOIRA E (2002). *Desarrollo de sistemas embriogénicos en olmo y castaño*. Tese Doutoral. Universidade de Santiago de Compostela, España.
- CORREDOIRA E, BALLESTER A e VIEITEZ AM (2003). Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants. *Ann. Bot.*, 92: 129-136.
- CORTIZO M, ALONSO P, FERNÁNDEZ B, RODRÍGUEZ A, CENTENO ML e ORDÁS RJ (2004). Micrografting of mature stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. *Ann. For. Sci.* 61: 843-845.
- CRADDOCK JH e BASSI G (1999). Effect of clonally propagated interspecific hybrid chestnut rootstocks on short-term graft compatibility with four cultivars of italian "Marrone". *Acta Hort.*, 494: 207-212.
- DANTHU P, HANE B, SAGNA P e GASSAMA YK (2002). Restoration of rooting competence in mature *Faidherbia albida*, a Sahelian leguminous tree, through serial root sucker micrografting. *New Forests*, 24: 239-244.

- DANTHU P, TOURÉ MA, SOLOVIEV P e SAGNA P (2004). Vegetative propagation of *Ziziphus mauritiana* var. *Gola* by micrografting and its potential for dissemination in the Sahelian Zone. *Agroforest. Syst.*, 60: 247-253.
- DARIKOVA JA, SAVVA YV, VAGANOV EA, GRACHEV AM e KUZNETSOVA GV (2011). Grafts of woody plants and the problem of incompatibility between scion and rootstock (a review). *J. Sib. Fed. Univ. Biol.*, 1 (4): 54-63.
- DEBERGH PC (1988). Micropropagation of woody species - state of the art on *in vitro* aspects. *Acta Hort.*, 227: 287-295
- DEOGRATIAS JM, DOSBA F e LUTZ A (1989). Elimination of PVD, NRSV and CLSV from sweet cherries by mean of *in vitro* culture. *Acta Hort.*, 235: 189-190.
- DEOGRATIAS JM, LUTZ A e DOSBA F (1986). *In vitro* micrografting of shoot tips from juvenile and adult *Prunus avium* L. and *Prunus persica* (L.) Batsch to produce virus-free plants. *Acta Hort.*, 193: 139-146.
- DOBRÁNSZKI J, MAGYAR-TÁBORI K, LAZÁNYI J, JÁMBOR-BENCZÚR E (2000). Special micrografting method for apple. *COST 843: Quality enhancement of Plant Production through Tissue Culture, WG1: Developmental Biology of Regeneration, 1<sup>st</sup> Meeting*. Geisenheim, Germany.
- DOERING-SAAD C, NEWBURY HJ, BALE JS e PRITCHARD J (2002). Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J. Exp. Bot.*, 53: 631-637.
- DUNOYER P, BROSNAN CA, SCHOTT G, WANG Y, JAY F, ALIOUA A, HIMBER C e VOINET O (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J.*, 29: 1699-1712.
- EVERS P, HAANSTRA L, VERMEER E e VAN EEDEN S. (1996a). Influence of reversed phase change on micropropagation of *Quercus robur*. *Plant Tiss. Cult. Biotech.* 2 (3): 148-153.
- EVERS P, VAN LAAR J e VERMEER E (1996b). The small time window to obtain somatic embryogenesis in *Quercus robur*. IBN-DLO Research Institute for Forestry and Nature Research. Wageningen.

- EVERS P, VERMEER E e VAN EEDEN S (1993). Rejuvenation of *Quercus robur*. *Ann. For. Sci.*, 50: 330-335.
- EWALD D e KRETZSCHMAR U (1996). The influence of micrografting *in vitro* on tissue culture behaviour and vegetative propagation of old European larch trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44: 249-252.
- EWALD D e NAUJOKS G (1997). Sustainability of rejuvenation in larch and oak clones. *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*. Ed. European Commission.
- EWALD D (1997). Results of tissue culture methods aimed at the propagation of adult larch (*Larix* sp.). *COST 822, Development of integrated systems for large-scale propagation of elite plants using in vitro techniques, Report of activities.*: 40-47.
- EWALD D (1999). Methods aimed at Rejuvenation. *Federal Research Centre for Forestry and Forest Products, Institute for Forest Genetics and Forest Tree Breeding* (Eds). Internal Report.
- FARAHANI F, RAZEGHI S, PEYVANDI M, ATTAII S E MAZINAMI MH (2011). Micrografting and micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) Iranian cultivar: Zard. *Afr. J. Plant. Sci.*, 5 (11): 671-675.
- FAVRE JM e JUNCKER B (1987). *In vitro* growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 8: 49-60.
- FENNING TM, GARTLAND KMA e BRASIER CM (1993). Micropropagation and regeneration of English Elm, *Ulmus procera* Salisbury. *J. Exp. Bot.*, 44 (7): 1211-1217.
- FERAUD-KELLER C e ESPAGNAC H (1989). Conditions d'apparition d'une embryogenèse somatique des cals issus de la culture de tissus phase du chêne vert. (*Quercus ilex*). *Can. J. Bot.*, 67: 1066-1070.
- FERNÁNDEZ J, MIRANDA E e PEREIRA S (1995). Esquema de producción de materiales clonales forestales y frutales de castaño híbrido (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc. x *C. sativa* Mill.). *ITEA*, 91 (2): 56-70.
- FERNÁNDEZ JL, OTERO E e VEIGA M (2001). Micropropagación de clones seleccionados de *Quercus robur* L. *Actas del III Congreso Forestal Español. Tomo II:*

*Mejora Genética, viveros y repoblación forestal*. Ed. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. Granada (2001), 750-756.

FERNÁNDEZ-LORENZO JL e FERNÁNDEZ-LÓPEZ MJ (2005). Reinvigoration of mature *Castanea sativa* by micrografting onto a juvenile clone. *Acta Hort.*, 693: 293-298.

FERRADOR S, MARQUES G e GUEDES-PINTO H (2005). Endogenous contamination in micropropagation of *Castanea sativa* Mill. *Acta Hort.*, 693: 349-354.

FINNEGAN EJ, GINGER RK, PEACOCK WJ e DENNIS ES (1998). DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 223-247.

FINNEGAN EJ, PEACOCK WJ e DENNIS ES (1996). Reduced ADN methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Developmental Biology, 93: 8449-8454.

FRAGA MF, CAÑAL MJ, ARAGONÉS A e RODRÍGUEZ R (2002a). Factors involved in *Pinus radiata* D. Don. micrografting. *Ann. For. Sci.*, 59: 155-161.

FRAGA MF, CAÑAL MJ e RODRÍGUEZ R (2002b). *In vitro* morphogenic potential of differently aged *Pinus radiata* trees correlates with polyamines and DNA methylation levels. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 70: 139-145.

FRAGA MF, RODRÍGUEZ R e CAÑAL MJ (2002c). Genomic DNA methylation-demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol.*, 22: 813-816.

FRANCLET A (1981). Rajeunissement et propagation végétative de ligneux. *Ann. Afocel 1980*: 12-39.

FRANCLET A, BOULAY M, BEKKAOUI F, FOURET Y, VERSCHOORE-MARTOUZET B e WALKER N (1987). Rejuvenation. En: BONGA JM e DURZAN DJ (eds.), *Cell Tissue Culture in Forestry. General Principles and Biotechnology* Vol. 1. Martinus Nijhoff/Dr.W.Junk Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, 232-248.

FRANCLET A e BOULAY M (1989). Rejuvenation and clonal silviculture from *Eucalyptus* and forest species harvested through short rotation. En: *Biomass production*

by fast growing trees. Ed. J.S. Pereira e J.J. Landsberg. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 267-274.

FREITAS MI (2002). Propagação Vegetativa de Sobreiros Seleccionados. *Silva Lus.* 10 (1): 17-52.

GIL B, PASTORIZA E, BALLESTER A e SÁNCHEZ C (2003). Isolation and characterization of a cDNA from *Quercus robur* differentially expressed in juvenile-like and mature shoots. *Tree Physiol.*, 23: 633-640.

GINGAS VM e LINEBERGER RD (1989). Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 17: 191-204.

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

GIOVANNELLI A, GIANNINI R, BENNICI A e MORI B (2004). *In vitro* organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cotyledon explants: responses to growth regulators and developmental aspects. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 40: 509-514.

GONÇALVES JC, DIOGO G e AMÂNCIO S (1998). *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Sci. Hort.*, 72: 265-275.

GONÇALVES JC, DIOGO G, COELHO MT e AMÂNCIO S (2000). Changes in leaf morphology and anatomy of *in vitro*-cultured chestnut plantlets during acclimatization. *Acta Hort.*, 520: 183-194.

GOPI C e PONMURUGAN P (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *J. Biotech.*, 126: 260-264.

GREENWOOD MS (1987). Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Reg.*, 6: 1-12.

GREENWOOD MS (1995). Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiol.*, 15: 433-438.

- GREENWOOD MS, HOPPER CA e HUTCHISON KW (1989). Effect of age on shoot growth, foliar characteristics, and DNA methylation. *Plant Physiol.*, 90: 406-412.
- GRESSHOFF PM e DOY CH (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum*. *Planta*, 197: 161-170.
- GRUSELLE R e NICAISE C (1997). Influence of carbon and iron source on *in vitro* multiplication of adult oak. *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*.
- GUOCHEN Y, ZHONGGE L, ASANTE TM e READ PE (2009). *In vitro* responses of american chestnut to plant growth regulators in culture medium. *Acta Hort.*, 844: 229-234.
- HACKETT W (1976). Control of phase change in woody plants. *Acta Hort.*, 56: 143-154.
- HACKETT WP (1985). Juvenility, maturation and rejuvenation in woody plants. *Hortic. Rev.*, 7: 109-155.
- HACKETT WP (1987). Juvenility and maturity. En: *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Ed. J.M. Bonga e D.J. Durzan. Martinus Nihjoff Publishers, 216-231.
- HACKETT WP e MURRAY JR (1993). Maturation and rejuvenation in woody species. En: AHUJA, MR (Ed.). *Micropropagation of Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 93-105.
- HACKETT WP e MURRAY JR (1996). Maturation or phase change. En: *Molecular and morphological markers for juvenility, maturity, rejuvenation and somatic embryogenesis in woody plant species*. THOMPSON D, WELANDER M (eds.) Annual Report Concerted Action AIR 3-CT94-2002. Bruselas. Comisión Europea DG XII-E.,: 7-22.
- HAFFNER V, ENJALRIC F, LARDET L e CARRON MP (1991). Maturation of woody plants: a review of metabolic and genomic aspects. *Ann. Sci. For.*, 48: 615-630.
- HAN K, SHIN D e KEATHLEY (1997). Tissue culture responses of explants taken from branch sources with different degrees of juvenility in mature black locust (*Robinia pseudoacacia*) trees. *Tree Physiol.*, 17: 671-675.

- HAQUE AK, YAMAOKA N e NISHIGUCHI M (2007). Cytosine methylation is associated with RNA silencing in silenced plants but not with systemic and transitive RNA silencing through grafting. *Gene*, 396: 21-31.
- HARADA T (2010). Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. *Sci. Hort.*, 125: 545-550.
- HARTMANN HT, KESTER DE e DAVIES FT (1990). *Plant Propagation. Principles and Practices* (5<sup>th</sup> Edition). Ed. Prentice-Hall. Int. New Jersey. 647 pp.
- HARTMANN HT, KESTER DE, DAVIES FT e GENEVE RL (1997). The biology of grafting. En: *Plant Propagation. Principles and Practice*. (Eds.: H.T. Hartmann, D.E. Kester, F.T. Davies, Jr. And R.L. Geneve), Prentice-Hall, New Jersey, pp. 392-436.
- HAYWOOD V, YU TS, HUANG NC e LUCAS WJ (2005). Phloem long-distance trafficking of *GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE* RNA regulates leaf development. *Plant J.*, 42: 49-68.
- HELLER R (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Natur. Bot. Biol. Vég.*, 14: 1-223.
- HERNÁNDEZ I, CELESTINO C e TORIBIO M (2001). Clonación de árboles seleccionados de alcornoque (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. *Actas del III Congreso Forestal Español. Mesa 3, Mejora genética, viveros y repoblación forestal*, Granada, Sept. 2001: 397-402.
- HEYBROEK H e VISSER T (1976). Juvenility in fruit growing and forestry. *Acta Hort.*, 56: 71-80.
- HSINA T e EL MTILI N (2009). *In vitro* micrografting of mature carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *The Open Hort. J.*, 2: 44-48.
- HUANG HJ, CHEN Y, KUO JL, KUO TT, TZENG CC, HUANG BL, CHEN CM e HUANG LC (1996). Rejuvenation of *Sequoia sempervirens in vitro* changes in isoesterase and isoperoxidase. *Plant Cell Physiol.*, 37: 77-80.
- HUANG L, LIN L, CHEN C, CHEN L, HUANG B e MURASHIGE T (1995). Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA. *Physiol. Plant.*, 94 (3): 379-383.

HUANG L, CHOW T, TSENG T, KUO C, LIU S, NGOH M, MURASHIGE T, HUANG H (2003a). Association of mitochondrial plasmids with rejuvenation of the coastal redwood, *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 44:25-30.

HUANG LC, HSIAO CK, LEE SH, HUANG BL e MURASHIGE T (1992a). Restoration of vigor rooting competence in stem tissues of mature *Citrus* by repeated grafting of their shoot apices onto freshly germinated seedlings *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 28: 30-32.

HUANG LC, KUO CI, WANG CH, MURASHIGE T e HUANG TC (2000). Ethylene evolution by juvenile and adult developmental phase of *Sequoia sempervirens* shoots cultured *in vitro*. *Bot. Bull. Acad. Sinica.*, 41: 263-266.

HUANG LC, LIU S, HUANG BL, MURASHIGE T, MAHDI EFM e VAN GUNDY R (1992b). Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks *in vitro*. *Plant Physiol.* 98: 166-173.

HUANG LC, PU SY, MURASHIGE T, FU SF, KUO TT, HUANG DD e HUANG HJ (2003c). Phase- and Age-related differences in protein tyrosine phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *Biol. Plant.*, 47: 601-603.

HUANG LC, WENG JH, WANG CH, KUO CI e SHIEH YJ (2003b). Photosynthetic potentials of *in vitro*-grown juvenile, adult and rejuvenated *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. shoots. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 44: 31-35.

HUSEN A e PAL M (2003). Effect of serial bud grafting and etiolation on rejuvenation and rooting cuttings of mature trees of *Tectona grandis* Linn.f. *Silvae Genet.*, 52: 84-88.

IDE Y e YAMAMOTO S (1986). *In vitro* plantlet regeneration from axillary buds of juvenile seedlings of kunugi (*Quercus acutissima*). *J. Jpn. For. Soc.*, 68: 472-474.

IGLESIAS-DÍAZ MI, FERNÁNDEZ JL e GUTIÉRREZ O (2000). Macro and Micropropagation of a centenarian clone of *Quercus robur* "Fastigiata". *Acta Hort.*, 536: 331-337.

INGELBRECHT I, VAN HOUTT H, MONTAGU MV e DEPICKER A (1994). Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 10502-10506.

- JACQUIOT C (1952). Sur les phénomènes d'histogenèse dans les cultures *in vitro* de tissu cambial de chênes (*Quercus sessiflora* Sm., *Q. pedunculata* Ehrh., *Q. suber* L.) C. R. Acad. Sci., 234 : 1468-1470.
- JACQUIOT C (1956). Sur les besoins en auxine et les caractères morphologiques externes des cultures de tissu cambial de quelques espèces d'arbres. C.R. Acad. Sci. Paris, 43: 510-512.
- JACQUIOT C (1973). Cultures de tissus de *Quercus*, *Fagus*, *Fraxinus*. Étude anatomique des colonies. C.R. 96 Cong. Nat. Soc. Savantes, Toulouse, Sci. IV: 157-162.
- JAIN A, ROUT GR e RAINA SN (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Phlox paniculata* Linn. *Sci. Hort.*, 94: 137-143.
- JAYNES RA (1961). Buried-inarch technique for rooting chestnut cuttings. *Proc. North. For. Tree Improv. Conf.*, 9: 14-16.
- JOSHI P e DHAWAN V (2007). Assesment of genetic fidelity of micropropagated *Swertia chirayita* plantlets by ISSR marker assay. *Biol. Plant.*, 51 (1): 22-26.
- JUNCKER B e FAVRE JM (1989). Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 19: 267-276.
- JUNCKER B e FAVRE JM (1994). Long-term effects of culture establishment from shoot-tip explants in micropropagated oak (*Quercus robur* L.). *Ann. Sci. For.*, 51(6): 581-588.
- KASAI A, BAI S, LI T e HARADA T (2011). Graft-transmitted siRNA signal from the root induces visual manifestation of endogenous post-transcriptional gene silencing in the scion. *PloS One*, 6 (2): e16895. doi:10.1371/journal.pone.0016895.
- KATOH N, YUI M, SATO S, SHIRAI T, YUASA H e HAGIMORI M (2004). Production of virus-free plants from virus-infected sweet pepper by *in vitro* grafting. *Sci. Hort.*, 100: 1-6.
- KEHR J e BUHTZ A (2008). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Exp. Bot.*, 59 (1): 85-92.

- KHALAFALLA MM e DAFFALLA HM (2008). *In vitro* micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia senegal* (L.) Wild]. *Int. J. Sustain. Crop Prod.*, 3 (1): 19-27.
- KIM M, CANIO W, KESSLER S, SINHA N (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, 293: 287-289.
- KIM SJ (2010). Use of the temporary immersion bioreactor system for mass production of *Eucalyptus pellita* plus tree. *J. Kor. For. Soc.*, 99 (1): 125-130.
- KLEINSCHMIDT J, WITTE R e SÄUER A (1975). Möglichkeiten der Züchterischen Verbesserung von Stiel und Traubeneichen (*Quercus robur* und *Quercus petraea*). II. Versuche zur Stecklingsvermehrung von Eiche. *Allg. Forst. Jagd. Z.*, 146-179.
- KOTHENCZ Z, LANTOS A e VEGVARI G (2001). Bench grafting of *Quercus robur* "Fastigiata", *Quercus pontica* and *Quercus x turneri* "Pseudoturneri". *Prop. Orn. Plants*, 1: 28-30.
- KUDO H e HARADA T (2007). A graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. *HortSci.*, 42: 225-226.
- LÊ CL (2004). Microgreffage *in vitro* du châtaignier. Premiers résultats. *Vitic. Arboric. Hortic.*, 36 (2): 87-92.
- LEIFERT C e CASSELLS A (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 37:133-138.
- LIANG D, FINNEGAN EJ, DENNIS ES, WATERHOUSE PM e WANG M (2011). Mobile silencing in plants: what is the signal and what defines the target. *Front. Biol.*, 6 (2): 140-146.
- LIMASSET P e CORNUET P (1949). Recherche du virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes de plantes infectées. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 228: 1971-1972.
- LINEBERGER RD (1980). Anatomy of organized structures produced on "Sovereign" pin oak callus. *Hort Sci.*, 15, 437.

- LLAMAZARES JC (2003). *Optimización de la micropropagación de cuatro clones seleccionados de Quercus robur L.* Trabajo fin de carreira de Enxeñaría de Montes. Universidade de Santiago de Compostela. 179 pp.
- LLOYD G e MCCOWN B (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- LUCAS WJ, YOO B-C e KRAGLER F (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 849-857.
- LUO J e GOULD JH (1999). *In vitro* shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 57: 211-213.
- MAATAOUI E, ESPAGNAC H e FERRIERE N. (1990). Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Ann. Bot.*, 66: 183-190.
- MALLÓN R, COVEL P e VIÉITEZ AM (2012). Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees*, 26: 731-741.
- MANTELL SH, MATTHEWS JA e MCKEE RA (1985). Principles of plant Biotechnology: an introduction to genetic engineering in plants. *Blackwell Scientific Publications*.
- MANZANERA JA e PARDOS JA (1990). Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber L.* *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 21: 1-8.
- MARGARA J (1988). *Multipliación vegetativa y cultivo in vitro*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 196 pp.
- MARTINS A, BARROSO J e PAIS MS (1996). Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* Mill. *Mycorrhiza*, 6: 265-270.
- MARTINS A, CASIMIRO A e PAIS MS (1997). Influence of mycorrhization on physiological parameters of micropropagated *Castanea sativa* Mill. *Plants. Mycorrhiza*, 7: 161-165.

- MAURI PV e MANZANERA JA (2003). Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 74: 229-235.
- MCCLELLAND MT e SMITH MAL (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortSci.*, 25(7): 797-800.
- MCCOWN DD e MCCOWN BH (1987). North American hardwoods. *Cell and Tissue Culture in Forestry*, Vol. 3, *Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms*. Ed. BONGA JM and DURZAN DJ. Martinus Nijhoff Publishers, 247-260.
- MCGOWRAN E, DOUGLAS GC e PARKINSON M (1998). Morphological and physiological markers of juvenility and maturity in shoot cultures of oak (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). *Tree Physiol.*, 18: 251-257.
- MEIER K e REUTHER G (1994). Factors controlling micropropagation of mature *Fagus sylvatica*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 39: 231-238.
- MEIER-DINKEL A, BECKER B e DUCKSTEIN D (1993). Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late flushing *Quercus robur* L. *Ann. Sci. For.*, 50: 319-322.
- MEISTER G e TUSCHL T (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431: 343-349.
- MERKLE SA, WIECKO AT e WATSON-PAULEY BA (1991). Somatic embryogenesis in American chestnut. *Can. J. For. Res.*, 21: 1698-1701.
- MERT C e SOYLU A (2009). Shoot apex culture of dormant buds in chestnut. *Acta Hort.*, 844: 145-152.
- METRAUX JP (1987). Gibberellins and plant cell elongation. En: *Plant Hormones and their role in plant growth and development*. PJ Davies, Ed (Dordrecht: Martinus Nijhoff): 296-317.
- MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE. DIRECCIÓN GENERAL DE CONSERVACIÓN DE LA NATURALEZA (2000). *Tercer Inventario Forestal Nacional 1997-2006*.

- MIRANDA-FONTAÍÑA ME e FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (2001). Genotypic and environmental variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* and *Castanea sativa* clones in aptitude to micropropagation. *Silvae Genet.*, 50 (3-4): 153-162.
- MISSON JP e GIOT-WIRGOT P (1985). Rajeunissement d'un clone de thuja en vue de sa multiplication *in vitro*. *Ann. Afocel 1984*: 187-197.
- MNENEY E e MANTELL S (2001). *In vitro* micrografting of cashew. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 66: 49-58.
- MOLNAR A, MEINYK CW, BASSETT A, HARDCASTLE TJ, DUNN R e BAULCOMBE DC (2010). Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science*, 328: 872-875.
- MONTEIRO RIBEIRO L, RICARDO PEIXOTO J, MONEIRO DE ANDRADE SR, SANTOS FONSECA R, MELO VIEIRA L e SOUZA PEREIRA WV (2008). Microenxertia *ex vitro* para eliminação do vírus CABMV em maracujá-azedo. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43 (5): 589-594.
- MONTEUUIS O (1994). Effect of technique and darkness on the success of meristem micrografting of *Picea abies*. *Silvae Genet.*, 43: 91-95.
- MONTEUUIS O (1995a). Influence of the grafting technique on meristem micrografting of Douglas-fir. *New Forest.*, 10 (3): 267-273.
- MONTEUUIS O (1995b). *In vivo* grafting and *in vitro* micrografting of *Acacia mangium*: impact of ortet age. *Silvae Genet.*, 44: 190-193.
- MONTEUUIS O (2011). *In vitro* grafting of woody species. *Prop. Orn. Plants*, 12 (1): 11-24.
- MOON HK, YI JS (1993). Cutting propagation of *Quercus acutissima* clones after rejuvenation through serial grafting. *Ann. Sci. For.*, 50: 314-318.
- MOORE GM (1984). Mechanisms of hormone action in plants. *Proc. Int. Plant Propagators' Soc.*, 34: 79-90.

- MULIN M, PAIS MS e DA COSTA SEABRA R (1999). Induction of adventitious shoots from internodal longitudinal sections of *Castanea sativa* Mill. *Acta Hort.*, 494: 255-260.
- MULLINS KV (1987). Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Hort.*, 212: 525-530.
- MURASHIGE T e SKOOG F (1962). A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- MURASHIGE T, BITTERS WP, RANGAN EM, NAUER EM, ROISTACHER CN e HOLLYDAY PB (1972). A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *Hort. Sci.*, 7: 118-119.
- NADHA HK, KUMAR R, SHARMA RK, ANAND M e SOOD A (2011). Evaluation of clonal fidelity of *in vitro* raised plants of *Guadua angustifolia* Kunth using DNA-based markers. *J. Med. Plants Res.*, 5(23): 5636-5641.
- NAS MN, READ PE, MILLER V e RUTTER PA (2003). *In vitro* "rejuvenation" of woody species is temporary. *Acta Hort.*, 625: 211-215.
- NAVA R, VEGAS GARCÍA A, MARÍN C e VILLEGAS Z (2011). Propagación clonal de plantas de élite de *Carica papaya* L. usando microinjertación *in vitro* e *in vivo*. *Interciencia*, 36 (7): 517-523.
- NAVARRO L (1988). Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Hort.*, 227: 43-56.
- NAVARRO L, ROISTACHER CN e MURASHIGE T (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 100 (5): 471-479.
- NAZ AA, JASKANI MJ, ABBAS H e QASIM M (2007). *In vitro* studies on micrografting technique in two cultivars of *Citrus* to produce virus free plants. *Pak. J. Bot.*, 39 (5): 1773-1778.
- NELSON SC (2006). Grafting of *Acacia koa* Gray onto young *Acacia* seedlings. *Nat. Plants J.*, 7 (2): 137-140.

- NIANG D, GASSAMA YK, NDIAYE A, SAGNA M, SAMBA SAN e TOURE MA (2010). *In vitro* micrografting of *Sterculia setigera* Del. *Afr. J. Biotech.*, 9 (50): 8613-8618.
- NTUI VO, AZADI P, SUPAPORN H e MII M (2010). Plant regeneration from stem segment-derived friable callus of “Fonio” (*Digitaria exilis* (L.) Stapf.). *Sci. Hort.*, 125: 494-499.
- NUNES JCO, ABREU MF, DANTAS ACM, PEREIRA AJ e PEDROTTI EL (2005). Caracterização morfológica de microenxertia em macieira. *Rev. Bras. Frutic.*, 27 (1): 80-83.
- OBDRŽÁLEK J, JÍLKOVÁ J (2006). Winter grafting of oaks *Quercus* L. *Hort. Sci.*, 33 (2): 61-69.
- OLSZEWSKA MJ, SAKOWICZ T, KAZMIERCZAK J e LUCHNIAK P (1997). Enhanced nucleolar parameters in *Vicia faba* L. induced by 5-azacytidine may be only partly attributed to DNA demethylation. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 35: 185-192.
- OMID A, KEILIN T, GLASS A, LESHKOWITZ D e WOLF S (2007). Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *J. Exp. Bot.*, 58: 3645-3656.
- ONAY A, PIRINÇ V, YILDIRIM H e BASARAN D (2004). *In vitro* micrografting of mature pistachio (*Pistacia vera* var. Siirt). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 77: 215-219.
- ORAGUZIE NC, PATERSON AM e MCNEIL DL (1999). Origin and relationships of New Zealand chestnut (*Castanea* sp. *Fagaceae*) selections reflect patterns of graft failure. *Plant Syst. Evol.*, 218: 193-204.
- ORLIKOWSKA T, SABA I e KUCHARSKA D (2000). The effect of leaf and shoot tip removal and explant orientation on axillary shoot proliferation of *Codiaeum variegatum* Blume var. *pictum* Muell. Arg. cv. Excellent. *Sci. Hort.*, 85 (1-2): 103-111.
- OSTERC G, ZAVRL FRAS M, VODENIK T e LUTHAR Z (2005). The propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) nodal explants. *Acta agric. Slov.*, 85: 411-418.
- OSTROLUCKA MG e BEZO M (1994). Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus* sp.). *Pol. J. Theor. App. Gen.*, 35(3): 161-169.

- OTERO JE (1999). Micropropagación de variedades seleccionadas de *Quercus robur* L. adulto y juvenil. *Traballo fin de carreira de Enxeñaría Técnica Forestal*. Universidade de Santiago de Compostela. 165 pp.
- PACHAURI RK e DHAWAN V (1989). Cost analysis of micropropagated plants. En: *Applications of Biotechnology in forestry and horticulture*. Dhawan (Ed.). Plenum Press, New York, London: 276-282.
- PADILLA IMG e ENCINA CL (2011). The use of consecutive micrografting improves micropropagation of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) cultivars. *Sci. Hort.*, 129: 167-169.
- PALAUQUI JC, ELMAYAN T, POLLIEN JM e VAUCHERET H (1997). Systemic acquired silencing: Transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J.*, 16: 4738-4745.
- PALAUQUI JC e VAUCHERET H (1998). Transgenes are dispensable for the RNA degradation step of cosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9675-9680.
- PALMA B, VOGT GF e NEVILLE P (1997). La microgreffe, une solution pour la multiplication *in vitro* de l'*Acacia senegal* (L) Wild?. *Ann. Sci. For.*, 54: 203-210.
- PATHIRANA R, MCKENZIE MJ (2005). Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.*, 81: 11-18.
- PEREIRA-LORENZO S e FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (1997a). Propagation of chestnut cultivars by grafting: methods, rootstocks and plant quality. *J. Hort. Sci.*, 72 (5): 731-739.
- PEREIRA-LORENZO S e FERNÁNDEZ-LÓPEZ J (1997b). *Los cultivares autóctonos de castaño (Castanea sativa Mill.) en Galicia*. Ed. INIA. 540 pp.
- PEREIRA-LORENZO S, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J, VARELA ARIAS I e SAU F (2000). Comportamiento de patrones híbridos de castaño resistentes a la tinta en zonas de castañar en Galicia. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.*, 9 (1): 89-101.
- PÉREZ BECERRA V, FERNÁNDEZ LÓPEZ MJ e FERNÁNDEZ-LORENZO JL (2003). Micropropagación de *Acer palmatum* cv. Osakii: recultivo del callo basal. V

*Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales*, Pamplona, España.

PÉREZ-FRANCÉS JF, RAVELO BJ e RODRÍGUEZ-PÉREZ JA (2001). *In vitro* establishment and proliferation of axillary bud cultures of *Leucadendron discolor* (Proteaceae). *Acta Hort.*, 545: 179-185.

PERRIN Y, LARDET L, ENJALRIC F e CARRON MP (1994). Rejuvenation of mature clones of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg.) by *in vitro* micrografting. *Can. J. Plant Sci.*, 74 (3): 623-630.

PEVALEK-KOZLINA B (1991). Clonal propagation of common oak (*Quercus robur* L.). *Acta Hort.*, 289: 143-144.

PEVALEK-KOZLINA B e JELASKA S (1986). *In vitro* growth development of oaks (*Quercus robur* and *Quercus petraea*). *Acta Bot. Croat.*, 45: 55-61.

PHARIS R e KING R (1985). Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36: 517-568.

PIAGNANI C e ECCHER T (1988). Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut *in vitro*. *Acta Hort.*, 227: 384-386.

PIERIK RLM (1976). *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 37 (1) : 80-82.

PIERIK RLM (1990a). *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 325 pp.

PIERIK RLM (1990b). Rejuvenation and micropropagation. *Abstracts VIIth Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Amsterdam, 24-29 Junio 1990, pp. 91-101.

PIERIK RLM, OOSTERKAMP J e EBBING MAC (1997a). Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* var. "Fastigiata". *Sci. Hort.*, 71: 87-92.

PIERIK RLM, OOSTERKAMP J, MANSCHOT GAJ, BARTH T e SCHOLTEN HJ (1997b). Agar brand, a dominating factor for shoot growth of juvenile and adult *Quercus robur* L. "Fastigiata" *in vitro*. *Plant Tiss. Cult. Biotech.*, 3(1): 27-31.

PILLAI SK e HILDEBRANDT AC (1969). Induced differentiation of *Geranium* plants from undifferentiated callus *in vitro*. *Am. J. Bot.*, 56 (1): 52-58.

PLIEGO-ALFARO F e MURASHIGE T (1987). Possible rejuvenation of adult avocado by graftage onto juvenile rootstocks *in vitro*. *HortSci.*, 22 (6): 1321-1324.

POETHIG RS (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250: 923-930.

POETHIG RS (2010). The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiol.*, 154: 5451-5444.

PUDDEPHAT IJ, ALDERSON PG e WRIGHT NA (1997). Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 48 (309): 951-962.

PUDDEPHAT IJ, ALDERSON PG e WRIGHT NA (1999). *In vitro* root induction in axillary microshoots of *Quercus robur* L. *Ann. Appl. Biol.*, 134 (2): 233-239.

QI-GUANG Y, READ PE, FELLMAN CD e HOSIER MA (1986). Effect of cytokinin, IBA, and rooting regime on Chinese chestnut cultured *in vitro*. *HortSci.*, 21 (1): 133-134.

QUOIRIN M e LEPOIVRE P (1977). Étude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.*, 78: 437-442.

RACHE-CARDENAL L, ROJAS-PINZÓN e PACHECO-MALDONADO J (2008). Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento *in vitro* de microinjertos. *Bioagr.*, 20 (1): 57-65.

RAHARJO S e LITZ R (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 82: 1-9.

RAMANAYAKE SMSD e KOVOOR A (1999). *In vitro* micrografting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.*, 74 (2): 265-268.

RANI G e GROVER IS (1999). *In vitro* callus induction and regeneration studies in *Withania somnifera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 57: 23-27.

- RAZIN A e RIGGS AD (1980). DNA methylation and gene function. *Science*, 210: 604-610.
- RAZIN A e SZYF M (1984). DNA methylation patterns: formation and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 782: 331-342.
- REVILLA MA, PACHECO J, CASARES A e RODRÍGUEZ R (1996). *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 32: 257-261.
- ROBBINS WJ (1957). Gibberellic acid and the reversal of adult *Hedera* to a juvenile state. *Am. J. Bot.*, 44: 743-746.
- RODRÍGUEZ L, CUENCA B, PATO B, CÁMARA MJ e OCAÑA L (2005). Cost and efficiency of propagating *Castanea sativa* hybrids *in vitro* and by cutting in a commercial nursery. *Acta Hort.*, 693: 305-312.
- ROMANO A e MARTINS-LOUÇÃO MA (2003). Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. *Acta Hort.*, 616: 439-442.
- ROUT GR, SAMANTARAY S e DAS P (2000). *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard. *Sci. Hort.*, 86: 71-79.
- RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B e LUCAS WJ (1999). Phloem long-distance transport of *CmNACP* mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development*, 126: 4405-4419.
- RUTTER PA, MILLER G e PAYNE JA (1990). Chestnuts (*Castanea*). *Acta Hort.*, 290: 761-768.
- SÁNCHEZ MC (1991). *Propagación in vitro de material adulto de castaño y roble: Desarrollo de métodos de rejuvenecimiento*. Tese Doutoral. Universidade de Santiago de Compostela. 203 pp.
- SÁNCHEZ MC, BALLESTER A, VIEITEZ AM (1997). Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Ann. Sci. For.*, 54: 359-370.

SÁNCHEZ MC, SAN JOSÉ MC, BALLESTER A e VIEITEZ AM (1996). Requeriments for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol.*, 16, 673-680.

SÁNCHEZ MC e VIEITEZ AM (1991). *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiol.*, 8: 59-70.

SAN JOSÉ MC, BALLESTER A e VIEITEZ AM (1988). Factors affecting *in vitro* propagation of *Quercus robur* L. *Tree Physiol.*, 4: 281-290.

SAN JOSÉ MC, BALLESTER A e VIEITEZ AM (1990). Clonal propagation of juvenile and adult trees of sessile oak by tissue culture techniques. *Silvae Genet.*, 39: 50-55.

SAN JOSÉ MC e VIEITEZ E (1984). Regeneración *in vitro* de plantas de castaño a partir de yemas adventicias. *Congreso sobre el castaño, ponencia IV*. Lourizán, Galicia.

SAN JOSÉ MC, VIEITEZ AM e VIEITEZ E (1983). Propagación de roble mediante cultivo “*in vitro*” de yemas axilares. *Bol. Acad. Gal. Cienc.*, 2: 65-72.

SAN JOSÉ MC, VIEITEZ AM e VIEITEZ E (1985). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes del género *Quercus*. *Phyton*, 45: 31-40.

SANJAYA, MUTHAN B, RATHORE TS e RAI VR (2006). Factors influencing *in vivo* and *in vitro* micrografting of sandalwood (*Santalum album* L.): an endangered tree species. *J. For. Res.*, 11 (3): 147-151.

SASAKI T, CHINO M, HAYASHI H e FUJIWARA T (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.*, 39: 895-897.

SASAKI Y, SHOYAMA Y, NISHIOKA J e SUZAKI T (1988). Clonal propagation of *Quercus acutissima* Carruth by somatic embryogenesis from embryogenic axes. *J. Fez. Agr. Ryushu Univ.*, 33: 99-101.

SATO T, MORI N e SAITO A (1987). *In vitro* plantlet propagation from epicotyl segments of young seedlings of kunugi (*Quercus acutissima*). *J. Jpn. For. Soc.*, 69:113-117.

- SAUER U e WILHELM E (2005). Somatic embryogenesis from ovaries, developing ovules and immature zygotic embryos, and improved development of *Castanea sativa*. *Biol. Plant.*, 49 (1): 1-6.
- SCHWARZ OJ (1987). Plant growth regulator effects in the *in vitro* propagation of three hardwood tree genera: *Castanea*, *Juglans*, and *Quercus*. *Plant Growth Reg.*, 6 (1-2): 113-135.
- SECKINGER GR, MCCOWN BH e STRUCKMEYER BE (1979). Production of anomalous structures in *Quercus rubra* L. callus cultures. *Amer. J. Bot.*, 66: 993-996.
- SERDAR U (2009). Grafting in seeds, radicles, hypocotyls and epicotyls of chestnut. *Acta Hort.*, 815: 199-204.
- SERDAR U e SOYLU A (2005). The effect of grafting time and methods on chestnut nursery tree production. *Acta Hort.*, 693: 187-194.
- SHA VALLI KHAN PS, EVERS D e HAUSMAN JF (1999). Stomatal characteristics and water relations of *in vitro* grown *Quercus robur* NL 100 in relation to acclimatization. *Silvae Genet.*, 48 (2): 83-87.
- SHIBLI RA, SHATNAWI M, ABU-EIN e AL-JUBOORY KH (2001). Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europea* L.). *Sci. Hort.*, 88: 243-256.
- SIMÓN-PÉREZ E, BARCELÓ-MUÑOZ A e PLIEGO-ALFARO F (1997). Micropropagation of *Quercus robur*. *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*.
- SIMPSON SE e MARKS TR (1995). The role of sucrose in shoot development leading to rhizogenesis *in vitro* in juvenile and mature pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Bull. Rech. Agron.*, Gembloux, 30 (1-2): 87-101.
- SINGH B, SHARMA S, RANI G, HALLAN V, ZAIDI AA, VIRK GS e NAGPAL A (2008). *In vitro* micrografting for production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour x *C. deliciosa* Tenora). *Plant Biotech. Reports*, 2 (2): 137-143.

SINISCALCO C e PAVOLETTONI L (1988). Rejuvenation of *Eucalyptus x trabuttii* by successive grafting. *Acta Hort.*, 227: 98-100.

SKIRVIN RM, MOTOIKE S, NORTON MA, OZGUR M, AL-JUBOORY K e MCMEANS OM (1999). Establishment of contaminant-free perennial plants *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 35 (4): 278-280.

SONODA S e NISHIGUCHI M (2000). Graft transmission of post-transcriptional gene silencing: Target specificity for RNA degradation is transmissible between silenced and non-silenced plants, but not between silenced plants. *Plant J.*, 21: 1-8.

SOTO M (2003). *Optimización da micropropagación de tres clons xuvenís e establecemento e multiplicación dun clon adulto de Quercus robur var. Fastigiata*. Trabajo fin de carreira de Enxeñaría Agrónoma. Universidade de Santiago de Compostela. 166 pp.

SRIVASTANA PS e STEINHAEUER A (1982). *In vitro* culture of embryo segments of *Quercus libani*: Organogenesis and callus growth as a differential response to experimental conditions. *Z. Pflanzenphysiol.*, 106: 93-96.

STARRANTINO A e CARUSO A (1988). The shoot-tip grafting technique applied in citriculture. *Acta Hort.*, 227: 101-103.

TE-CHATO S, LIM M e KULSIRORATANA J (1992). *In vitro* micrografting of mangosteen. *Sonklanak. J. Sci. Tech.*, 14 (4): 353-359.

THAKUR A e KANWAR JS (2008). Micropropagation of 'Wild Pear' *Pyrus pyrifolia* (Burn F.) Nakai.I. Explant establishment and shoot multiplication. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj*, 36 (1): 103-108.

THIMMAPPAIAH, PUTHRA GT e ANIL SR (2002). *In vitro* grafting of cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Sci. Hort.*, 92: 177-182.

THOMAS H (2002). Ageing in plants. *Mech. ageing develop.*, 123: 747-753.

TORIBIO M, FERNÁNDEZ C, CELESTINO C, MARTÍNEZ MT, SAN JOSÉ MC e VIEITEZ AM (2004). Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 76: 283-287.

- TRANVAN H, BARDAT F, JACQUES M e ARNAUD Y (1991). Rajeunissement chez le *Sequoia sempervirens*: effets du microgreffage *in vitro*. *Can. J. Bot.*, 69 (8): 1772-1779.
- TROCH V, SAPETA H, WERBROUCK S, GEELLEN D e VAN LABEKE M-C (2010). *In vitro* culture of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) using temporary immersion bioreactors. *Acta Hort.*, 885: 383-389.
- TUSA N, RADOGNA L, DAVINO M e LA ROSA R (1988). Micrografting technology for recovering tree virus/affected "Femminello" Lemon clones. *Acta Hort.*, 227: 104-106.
- URQUIJO P (1952). Multiplicación asexual de castaños. *Ann. Inst. Nac. Inves. Agron.*, 1: 317-323.
- VALDES AE, CENTENO ML, FERNÁNDEZ B (2003). Changes in the branching pattern of *Pinus radiata* derived from grafting are supported by variations in the hormonal content. *Plant Sci.*, 165: 1397-1401.
- VANYUSHIN BF e KIRNOS MD (1988). DNA methylation in plants. *Gene*, 74: 117-121.
- VÁZQUEZ A e GESTO DV (1982). Juvenility and endogenous rooting substances in *Castanea sativa* Mill. *Biol. Plant.*, 24 (1): 48-52.
- VENGADESAN G e PIJUT PM (2009). *In vitro* propagation of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 45: 474-482.
- VESTRI F, SCHIFF S, COZZI A, SANTANDREA G, BENNICI A (1991) *In vitro* behaviour of *Alnus*, *Cupressus* and *Castanea* spp. *Acta Hort.*, 289: 163-164.
- VIDAL N, ARELLANO G, SAN JOSÉ MC, VIEITEZ AM e BALLESTER A (2003). Developmental stages during the rooting of *in-vitro*-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiol.*, 23: 1247-1254.
- VIEITEZ E (1952). Ensayos de reproducción vegetativa de híbridos de castaño *Castanea sativa* x *Castanea crenata*. *Ann. Edaf. Fisiol. Veg.*, 11: 185-209.

- VIEITEZ E (1956). Problemas que plantea el estaquillado de castaño. *Ann. Edaf. Fisiol. Veg.*, 15: 629-659.
- VIEITEZ E (1963). Enraizamiento de estaquillas juveniles de castaño. *Montes*, 19: 331-333.
- VIEITEZ (1995). Somatic embryogenesis in chestnut. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, eds. *Somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 2. Angiosperms*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 375-407.
- VIEITEZ AM, BALLESTER A, VIEITEZ ML e VIEITEZ E (1983). *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *J. Hort. Sci.*, 58 (4): 457-463.
- VIEITEZ J, KINGSTON DGI, BALLESTER A e VIEITEZ E (1987). Identification of two compounds correlated with lack of rooting capacity of chestnut cuttings. *Tree Physiol.*, 3: 247-255.
- VIEITEZ AM, PINTOS F, SAN JOSÉ MC e BALLESTER A (1993). *In vitro* shoot proliferation determined by explant orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiol.*, 12: 107-117.
- VIEITEZ AM, SÁNCHEZ C, AMO-MARCO JB e 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. Org. Cult.*, 37: 287-295.
- VIEITEZ AM, SÁNCHEZ C e BALLESTER A (1997). Micropropagation of *Quercus robur* NL 100A and NL 100R. *Annual Report of The COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*.
- VIEITEZ AM, SÁNCHEZ MC, GARCÍA-NIMO ML e BALLESTER A (2007). Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. En: JAIN SM e HÄGGMAN (eds.) *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 299-312.
- VIEITEZ AM, SÁNCHEZ C e SAN-JOSÉ C (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Sci. Hort.*, 41 (1-2): 151-159.
- VIEITEZ AM, SAN-JOSÉ MC e VIEITEZ E (1985). *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *J. Hort. Sci.*, 60 (1): 99-106.

- VIEITEZ AM e VIEITEZ ML (1980). Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *J. Hort. Sci.*, 55 (1): 83-84.
- VIEITEZ AM e VIEITEZ ML (1983). *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. *Sci. Hort.*, 18: 343-351.
- VILELA L, ALVES S e DE SOUZA M (1993). Limpeza clonal da laranjeira “Seleta Folha Murcha” através da microenxertia *in vitro*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 28 (11): 1341-1344.
- VOINNET O, VAIN P, ANGELL S e BAULCOMBE DC (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95: 177-187.
- VOLKAERT H, SCHOOF J, PIETERS A e DE LANGHE E (1990). Influence of explant source on *in vitro* axillary shoot formation in oak seedlings. *Tree Physiol.*, 6: 87-93.
- VON ADERKAS P e BONGA JM (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.*, 20: 921-928.
- WANG J-W, PARK MY, WANG L-J, KOO Y, CHEN X-Y, WEIGEL D e POETHIG (2011). MiRNA control of vegetative phase change in trees. *Plos Genet.*, 7 (2): e1002012.doi:10.1371/journal.pgen.1002012.
- WAREING PF e FRYDMAN VM (1976). General aspects of phase change with special reference to *Hedera helix* L. *Acta Hort.*, 56: 57-68.
- WEBSTER T (1994). Rootstock and interstock effects on deciduous fruit tree growth and cropping. *Compact Fruits Tree*, 27: 5-12.
- WILHELM E (2000). Somatic Embryogenesis in Oak (*Quercus* spp.) *In vitro Plant*, 36: 349-357.
- WOO JH, CHOI MS e PARK YG (1995). Plant regeneration from callus cultures of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *J. Korean For. Soc.*, 84 (2): 145-150.

- WU G e POETHIG RS (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development*, 133: 3539-3547.
- WU HC, DU TOIT ES e REINHARDT CF (2007). Micrografting of *Protea cynaroides*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 89: 23-28.
- XING Z, SATCHWELL MF, POWELL WA e MAYNARD CA (1997). Micropropagation of american chestnut: increasing rooting rate and preventing shoot-tip necrosis. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 33: 43-48.
- XING Z, POWELL WA e MAYNARD CA (1999). Development and germination of American chestnut somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Org.*, 57: 47-55.
- XOCONOSTLE-CÁZARES B, XIANG Y, RUIZ-MEDRANO R, WANG HL, MONZER J, YOO BC, MCFARLAND KC, FRANCESCHI VR, LUCAS WJ (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science*, 284: 94-98.
- YAE BW, ZIMMERMANN RH, FORDHAM I e KO KCH (1987). Influence of photoperiod, apical meristem and explant orientation on axillary shoot proliferation of apple cultivars *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 112: 588.
- YANG L, CONWAY SR e POETHIG RS (2011). Vegetative phase change is mediated by a leaf-derived signal that represses the transcription of miR156. *Development*, 138: 245-249.
- YILDIRIM H, ONAY A, SÜZEREZ V, TILKAT E, OZDEN-TOKATLI Y e AKDEMIR H (2010). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars “Ferragnes” and “Ferraduel”. *Sci. Hort.*, 125: 361-367.
- YOO B-C, KRAGLER F, VARKONYI-GASIC E, HAYWOOD V, ARCHER-EVANS S, LEE YM, LOUGH TJ e LUCAS WJ (2004). A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell*, 16: 1979-2000.
- ZACCHANI M, MORINI S e VITAGLIANO C (1997). Effect of photoperiod on some stomatal characteristics of *in vitro* cultured fruit shoots. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 49: 195-200.

ZACZEK JJ, STEINER KC, HEUSER CW e TZILKOWSKI WM (2006). Effects of serial grafting, ontogeny, and genotype on rooting of *Quercus rubra* cuttings. *Can. J. For. Res.* 36: 123-131.

ZHU B, ZHENG Y, HESS D, ANGLIKER H, SCHWARZ S, SIEGMANN M, THIRY S e JOST JP (2000). 5-Methylcytosine-DNA glycosylase activity is present in a cloned G/T mismatch DNA glycosylase associated with the chicken embryo DNA demethylation complex. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 97: 5135-5139.

ZLUVOVA J, JANOUSEK B e VYSKOT B (2001). Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *J. Exp. Bot.*, 52 (365): 2265-2273.

