

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Microinjerto *in vitro* de *Castanea sativa*

Microenxerto *in vitro* de *Castanea sativa*

In vitro* micrografting of *Castanea sativa



Pablo Torreira Pardo

Curso: 2023 - 2024. Convocatoria: Febrero

Directores:

Juan Luis Fernández Lorenzo

María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga

Resumen

Se realizó el microinjerto *in vitro* de la variedad 'Branca' de castaño (*Castanea sativa* Mill.) sobre los portainjertos híbridos (*Castanea sativa* x *C. crenata*) 3 y 7521, con el objetivo de analizar diversas variables que pueden influir en el éxito del microinjerto en castaño para la producción de planta. Se analizó el efecto del genotipo del portainjerto, del protocolo de enraizamiento previo de los portainjertos híbridos, de la presencia o no de raíces en el portainjerto y del tipo de púa (una o dos yemas axilares) sobre la tasa de prendimiento del injerto y el crecimiento de la púa. En los ensayos previos de enraizamiento de los portainjertos se evaluaron las tasas de enraizamiento y de necrosis apical de microbrotes con o sin yema apical y defoliados o sin defoliar, con el objetivo de analizar otros factores que pueden influir de forma directa o indirecta en la producción de planta de calidad.

Se demostró que la eliminación de la yema apical en los portainjertos disminuye el porcentaje de plantas necrosadas durante el proceso de enraizamiento y que la defoliación de los portainjertos conduce a menores porcentajes de enraizamiento y de prendimiento del microinjerto. Asimismo, la presencia o no de raíces no influye en la tasa de prendimiento ni en el crecimiento de la púa tras el microinjerto, y el uso de púas con dos yemas mejora la tasa de prendimiento.

Palabras clave: micropropagación, castaño, portainjertos híbridos, enraizamiento

Resumo

O microenxerto *in vitro* da variedade de castiñeiro 'Branca' (*Castanea sativa* Mill.) realizouse sobre os portaenxertos híbridos (*Castanea sativa* x *C. crenata*) 3 e 7521, co obxectivo de analizar diversas variables que poden influír no éxito do microenxerto en castiñeiro para produción vexetal. Analizouse o efecto do xenotipo do portaenxerto, o protocolo de enraizamento previo dos portaenxertos híbridos, a presenza ou ausencia de raíces no portaenxerto e o tipo de puga (un ou dous xemas axilares) sobre a taxa de toma do enxerto e o crecemento da puga. Nos anteriores ensaios de enraizamento dos portaenxertos avaliáronse as taxas de enraizamento e necrose apical dos microbrotes con ou sen xema apical e defoliados ou sen follas, co obxectivo de analizar outros factores que poidan influír directa ou indirectamente na produción de planta de calidade.

Demostrouse que a eliminación da xema apical nos portaenxertos diminúe a porcentaxe de plantas necrosadas durante o proceso de enraizamento e que a defoliación dos portaenxertos conduce a menores porcentaxes de enraizamento e toma do microenxerto. Así mesmo, a presenza ou ausencia de raíces non inflúe na taxa de adherencia nin no crecemento da espiga despois do microenxerto, e o uso de espigas con dúas xemas mellora a taxa de adherencia.

Palabras chave: micropropagación, castiñeiro, portaenxertos híbridos, enraizamento

Abstract

The *in vitro* micrograft of the chestnut variety 'Branca' (*Castanea sativa* Mill.) was carried out on the hybrid rootstocks (*Castanea sativa* x *C. crenata*) 3 and 7521, with the aim of analyzing various factors that can influence the success of the micrograft in chestnut for plant production. The rootstock genotype, previous rooting protocol of the hybrid rootstocks, presence or absence of roots in the rootstock and type of scion (with one or two axillary buds) effect on the graft take rate and the scion growth was analyzed. In the previous rooting trials of the rootstocks, the rooting and apical necrosis rates of microshoots with or without apical bud, and defoliated or undefoliated were evaluated, with the aim of analyzing other factors that may directly or indirectly influence production of quality plants.

It was shown that the elimination of the apical bud in the rootstocks decreases the percentage of necrotic plants during the rooting process and that the defoliation of the rootstocks leads to lower percentages of rooting and taking of the micrograft. On the other hand, the presence or absence of roots does not influence the graft-take rate or the growth of the scion after micrografting, and the use of scions with two buds improves the graft-take rate.

Keywords: micropropagation, chestnut, hybrid rootstocks, rooting

Índice

Resumen	0
Introducción	4
Objetivos	5
Material y métodos	6
1) Diseño experimental.....	6
2) Material vegetal utilizado	6
3) Preparación del material	7
4) Microinjerto	7
5) Aclimatación	8
6) Análisis de datos	8
Resultados	9
1.1) Ensayo previo de enraizamiento: necrosis de los portainjertos	9
1.2) Ensayo previo de enraizamiento: formación de raíces	10
2) Ensayo de microinjerto	12
Discusión	15
Conclusiones	17
Bibliografía	18

Introducción

El injerto de árboles frutales es una práctica que implica la unión de dos variedades de plantas con el objetivo de combinar sus características deseables. Desde las civilizaciones antiguas hasta la actualidad, esta técnica ha permitido cultivar variedades de árboles frutales adaptadas a nuestras necesidades específicas, lo que ha contribuido significativamente a la seguridad alimentaria y la diversificación de las fuentes de nutrientes a lo largo de la historia.

La planta sobre la que se realiza el injerto se denomina patrón o portainjerto y el fragmento de planta que es insertado se denomina púa o pieza de injerto. El portainjerto suele aportar un mejor sistema radicular y/o resistencia a patógenos presentes en el suelo, mientras que la púa puede aportar una producción de frutos de mayor calidad. A través de este proceso, una planta puede ser manipulada para optimizar la producción de frutos, resistencia a enfermedades y adaptación a diversos climas.

En el contexto de la biotecnología vegetal, las técnicas de microinjerto *in vitro* constituyen una herramienta de gran utilidad en distintos ámbitos, como el saneamiento (para la obtención de plantas libres de virus), el rejuvenecimiento de material adulto, el indexado de virus y la producción de planta (Chilukamarri et al., 2021). En el caso específico del castaño (*Castanea sativa* Mill.) se han desarrollado hasta la fecha experimentos de microinjerto con fines de rejuvenecimiento (Fernández-Lorenzo y Fernández López, 2005; Fernández-Lorenzo y Crecente-Campo, 2010), pero los protocolos de microinjerto para producción de planta injertada aún no están optimizados.

En el aspecto de la producción, el desarrollo de un método eficiente de obtención de planta microinjertada con variedades certificadas de castaño para producción de castaña sobre patrones híbridos (*Castanea sativa* x *C. crenata*) resistentes a la enfermedad de la 'tinta', causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands, que provoca podredumbre radical en la planta infectada (Miranda-Fontañña et al., 2007), podría contribuir a responder a la alta demanda de este tipo de material, que no se puede cubrir actualmente mediante técnicas de propagación convencionales.

En investigaciones previas centradas en el cultivo del castaño, se había efectuado el microinjerto en patrones que habían sido previamente enraizados, lo que resultó en un exitoso porcentaje de prendimiento (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005). Ahora bien, los autores observaron que las raíces, bajo el efecto de las citoquininas presentes en el medio, no resultaban funcionales para la aclimatación. En el microinjerto de otras especies, como la vid (*Vitis* spp.) se observó que con el uso de portainjertos no enraizados se obtenían mayores porcentajes de prendimiento y crecimiento de la púa respecto a los obtenidos con portainjertos enraizados (Sammona et al., 2018). Esta estrategia podría ser aplicable en castaño, siempre que los porcentajes de prendimiento fueran iguales o mejores que sobre portainjertos enraizados. En ese caso, el enraizamiento de los patrones se realizaría en una fase posterior.

En otras publicaciones se demuestra que púas de mayor tamaño proporcionan mayores porcentajes de prendimiento (Rehman y Gill, 2015), pero una característica que no suele tenerse en cuenta es el número de yemas presentes en la púa, cuya influencia sobre el éxito del microinjerto no ha sido evaluada en castaño, por lo que decidimos analizarlo en esta investigación.

Una característica indispensable para la obtención de plantas injertadas viables es la presencia de un buen sistema radicular antes de pasar a la fase de aclimatación. En el presente estudio, se abordará el uso de patrones enraizados que se microinjertarán en medios sin citoquininas, para mantener la calidad de las raíces. Aquellos patrones que no

enraícen se microinjertarán igualmente, por las razones indicadas anteriormente (comparación de la eficacia del microinjerto sobre patrones con y sin raíces), pero el enraizamiento posterior de los microinjertos no formará parte de los objetivos del presente TFG. Finalmente, se abordará el uso de portainjertos in vitro de una longitud netamente mayor de la normalmente utilizada en la práctica del microinjerto (Rehman y Gill, 2015). Esto se debe a que en el castaño es indispensable evitar que la parte correspondiente a la púa, una vez establecida en campo, pueda autorradicar si queda enterrada en el suelo, perdiéndose la resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. En este aspecto (evaluación del microinjerto a una altura superior a la normal), este estudio resulta novedoso.

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el efecto de algunas variables sobre el éxito del microinjerto de *Castanea sativa* Mill. sobre portainjertos híbridos de *Castanea sativa* x *C. crenata* para la producción de planta. Se estudió la influencia del proceso de enraizamiento previo de los portainjertos sobre la tasa de prendimiento y crecimiento del injerto. También se examinó si influía en los mismos el número de yemas presentes en la púa utilizada en el proceso y el clon híbrido utilizado como portainjerto. En este último caso, con el fin de averiguar si existen diferencias de afinidad con la variedad 'Branca' entre los híbridos detectables de forma precoz a través del microinjerto.

Un objetivo complementario del estudio es evaluar como diversas variables (clon, defoliación, eliminación de la yema apical), afectan al enraizamiento previo y al grado de necrosis de los portainjertos que se utilizarán en el microinjerto.

Material y métodos

1) Diseño experimental

Se llevó a cabo un estudio experimental dividido en dos ensayos, siendo el principal el **ensayo de microinjerto**, en el cual se evaluó la influencia de distintos factores (clon híbrido usado como portainjerto, número de yemas axilares en la púa (una o dos), y condiciones de enraizamiento previo del portainjerto (defoliación y eliminación de la yema apical), sobre la tasa de prendimiento del injerto y la reactividad de la púa. Se evaluó igualmente la posible relación entre la formación de callo en el punto de injerto y las variables dependientes mencionadas.

En el **ensayo previo de enraizamiento** se analizó si la decapitación del ápice y la defoliación tenían incidencia en el enraizamiento (tasa, número y longitud de raíces) y en la necrosis (tasa y extensión) de los portainjertos. La hipótesis de partida con respecto a este último punto es que la eliminación de la yema apical debería reducir la necrosis provocada por la asimilación de la auxina exógena (Teixeira da Silva et al., 2020; Viéitez et al., 1989).

También se ha incluido la posibilidad de realizar una preaclimatación con las plantas que presenten las condiciones adecuadas, es decir, éxito en el injerto y presencia de raíces.

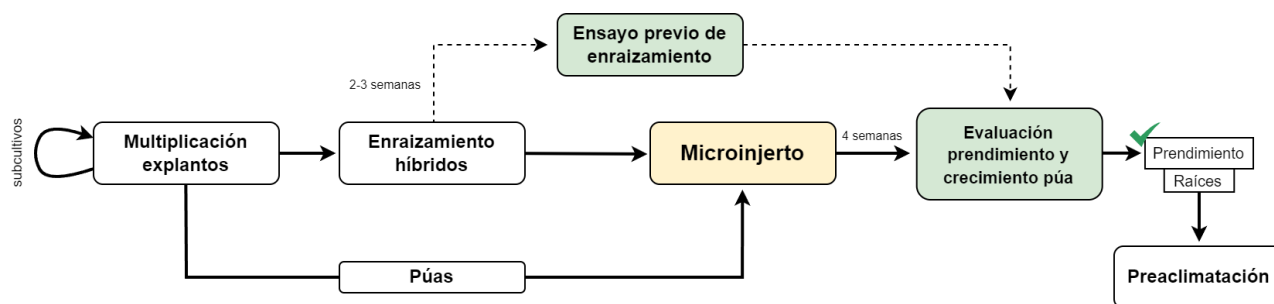


Figura 1: Diseño experimental donde se muestran los ensayos mencionados, las líneas continuas muestran el camino principal que conduce al ensayo de microinjerto, mientras que las líneas de puntos muestran el ensayo previo de enraizamiento y el estudio de sus posibles implicaciones sobre el microinjerto.

2) Material vegetal utilizado

Como portainjerto se han utilizado los híbridos certificados 3 y 7521. Estos son híbridos entre castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) y castaño japonés (*Castanea crenata* Siebold y Zucc.), ambos autorizados para su comercialización por ser resistentes a la enfermedad de la 'tinta', causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands (Miranda-Fontaíña et al., 2007).

Como púa se ha utilizado un clon de la variedad 'Branca', una variedad de *Castanea sativa* originaria de la comarca de Valdeorras (Ourense). Este cultivar se caracteriza por presentar una gran producción de fruto de un calibre medio. Como todas las variedades de castaño europeo, es susceptible a la 'tinta', por lo que debe injertarse sobre un portainjerto resistente a esta.

Este material ha sido mantenido a través subcultivo continuo, llevado a cabo cada 5 semanas, en medio de cultivo WPM (Lloyd y McCown, 1981), enriquecido con 0,1 mg·L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP), 3% de sacarosa y 0,7% de agar Difco® (ajustando el pH a 5,55 previo al autoclavado). Los experimentos se han establecido en una cámara de cultivo a 24 ± 2°C, bajo luces LED de luz blanca neutra (4000K), con un valor PAR de 45-55 μmol·m⁻²·s⁻¹ y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

3) Preparación del material

En primer lugar, se llevaron a cabo tres subcultivos consecutivos con el fin de ampliar el stock de explantos necesarios para llevar a cabo los experimentos programados. El primer subcultivo se realizó en julio de 2023 y el último se realizó en septiembre de ese mismo año.

Se tomó la decisión de establecer una altura de injerto de 6-8 cm, superior a la realizada en experimentos precedentes (Fernández Lorenzo et al., 2022), para prevenir el posible enraizamiento espontáneo de la púa una vez establecido el injerto en campo. Por este motivo, tras el último subcultivo de los híbridos se seleccionaron sólo aquellos brotes que superaban esta longitud para someterlos a la fase de enraizamiento.

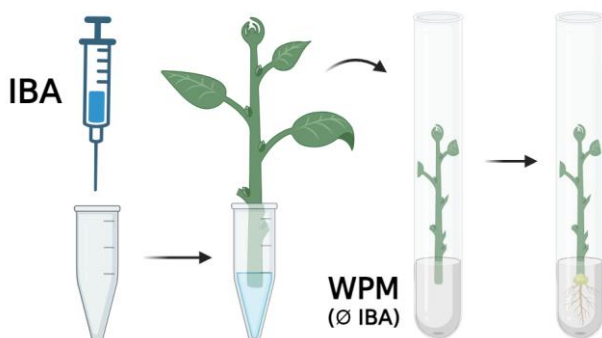


Figura 1: Enraizamiento mediante la técnica de inmersión basal (*dipping*).

La inducción del enraizamiento se llevó a cabo mediante inmersión basal (*dipping*), retirando primero el callo basal del brote y sumergiendo la base del tallo de los explantos (unos 2 mm) en una solución acuosa de ácido indol-3-butírico (IBA) a una concentración de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, durante 1 minuto, para luego pasarlos a un medio WPM desprovisto de reguladores del crecimiento.

En el momento del establecimiento, en la mitad de los explantos se recortaron las hojas de los explantos tratados, lo que en principio podría contribuir a reducir las posibilidades de rebrote del portainjerto, facilitar el manejo y prevendría la contaminación durante la manipulación. La condición 'defoliación o no' fue uno de los factores considerados tanto a la hora de evaluar el enraizamiento como el éxito del microinjerto.

En cuanto a los explantos de 'Branca' usados como púas, estos se mantuvieron en medio WPM enriquecido con $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BAP, de composición idéntica al usado en la fase de multiplicación, hasta el momento de ser injertados. Basándonos en experiencias previas, decidimos trabajar con segmentos nodales, ya que estos tienden a sufrir menor necrosis (Fernández Lorenzo et al., 2022). Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este estudio es analizar si el número de yemas presentes en la púa afecta al prendimiento, se decidió realizar microinjertos con púas de una o dos yemas.

4) Microinjerto

La técnica de microinjerto utilizada ha sido el método de hendidura vertical, que consiste en realizar un corte longitudinal en el portainjerto previamente decapitado, realizar dos cortes en forma de V en la base de la púa y finalmente insertar la púa en la hendidura practicada en el patrón, para que entre en estrecho contacto el cámbium de ambas partes. Para facilitar este contacto, se coloca un anillo de silicona de 1-2 mm de diámetro rodeando el área de injerto. Esta técnica ha derivado en altas tasas de prendimiento en estudios previos con *Castanea sativa* (Fernández-Lorenzo y Fernández-López, 2005). Además, en nuestros experimentos, hemos añadido una gota de BAP a una concentración de $0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el punto del injerto, para facilitar la cicatrización (figura 3).

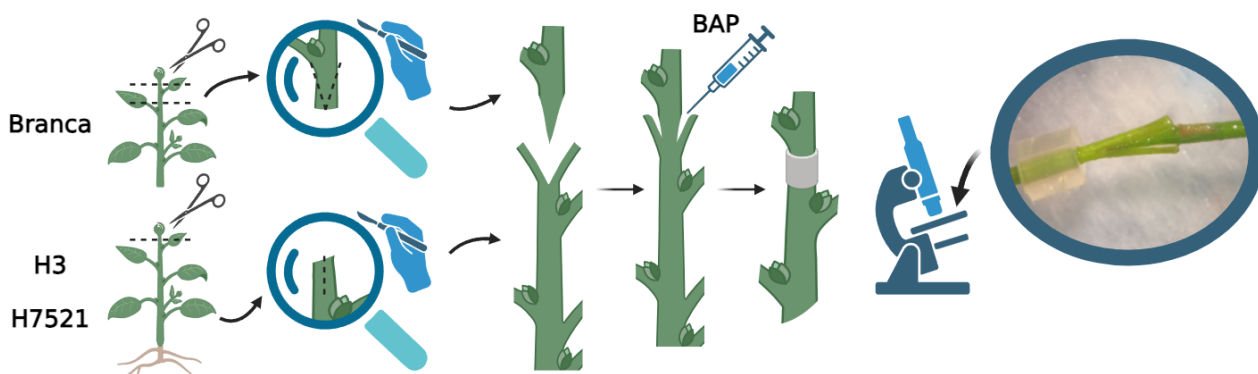


Figura 3: Preparación de púa ('Branca') y portainjerto (H3 y H7521) y técnica de microinjerto por hendidura vertical; a la derecha, una fotografía (tomada por el autor) de un injerto bajo lupa.

Los explantos microinjertados fueron establecidos de nuevo en un medio WPM idéntico al utilizado en la fase de enraizamiento. Pasadas 4 semanas, se comprobó si hubo prendimiento del injerto y, en las púas brotadas, se midió el crecimiento de la yema de la púa que emitió el brote más largo. Finalmente, se registró el grado de desarrollo de callo en el punto de injerto, asignándole un valor cuantitativo (0 = sin callo visible; 1 = callo de menos de 1 mm de radio; 2 = callo de entre 1 y 2 mm de radio; 3 = callo de más de 2 mm de radio).

5) Aclimatación

La aclimatación es una de las etapas cruciales en la producción de plantas propagadas mediante cultivo in vitro, ya que es en este proceso donde mayor porcentaje de plantas suele perderse. Para realizar una aclimatación exitosa se precisa de unas buenas condiciones de aclimatación. Teniendo en cuenta que las plantas proceden de un medio aséptico y con una humedad a saturación, es necesario mantener inicialmente una humedad alta a la vez que intentar evitar el desarrollo de hongos.

Se realizó un pequeño ensayo de preaclimatación de plantas microinjertadas que presentaban raíces, haciendo uso del material del que se disponía en el laboratorio. Para intentar mantener las condiciones antes citadas se esterilizó el sustrato (50% de turba rubia y 50% de perlita) y se pulverizaron las plantas con fungicida Captán® (0,3 g·L⁻¹) semanalmente con la intención de evitar la expansión de hongos. Las plantas se introdujeron en un contenedor de plástico transparente, que hizo de invernadero. El contenedor se mantuvo cerrado inicialmente (15 d), con la intención de mantener la mayor humedad posible en su interior, retirándose posteriormente la cubierta durante períodos progresivamente mayores.

6) Análisis de datos

El análisis de datos se realizó utilizando el entorno de desarrollo integrado RStudio (versión 2023.9.1.494) (Posit team, 2023), con el lenguaje de programación R (versión 4.3.0) (R Core Team, 2023).

Los resultados fueron analizados por análisis de varianza (ANOVA) mediante la función ``aov`` y por la prueba de Kruskal-Wallis, como alternativa no paramétrica, mediante la función ``kruskal.test``, ambas del paquete ``stats`` (R Core Team, 2023). Ambas pruebas parten de la hipótesis nula de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. También se incluyeron gráficos generados por medio de la función ``Boxplot`` del paquete ``car`` (Fox J. y Weisberg S., 2019).

Para el estudio de las hipótesis estructurales de los residuos se utilizaron:

- **Normalidad:** test de Shapiro-Wilks mediante la función ``shapiro.test`` del paquete ``stats``
- **Homocedasticidad:** test de Levene mediante la función ``leveneTest`` del paquete ``car``
- **Aleatoriedad:** test de Durbin-Watson mediante la función ``dwtest`` del paquete ``lmtest`` (Zeileis A. y Hothorn T., 2002)
- **Detección de atípicos:** test de detección de atípicos de Bonferroni mediante la función ``outlierTest`` del paquete ``car``

Todas estas pruebas parten de la hipótesis nula de que se cumplen las hipótesis estructurales estudiadas. Se llevaron a cabo todas las pruebas estadísticas con un nivel de confianza del 95%.

Los *datasets* utilizados presentan 268, 366 y 288 muestras (explantos), para los ensayos de enraizamiento (necrosis), enraizamiento (*sensu stricto*) y microinjerto, respectivamente. Estas muestras han sido separadas en función de los distintos niveles de la variable explicativa que se está estudiando y a su vez divididas en 20 grupos, de forma que a cada nivel de cada factor le corresponden un total de 20/(número de niveles de la variable explicativa) grupos. Las muestras han sido aleatorizadas previamente para evitar sesgos dentro de los grupos.

Resultados

1.1) Ensayo previo de enraizamiento: necrosis de los portainjertos

Se ha estudiado el efecto de retirar la yema apical (*Ápice*) de los portainjertos sobre el porcentaje de plantas necrosadas (*porc_necrosis*) y en qué medida se extendía esa necrosis en plantas necrosadas (*media_longitud*, medido en mm) por grupo de explantos durante el proceso de enraizamiento. También se ha estudiado si existen diferencias entre los clones híbridos (*Híbrido*).

Porcentaje de híbridos necrosados (*porc_necrosis*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	38,589%	±9,753	ANOVA I	0,9553	
	H7521	38,857%	±11,222			
Ápice	sin ápice	28,815%	±11,408	ANOVA I	2,11E-06	0,722
	con ápice	67,142%	±13,552			

Tabla 1: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

En primer lugar, se estudió si existían diferencias en el porcentaje de híbridos necrosados. Podemos observar en la *Tabla 1* como no existe diferencia significativa entre híbridos. Sin embargo, si se observa diferencia significativa en función de la presencia/ausencia del ápice, siendo mayor el porcentaje de necrosis en el caso de las plantas no decapitadas (es decir, que conservan el ápice), como habíamos previsto.

Media de extensión de necrosis (mm) en explantos necrosados (*media_longitud*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	11,830 mm	±5,548	Kruskal-Wallis	0,0006	
	H7521	6,355 mm	±4,177			
Ápice	sin ápice	9,111mm	±4,853	ANOVA I	0,667	
	con ápice	8,208 mm	±4,371			

Tabla 2: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Complementariamente, se estudió si existían diferencias en cuanto a la extensión de la necrosis en las plantas necrosadas. Como se observa en la Tabla 2, la extensión de la necrosis en el híbrido H3 es mayor que en H7521. En este caso, no se observó una diferencia significativa en función de la presencia/ausencia del ápice. Es decir, una vez que se manifiesta la necrosis, esta se extiende de forma similar en plantas con ápice o sin él.

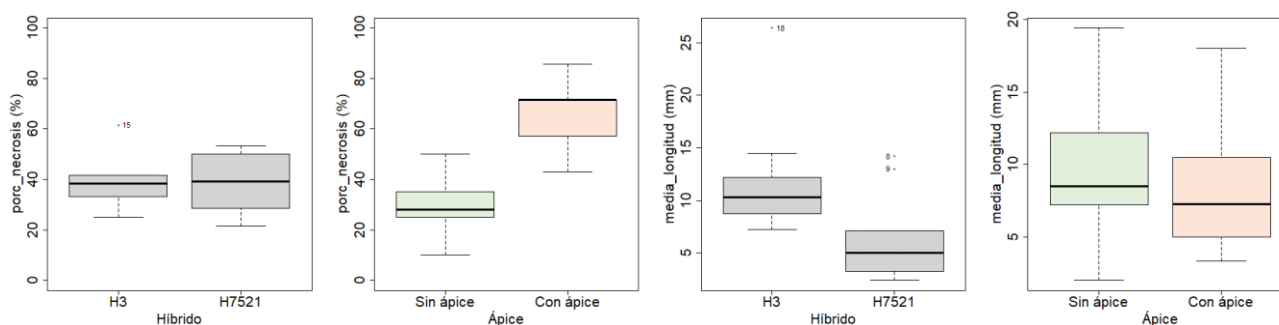


Figura 4: En orden de izquierda a derecha: boxplot de híbridos enfrentados a 'porc_necrosis' (%), ápice enfrentado a 'porc_necrosis', 'Híbrido' enfrentado a 'media_longitud' (mm) y 'Ápice' enfrentado a 'media_longitud'.

1.2) Ensayo previo de enraizamiento: formación de raíces

Se ha estudiado el efecto de la defoliación de los híbridos (*Hojas*) y la eliminación del ápice de los portainjertos (*Ápice*) sobre el porcentaje de plantas enraizadas (*porc_enraizamiento*), el número medio de raíces que presentan las plantas enraizadas (*media_numero_raices*) y la media de la longitud de la raíz más larga (*media_raiz_max_long*, medido en mm) por grupo de explantos. También se ha analizado si existen diferencias entre los híbridos (*Híbrido*).

Porcentaje de híbridos enraizados (*porc_enraizamiento*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	45,490%	±9,838	ANOVA I	0,089	
	H7521	52,631%	±7,845			
Ápice	sin ápice	51,900%	±8,948	ANOVA I	0,057	
	con ápice	43,910%	±8,654			
Hojas	defoliado	41,038%	±11,964	ANOVA I	0,002	0,414
	no defoliado	61,285%	±13,342			

Tabla 3: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

En primer lugar, se estudió si existían diferencias en el porcentaje de enraizamiento de los clones híbridos. Podemos observar en la Tabla 3 como no existe diferencia significativa entre las medias de los híbridos H3 y H7521, tanto decapitados como con ápice. Sin embargo, sí existe una diferencia significativa en función de la presencia/ausencia de hojas (*Hojas*), siendo mayor el enraizamiento en el caso de las plantas no defoliadas.

Número medio de raíces en explantos enraizadas (*media_numero_raices*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	2,953	±0,767	ANOVA I	0,191	
	H7521	2,518	±0,662			
Ápice	sin ápice	2,642	±0,540	Kruskal-Wallis	0,520	
	con ápice	2,978	±0,955			
Hojas	defoliado	2,789	±0,603	Kruskal-Wallis	0,791	
	no defoliado	2,807	±0,474			

Tabla 4: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Paralelamente, como complemento al estudio de las tasas de enraizamiento, se estudió si existían diferencias en el número medio de raíces en plantas enraizadas. Se observó que no existían diferencias en las medias para ninguno de los niveles de las variables explicativas.

Longitud media de la raíz más larga (mm) en explantos enraizados (*media_raiz_max_long*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	24,064 mm	±9,079	Kruskal-Wallis	0,005	
	H7521	13,092 mm	±2,345			
Ápice	sin ápice	14,785 mm	±2,885	Kruskal-Wallis	0,0008	
	con ápice	25,464 mm	±10,045			
Hojas	defoliado	22,293 mm	±3,653	ANOVA I	8,86E-05	0,583
	no defoliado	14,300 mm	±3,462			

Tabla 5: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Por último, analizamos si existían diferencias en la longitud media de la raíz más larga en explantos enraizados. Observamos que todos los factores influían en el valor de esta variable. Por ejemplo, la diferencia entre híbridos en este aspecto puede deberse a diferencias en la constitución genética relacionadas con la estructura radicular. Por otra parte, la diferencia entre plantas con o sin ápice, podría relacionarse con que la presencia de la yema apical favorecería el desarrollo en longitud de las nuevas raíces a través del aporte endógeno de auxinas. En cuanto a las hojas, la presencia de hojas desviaría parte de los recursos a la nutrición de estas, en detrimento del desarrollo radicular en longitud.

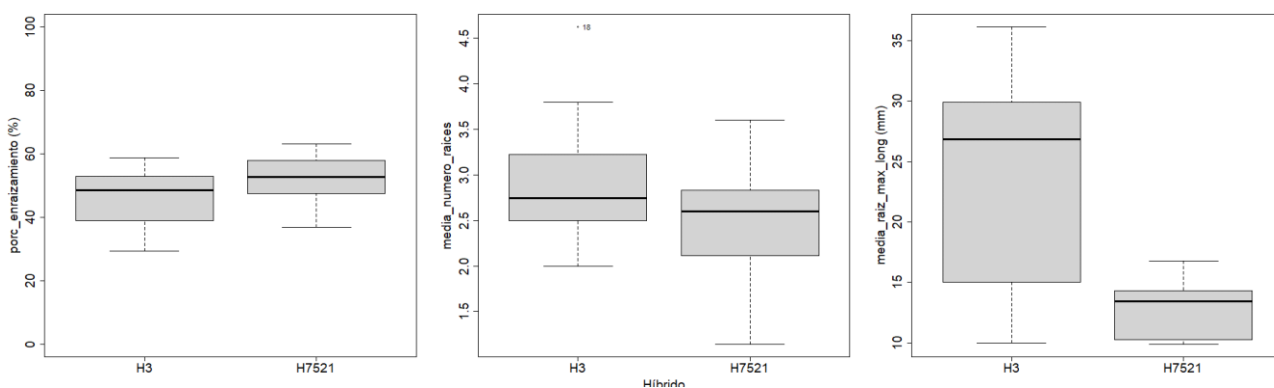


Figura 5: En orden de izquierda a derecha: boxplot de 'Híbridos' enfrentados a 'porc_enraizamiento' (%), 'media_numero_raices' y 'media_raiz_max_long' (mm).

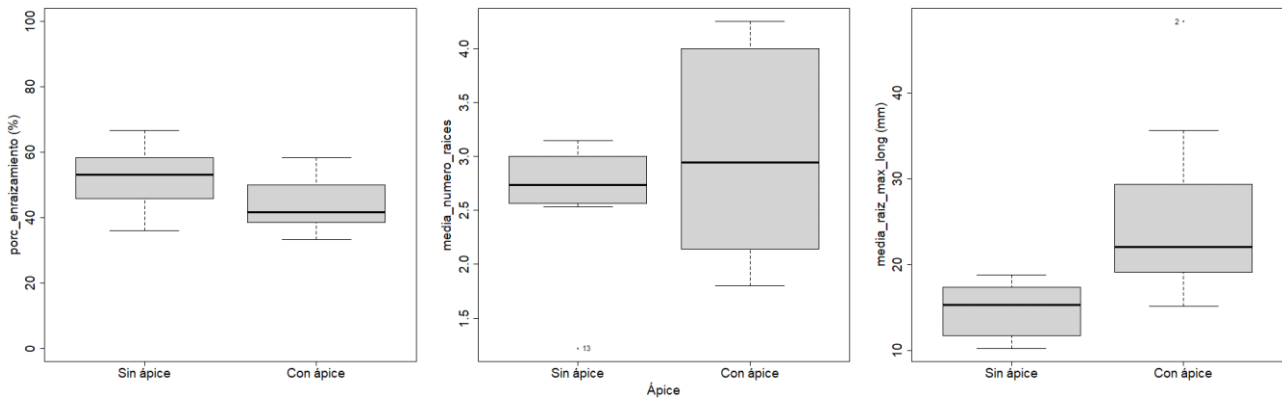


Figura 6: En orden de izquierda a derecha: boxplot de 'Ápice' enfrentado a 'porc_enraizamiento' (%), 'media_numero_raices' y 'media_raiz_max_long' (mm).

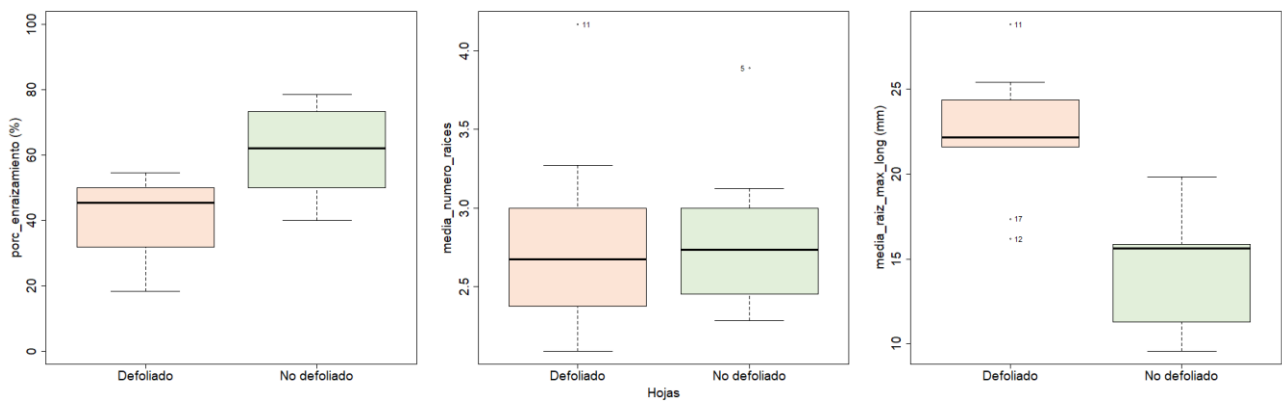


Figura 7: En orden de izquierda a derecha: boxplot de 'Hojas' enfrentado a 'porc_enraizamiento' (%), 'media_numero_raices' y 'media_raiz_max_long' (mm).

2) Ensayo de microinjerto

En el ensayo de microinjerto, en primer lugar, se estudió si la defoliación (*Hojas*) de los portainjertos híbridos durante el enraizamiento podía tener un efecto, en este caso, sobre el porcentaje de injertos prendidos (*porc_prendimiento*) y sobre la media de longitud máxima de los brotes en las púas prendidas (*media_crecimiento_max_yema*, medido en mm) por grupo de explantos.

Porcentaje de injertos prendidos (*porc_prendimiento*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Hojas	defoliado	41,950%	±11,391	ANOVA I	0,0001	0,554
	no defoliado	66,500%	±11,796			

Tabla 6: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Media de la longitud máxima (mm) de los brotes en las púas prendidas (*media_crecimiento_max_yema*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Hojas	defoliado	11,782	±4,938	ANOVA I	8,67E-01	0,554
	no defoliado	11,300	±7,562			

Tabla 7: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

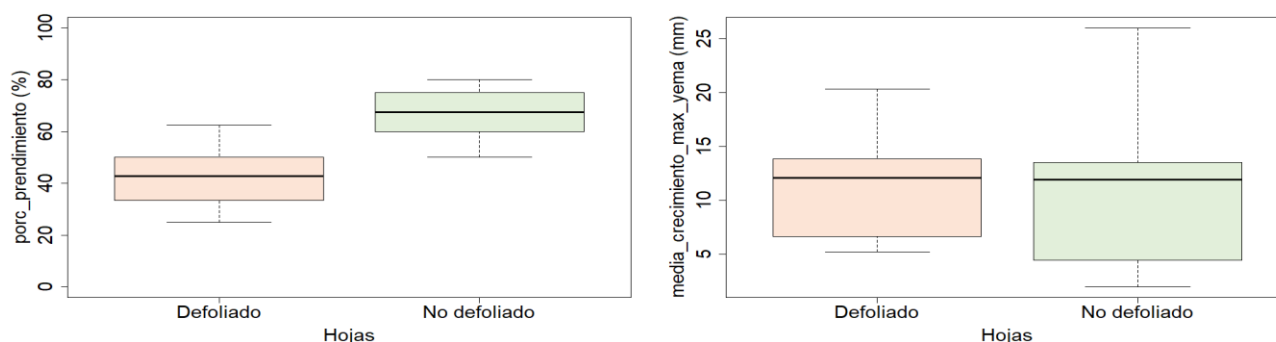


Figura 8: Boxplot de 'Hojas' enfrentado a 'porc_prendimiento' (%) (izquierda) y a 'media_crecimiento_max_yema' (mm) (derecha).

Tras comprobarse que la defoliación de los patrones reducía significativamente el porcentaje de prendimiento, se decidió retirar del *dataset* aquellos explantos que no habían sido defoliados, para mantener un estándar que permitiese obtener conclusiones estadísticamente válidas, con respecto a otras variables estudiadas.

Se procedió a analizar el efecto del tipo de púa (con 1 o 2 yemas axilares) (*Yemas*), de retirar el ápice de los portainjertos (*Ápice*), de la presencia de raíces en el portainjerto (*Enraizamiento*) y del desarrollo de callo en el punto de injerto (*Callo*, dividido en 4 niveles: '0' para explantos sin desarrollo de callo, '1' para callos de menos de 1 mm de radio, '2' entre 1 y 2 mm de radio y '3' más de 2 mm de radio) sobre las variables mencionadas anteriormente. También se estudió si existían diferencias entre clones híbridos (*Híbrido*).

Porcentaje de injertos prendidos (*porc_prendimiento*)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	39,523%	±14,999	ANOVA I	0,445	
	H7521	45,333%	±18,135			
Yemas	1 yema	19,333%	±9,269	ANOVA I	5,14E-08	0,815
	2 yemas	57,619%	±9,940			
* Ápice	sin ápice	29,380%	±12,119	ANOVA I	* 0,041	0,616
	con ápice	60,000%	±13,333			
Enraizamiento	enraizado	42,820%	±14,364	ANOVA I	0,799	
	no enraizado	41,212%	±13,463			
Callo	0 (sin callo)	25,789%	±7,061	Kruskal-Wallis	0,0003	
	1 (<1 mm)	100%	±0			
	2 (1-2 mm)	100%	±0			
	3 (>2 mm)	100%	±0			

Tabla 8: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Se observó que los únicos factores relacionados significativamente con el porcentaje de prendimiento eran el número de yemas en la púa (*Yemas*) y la presencia o no de callo en el punto de injerto (*Callo*), mientras que el diámetro del callo no parece estar correlacionado con el porcentaje de prendimiento. Las púas con 2 yemas axilares, de mayor tamaño, presentaron un porcentaje de prendimiento significativamente mayor que las púas con 1 yema. También se observó que los microinjertos realizados con portainjertos cuyo ápice había sido decapitados para el ensayo de enraizamiento presentaban un menor porcentaje de prendimiento.

El porcentaje de prendimiento para ambos clones híbridos no presenta diferencias significativas, por lo que, al menos en esta fase precoz, su grado de afinidad con la variedad ensayada es similar. Por último, ninguno de los factores analizados parece afectar significativamente al crecimiento de la púa tras el prendimiento.

Media de la longitud máxima (mm) de los brotes en las púas prendidas (media_crecimiento_max_yema)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Híbrido	H3	11,085 mm	±9,485	ANOVA I	0,592	
	H7521	12,836 mm	±3,662			
Yemas	1 yema	16,333 mm	±11,241	ANOVA I	0,412	
	2 yemas	12,423 mm	±7,384			
* Ápice	sin ápice	10,550 mm	±5,204	ANOVA I	0,524	
	con ápice	12,670 mm	±8,925			
Enraizamiento	enraizado	12,605 mm	±9,213	ANOVA I	0,549	
	no enraizado	10,296 mm	±6,937			
Callo	0 (sin callo)	9,250 mm	±5,670	Kruskal-Wallis	0,580	
	1 (<1 mm)	10,016 mm	±4,166			
	2 (1-2 mm)	11,200 mm	±13,000			
	3 (>2 mm)	14,033 mm	±6,000			

Tabla 9: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

(*) Al estudiar la posible interacción entre los factores 'Yemas' y 'Ápice' observamos que la combinación '1 yema : sin ápice' está representada por una única muestra, lo que provocaría un sesgo en los análisis. Para evitar esto, se decidió analizar la variable 'Ápice' filtrando las muestras en función de 'Yemas', analizando estadísticamente únicamente las muestras pertenecientes al nivel '2 yemas', donde la representación de ambos niveles de 'Ápice' está bien distribuida.

Porcentaje de injertos prendidos (porc_prendimiento)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Ápice	sin ápice	52,500%	±18,611	ANOVA I	0,313	
	con ápice	60,555%	±16,043			

Tabla 10: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Media de la longitud máxima (mm) de los brotes en las púas prendidas (media_crecimiento_max_yema)

Factor	Nivel	media	desviación estándar	test estadístico	p-valor	R ²
Ápice	sin ápice	9,750 mm	±4,424	ANOVA I	0,364	
	con ápice	12,741 mm	±6,962			

Tabla 11: Media, desviación estándar, test estadístico utilizado, p-valor y R² por nivel para cada factor.

Aplicando esta condición, las medias para los niveles del factor 'Ápice' no presentaron diferencias significativas en ninguna de las variables respuesta estudiadas.

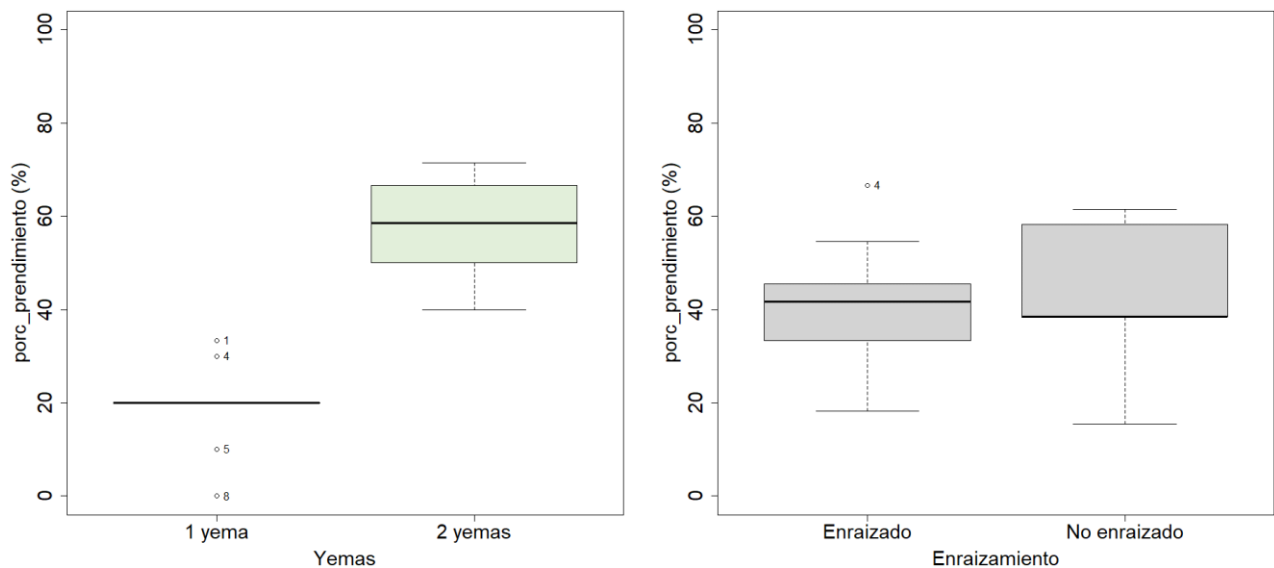


Figura 9: Boxplot de 'Yemas' enfrentado a 'porc_prendimiento' (%) (izquierda) y 'Enraizamiento' enfrentado a 'porc_prendimiento' (derecha).

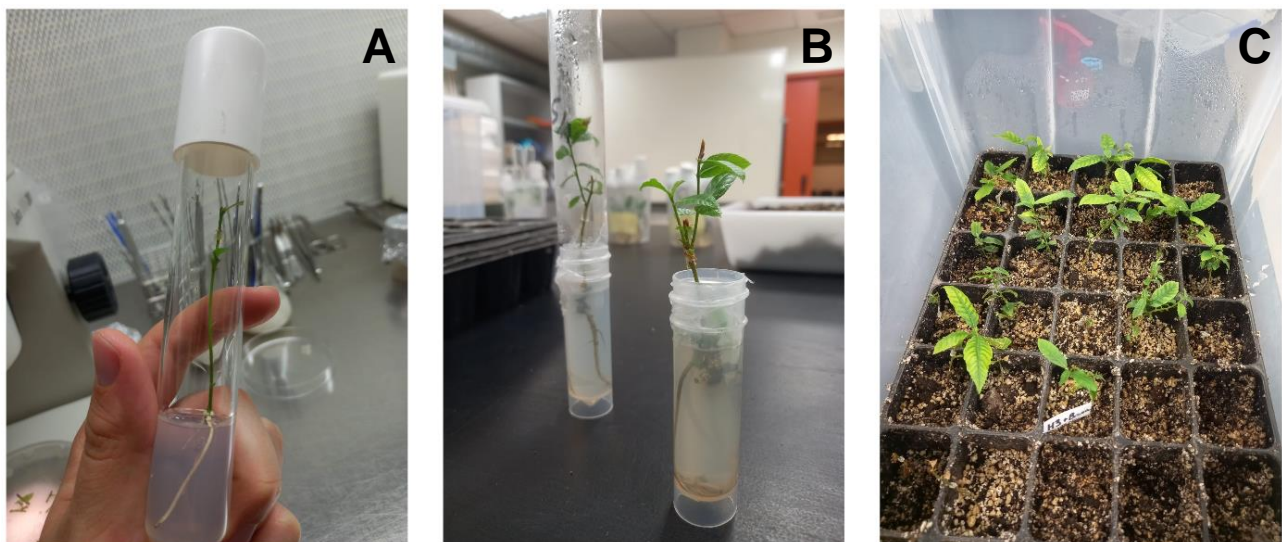


Ilustración 1: A) portainjerto híbrido recién injertado, B) microinjerto prendido y brotado listo para preaclimatación, C) plantas microinjertadas (H3 + Branca) en proceso de preaclimatación

Discusión

La necrosis durante el proceso de enraizamiento de los portainjertos

El elevado porcentaje de necrosis que presentan los explantos no decapitados puede explicarse por el efecto de las auxinas exógenas sobre el meristemo apical (Teixeira da Silva et al., 2020). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Viéitez et al. (1989), confirmando la hipótesis de que eliminar el ápice puede reducir la necrosis durante el enraizamiento. En sus experimentos también indicaban que tratar los explantos con unas gotas de BAP a los 10 días del tratamiento auxínico (cuando ya se había producido la diferenciación del tejido y las raíces ya habían comenzado a desarrollarse) podía ayudar a reducir la necrosis apical.

En cuanto a la diferencia en la extensión de la necrosis en explantos necrosados en función del híbrido analizado, no se han encontrado estudios de referencia que aborden explícitamente esta cuestión. En nuestro caso, se trata de una cuestión importante, puesto que para la realización de los microinjertos precisamos que los portainjertos presenten unas longitudes mínimas, que en este estudio se establecieron en 6 cm. Una hipótesis plausible para explicar la diferencia de respuesta entre los dos genotipos se basaría en la diferencia en diámetro medio del tallo que caracteriza a estos híbridos en cultivo in vitro. De esta manera, esto explicaría, al menos en parte, que en el híbrido H3, que presenta tallos de menor diámetro, se produzca una mayor extensión de la necrosis a lo largo del tallo que en el híbrido H7521.

Factores que afectaron al enraizamiento de los portainjertos

No se han encontrado estudios que relacionen explícitamente la remoción de las hojas sobre el enraizamiento en condiciones in vitro, aunque es práctica común conservarlas, por su presumible efecto positivo como fuente de reservas durante el proceso de enraizamiento adventicio (Fernández-Lorenzo, comunicación personal). Lo más similar en este sentido que hemos encontrado en la literatura es un estudio sobre el efecto de la defoliación por parte de insectos herbívoros de *Populus x canadensis* Moench, donde se reportaba la reducción de la formación de nuevas raíces en plantas defoliadas (Qu et al., 2001).

En cuanto al efecto de la decapitación (eliminación de la yema apical) de los portainjertos, en otros estudios en castaño (Viéitez et al., 1989) no se encontraron diferencias en el porcentaje de enraizamiento ni en el número de raíces, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Factores que afectan al éxito del microinjerto

Un aspecto relevante que se desprende de nuestro estudio es que la presencia de raíces en los portainjertos no afecta a la tasa de prendimiento ni al crecimiento de las púas, en contraste con los experimentos sobre *Vitis* spp. mencionados en la introducción (Sammona et al., 2018), en los cuales obtuvieron un aumento en la tasa de prendimiento y de crecimiento de la púa al utilizar portainjertos no enraizados. En otros estudios sobre *Vitis vinífera* (Zhu et al., 2007) y *Morus* spp. (Ma et al., 1996), se utilizaron patrones sin enraizar para microinjertar, aplicando un tratamiento auxínico de manera simultánea, obteniendo resultados exitosos.

Con respecto a la importancia de la presencia de las hojas en los portainjertos, en ensayos como el de Richardson et al. (1996) en microinjerto en manzano, se utilizaron portainjertos defoliados con el fin de facilitar el manejo, pero no encontramos referencias en las que se haya comparado el efecto de la defoliación del patrón sobre la tasa de prendimiento. En nuestro caso, se observa claramente que la defoliación tiene un efecto negativo tanto en las tasas de enraizamiento de los patrones como en el prendimiento posterior de los microinjertos.

En lo que se refiere al tipo de púa utilizada, hemos obtenido un mayor porcentaje de prendimiento con el uso de púas de 2 yemas axilares respecto a púas con una sola yema. En ningún estudio de los consultados se aborda el factor tipo de púa en función de las yemas axilares presentes en esta. Lo que sí se ha comprobado en numerosos estudios es que, en general, el porcentaje de prendimiento mejora al aumentar el tamaño de la púa, evidentemente hasta un cierto límite (Rehman y Gill, 2015). Es probable que en nuestro caso tenga un mayor peso sobre el resultado observado el hecho de que las púas con 2 yemas axilares presentan en general una longitud que duplica la de las púas con 1 yema,

siendo el tamaño de la púa, y no el número de yemas el que haya determinado en gran medida el éxito en el prendimiento.

Finalmente, la observación de un cierto desarrollo de callo en la zona de injerto parece mostrarse como un indicador inicial de un injerto exitoso. Este callo se desarrolla básicamente como consecuencia de la proliferación del cambium vascular (Richardson et al., 1996). Aunque normalmente esta no es una característica deseable cuando la proliferación de callo alrededor del punto de injerto se hace excesiva, ya que tiende a relacionarse con un deficiente proceso de conexión de los sistemas vasculares y con posibles fenómenos de incompatibilidad, en nuestro caso, las dimensiones de este pequeño callo formado en torno a la unión del injerto no parecen estar relacionadas con estos fenómenos, y nuestros resultados han mostrado que su presencia y dimensiones no se relacionan con un mayor o menor grado de crecimiento de la púa tras el prendimiento.

Conclusiones

- La presencia de raíces en los portainjertos en el momento de la realización de los microinjertos no mejora la tasa de prendimiento ni el crecimiento de la púa con respecto al uso de patrones sin raíces. Estos últimos resultan interesantes a efectos de facilitación de la técnica y de disminución del riesgo de contaminación durante el microinjerto. Resultan por lo tanto ideales para estudios preliminares de compatibilidad, pero presentan menos ventajas si el objetivo es la producción de planta para aclimatación.
- El número de yemas axilares de la púa tiene un efecto sobre la tasa de prendimiento, siendo mayor en púas con 2 yemas que en púas con 1 yema. Debería verificarse si este aumento se debe básicamente a que las púas con 2 yemas son de mayor tamaño.
- Se han encontrado varios factores que afectan directa o indirectamente a la obtención de planta injertada de buena calidad:
 - Eliminar el ápice de los portainjertos en el proceso de enraizamiento previene en cierta medida la necrosis provocada por el tratamiento auxínico, y no parece tener un efecto negativo sobre el éxito del microinjerto realizado posteriormente.
 - Aunque la práctica de la defoliación de los portainjertos pueda presentar ciertas ventajas en el manejo y el mantenimiento de las condiciones de asepsia, es preferible evitar la defoliación, ya que provoca un descenso importante de la tasa de enraizamiento de los portainjertos y del prendimiento de los microinjertos.
 - En nuestro caso, el desarrollo de un pequeño callo alrededor del punto de injerto se ha relacionado con el éxito del microinjerto y parece no vincularse, al menos inicialmente, con la mayor o menor afinidad púa-patrón.
- La aplicación de unas condiciones de microinjerto basadas en los resultados obtenidos resultará en una optimización del proceso, quedando pendiente el desarrollo de protocolos válidos de enraizamiento en el caso de optar por la realización de microinjertos sobre portainjertos sin raíces.

Bibliografía

- Chilukamarri, L., Ashrafzadeh, S., & Leung, D. W. M. (2021). In-vitro grafting – Current applications and future prospects. In *Scientia Horticulturae*, 280
- Fernández-Lorenzo, J. L., Crecente-Campo, S., Prado-Vázquez, A. N., Couso-Viana, A., Rigueiro-Rodríguez, A., & Ferreiro-Domínguez, N. (2022). *Microinjerto de variedades certificadas de castaño*. 8º Congreso Forestal Español
- Fernández-Lorenzo, J.L. & Crecente-Campo, S. (2010). IN VIVO SERIAL MICROGRAFTING OF CASTANEA SATIVA IN SHORT CYCLES. *Acta Hortic.* 866, 291-296
- Fernández-Lorenzo, J. L., & Fernández-López, M. J. (2005). Reinvigoration of mature castanea sativa by serial micrografting onto a juvenile clone. *Acta Horticulturae*, 693
- Fox J. & Weisberg S. (2019). An R Companion to Applied Regression, Third edition
- Rehman H. & Gill, M. (2015). Micrografting of Fruit Crops-A Review. *Journal of Horticulture*, 2(3)
- Lloyd, G., & McCown, B. H. (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*), by shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagation Society*, 30, 421–42
- Ma, F., Guo, C., Liu, Y., Li, M., Ma, T., Mei, L., & Hsiao, A. I. (1996). In vitro shoot-apex grafting of mulberry (*Morus alba* L.). *HortScience*, 31(3)
- Miranda-Fontañá, M. E., Fernández-López, J., Vettraino, A. M., & Vannini, A. (2007). Resistance of *Castanea* clones to *Phytophthora Cinnamomi*: Testing and genetic control. *Silvae Genetica*, 56(1)
- Posit team (2023). RStudio: Integrated Development Environment for R. Posit Software
- Qu, Y., Ghatpande, A., El-Sherif, N., & Boutjdir, M. (2001). Repeated insect defoliation effects on growth, nitrogen acquisition, carbohydrates, and root demography of poplars. *Oecologia*, 129(1), 65–74
- R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing
- Richardson, F. V. M., Mac, S., Tsaio, A., & Harvey, B. M. R. (1996). A Study of the graft union in in vitro micrografted apple. *Plant Growth Regulation*, 17–23
- Sammona, O. S., Abde Elhamid, N. A., & Samaan, M. S. F. (2018). EFFECT OF SOME FACTORS ON THE MICROPROPAGATION AND MICROGRAFTING OF SOME GRAPE ROOTSTOCKS IN VITRO. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 26(1), 133–146
- Teixeira da Silva, J. A., Nezami-Alanagh, E., Barreal, M. E., Kher, M. M., Wicaksono, A., Gulyás, A., Hidvégi, N., Magyar-Tábori, K., Mendler-Drienyovszki, N., Márton, L., Landín, M., Gallego, P. P., Driver, J. A., & Dobránszki, J. (2020). Shoot tip necrosis of in vitro plant cultures: a reappraisal of possible causes and solutions. In *Planta*, 252(3)
- Vieitez, A. M., Sánchez, C., & San-José, C. (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae*, 41(1–2), 151–159
- Zeileis A, & Hothorn T (2002). Diagnostic Checking in Regression Relationships. *R News*, 2(3), 7–10
- Zhu, B., Cao, H. N., Zong, C. W., Piao, R. Z., Chen, L., & Zhou, L. (2007). Micrografting Technology in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1(1)