
AVANCES BIOTECNOLÓGICOS EN CASTAÑO MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE ÁRBOLES SUPERIORES

Marta González O¹.; Oriana Ortiz N². y Susana Benedetti R³

RESÚMEN

Entre las actividades de investigación llevadas a cabo por el Instituto Forestal se ha desarrollado una serie de proyectos relacionados con especies de madera valiosas, siendo una de las principales el castaño (*Castanea sativa*). Por medio de ellos se ha detectado la necesidad de contar con plantas de calidad y en cantidad suficiente para establecer plantaciones con fines forestales.

El presente trabajo fue llevado a cabo con el objetivo de producir replicas de árboles superiores de castaño, mediante técnicas de micropropagación o cultivo *in vitro*.

Se probó un total de 31 árboles superiores, de los cuáles 29 clones fueron establecidos y multiplicados en laboratorio. La tasa de multiplicación fue variable dependiendo del clon. Se obtuvo porcentajes de 70 a 100 % tanto para la etapa de enraizamiento como para la de supervivencia, luego de la aclimatación.

Los avances desarrollados en la micropropagación de árboles superiores adultos de castaño, ya permiten utilizar esta técnica para obtener réplicas de individuos selectos y generar plantas de características superiores, destinadas a promover el cultivo forestal de la especie y la generación de madera de alto valor de castaño en Chile.

Palabras claves: *Castanea sativa*, mejoramiento genético, cultivo *in vitro*.

¹ Instituto Forestal. Chile. mgonzale@infor.gob.cl

² Instituto Forestal. Chile. oortiz@infor.gob.cl

³ Instituto Forestal. Chile. sbenedet@infor.gob.cl

BIOTECHNOLOGICAL ADVANCES IN CHESTNUT SUPERIOR TREES *IN VITRO* PROPAGATION

SUMMARY

Among research activities carried out by the Forest Institute of Chile, a series of projects related to valuable wood species has been made, being one of the main species chestnut (*Castanea sativa*). Through them, it has been detected the need to have high quality seedlings in a sufficient number to establish forest plantations.

The present study was carried out with the objective to produce superior copies of chestnut, through micropropagation or *in vitro* culture techniques.

Superior trees (31) were tested, from which 29 clones were established and multiplied in laboratory. Multiplication rate was variable depending on the clone. From 70 to 100 % propagation success was obtained during the rooting to acclimatization stages.

Micropropagation advances of adult superior chestnut trees, allow using this technique to obtain copies of select individuals and to generate superior characteristics seedlings destined to promote chestnut forest culture and high value wood generations in Chile.

Key words: *Castanea sativa*, genetic improvement, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

Entre las actividades de investigación llevadas a cabo por el Instituto Forestal se han realizado una serie de proyectos relacionados con especies de madera valiosas. Por medio de ellos se ha detectado la necesidad de contar con plantas de calidad y en cantidad suficiente para establecer plantaciones con fines forestales. Recogiendo esta inquietud, se ha tomado la decisión de trabajar con castaño para superar los inconvenientes técnicos y responder a las necesidades del sector privado.

El castaño es una especie tradicionalmente cultivada en Chile, principalmente por su aptitud frutal, cuyo mercado ha sido el interno y de consumo directo por parte de los propietarios dueños de los bosquetes o árboles, así como para la alimentación animal (directa en el lugar o como parte integrante de una alimentación artificial). En cuanto a su aptitud forestal, esta especie de madera fina, forma parte de un nicho de mercado selecto, que compra maderas a valores muy elevados. Es así que en el mercado europeo se transan trozas de castaño en valores que fluctúan entre los 150 - 500 US \$/m³. Incluso en Chile se comercializa castaño, pero se vende como encino, dado el mayor conocimiento y valoración que existe de ésta especie, a pesar de que sus características tecnológicas y su color más claro hace al castaño una materia prima sustituto muy apreciada por los mueblistas (Loewe y González, 2002).

Con el objeto de avanzar en la temática biotecnológica del castaño, el Instituto Forestal se encuentra desarrollando los proyectos "Uso de Herramientas Biotecnológicas para Aumentar la Rentabilidad de Plantaciones de Castaño en la VIII Región" financiado por Innova Bio-Bio y FIA y "Hacia el Desarrollo del Castaño Forestal en Chile", financiado por FONDEF. Uno de los objetivos de estos proyectos es implementar diversas acciones para mejorar la productividad de las plantaciones de castaño, tales como la selección de árboles superiores y la propagación de estos mediante el uso de organogénesis somática y semilla genéticamente mejorada en la producción de plantas.

Cabe señalar que en el caso de castaño, existen factores que no han permitido un desarrollo importante de sus plantaciones para destino industrial y su valor se ve opacado por el uso de materiales genéticos inadecuados, particularmente de variedades que no son las idóneas para la producción maderera, en ocasiones incluso de variedades destinadas a producción de frutos.

Estas condiciones permiten suponer que es necesario impulsar el establecimiento y manejo de plantaciones forestales a través del desarrollo y perfeccionamiento de tecnologías que permitan maximizar la productividad de la especie aprovechando las instancias de fomento disponibles según las condiciones de cada propietario, es decir, crear la base productiva con condiciones óptimas para la obtención de madera de alta calidad. En este sentido, la existencia de un mercado real en el país para la madera de castaño y toda mejora tecnológica y de fomento a la forestación, permitirán consolidar al castaño como una opción real de diversificación y negocio forestal en Chile.

A continuación, son presentados los principales aspectos técnicos relacionados con la multiplicación *in vitro* de árboles superiores de castaño, información que pretende presentar los avances logrado por medio de esta técnica en material vegetal adulto, seleccionado para producir madera de alto valor en la especie.

MATERIAL Y MÉTODO

La micropropagación de especies forestales, en este caso castaño, es una herramienta muy útil para masificar material genético selecto, constituyendo así un importante elemento de apoyo para transferir las ganancias obtenidas en los programas de selección y mejoramiento genético.

Su aplicación operativa requiere la ejecución de las siguientes etapas sucesivas:

- Identificación y selección del material a propagar (árboles superiores)
- Colecta de propágulos y establecimiento de cultivos.
- Desarrollo y multiplicación de brotes.
- Enraizamiento de brotes.
- Aclimatación de plantas.

Identificación y Selección de Árboles Superiores

El material vegetal a propagar se cosechó desde árboles seleccionados (plus). La selección de candidatos a plus se inició con la búsqueda de los árboles desde plantaciones de castaño ya identificadas por INFOR y que presentaban individuos de interés forestal. Estos rodales ubicados entre la VIII y X Región fueron recorridos sistemáticamente en busca de árboles superiores. Cabe señalar que el origen principal de los árboles seleccionados (principalmente en la VIII Región) corresponde en la mayoría de los casos a árboles frutales que han tenido muy poco manejo pero que presentan características forestales de interés, también se seleccionó rodales (para las Regiones IX y X) que fueron plantados para producir madera y han sido manejados irregularmente, pero que, sin embargo, presentan características dendrométricas y fenotípicas de interés forestal, es decir, árboles producidos de semillas (sin injertar) que fueron plantados a alta densidad, siendo la mayoría de ellos escasamente manejados. La cosecha de material, púas, se realizó en terreno a través del escalamiento de los árboles superiores previamente seleccionados.

El material a micropropagar correspondió a árboles adultos, lo cual esta asociado a un mayor grado de dificultad para el cultivo *in vitro*, debido a factores tales como, contaminación de explantes, necrosis apical, oxidación, enraizamiento y posterior supervivencia *ex vitro*.

También es importante destacar que existe un factor de tipo clonal, que ocasiona una respuesta diferenciada de los clones a los medios de cultivo. Distintos clones exhiben mayor o menor facilidad para el establecimiento e iniciación de los cultivos, además de diferentes tasas de multiplicación y respuestas a los tratamientos de enraizamiento. En este caso, se trabajó con un número moderado de clones (31), encontrándose diferencias importantes entre ellos (Figura N° 1).



Figura N° 1
ÁRBOL SUPERIOR DE CASTAÑO SELECCIONADO PARA SER MICROPROPAGADO
X REGIÓN, CHILE

Colecta de Propágulos y Establecimiento de Cultivos

Mediante escalamiento de los árboles selectos se obtuvo porciones de ramas con yemas latentes, las cuales fueron almacenadas en cámara de frío y posteriormente inducidas a brotar en laboratorio, bajo condiciones controladas de asepsia, fotoperiodo y temperatura. Una vez iniciado el desarrollo de los brotes, fueron cortadas, sometidas a un protocolo de asepsia y establecidas en frascos de vidrio de 200 ml con 60 ml de un medio de cultivo basado en el de Gresshoff y Doy (1972) con los macronutrientes reducidos a la mitad, sin hormonas, suplementado con sacarosa (3% p/v) y agar (0,7% p/v, Difco-Bacto Agar). El pH fue ajustado a 5,7 con HCl 0,1 N, antes de ponerlo en autoclave por 20 minutos a 0,1 Mpa. Esta última labor se desarrolló bajo máximas condiciones de asepsia, en una cámara de flujo laminar, manteniendo una rigurosa identificación del material.

El principal problema en esta fase fue la frecuente oxidación de los cultivos, la cual fue muy intensa en algunos clones, lo que provocó una pérdida importante de brotes. En algunos clones esta pérdida fue de hasta el 60 % de los explantes ya establecidos libres de contaminación.

Para mitigar este problema, los explantes fueron repicados a medio fresco, tan pronto como se observaba la presencia de oxidación en el cultivo. Adicionalmente, durante esta fase y por un periodo de 4 a 6 semanas, los cultivos fueron mantenidos en una condición de semisombra. También se observó una respuesta positiva a la adición de PVP (Polivinylpirrolidone) al medio de cultivo, en una dosis de 60 mg/L.

Desarrollo y Multiplicación de Brotes

Una vez observada la estabilización de los cultivos (caracterizada por brotación abundante y crecimiento normal del callo), los explantes fueron traspasados a frascos de mayor tamaño, utilizando finalmente una variante del medio BTM (Chalupa, 1983) desarrollada por el proyecto. Se probó tres medios de cultivos; GD, BTM (Chalupa, 1983) y DKW (Driver y Kuniyuki, 1984), con diferentes concentraciones de citoquinina (6-benzylaminopurine) y agentes gelificantes como Agar y Phytigel. Se observó un comportamiento diferenciado de los clones a los distintos medios de cultivo utilizados.

El principal problema presentado en esta fase fue la necrosis apical de los explantes. Para evitar esto se reemplazó la tapa de los frascos por una doble capa de film de polietileno, con el objetivo de permitir un mayor intercambio de gases, lo que ayudó a corregir este problema y el de la vitrificación de los cultivos. Además, se observó que la utilización de una concentración de 0,125 mg/L de BAP, provocó en algunos clones una excesiva elongación de los explantes, por lo que se aplicó una dosis más alta de esta hormona, en los tratamientos de multiplicación.

Durante la fase de multiplicación de brotes, los explantes fueron periódicamente seccionados para su multiplicación y traspasados a medio fresco. Los cultivos fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales de la etapa anterior.

Enraizamiento de Brotes

Los ensayos de enraizamiento, fueron efectuados con aquellos clones que presentaron las tasas más altas de multiplicación, sobre los 100 brotes cultivados *in vitro*. El principal problema que presentó la especie, fue la necrosis apical producto de la aplicación de la auxina IBA (Ácido Indol-Butírico), lo que provoca su muerte. Este efecto ha sido reportado en numerosos estudios de la especie al respecto (Sánchez *et al*, 1997a; Sánchez *et al*, 1997 b; Sánchez y Vieitez, 1991; Vieitez *et al*, 1986).

Como procedimiento, se adoptó colocar los brotes en medio MS ₂, ° nitratos, sales y vitaminas, 3 mg/L de IBA y agar; luego colocar durante 5 días en oscuridad y traspasar a medio BTM ₂, sin hormona y finalmente en fotoperíodo normal como el utilizado operativamente para la producción de plantas, ya que con este se obtienen los porcentajes de enraizamiento más altos, en conjunto con un mejor resultado en cuanto al manejo de la necrosis apical. Este procedimiento se basa en la utilización de medios de cultivo sucesivos, de manera de utilizar uno para la primera fase llamada de inducción de raíces y otro para una segunda fase de expresión, que es donde se forman y emergen las raíces del brote.

Adicionalmente, se ha observado que la adición de calcio, en la forma de Pantetonato de calcio, al medio de expresión de raíces (BTM _ sin hormonas) eleva los porcentajes de enraizamiento sobre 70 % en todos los clones ensayados y, además, mejora la estructura de las raíces obtenidas, tanto en conexión vascular como en su número y forma. El enraizamiento de los brotes alargados se efectuó en un proceso de dos etapas sucesivas. La primera de inducción de raíces en oscuridad y con estimulación hormonal y la segunda de expresión y elongación radicular, en la cual se forman y emergen las raíces del brote.

Aclimatación de Plantas

Las plantas producidas *in vitro* inicialmente presentan estomas no funcionales, por lo tanto deben someterse a un proceso de aclimatación, en el cual se acondiciona la planta para permitir su sobrevivencia en un ambiente normal.

Para tal efecto, una vez ocurrido el enraizamiento y cuando las raíces alcanzan 4 cm de longitud, los explantes fueron repicados a cajas con un sustrato compuesto por turba, perlita y un medio de cultivo líquido desarrollado por INFOR, correspondiente a una variación del medio BTM sin sacarosa y con los macronutrientes reducidos a la mitad. Las cajas fueron cubiertas con film de polietileno, que se retiró por intervalos progresivos de tiempo para exponer en forma gradual a la planta a condiciones de humedad *ex vitro*.

RESULTADOS

Identificación y Sección de Árboles Superiores

Se identificó un total de 31 árboles superiores (Cuadro N° 1), con una edad que fluctúa entre los 15 y 45 años.

Cuadro N° 1
 ÁRBOLES DE CASTAÑO SELECCIONADOS PARA MICROPROPAGACIÓN

N° de árboles seleccionados	Predio	Propietario	Año Plantación	Comuna	Provincia	Región
1	Lanalhue	Forestal Mininco	1979	Cañete	Arauco	VIII
2	Santa Luisa (Jauja)	Forestal Mininco	1980	Collipulli	Malleco	IX
2	Quilas Bajas	Herman Toeter		Quepe	Cautín	IX
2	Voipir	Carlos Weber	1973	Villarrica	Cautín	IX
3	Pillo Pillo	Forestal Tornagaleones	1980	Valdivia	Valdivia	X
1	Los Copihues	Forestal Anchile		Valdivia	Valdivia	X
5	Las Palmas	UACH	1962	Valdivia	Valdivia	X
2	Los Pinos	UACH	1975	Valdivia	Valdivia	X
1	Tornagaleones	Forestal Anchile		Corral	Valdivia	X
3	Las Minas	Forestal Tornagaleones	1982	Corral	Valdivia	X
2	Taico	Forestal Anchile	1989	Paillaco	Valdivia	X
2	Las Trancas	Forestal Valdivia	1975	La Unión	Valdivia	X
3	Peleco	Forestal Valdivia	1976	La Unión	Valdivia	X
1	San Pedro	Forestal Valdivia	1980	Los Lagos	Valdivia	X
1	Pumillahue	Forestal Tornagaleones	1982	Máfil	Valdivia	X

Colecta de Propágulos y Establecimiento de Cultivos

El procedimiento utilizado para coleccionar y establecer asépticamente el material, permitió instalar en cultivo *in vitro* a 28 clones de los 31 árboles superiores seleccionados.

Desarrollo y Multiplicación de Brotes

La tasa de multiplicación obtenida fue variable, obteniéndose al cabo de seis meses clones con elevadas tasas de multiplicación y otros donde esta no fue mayor a 1:2.

Enraizamiento de Brotes

El procedimiento utilizado para el enraizamiento permitió obtener porcentajes de éxito entre 70 y 100 % y disminuir la incidencia de la necrosis apical provocada por la auxina utilizada para estimular la formación de raíces (Figura N° 2).

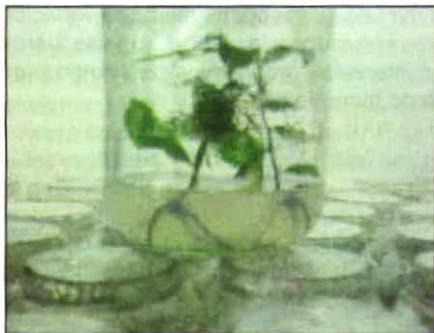


Figura N° 2
ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE BROTES DE CASTAÑO, VIII REGIÓN, CHILE

Aclimatación de Plantas

Durante la etapa de aclimatación se obtuvo un porcentaje de sobrevivencia de las plantas micropropagadas que varió entre clones, entre un 70 y 100 %, permitiendo obtener plantas funcionales autotróficas (Figura N° 3).



Figura N° 3

PLANTAS MICROPROPAGADAS DE ÁRBOLES SUPERIORES DE CASTAÑO, VIII REGIÓN, CHILE

CONCLUSIONES

El protocolo de micropropagación desarrollado por INFOR para multiplicar árboles adultos de castaño ha demostrado ser una alternativa viable para la obtención de réplicas vegetativas de individuos de características productivas superiores.

Estos promisorios resultados facultan la masificación de genotipos superiores y el posterior aprovechamiento de sus ventajas productivas en plantaciones operacionales destinadas a la producción de madera de alta calidad.

Las plantas obtenidas experimentan un desarrollo normal y serán próximamente establecidas en ensayos clonales de terreno, para continuar evaluando su comportamiento a través del tiempo.

La rigurosa evaluación de los ensayos clonales que serán próximamente establecidos permitirá la adopción de esquemas de silvicultura clonal o de plantaciones mixtas con participación de castaños clonales, aspecto que permitirá aumentar la productividad de sus plantaciones, en la medida que se utilicen clones selectos de manifiesta superioridad productiva y probada superioridad de su desempeño en terreno.

REFERENCIAS

Chalupa, V., 1983. Micropropagation of Conifer and Broad-Leaved Forest Trees. *Communications Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.

Driver, J. A. y Kuniyuki, A. H., 1984. In Vitro Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *Hortscience* 19: 507-509.

Gresshoff, P. M. y Doy, C.H., 1972. Development and Differentiation of Haploid *Lycopersicum esculentum*. *Planta* 107: 161-170.

Loewe, M. V. y González, O. M., 2002. Una Tarea Pendiente: Rescate y Valorización de Recursos Genéticos de Nogal (*Juglans regia*) y Castaño (*Castanea sativa*) Chilenos para la Producción de Maderas Valiosas. *Revista Chile Forestal* 294: 51-56.

Sánchez, M. y Vieitez, A., 1991. In Vitro Morphogenetic Competence of Basal Sprouts and Crown Branches of Mature Chesnut. *Tree Physiology*, 8: 59-70

Sánchez, M.; Ballester, A. y Vieitez, A., 1997 a. Reinvigoration Treatments for the Micropropagation of Mature Chesnut Trees. *Annales des Sciences Forestières* 54: 359-370.

Sánchez, M.; Ferro, C.; Ballester A. y Vieitez, A., 1997 b. Improving Micropropagation Conditions for Adult-Phase Shoots of Chestnut.

Vieitez, A.; Vieitez, M. y Vieitez, E., 1986. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 1: Trees I, 393-414.