ITEA (1995), Vol. 91V N.º 2, 65-70

ESQUEMA DE PRODUCCIÓN DE MATERIALES CLONALES FORESTALES Y FRUTALES DE CASTAÑO HIBRIDO (*Castanea crenata Sieb et Zucc x C. sativa Mill*)

J. Fernández*
E. Miranda*
S. Pereira**

* Centro de Investigaciones Forestales de Lourizan Aptd 127 Pontevedra
** EPS. Universidad de Santiago de Compostela

RESUMEN

Para establecer un esquema de producción de materiales de castaño híbrido se ha definido un sistema que comprende: la disposición del material parental; los métodos de propagación clonal a utilizar para la producción de materiales de base y comerciales; y, finalmente, un sistema de identificación de los materiales. Se trata de material para uso forestal y frutal (portainjertos y productores directos de fruto) y se ha adoptado para todos ellos el esquema establecido en el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Vivero Frutales. La utilización de isoenzimas para verificar la identidad de los materiales de base presenta en híbridos de castaño una buena capacidad para diferenciación clonal. El material vegetal organizado esta siendo evaluado en ensayos clonales en campo.

Palabras clave: castaño, certificación, isoenzimas, propagación clonal.

SUMMARY
SCHEME FOR THE PRODUCTION OF FOREST AND FRUIT CLONAL MATERIALS OF HYBRID CHESTNUT (*Castanea crena ta Si eb e t Zucc x C . sativa Mill*)

The plan to produce chesnut hybrid materials comprises: the disposition of the foundation stock; the clonal propagation methods to use for the production of expansion stock and commercial materials; and, a system of clonal identification. Clone collection comprises materials resistant to ink disease selected for wood production, nut production and rootstoks to graft with varieties of sweet chestnut.

Key words: chestnut, certification, isozymes, clonal propagation.

Introducción

El programa de mejora del castaño, desarrollado durante los últimos años en el Centro de Investigaciones de Lourizán, ha tenido como objetivos la selección entre clones híbridos de *Castanea crenata* Sieb et Zucc. con *C. sativa Mill* resistentes a

Phytophtora sp, destinados a producción de madera, de portainjertos para variedades de castaño europeo y de productores directos de fruto, así como la selección de cultivares tradicionales de *C. sativa* para la producción de fruto y en algunos casos de madera (URQUIJO, 1944, 1957; VIEITEZ, 1966; FERNÁNDEZ, 1990; FERNÁNDEZ, et al., 1993; FERNÁNDEZ y PEREIRA, 1993; PEREIRA y FERNÁNDEZ, 1992). Se trata de materiales clonales con utilizaciones forestales y frutales y se ha buscado el modo de disponer los materiales de partida de clones de forma que su identidad quede garantizada.

Actualmente no está regulada la utilización de materiales forestales o frutales de castaño. Sin embargo, con vistas a una futura certificación de castaño, los materiales seleccionados se han de disponer según un esquema que garantice la identidad clonal. además, los métodos de propagación a utilizar han de ser eficientes y producir plantas fieles al tipo. Finalmente, se ha de contar con métodos de identificación que permitan verificar la fidelidad clonal. Veamos lo que dice la legislación existente para especies forestales y frutales.

El Reglamento General Técnico de Control y Certificación de Semillas y Plantas de Vivero (BOE, 1986) establece entre otras, las siguientes categorías de plantas de vivero: el material parental, que es la unidad inicial a partir de la que se producen todas las semillas y plantas de vivero de un cultivar; material vegetal de base de plantas de vivero es el constituido por plantas madre procedentes del material parental o de partida que reúna los requisitos necesarios para garantizar calidad, autenticidad varietal y sanidad; material vegetal certificado es la planta comercial procedente de materiales de base.

El Reglamento Técnico de Control y Certificación de Frutales (BOE, 1982) adapta las citadas categorías de plantas de vivero al caso de los frutales. Especifica que el material parental o unidad inicial está compuesto de la planta cabeza de clon, de las plantas de reserva (plantas libres de virus al abrigo de vectores) y de las plantas de partida (plantadas en campo), obtenidas de la planta cabeza de clon. En ellas se ha de comprobar estado sanitario y características varietales. Las plantas madre de base proceden del material de partida y se considerarán de base una vez comprobada identidad varietal y estado sanitario. Con ellas se establecen los campos de plantas madre de certificada. El mismo reglamento exige pureza varietal del 99% a las plantas de base y certificadas.

La Orden de Comercialización de los Materiales Forestales de reproducción (BOE,1989) establece dos categorías de materiales forestales de reproducción, materiales seleccionados y materiales controlados. Los materiales clonales han de cumplir preferentemente los requisitos exigidos a los materiales controlados. Los caracteres sometidos a examen para la admisión de los materiales de base en la categoría de materiales controlados son los de identificación de los materiales de base, los caracteres de comportamiento y los de producción. Esta orden de materiales forestales no cita en ningún momento al material parental, sólo dice que los individuos que constituyen el clon han de proceder de un sólo individuo por vía vegetativa. En cuanto a los caracteres de identificación de los materiales de base, dice que se han de presentar de forma suficientemente completa pero no dice nada sobre el método de identificación clonal a utilizar.

En materiales clonales de uso forestal LIBBY (1983) utiliza una denominación del

material parental y de las plantas de base equivalente a la utilizada en el reglamento técnico de frutales. Habla de tres tipos de plantas en los programas de selvicultura clonal: *foundation stock, expansion stock, y test plants.* El *foundation stock,* compuesto por el ortet y un número reducido de ramets es el material parental. El *expansion stock,* conjunto de plantas donantes de propágulos utilizados para la producción de plantas comerciales, es equivalente a la categoría plantas de vivero de base de la legislación sobre frutales. Se puede adoptar por tanto el esquema y denominaciones utilizados en frutales para denominar a las categorías de materiales clonales forestales de vivero. Normalmente se utiliza el término ortet en vez de cabeza de clon.

Los métodos de propagación a utilizar en la multiplicación de clones autoradicados de castaño son el acodo bajo, el estaquillado semileñoso y la micropropagación. Entre estos métodos sólo la micropropagación puede dar lugar a plantas no fieles al tipo. Sin embargo la micropropagación a partir de yemas axilares y brotes terminales, junto con la limitación del número de subcultivos garantiza la obtención de plantas fieles al tipo, desprovistas de variaciones somaclonales (CHEN y AHUJA, 1993). Esta limitación del número de subcultivos y la exclusión de certificación de material obtenido a partir de callo, están reflejados en la norma que regula la utilización del cultivo in vitro en la producción de patrones de frutales (BOE, 1992). En ella, para la obtención de plantas madre de base, se limita el número de multiplicaciones por cultivo in vitro a un máximo de cinco, y para la obtención de plantas certificadas, se limita a diez, en ambos casos después de la fase de adaptación, que es aquella que permite la obtención de un máximo de 20 porciones a partir de cada explanto inicial.

No existen aún regulaciones de la aplicación de las técnicas de cultivo in vitro a la producción de plantas forestales aunque ya que el material ha de ser estable y fiel al tipo, los cultivos a partir de callos, células y protoplastos con propensión a la producción de variaciones somaclonales no deben ser utilizados en multiplicación clonal aunque pueden ser útiles con otras finalidades diferentes (MUHS, 1993)

En los programas de selvicultura clonal los errores cometidos en la identificación de los materiales de base pueden dar lugar a graves daños. Una sóla planta errónea en el material parental de un clon puede afectar a casi todo el clon. Normalmente, las normas que regulan el uso material clonal en una determinada zona, obligan al uso de unos determinados clones, por lo que es necesario contar con herramientas que permitan verificar la identidad clonal. Los caracteres a utilizar en identificación y certificación deben estar bajo control genético, presentar variabilidad en el taxon en estudio y poca influencia ambiental. La caracterización morfológica mediante caracteres cualitativos y cuantitativos no presenta dificultades técnicas, pero es muy laborioso. Además los caracteres cuantitativos presentan una elevada influencia ambiental. La caracterización morfológica no puede ser realizada hasta que las plantas desarrollan todas sus características, cosa que en algunas especies puede tardar varios años en ocurrir. Entre los métodos bioquímicos a utilizar en certificación, isoenzimas y ADN son los más adecuados. Sin embargo en el estado actual de desarrollo de las técnicas los isoenzimas ofrecen la mejor solución a la mayoría de los problemas (CHELIAK, 1993). La electroforesis de isoenzimas es una técnica no destructiva que puede ser realizada desde los primeros momentos de la vida de un árbol y proporciona resultados en unas pocas horas.

La probabilidad de diferenciar un cierto clon de todos los demás depende del número de genotipos diferentes posibles, cosa que a su vez depende de: el número de loci analizados, del número de alelos presentes en cada locus, y de las frecuencias de esos alelos en el grupo de clones en estudio.

Métodos de multiplicación clonal

El castaño, especie de difícil enraizamiento, se ha clonado durante muchos años sólo por acodo bajo. El método presenta gran número de problemas: baja producción de plantas por hectárea (de 10.000 a 20.000); tiempo prolongado de entrada en producción (unos 4 años); necesidad de un número elevado de jornales en períodos cortos de tiempo; costos de producción elevados; calidad de planta muy deficiente en plantas de una savia (el peso seco de las raíces nunca es más del 10% del peso del tallo). A pesar de ello las plantaciones en áreas de clima atlántico dan resultados de arraigamiento adecuados, con menos de un 10% de marras, aunque el crecimiento de los primeros años es muy débil.

El estaquillado de castaño se ha de realizar con material semileñoso de brotes de cepa de unos meses. Las condiciones ambientales, especialmente la humedad relativa, han de ser cercanas al 100%, para que las estaquillas sobrevivan durante el período de enraizamiento, comprendido entre cuatro o cinco semanas. La utilización de *fog-air* (FERNÁNDEZ et al., 1992) o fog-press (CHAPA et al., 1990) supone en este aspecto una mejora sustancial sobre la utilización de *mist*. Pero aún en estas condiciones los porcentajes de enraizamiento no superan el 50%. El sistema es muy frágil, de forma que fallos de funcionamiento del fog de sólo media hora, dan lugar a pérdidas de todo el material. Las estaquillas en período de enraizamiento son aún más sensibles a la desecación que el material micropropagado en aclimatación. A pesar de que las plantas multiplicadas por estaquilla tienen muy buena calidad después de un año en vivero, los malos rendimientos de la técnica hacen imposible su utilización.

La micropropagación a partir de ápices caulinares y yemas axilares, seguida de enraizamiento *in vivo*, aclimatación en fog air y uno o dos años de cultivo en vivero, da lugar a plantas con un buen sistema radical (más del 50% del peso total de la planta) a un precio de coste muy parecido al precio de la planta de acodo (MIRANDA y FERNÁNDEZ, 1992, 1993). El sistema tiene el inconveniente de la necesidad de una inversión inicial muy superior a la de otras técnicas, sin embargo sus ventajas hacen que se vea como la modalidad de multiplicación clonal con más futuro en castaño.

Disposición de material parental y colección de referencia

La colección de clones híbridos de castaño del Centro de Lourizán tiene más de treinta años de edad, no se conserva la planta de partida y además en este tiempo se habrán cometido errores de etiquetado. Para salvar esta situación se ha reclonado toda la colección a partir de un árbol bien identificado de cada clon, que es la nueva planta cabeza de clon u ortet. La clonación se ha realizado mediante recepado seguido de acodo. Tres barbados por clon, obtenidos del ortet, se han puesto en campo a un espaciamiento de 2 x 2 metros, con la finalidad de utilizarlas en el futuro como plantas de partida. Este material ha de ser identificado a partir del momento que se estabilicen los caracteres productivos, es decir, después del

cuarto o quito año en campo. Después será necesario el rejuvenecimiento mediante recepado con la finalidad de obtener propágulos a partir de los que se obtendrán materiales de base. Por el momento no se han incluído plantas de reserva (plantas libres de virus, al abrigo de vectores) ni el indexado (testado de presencia de virus) aunque se considerará ya que se ha detectado un mosaico del castaño (DESVIGNES y BREISCH, 1992).

A partir del ortet, por acodo se han obtenido otras dos plantas de cada clon que se han llevado a una colección de arboles espaciados a 6 x 6 metros en la que los árboles se dejarán desarrollar, con la finalidad de poder observar en ellos todos los caracteres (porte, ramificación, ramo del año en floración y frutos) útiles en la identificación y diferenciación clonal.

Métodos de propagación clonal de materiales de base y materiales comerciales

Los materiales de base y comerciales de clones productores directos de fruto se obtendrán por acodo. Los materiales de base y comerciales de clones de uso forestal o portainjertos se obtendrán por acodo o micro propagación. La influencia del número de repicados en la estabilidad de los caracteres fenotípicos de materiales micropropagados, se está estudiando mediante la instalacción de ensayos en campo, para saber si es necesario limitar el número de repicados, de la misma forma que en el reglamento de frutales (BOE, 1992).

Identificación de materiales de base y de materiales comerciales

La caracterización morfológica de la colección de clones en estudio ha sido realizada en material procedente de la planta cabeza de clon siguiendo la ficha de UPOV (1988) para castaño. Las plantas de partida y los materiales de base han de ser identificados durante tres años consecutivos a partir de que se estabilicen los caracteres reproductivos, es decir después del cuarto año de su instalacción. Las plantas de partida instaladas en campo entre 1992 y 1993 no podrán ser identificadas hasta 1996, al menos.

Por el contrario el estudio de siete loci isoenzimáticos en extractos de hoja de castaño permite la identificación rápida y temprana del material. La técnica permite diferenciar las especies *C. sativa* de *C. crenata* y los híbridos interespecíficos. La capacidad de separación de clones es bastante alta en *C. sativa,* casi nula dentro de *C. crenata,* baja en híbridos F_1 y muy elevada en híbridos F_2 Y F_3. Puede ser utilizada para la identificación del material parental y como método de control de errores de etiquetado en las multiplicaciones comerciales (FERNÁNDEZ et al., en prensa).

Bibliografía

B.O.E., 1982. Orden de 16 de Julio de 1982 por la que se aprueba el Reglamento Técnico de Control y Certificación de Plantas de Vivero Frutales, *BOE,* 183 de 2 Agosto de 1982.

B.O.E., 1986. Orden 23 de Mayo de 1986 por la que se aprueba el Reglamento General Técnico de Control y Certificación de Semillas y Plantas de Vivero, *B.O.E.*. 135 de 6 de Junio de 1986.

B.O.E., 1989. Orden 21 de Enero 1989 por la que se regula la comercialización de los materiales forestales de reproducción. *B.O.E.* 33 de 8 de Febrero de 1989.

B.O.E., 1992. Orden de 22 de Abril de 1992 por la que se modifica el Reglamento técnico de control y cer-

tificación de plantas de vivero frutales. *B.O.E.* 109 de 6 de Febrero 1992.

CHAPA, J., CHAZERANS, P., COULIE, J., 1990. Multiplication vegetative du chataignier, amelioration par greffage de printemps et bouturage semi-ligneux, L' Arboriculture fruitire, 431, 41-48.

CHELIAR, WM., 1993. Clone identification. In: Ahuja MR., Libby WJ. (eds) Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology, Springer-Verlag, Berlin-Heilderberg, 101-109.

CHEN, Z., AHUJA, MR., 1993. Regeneration and genetic variation in plant tissue cultures. In: Ahuja MR., Libby WJ (eds) Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology, Springer-berlag, Berlin-Heilderberg, 87-100.

DESVIGNES, J.C., BREISCH, H, 1992. Caractérization de la Mosaïque du Châtaignier. *Infos-Ctifl*, 82, 43-46.

FERNÁNDEZ, J., 1990. Primeros resultados de portainjertos clonales de castaño seleccionados por resistencia a *Phytophtora sp*, ITEA, 8 V, 3, 167-177.

FERNÁNDEZ, J., PEREIRA, S., MIRANDA, E., 1992. Fog and Sustrate conditions for chesnut propagation by leafy cuttings. In Symposium Proceedings Mass production Technology for genetically improved fast growing forest tree species, Tome I, AFOCEL/IUFRO, Bordeaux, 14 - 18 Septiembre, 379-383.

FERNÁNDEZ, J., PEREIRA, S., MIRANDA, E., 1993. Selección, identificación y esquema de producción de clones híbridos de *Castanea sativa* Mill y *C. crenata* Sieb. et Zucc. para producción de madera o fruto. En: Actas del Congreso Forestal Español, Lourizán 1993, II, 95-100.

FERNÁNDEZ, J., MIRANDA, E., PEREIRA, S. Isozymes in the management of a foundation stock of chestnut hybrid clone, in International Workshop of IUFRO Working party S2.04-07, Balsain, Spain, 18-22 October 1993. (En prensa, Anales INIA, Serie de Recursos Forestales).

FERNÁNDEZ, J., PEREIRA, S., 1993. Inventario y distribución de los cultivares tradicionales de castaño (*Castanea sativa Mill*) en Galicia. Col. monografías INIA, 87, 271 p.

LIBBY, W.J., 1983. The Clonal Option, Nortw For Res Inst 1432 As, 32 p.

MUHS, H.J., 1993. Policies, Regulations, and Laws Affecting Clonal Forestry. In: Clonal Forestry II. Conservation and Applicattion, Ed. M.R. Ahuja and W.J., Libby, Springer-Berlag, Berlin, 213-227.

MIRANDA, E., FERNÁNDEZ, J., 1992. Micropropagation of Chesnut tree: *in vivo* stablishment and post-propagation growth, in Symposium Proceedings Mass production Technology for genetically improved fast growing forest tree species, Tome I, AFOCEL/IUFRO, Bordeaux, 14-18 Septiemhre, 421-426.

MIRANDA, M.E., FERNÁNDEZ, J., 1993. Micropropagación, cultivo en vivero y calidad de planta de clones híbridos de *Castanea sativa* y *C. crenata*. En Congreso Forestal Español, II, Lourizán, Junio de 1993, 343-348.

MIRANDA, M.E., FERNÁNDEZ, J. Cost component analysis of micropropagating chestnut plants. In: International Workshop of IUFRO Working party S2.04-07, Balsain, Spain, 18-22 October 1993. (en prensa, Anales INIA, serie de Recursos Forestales).

PEREIRA, S., FERNÁNDEZ, J., 1994. Fruit Quality Characteristics of Important Chestnut Cultivars in Galicia, Spain, in Proceedings of the International Chestnut Conference, Morgantown, West Virginia, July 10-14, 1992, West Virginia University Press, 66- 69.

UPOV, 1988. Guideliness for the conduct of tests of Distincness, Homogenity and Stability of Chestnut, *UPOV*, TG/124/1, 1988-07-01: 23.

URQUIJO, P., 1944. Aspectos de la obtención de híbridos resistentes a la enfermedad del castaño, *Bol. Pat. Veg. Ent. Agr.*, XIII, 447-462.

URQUIJO, P., 1957. La regeneración del castaño, *Bol. Pat. Veg. Ent. Agr.*, XXII, 217-232.

VIEITEZ, E., 1966. Resistencia a *Phytophtora cambivora* y *P. cinnamomi* de algunas variedades de castaños, *Anales Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias*, 1, 61-74.

(Aceptado para publicación el 1 de marzo de 1995)