

## Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo *in vitro* de tejido adulto de *Castanea sativa* Mill.

### Effect of Genotype and cytokines source at the initiation stage *in vitro* culture of adult tissue of *Castanea sativa* Mill.

CARMEN GLORIA LARSON A.<sup>1\*</sup>, RODRIGO HASBÚN Z.<sup>2</sup>, MARÍA PAZ JOFRÉ V.<sup>1</sup>, MANUEL SÁNCHEZ-OLATE<sup>1</sup> & DARCY RÍOS L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Epigenética Vegetal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile.

\*cglarson@udec.cl

#### RESUMEN

*Castanea sativa* Mill. es una especie de interés agroforestal ampliamente cultivada en Europa, cuya producción actual está principalmente enfocada en la obtención de fruto calidad marrón, apetecido en la industria gourmet. En Chile, esta especie puede ser cultivada exitosamente debido al clima y a la ausencia de enfermedades que la afecten. Sin embargo, no existe un sistema de propagación que permita la masificación de plantas para el establecimiento de huertos frutales. Ante esto, la micropropagación se presenta como una alternativa posible de aplicar, ya que es un método muy estudiado en esta especie. La propagación *in vitro* de *Castanea sativa* ha generado resultados exitosos en cuanto su introducción y multiplicación, sin embargo la propagación *in vitro* de variedades productoras de fruto marrón, es aún escasamente estudiada. Ante esta situación, para establecer un sistema de producción de plantas variedades de interés es necesario evaluar los efectos de algunas variables que influyen en el cultivo *in vitro* de leñosas, como son el genotipo y la fuente de citoquinina. Para esto, se estudiaron seis variedades de castaño provenientes de Italia y Francia y dos tipos de citoquininas, evaluándose su efecto en parámetros de inicio de establecimiento *in vitro*, tales como sobrevivencia, contaminación, formación de callo basal, apertura de yema axilar, entre otros. Los resultados muestran que en iguales condiciones de cultivo las variedades con mejor respuesta son Marrone Citta di Castello (CC) y Marrone Chiusa di Pesio (CP), en relación a la formación de callo basal y capacidad de reacción morfológica, donde el porcentaje de explantos fue superior al 80 y 85%, respectivamente, independiente del tipo de citoquinina utilizada. Por otra parte, la cantidad de explantos con yemas brotadas fue superior en el tratamiento con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP) con un 100% en CC y 55% en CP, existiendo diferencia significativas con la respuesta obtenida en el tratamiento con 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Thidiazuron (TDZ), donde se observó un 10 y 15% de explantos con yemas brotadas, respectivamente. Estos resultados nos indican que el genotipo y la fuente de citoquinina influyen en la respuesta al establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de variedades de castaño; por lo tanto, para establecer un programa de propagación es necesario ajustar un protocolo específico para cada variedad.

**PALABRAS CLAVE:** Cultivo *in vitro*, variedad, 6-bencilaminopurina, Thidiazuron.

#### ABSTRACT

*Castanea sativa* Mill. is a specie of agroforestry interest widely grown in Europe, its current production it is mainly focused on the extraction of a quality brown fruit, highly demanded in the gourmet industry. In Chile, this specie might be successfully grown due to the climate and lack of diseases that may affect it. However, there is not a propagation system that can provide a plant massification for the establishment of fruit orchards. Given this situation, the micropropagation is a possible alternative to apply since this method is extensively studied in this species. The propagation *in vitro* of *Castanea sativa* has created successful results in terms of introduction and multiplication. Nevertheless, the propagation *in vitro* of direct-producer varieties of brown fruit is still poorly studied and for this situation, in order to stablish a production system of a variety of plants of great interest is necessary to evaluate the effects of some variables that affects the *in vitro* culture of woody as it is the genotype and cytokine source. For this, six varieties of chestnut from Italy and France and two types of cytokines were studied to evaluate their effects on the parameters *in vitro* establishment as survival, contamination, formation of basal callus, axillary bud break, etc. The results indicate that in the same culture conditions the varieties

with better response is Marrone Citta di Castello (CC) and Marrone Chiusa di Pesio (CP), in relation to the formation of basal callus and morphological reaction capacity, where the percentage of explants was greater than 80% and 85%, respectively, independent of the type of cytokinin used. Moreover, the amount of explants with axillary bud break was higher in the treatment with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP) with 100% in CC and 55% in CP, being there significant differences with the obtained response in the treatment with 0.5 mg L<sup>-1</sup> of Thidiazuron (TDZ), where 10% and 15% of explants with axillary bud break were observed, respectively. These results indicate that the genotype and cytokine source have influence on the response of *in vitro* establishment of nodal segments of chestnut variety, therefore, to establish a propagation system it is necessary to adjust a specific protocol for each variety.

**KEYWORDS:** *In vitro* culture, variety, 6-benzylaminopurine, Thidiazuron.

---

## INTRODUCCIÓN

El castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) fue introducido en Chile por inmigrantes Europeos hace más de 250 años y se cultiva desde la Región del Maule hasta la Región de La Araucanía (Grau 2003), con aproximadamente 431,3 ha (INE 2007).

Esta especie multipropósito, tanto por la producción de madera como por el uso de sus frutos (Benedetti & Saavedra 2007), presenta ventajas importantes para su cultivo en Chile respecto de otros países. La tasa de crecimiento de los árboles es incluso superior a la de Europa, producto del mejor clima, la ausencia de las principales enfermedades y plagas y la calidad de suelos volcánicos (Grau 2003).

El mercado mundial de castañas es abastecido hasta hoy exclusivamente por el hemisferio norte. La producción del hemisferio sur es pequeña y de baja calidad, como las que ha producido Chile mayoritariamente para abastecimiento local (Valderrama & Halçartegaray 2012). Por otra parte, la oferta en Europa ha bajado en forma considerable en los últimos cincuenta años debido al envejecimiento de la población y de los huertos, y la muerte de árboles provocada por la avispa del castaño o avispa china (*Dryocosmus kuriphilus*) (Valderrama & Halçartegaray 2012, ProChile 2016). Es así como hoy existe demanda insatisfecha, la que en algunos casos ni siquiera logra abastecerse durante la temporada del hemisferio norte. Debido a lo anterior, surge un gran interés en crear huertos frutales de variedades de importancia comercial.

Actualmente, para la producción de frutos, el método de propagación de los cultivares es mediante injerto. Este sistema tiene la ventaja de poder disponer de un material de partida adulto y por tanto, acelerar la entrada en producción de la planta, debido a que permite eludir el periodo juvenil, junto con originar descendencias genéticamente homogéneas e idénticas a la planta madre. Sin embargo, presenta una limitación que es la incompatibilidad entre patrón y púa, influenciada por las variedades y especies diferentes. Además, el interés por aumentar la producción de plantas requiere de un método de producción que masifique el material vegetal de interés, producir plantas sobre su propio pie que evite el riesgo de pérdida de plantas

de alta calidad productora por incompatibilidad púa-patrón (Sánchez-Olate 2009).

Dentro de los métodos de propagación vegetativa, la macro propagación se ve limitada debido a su dificultad para enraizar (Caboni *et al.* 1996, Vidal *et al.* 2015). Por otra parte, el cultivo *in vitro* de *Castanea sativa* ha generado resultados exitosos en cuanto a su introducción y multiplicación (Gonçalves *et al.* 1998, Hasbún *et al.* 2009, Vieitez *et al.* 2007, Ríos *et al.* 2009), aunque los resultados han estado muy limitados con respecto a la edad del material vegetal. Hasbún (2005) estudió las diferencias en cuanto a las respuestas morfológicas en esta especie entre material juvenil y adulto, demostrando que la edad de la planta madre condiciona el establecimiento *in vitro*. Por otra parte, la mayoría de los resultados logrados a la fecha, en esta especie, están basados en la multiplicación de material de origen embrionario, con lo cual se alcanzan elevadas tasas de proliferación y enraizamiento (Leslie & McGranahan 1992, Ripetti *et al.* 1994), el resultado final de producción de plantas lleva inmersa la variabilidad genética (Hartmann & Kester, 1997). La clonación de árboles adulto por medio del cultivo *in vitro* se ha logrado sólo con relativo éxito a partir de material vegetal que retiene algunas características fisiológicas juveniles, tales como brotes basales, epicórmicos o rebrotes de tocón (Sánchez & Vieitez 1991, Vieitez *et al.* 1994). Corredoira *et al.* (2011) confirmaron que los brotes obtenidos de ramas basales de los árboles adultos son más reactivos para el establecimiento *in vitro* que el material de la copa. Sin embargo, cuando no es posible disponer de estos materiales, es posible aplicar determinados tratamientos para reactivar o revigorizar tejidos adultos, aunque éstos no son permanentes (Sánchez *et al.* 2004).

En la actualidad, los principales focos de investigación han estado asociados a *Castanea sativa* y algunos híbridos (*Marigoule* y *Precoce Migoule*), con los cuales se han desarrollado protocolos de cultivo de tejido, desde el establecimiento hasta el enraizamiento, a partir de material juvenil, lográndose la obtención de un gran número de individuos (Ríos *et al.* 2009). Sin embargo, los problemas asociados al establecimiento persisten, así los resultados obtenidos en esta etapa han sido variables y dependientes de diversos factores tales como la edad (Hasbún 2005,

Corredoira *et al.* 2011), el genotipo (Park *et al.* 1998), reguladores del crecimiento (Gonçalves *et al.* 1998, Ríos *et al.* 2005), entre otros.

En *Castanea sativa* el genotipo juega un rol importante en el cultivo *in vitro*, ya que respuestas obtenidas en la tasa de multiplicación (Miranda-Fontañña & Fernández-López 2001, Hasbún *et al.* 2009), en los requerimientos lumínicos y respuesta al enraizamiento adventicio (Sáez *et al.* 2012), respuesta a distintos medios de cultivos y a distintas concentraciones hormonales (Hasbún *et al.* 2009), tasa de brotación (Corredoira *et al.* 2011), dependen y varían considerablemente entre genotipo.

Las distintas variedades de castaño difieren tanto por su morfología como por fenología. Dentro de las características morfológicas están, crecimiento, fuste, hojas, flores y características de fruto. Por otra parte, dentro de las fenológicas están el periodo de brotación, floración, maduración de los frutos y caída de las hojas (Serdar 2011), siendo el tipo de fruto el factor determinante en la selección para el establecimiento de cultivares, ya que es esta la característica que más interesa comercialmente (Grau 2003).

Existen, principalmente, dos tipos de frutos de castaño que comercialmente son conocidos como fruto “marrón” y como fruto “castaña”. Esta diferencia constituye un criterio fundamental en la cotización comercial del fruto, debido a que el marrón presenta características de calidad que permite su utilización especialmente en la industria de procesamiento, lo que permite una mejor valorización del fruto marrón (Grau 2003).

Por otra parte, los reguladores de crecimiento son los encargados de inducir respuestas morfogénicas, siendo este proceso dependiente del tipo de regulador utilizado (Shtereva *et al.* 2014), junto con factores como las condiciones ambientales, el medio de cultivo, entre otros. Es así como las citoquininas, juegan un rol variado en el desarrollo de la planta durante la formación y la actividad de los meristemas, debido a su función en el ciclo celular, junto con las auxinas (Kyozyuka 2007).

Dentro de las citoquininas se encuentra el 6-bencilaminopurina (BAP) que es un regulador de crecimiento sintético del tipo Adenina implicado en la mejora de la proliferación de brotes y elongación (Glocke *et al.* 2006). Por otra parte, el Thidiazuron (TDZ) es un compuesto sintético derivado de Fenilurea con una alta actividad de citoquinina, muy eficaz para la inducción de brotes adventicios en especies leñosas (Huetteman & Preece 1993, Glocke *et al.* 2006). Aunque existen pocos estudios sobre su acción caulogénica en explantos de Fagaceae y Nothofagaceae, se ha demostrado que induce brotes adventicios en Roble Europeo (*Quercus robur*) (Chalupa 1988), Raulí (*Nothofagus alpina*) (Jordan *et al.* 1996) y Haya (*Fagus sylvatica*) (Vieitez & San José 1996, Cuenca *et al.* 2000). Sin embargo, el efecto de TDZ sobre la

regeneración de brotes de castaño apenas se ha explorado. Estas citoquininas mejoran las tasas de proliferación en diferentes especies leñosas (Glocke *et al.* 2006).

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en la respuesta al establecimiento *in vitro* de material vegetal adulto proveniente de distintas variedades de castaño de interés comercial.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó como material vegetal segmentos nodales de plantas injertadas el año 2008 cuya púa proviene de árboles de 30 años de edad aproximadamente, colectados en el mes de noviembre (primavera) de variedades de *Castanea sativa*.

Para el establecimiento *in vitro* se utilizó como explanto inicial segmentos nodales de 2 cm de largo, con una yema axilar, a los cuales se les realizó una asepsia superficial (Vieitez *et al.* 2007).

Para evaluar el efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el establecimiento *in vitro* se estudiaron cinco variedades de castaño de calidad de fruto tipo marrón, seleccionada desde un huerto productivo experimental ubicado en la VII Región del Maule, en el sector estación Villa Alegre, Chile. Las variedades son Marrone Cita di Castello (CC), Marrone Chiusa di Pesio (CP), Marrone di Cuneo (MC), Bouche Rouge (BR) y Marrone Val di Susa (VS), los cuales fueron cultivados en el medio basal MS (Murashige & Skoog, 1962) con los nitratos reducidos a la mitad, suplementado con sacarosa al 3% p/v, sequestrene al 0,015% p/v y agar 0,7% p/v (Hasbún 2005). Para cada variedad se aplicaron dos tratamientos de cultivo diferenciados por la citoquinina utilizada. En el tratamiento T1 se suplementó el medio base con 6-Bencilaminopurina (BAP) y el tratamiento T2 con Thidiazuron (TDZ), en igual concentración (0,5 mg/L). Como tratamiento control se utilizó el medio basal sin regulador de crecimiento (T0). Todos los explantos fueron mantenidos en oscuridad por 7 días en condiciones ambientales de cámara controlada con fotoperiodo de 16h luz y 8h oscuridad a una temperatura de 25°C ± 1 y a 20°C ± 1, respectivamente, con una intensidad lumínica de 3000 lux. A los 30 días de cultivo los explantos de T0, T1 y T2 fueron transferidos a un medio basal MS suplementado con 0,05 mg/L de BAP, evaluando de esta manera el efecto del tratamiento en las primeras etapas del establecimiento *in vitro*.

A los 20, 50 y 80 días de cultivo se evaluó el porcentaje de contaminación (fúngica y/o bacteriana), de oxidación, de explantos con respuesta (inicio de reacción de yema axilar), formación de callo basal y apertura de yema, en los tres tratamientos.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se empleó un diseño factorial contemplando los factores Genotipo (5) y tipo de hormona (BAP, TDZ y sin hormona). Por tratamiento se tuvieron 3 repeticiones por variedad donde la unidad muestral estuvo formada por 16 explantos para el tratamiento control y para los tratamientos con BAP y TDZ se utilizaron 17 explantes.

Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza que evaluó el efecto del genotipo, la fuente de citoquinina y la interacción de estos dos factores. En caso de existir diferencias significativas  $P \leq 0,05$  se aplicó la prueba de comparación de medias de Tuckey. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN CONTAMINACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que en los cinco genotipos el tratamiento control tuvo la mayor tasa de contaminación, siendo sólo en las variedades MC y CC significativamente superior (Fig. 1a). En las variedades BR y MC existen diferencias entre los tratamientos con BAP y TDZ, siendo este último significativamente inferior. Además, no existen diferencias entre las dos variedades al comparar la tasa de contaminación en el tratamiento con BAP ni en el tratamiento con TDZ (Fig. 1a).

Por otra parte, en las variedades CP y CC no hubo diferencias significativas en la contaminación observada en los tratamientos con BAP y TDZ (Fig. 1a). En el caso de VS,

tampoco hubo diferencias significativas y la contaminación fue inferior al resto de las variedades (Fig. 1a).

EVALUACIÓN DE OXIDACIÓN

En la variedad VS no hay diferencias significativas en la tasa de oxidación de explantos entre los tres tratamiento y en la variedad CC no hubo diferencias entre los dos tipos de citoquininas, pero sí con respecto al control el cual fue significativamente superior. En MC la oxidación fue mayor con BAP y en BR y CP con TDZ. Al analizar el tratamiento control no hubo diferencias significativas entre las variedades, siendo el porcentaje de oxidación superior al 30 % en todos los genotipos (Fig. 1b). Por otra parte, se observó que en los cinco genotipos el tratamiento control tuvo la mayor tasa de oxidación, con respecto a las dos citoquininas, siendo sólo en CC y CP significativamente superior (Fig. 1b).

La oxidación que se produce en los cultivos es conocida por ser genotipo-dependiente, siendo especialmente grave en los géneros que naturalmente contienen altos niveles de taninos o de otros hidroxifenoles, como es el caso de *Castanea*. Además, estas diferencias también se encuentran entre las especies del mismo género y variedades dentro de una especie, lo que podría estar sucediendo en las variedades de castaño en estudio (George 1996). Por otra parte, la producción de polifenoles está influenciada por los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo (George 1996). No obstante, su efecto y relación en la oxidación de explantos no es consistente, pues un mismo regulador que induce oxidación en una especie, en otra no se observa igual efecto, esto se debe a las diferencias genéticas entre los materiales (Van Staden *et al.* 2006).

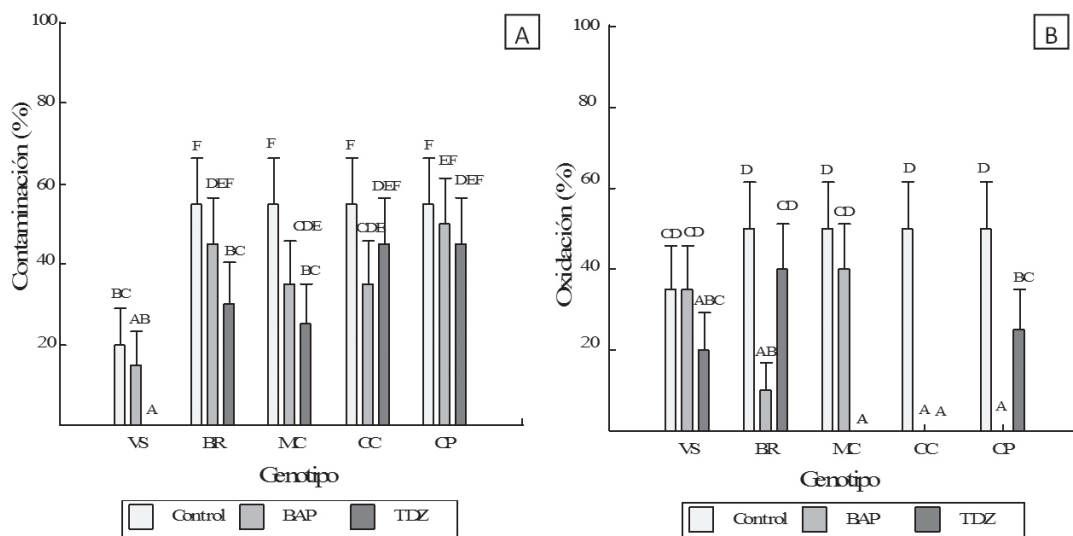


FIGURA 1. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de contaminación (A) y de Oxidación (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar. / Effect of genotype and cytokinin source on percentage of Contamination (A) and Oxidation (B), of nodal segments cultured *in vitro*, evaluated at day 80 after introduction. Different letters on bars corresponding to the same variable indicate significant differences between varieties according to the Tuckey test ( $P < 0,05$ ). Vertical bars correspond to standard error.

EVALUACIÓN RESPUESTA MORFOGÉNICA

Al analizar la respuesta de los explantos introducidos *in vitro*, se observó que las variedades CP y BR después de 20 días de cultivo fueron las primeras en formar callo en la base (Figs. 2, 3a y 3b) y la formación del callo estuvo siempre precedida por un marcado engrosamiento del explanto (Fig. 3c).

Al evaluar la formación de callo basal, en el tratamiento control ninguna variedad presentó explantos con formación de callo en la base (Fig. 4a). Por otra parte, las variedades que mostraron la mayor presencia de callo basal fueron CC y CP con porcentaje superior al 80% en los tratamientos con BAP y con TDZ, no existiendo diferencias significativas en ambos tratamientos (Fig. 4a). En las variedades VS y MC, tampoco se observaron diferencias, pero sí en BR donde el tratamiento con BAP fue superior que con TDZ (Fig. 4a).

En la Figura 4b se puede observar que en todas las variedades el tratamiento control no superó el 20% de segmentos nodales con yema axilar hinchada y cambio de tonalidad. La variedad que tuvo la menor cantidad de explantos con reacción fue MC, no superando el 20% en ninguno de los tratamientos evaluados (Fig. 4b). Si se observa la Figura 3a, esta variedad también presentó las menores tasas de formación de callo basal (inferior a 30%). Por otra parte, las variedades que presentaron la mejor respuesta fueron CC y CP con un porcentaje superior al 80% en los tratamientos con BAP y TDZ (Fig. 4b), siendo además las variedades que tuvieron la mayor formación de callo basal (Fig. 4a). Esto fue observado por Meier-Dinkel *et al.* (1993) en microtallos de *Quercus robur* L., donde la mejor respuesta obtenida en el establecimiento *in vitro* fue de 56% en segmentos nodales que presentaban formación de callo basal, comparados con 21% de explantos que no presentaban callo en la base. Esto se debe a que en el callo basal se acumulan sustancias y hormonas necesarias para la

respuesta *in vitro* (Meier-Dinkel *et al.* 1993). Por lo tanto, habría una relación directa entre esta última variable y el inicio del establecimiento *in vitro*.

En los cinco genotipos evaluados no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y TDZ al medir el porcentaje de explantos con reacción (Fig. 4b).

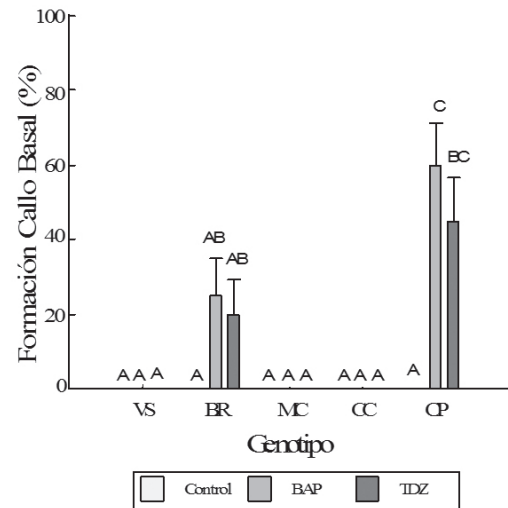


FIGURA 2. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de Formación de Callo Basal de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 20 días desde la introducción. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar. / Effect of genotype and cytokinin source on percentage of Basal Callus Formation of nodal segments cultured *in vitro*, evaluated at day 20 after introduction. Different letters on bars corresponding to the same variable indicate significant differences between varieties according to the Tukey test ( $P < 0,05$ ). Vertical bars correspond to standard error.

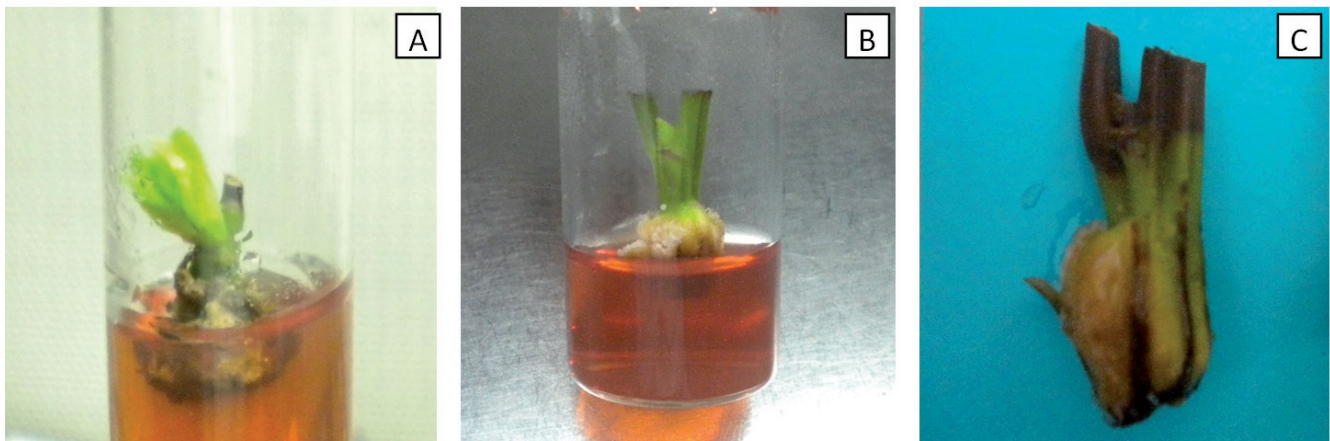


FIGURA 3. Explanto con formación de callo basal de las variedades Chiusa di Pesio (A) y Bouche Rouche (B y C) a 20 días desde el establecimiento en cultivo *in vitro*. / Explant with basal callus formation of the Chiusa di Pesio (A) and Bouche Rouche (B and C) varieties at 20 days since the establishment of the *in vitro* culture.

En las cinco variedades estudiadas no se observaron explantos brotados en el tratamiento control (Fig. 5a). A su vez, para las variedades VS, BR y MC, el porcentaje de explantos brotados fue muy bajo, no superando el 20% y no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos Control, BAP y TDZ (Fig. 5a). Por otra parte, en las variedades CC y CP la respuesta obtenida fue significativamente superior en el tratamiento con BAP con un 100 y 55%, respectivamente (Fig. 5a).

Estas diferencias observadas entre las variedades en el tratamiento con BAP pueden deberse a que las respuestas relacionadas con la apertura de yemas y la posterior

proliferación de brotes están fuertemente determinadas por el genotipo (Bhau & Wakhlu 2001, Gajdošová *et al.* 2007, Gahan & George 2008). Por otra parte, las diferencias observadas entre el BAP y el TDZ se pueden deber a que el BAP está más asociado con la estimulación de yemas axilares, a diferencia del TDZ que su respuesta está asociada a formación de brotes adventicios (Glocke *et al.* 2006). Esto último se debe a que la aplicación exógena de TDZ afecta la concentración de citoquininas endógenas en algunas especies de dicotiledóneas, afectando las vías de purinas y por tanto, estimulando la biosíntesis de ésta, o alterando su metabolismo endógeno (Zhou *et al.* 1994).

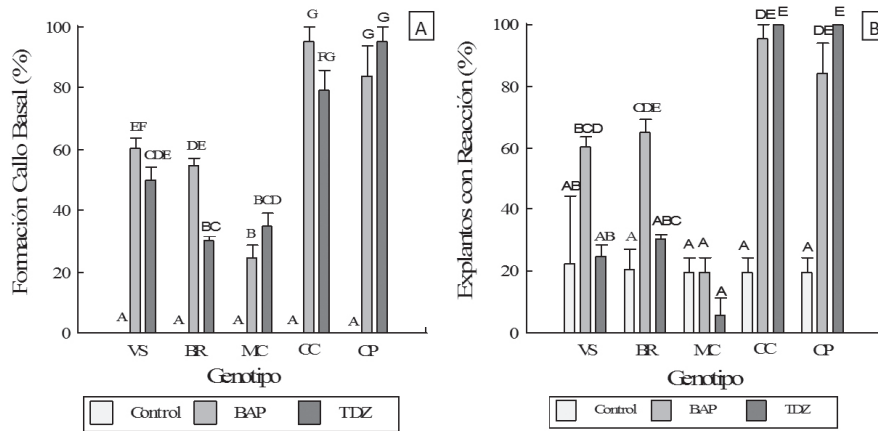


FIGURA 4. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de Formación de Callo Basal (A) y Reacción de yema axilar (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar. / Effect of genotype and cytokinin source on percentage of Basal Callus Formation (A) and Axillary bud reaction (B), of nodal segments cultured *in vitro*, evaluated at day 80 after introduction. Different letters on bars corresponding to the same variable indicate significant differences between varieties according to the Tuckey test ( $P < 0,05$ ). Vertical bars correspond to standard error.

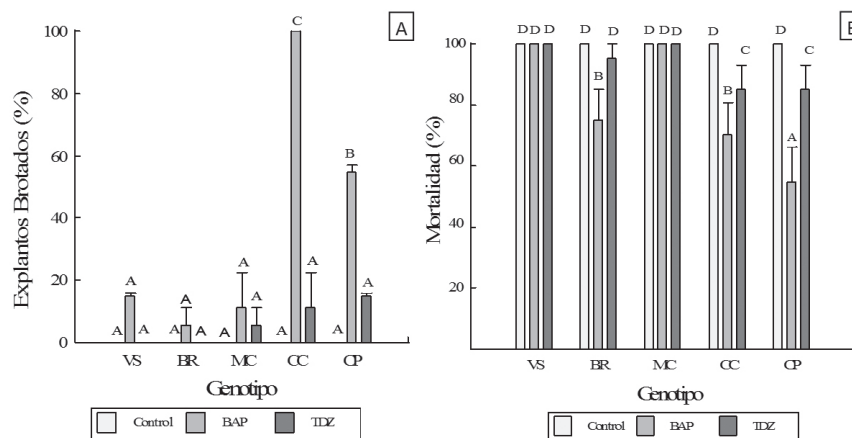


FIGURA 5. Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en el porcentaje de Apertura de yema axilar (A) y Mortalidad (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre las variedades de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0,05$ ). Las barras verticales corresponden al error estándar. / Effect of genotype on percentage of Axillary bud break (A) and Mortality (B), of nodal segments cultured *in vitro*, evaluated at day 80 after introduction. Different letters on bars corresponding to the same variable indicate significant differences between varieties according to the Tuckey test ( $P < 0,05$ ). Vertical bars correspond to standard error.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Peña *et al.* (2014), donde microtallos de Nogal (*Juglans neotropica*) tratados con TDZ y BAP tuvieron una mayor brotación con esta última citoquinina. Al igual que los resultados obtenidos por Fernández - Lorenzo *et al.* (2001), donde la mejor respuesta de dos cultivares de *Castanea sativa*, Loura y Parede, a partir de segmentos nodales procedente de árboles adultos, se obtuvo con BAP al compararla con TDZ.

A lo anterior, se puede sumar que el TDZ estimula la síntesis de auxinas endógenas (Murthy *et al.* 1995, De Melo *et al.* 2006) y se ha reportado que un aumento de las concentraciones de 3-ácido indolacético (IAA) en los sitios celulares induce anomalías en el crecimiento, como inhibición de los brotes (disminución de la elongación y el área foliar) (Saha *et al.* 2015).

En general, en este estudio la cantidad de explantos con apertura de yema fue muy baja, y las yemas abiertas presentaron una elongación mínima, por lo cual no se observó formación de microtallos (Fig. 6).

La ausencia de una mayor elongación de las yemas axilares se puede deber a la edad ontogénica del material vegetal utilizado, ya que la tasa de elongación de yemas axilares para su posterior multiplicación generalmente es mayor en explantos juveniles que en maduros (Monteuuis 2004). Esto estaría dado por una pérdida de competencia morfogénica en el material adulto asociada a diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares (Gil *et al.* 2003).

Los resultados del estudio coinciden con los obtenidos por Basto *et al.* (2012) en donde segmentos nodales de *Cedrela montana* Moritz ex Turcz, provenientes de individuos adultos e introducidos en cultivo *in vitro*, tuvieron una baja respuesta organogénica, observándose sólo un 6,7% de los segmentos nodales cuya yema axilar presentó elongación.

Todo tejido maduro pierde potencial morfogénico debido a la determinación celular que lleva a una especialización de tejido, lo que reduce la plasticidad y la capacidad de diferenciación de las células (Basto *et al.* 2012). Esto puede explicarse por el hecho de que en etapa de madurez, los genes se expresan en forma diferencial con respecto a los tejidos juveniles (García *et al.* 2000). Además, hay evidencia de que las citoquininas disminuyen durante la maduración de árbol, así reduce la división celular y la inducción del brote y acelera el envejecimiento de los tejidos (Valdés *et al.* 2003). Por otro lado, las auxinas están directamente relacionadas con la estimulación y desarrollo de las yemas vegetativas, las cuales también se verían afectadas por la edad principalmente en su transporte dentro de los tejidos (Sampathkumar *et al.* 2014).

Finalmente, es posible que con el aumento de la edad se acumulen inhibidores como por ejemplo ciertos fenoles, o bien disminuyan otros que favorecen el proceso morfogénico (Botti 1999).

#### EVALUACIÓN MORTALIDAD

Al evaluar la tasa de mortalidad de segmentos nodales (Fig. 5b), se puede observar que en el tratamiento control los cinco genotipos evaluados tuvieron un 100% de mortalidad. A su vez, las variedades que se vieron mayormente afectadas fueron VS y MC, presentando, además, un 100% de mortalidad en el tratamiento con BAP y con TDZ (Fig. 5b). Por otra parte, en las variedades BR, CC y CP se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y TDZ, siendo inferior la mortalidad en el tratamiento con BAP y siendo, además, significativamente inferior en CP (Fig. 5b).

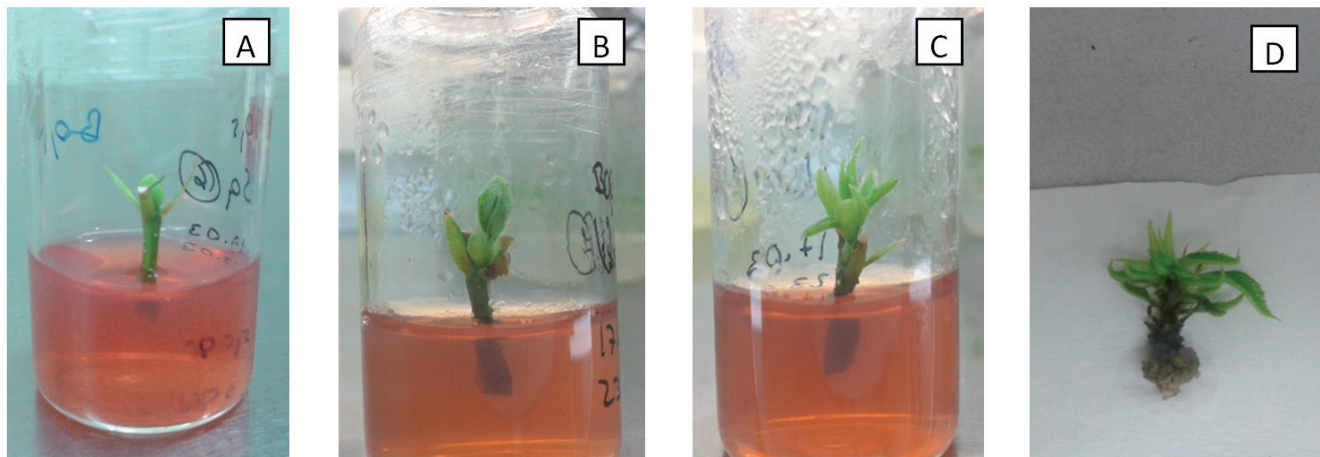


FIGURA 6. Proceso de brotación de la variedad Citta di Castello (CC), desde el inicio de Reacción de yemas (A), Elongación de yemas (B), Apertura de yema (C) y Elongación de brote (D). / Bud break process of Citta di Castello (CC) variety, from the beginning of the bud reaction (A), bud elongation (B), bud break (C) and shoot elongation (D).

Es importante mencionar que, en general, esta variable fue muy alta en todas las variedades evaluadas y esto se puede deber, al igual que en la baja respuesta, a que los explantos introducidos *in vitro* provienen de material vegetal adulto (Pandey *et al.* 2006). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Giovannelli & Giannini (1999) con la introducción *in vitro* de segmentos nodales de *Castanea sativa*, donde el 50% de los explantos presentó necrosis apical y posterior muerte, a diferencia de los explantos juveniles, los cuales el 100% tuvo una respuesta morfológica en iguales condiciones de cultivo.

Es importante destacar que, en general, esta variable fue muy alta en todas las variedades evaluadas y que la muerte de los explantos en algunos casos comenzó en el ápice extendiéndose hacia la base y comprometiendo el resto de los tejidos (Fig. 7).

El TDZ puede actuar a través de modificaciones del nivel endógeno de auxinas incrementando el contenido de 3-ácido indolacético (IAA) o de otros compuestos auxínicos (De Melo 2006, Sedlak & Poprstein 2009). Se ha demostrado que las auxinas inducen la síntesis de novo de ácido 1-aminocyclopropane-1-carboxílico sintasa (ACC) (Wei *et al.* 2000, Taiz & Zeiger 2012), cuya inducción de la actividad de la ACC sintasa estimula la biosíntesis de etileno, el cual desempeña un papel crucial en el envejecimiento y muerte celular (Wei *et al.* 2000, Sankhla *et al.* 2003, 2005). Por lo tanto, podría asociarse con una acumulación de etileno en la zona superior del frasco, producto de la acumulación de auxinas, aunque en este estudio se utilizaron tapas con ventilación. Tal vez la ventilación no es suficiente y es necesario reducir el tiempo de trasplante a medio fresco, el cual es de 20 días.

Por otra parte, se reporta que el TDZ en concentraciones muy altas puede tener efectos perjudiciales, tales como necrosis en los tejidos (Bretagne *et al.* 1994), hiperhidricidad

(Kadota & Niimi 2003), o mal formación en las hojas (Huetteman & Preece 1993), entre otros.

En general, para el porcentaje de contaminación de explantos en las variedades VS, CC y CP, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y TDZ, además, en BR y MC la contaminación fue mayor en el tratamiento con BAP, lo que demuestra que sí hay un efecto del genotipo y de la fuente de citoquinina.

Con respecto a la oxidación en las variedades VS y CC no hubo diferencias entre los tratamientos con BAP y TDZ, a diferencia de BR, MC y CP, donde sí existieron diferencias. En el caso de BR y CP el mayor porcentaje de oxidación se dio con TDZ y en MC con BAP. Por lo tanto, para esta variable es más determinante el genotipo.

En el caso de la formación de callo basal y los explantos con reacción, no hubo diferencias en estas dos variables en los cinco genotipos para los tratamientos con BAP y TDZ, excepto en la variedad BR que tuvo mayor formación de callo basal con BAP. Esto no permite concluir un efecto de la fuente de citoquinina. Con respecto al genotipo si hubo un efecto en la respuesta obtenida, ya que las variedades CC y CP fueron significativamente superiores en la formación de callo basal y la reacción de explantos.

Al evaluar la tasa de explantos brotados y de mortalidad, los resultados indican que existieron diferencias significativas entre las dos citoquininas utilizadas, BAP y TDZ, siendo inversamente proporcional estas dos respuestas en las variedades CC y CP. Se observó que en estas dos variedades la tasa de mortalidad fue inferior con BAP y por ende la tasa de explantos brotados fue significativamente mayor, existiendo un efecto de la fuente de citoquinina utilizada. Por otra parte, BR, VS y MC presentaron una mortalidad total de los explantos, lo que expresa que para estas variedades el factor fuente de citoquinina no fue determinante, sino un factor que no se evaluó en este estudio, la edad del explanto.

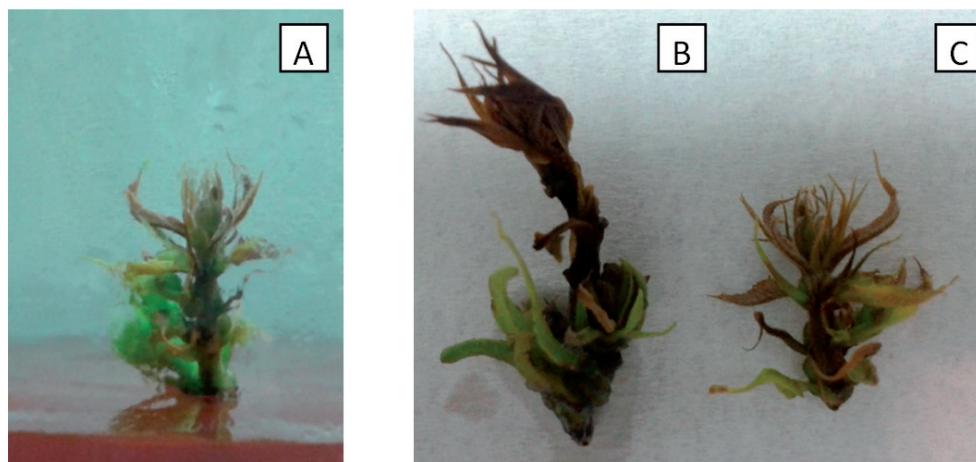


FIGURA 7. Muerte apical (A) y total (B) de explanto en tratamiento con BAP y muerte total de explanto en tratamiento con TDZ (C). / Apical death (A) and total death (B) of BAP treated explants, and total death of explants in the TDZ treated (C).



De acuerdo a lo anterior, los resultados expuestos coinciden con los obtenidos en otras investigaciones, donde la tasa de multiplicación (Miranda-Fontañña & Fernández-López 2001, Hasbún *et al.* 2009), tasa de brotación (Corredoira *et al.* 2011), requerimientos lumínicos y respuesta al enraizamiento adventicio (Fernández-Lorenzo *et al.* 2001), vigor y aclimatación de microplántulas (Vieitez *et al.* 2007) han sido dependientes del genotipo (Ballester *et al.* 1999).

Por otra parte, existen reportes de micropropagación de algunas variedades de castaño, las cuales son específicas y esto se debe a que en cultivo de tejidos el crecimiento y el desarrollo de los explantos son influenciados en gran medida por el genotipo y por los reguladores de crecimiento suministrados al medio de cultivo (Kothari *et al.* 2004).

En relación a la fuente de citoquinina y su interacción con el genotipo, se puede considerar que la capacidad diferencial de las citoquininas en la inducción de brotes podría atribuirse a factores tales como la tasa de absorción diferencial reportada en diferentes genomas (Blakesley 1991), variación en la tasa de translocación a regiones meristemáticas y procesos metabólicos en donde la citoquinina puede ser degradada o conjugarse con azúcares o aminoácidos para formar compuestos biológicamente inertes (D'Onofrio & Morini 2005).

Una variable que afectó de gran manera los resultados fue la alta tasa de mortalidad observada en los explantos, siendo en tres variedades de un 100% y en las dos restantes superior al 50%. Esta respuesta puede estar asociada a la edad del material vegetal, variable que no se evaluó en este estudio y que en general siempre ha sido un factor determinante en el cultivo *in vitro* de leñosas y en especial en *Castanea sativa*. De acuerdo con esto, es necesario realizar un siguiente estudio para evaluar el efecto de la edad en estas variedades utilizando material vegetal juvenil y adulto, y comparar los resultados con los obtenidos en este estudio. En la misma línea, se está continuando con la determinación de un protocolo para las variedades estudiadas hasta la fase de aclimatación de plantas.

Sobre la base de los resultados obtenidos en nuestro estudio, BAP fue más eficaz en el desarrollo de la apertura de yema axilar que TDZ, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Kadota & Niimi (2003) en *Pyrus pyrifolia*, donde al utilizar BAP obtienen un efecto más notable en la brotación y en la posterior multiplicación que con los derivados de fenilurea, TDZ y kinetina. Es bien sabido que las altas concentraciones de citoquininas de tipo adenina son a menudo necesarias para el crecimiento y diferenciación celular y por ende en la apertura de yemas vegetativas, mientras que las del tipo fenilurea son necesarias en bajas concentraciones para tener un efecto en la yema axilar (Guo *et al.* 2011). Es importante mencionar, que esto se dio sólo en dos de las cinco variedades estudiadas. Actualmente se continúa con la determinación de un protocolo específico

para las variedades estudiadas para producir plantas enraizadas y aclimatadas para llevarlas a sitio de plantación.

## CONCLUSIONES

En la etapa inicial del establecimiento *in vitro*, se concluye que la contaminación se ve afectada por el genotipo y por la fuente de citoquininas. Sin embargo, la oxidación se diferencia significativamente en las distintas variedades, existiendo algunas (CC) que no se oxidan bajo ningún tratamiento.

Para el desarrollo morfogénico del establecimiento *in vitro* se concluye que el genotipo es un factor determinante en la formación de callo basal, independiente de la citoquinina utilizada. Sin embargo, la apertura de yemas es afectada por la fuente de citoquinina siendo más efectiva BAP en las variedades CC y CP.

La tasa de mortalidad y la baja brotación de los explantos fue determinante en los bajos resultados obtenidos en la respuesta al establecimiento *in vitro* y esto está directamente relacionado con la edad del material vegetal utilizado (adulto).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, CONICYT, por beca estudio de Doctorado y al proyecto 12.188. INNOVA BioBio por financiamiento de Tesis doctoral. También estamos muy agradecidos por la colaboración de Seminario S.A. al proporcionar material vegetal para este estudio.

## REFERENCIAS

- BADR, A., DESJARDINS, Y. 2007. Sugar uptake and metabolism in tissue cultured potato plantlets cultured in liquid medium. In: Santamaría, J.M., Desjardins, Y. (eds.), II International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Acta Horticultura 748: 265-273.
- BALLESTER, A., SAN-JOSÉ, M., VIDAL, N., FERNÁNDEZ-LORENZO, J., VIÉITEZ, A. 1999. Anatomical and biochemical events during *in vitro* rooting of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Annals of Botany 83: 619-629.
- BASTO, S., SERRANO, C., HODSON DE JARAMILLO, E. 2012. Effects of donor plant age and explants on *in vitro* culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. Universitas Scientiarum 17(3): 263-271.
- BENEDETTI, S., SAAVEDRA, J. 2007. Caracterización Ambiental y Productiva de Rodales Forestales de Castaño en Chile. Ciencia e Investigación Forestal 13(1): 111-123.
- BHAU, B.S., WAKHLU, A.K. 2001. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66(1): 25-29.
- BLAKESEY, D. 1991. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in

- shoot proliferation of *Musa* and *Rhododendron*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25(1): 69-74.
- BRETAGNE, B., CHUPEAU, M.C., CHUPEAU, Y., FOUILLOUX, G. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Reports* 14: 120-124.
- BOTTI, C. 1999. Principios de la propagación y técnicas de propagación por estacas. En: Manejo tecnificado de invernaderos y propagación de plantas. Departamento de Producción Agrícola. Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp 72-82.
- CABONI, E., LAURI, P., TONELLI, N., FALASCA, G., DAMIANO, C. 1996. Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. *Plant Science* 118(2): 203-208.
- CHALUPA, V. 1988. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biología Plantarum* 30(6): 414-421.
- CORREDOIRA, E., JANEIRO, L.V., SAN JOSÉ, M.C. 2011. Aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en la propagación del aliso con vistas a su conservación. *Recursos Rurais* 7: 49-57.
- CUENCA, B., BALLESTER, A., VIEITEZ, A. M. 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 213-220.
- DE MELO, W., BARBANTE, G., KRAUS, J., PESCADOR, R., MAMORU, R. 2006. Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. *Journal of Plant Physiology* 163(11): 1126-1134.
- D'ONOFRIO, C., MORINI, S. 2005. Development of adventitious shoots from *in vitro* grown *Cydonia oblonga* leaves as influenced by different cytokinins and treatment duration. *Biología Plantarum* 49(1): 17-21.
- FERNÁNDEZ-LORENZO, J., RODRÍGUEZ, S., VEIGA, M. 2001. Multiplicación de dos cultivares de fruto de *Castanea sativa* Mill. *Actas III Congreso Forestal Español*, Mesa 3: 742-749.
- GAHAN, P.B., GEORGE, E.F. 2008. Adventitious regeneration. In: George, E., Hall, M., De Klerk, G. (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, pp: 335-401. Springer, The Netherlands.
- GAJDOŠOVÁ, A., OSTROLUCKÁ, M.G., LIBIAKOVÁ, G., ONDRUŠKOVÁ, E. 2007. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp: 457-464. Springer, The Netherlands.
- GARCIA, J.L., AVIDAN, N., TRONCOSO, A., SARMIENTO, R., LAVEE, S. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae* 85(4): 271-284.
- GEORGE, E.F. 1996. *Plant Propagation by Tissue Culture: In Practice*. Pt.2. 2 nd edition. Exegetics Limited, Basingstoke. 799 pp.
- GIL, B., PASTORIZA, E., BALLESTER, A., SÁNCHEZ, C. 2003. Isolation and characterization of a cDNA differentially expressed in juvenile-like and mature shoots of *Quercus robur*. *Tree Physiology* 23(9): 633-640.
- GIOVANNELLI, A., GIANNINI, R. 1999. Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae* 494: 243-245.
- GLOCKE, P., COLLINS, G., SEDGLEY, M. 2006. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. *Scientia Horticulturae* 109(4): 339-344.
- GONÇALVES, J.C., DIOGO, G., AMANCIO, S. 1998. *In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* × *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae* 72(3-4): 265-275.
- GRAU, P. 2003. Introducción de Cultivares de Castaño Europeo (*Castanea sativa* Mill.), Híbridos Eurojaponeses (*Castanea crenata* × *Castanea sativa*) y Castaño Japonés (*Castanea crenata* Siebold et Zucc.) a Chile. Primeros resultados. *Agricultura Técnica* 63(3): 329-335.
- GUO, B., HAIDER, B., ZEB, A., XU, L.L., WEI, Y.H. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10(45): 8984-9000.
- HARTMANN, H., KESTER, D., DAVIES, F., GENEVE, R. 2010. HARTMANN & KESTER'S Plant Propagation: Principles and Practices. 8th edition. Pearson Higher Ed USA. 928 pp.
- HASBÚN, R., SÁNCHEZ-OLATE, M., RÍOS, D. 2009. Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: Sánchez-Olate, M., Ríos, D. (eds.), *Producción de plantas seleccionadas de castaño a través de técnicas biotecnológicas*, pp: 14-26. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción.
- HUETTEMAN, C.A., PREECE, J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33(2): 105-119.
- INE. 2007. Citando Recursos Electrónicos. Instituto Nacional de Estadística Chile. Censo agropecuario y forestal 2007 resultados por comuna. Superficie con frutales en plantación compacta o industrial y huertos caseros en formación y producción, según región, provincia y especie. URL: [http://www.ine.cl/canales/chile\\_estadistico/censos\\_agropecuarios/censo\\_agropecuario\\_07\\_comunas.php](http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/censo_agropecuario_07_comunas.php). Visto: 26 de febrero de 2017.
- JORDAN, M., VELOZO, J., SABJA, A.M. 1996. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst, Fagaceae. *Plant Cell Reports* 15(10): 795-798.
- KADOTA, M., NIIMI, Y. 2003. Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 261-265.
- KOTHARI, S.L., AGARWAL, K., KUMAR, S. 2004. Inorganic nutrient manipulation for highly improved *in vitro* plant regeneration in finger millet- *Eleusine coracana* (L.) Gaertn. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40(5): 515-519.
- KYOZUKA, J. 2007. Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Current Opinion in Plant Biology* 10(5): 442-446.
- MEIER-DINKEL, A., BECKER, B., DUCKSTEIN, D. 1993. Micropropagation and *ex vitro* rooting of several clones of late-flushing *Quercus robur* L. *Annales des Sciences Forestières* 50(1): 319-322.
- LESLIE, C., MCGRANAHAN, G. 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 18: 136-150. High Technology and Micropropagation II. Springer-Verlag. Berlin.
- MIRANDA-FONTAÍÑA, M.E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. 2001. Genotypic and Environmental Variation of *Castanea crenata* × *Castanea sativa* and *Castanea sativa* Clones in Aptitude to micropropagation. *Silvae Genetica* 50(3-4): 153-162.
- MONTEUUIS, O. 2004. *In vitro* micropropagation and rooting of

- Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40(1): 102-107.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15(3): 473-497.
- MURTHY, B.N.S., MURCH, S.J., SAXENA, P.K. 1995. Thidiazuron induced morphogenesis somatic embryogenesis in intact seedling of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiology Plantarum* 94(2): 268-276.
- PANDEY, S., SINGH, M., JAISWAL, U., JAISWAL, V.S. 2006. Shoot initiation and multiplication from a mature tree of *Terminalia arjuna* roxb. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42(5): 389-393.
- PARK, Y.S., BARRETT, J.D., BONGA, J.M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: Deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 34(3): 231-239.
- PEÑA, D., ROCANO, M., SALAZAR, J., TORRES, C. 2014. Inducción de la brotación *in vitro* de microplántulas de Nogal (*Juglans neotropica*) tratadas con Thidiazuron (TDZ) y 6-Bencilaminopurina (BAP). *Maskana* 5(2): 81-85.
- PROCHILE. 2016. Citando Recursos Electrónicos. Ficha de mercado. El Mercado de las Castañas en Italia 2016 / Oficina Comercial en Milán. URL: [http://www.prochile.gob.cl/wp-content/uploads/2016/10/FMP\\_Italia\\_Castanas\\_2016.pdf](http://www.prochile.gob.cl/wp-content/uploads/2016/10/FMP_Italia_Castanas_2016.pdf) Visto: 26 de febrero de 2017.
- RÍOS, D., AVILÉS, F., SÁNCHEZ-OLATE, M., ESCOBAR, R., PEREIRA, G. 2005. Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño *Castanea sativa* Mill. *Agricultura Técnica* 65(3): 258-264.
- RÍOS, D., MUÑOZ, M., HASBÚN, R., ALARCÓN, A.L., SÁNCHEZ-OLATE, M. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Castanea sativa* Mill. a partir de ejes embrionarios aislados desde semillas de cultivares selectos. En: Sánchez-Olate, M., Ríos, D. (eds.), Producción de plantas seleccionadas de castaño a través de técnicas biotecnológicas, pp: 1-13. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción, Chile.
- RIPETTI, V., KEVERS, CL., GASPAR, TH. 1994. Two successive media for the rooting of walnut shoots *in vitro*. Changes in peroxidase activity and in ethylene production. *Advances in Horticultural Science* 8: 29-32.
- SÁEZ, P., BRAVO, L., LATSAGUE, M., SÁNCHEZ, M., RÍOS, D. 2012. Increased light intensity during *in vitro* culture improves water loss control and photosynthesis performance of *Castanea sativa* grown in ventilated vessels. *Scientia Horticulturae* 138: 7-16.
- SAHA, P., AFRIN, M., MOHIUDDIN, A.K.M., SHOHAEL, A.M. 2015. *In vitro* Regeneration of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.). *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences* 4(2): 1-8.
- SAMPATHKUMAR, A., YAN, A., KRUPINSKI, P., MEYEROWITZ, E.M. 2014. Physical forces regulate plant development and morphogenesis. *Current Biology* 24(10): 475-483.
- SANCHEZ, M., VIEITEZ, A. 1991. *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology* 8: 59-70.
- SANCHEZ-OLATE, M., RÍOS, D., RODRÍGUEZ, R., MATERÁN, M.E., PEREIRA, G. 2004. Duración del efecto revigorizante de podas severas de plantas adultas de avellano europeo (*Corylus avellana* L.) cv. Negretta sobre el cultivo *in vitro*. *Agricultura Técnica* 64(4): 338-346.
- SANKHLA, N., MACKAY, W.A., DAVIS, T.D. 2003. Reduction of flower abscission and leaf senescence in cut phlox inflorescence by thidiazuron. *Acta Horticulturae* 628: 837-841.
- SANKHLA, N., MACKAY, W.A., DAVIS, T.D. 2005. Effect of thidiazuron on senescence of flowers in cut inflorescences of *Lupinus densiflorus* Benth. *Acta Horticulturae* 669: 239-243.
- SEDLAK, J., PAPPSTEIN, F. 2009. *In vitro* proliferation of newly bred Czech pear cultivars. *Acta Horticulturae* 839: 87-92.
- SERDAR, U., DEMIRSOY, H., DEMIRSOY, L. 2011. A morphological and phenological comparison of chestnut (*Castanea*) cultivars 'Serdar' and 'Marigoule'. *Australian Journal of Crop Science* 5(11): 1311-1317.
- SHTEREVA, L., VASSILEVSKA-IVANOVA, R., KARCEVA, T., KRAPTCHEV, B. 2014. Micropropagation of six Paulownia genotypes through tissue culture. *Journal of Central European Agriculture* 15(4): 147-156.
- TAIZ, L., ZEIGER, E. 2012. Auxin: The first discovered plant growth hormone. In: Taiz, L., Zeiger, E. (eds.), *Plant Physiology*, pp. 545-578. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts U.S.A.
- VALDERRAMA, E., HALÇARTEGARAY, P. 2012. Cultivo y negocio de castañas tipo marrón en Chile. *Redagráfica virtual* 45: 50-52. Abril 2012. Chile.
- VALDÉS, A.E., FERNANDEZ, B., CENTENO, M.L. 2003. Alterations in endogenous levels of cytokinins following grafting of *Pinus radiata* support ratio of cytokinins as an index of ageing and vigour. *Journal of Plant Physiology* 160(11): 1407-1410.
- VAN STADEN, J., FENNEL, C., TAYLOR, N. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-61.
- VIDAL, N., BLANCO, B., CUENCA, B. 2015. A temporary immersion system for micropropagation of axillary shoots of hybrid chestnut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 123(2): 229-243.
- VIEITEZ, A.M., SAN-JOSÉ, M.C. 1996. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32(3): 140-147.
- VIEITEZ, A., SÁNCHEZ, M., AMO-MARCO, J., BALLESTER, A. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 37: 287-295.
- VIEITEZ, A., SÁNCHEZ, M., GARCÍA-NIMO, M., BALLESTER, A. 2007. Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. In: Jain, S.M., Häggman, H. (eds.), *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*, pp: 299-312. Springer, Heidelberg.
- WEI, Y.D., ZHENG, H.G., HALL, J.C. 2000. Role of auxin herbicide-induced ethylene on hypocotyl elongation and root/hypocotyl radial expansion. *Pest Management Science* 56(5): 377-387.
- ZHOU, J., MA, H., GUO, F., LUO, X. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1): 73-79.

Recibido: 24.11.2016  
 Aceptado: 21.04.2017