



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Doctorado en Ciencias Forestales

**Caracterización molecular de cultivares seleccionados de
castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) e híbridos
eurojaponeses (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) y
micropropagación a partir de material adulto.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Forestales

CARMEN GLORIA LARSON ARRIAGADA
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: DARCY RÍOS LEAL
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias forestales
Universidad de Concepción

Caracterización molecular de cultivares seleccionados de castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) e híbridos eurojaponeses (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) y micropropagación a partir de material adulto.

Comisión Evaluadora:

Darcy Ríos Leal (Profesor guía)

Profesora de Biología y Química, Dra. _____

Rodrigo Hasbún Zaror (Profesor co-guía)

Ingeniero Forestal, Dr. _____

Manuel Sánchez Olate

Ingeniero Forestal, Dr. _____

María Paz Jofré Vásquez

Licenciada en Biología, Dra. _____

Director de Postgrado:

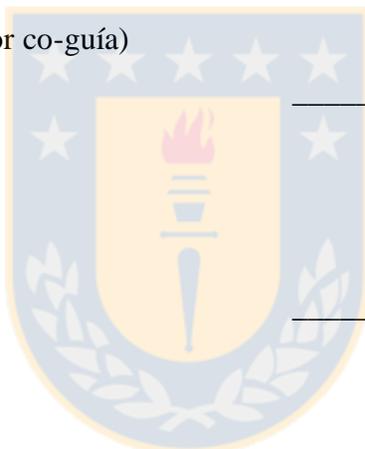
Regis Teixeira Mendoca

Ingeniero químico, Dr. _____

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino Cancino.

Ingeniero Forestal, Dr. _____



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis profesores Darcy Ríos, Manuel Sánchez y Rodrigo Hasbún, por apoyarme todo el tiempo, por su paciencia y por la confianza al aceptarme como su alumna, en especial a la profe Darcy, que ha sido mucho más que una guía,... Gracias por confiar en mí, darme autonomía, motivarme siempre y comprometerse con mi trabajo. Espero no haberlos defraudado...

También quiero agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, por recibirme y darme un espacio haciendo muy grata mi estadía en él, en especial a Gerson por su amistad y alegría, a Karina por toda su ayuda y compañía, a Evelyn por su infinita ayuda y su eterna paciencia, a la Carito y la Caro Álvarez, por todo el tiempo que compartimos... A Cathi, que aunque fue poquito tiempo tu alegría y compañía me alegraron los días a mi llegada al Laboratorio. A Luchito y a la Blanquita por toda su ayuda y por su compañía...

A mis profesores del programa que de una u otra manera fueron formadores de mi desarrollo académico, en especial a la profe Mati, con quien además compartí durante todo el tiempo el agradable cafecito de la mañana...

A margarita, por su infinita paciencia y por toda su buena disposición y ayuda que siempre tuvo conmigo, hasta el final...

A mi amiguita linda MP, por apoyarme en todo y subirme el ánimo siempre que me venían los bajones... lo mejor de todo ha sido tu amistad.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia y amigos, por todo su apoyo incondicional... A mi juanpa, por su apoyo, comprensión y amor brindado durante todo este tiempo y siempre, por alentarme a seguir cuando no quería nada más... a mi Jose y Simo, mis princesitas bellas, mi razón de existir...por todas las noches que tuve que dejarlas dormirse solitas..., por entenderme y por quererme tanto... A mis hermanos, por tanto cariño, por estar siempre cerca de mí... A mi mamá, por su apoyo incondicional, por estar ahí ayudándome siempre, principalmente con mis monitas... A mi papá, quien siempre ha estado ahí para

ayudarme en todo a mí y a mis niñas, con todo su cariño... Sin ustedes no habría podido...

También quiero agradecer a Seminario S.A., por la colaboración al proporcionar material vegetal para este estudio.

Quisiera también agradecer el apoyo financiero a:

BECA DOCTORAL CONICYT

BECA TERMINO DE TESIS DOCTORAL CONICYT

PROYECTO INNOVA BIOBIO N° 12.188.



TABLA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

Introducción General	1 - 43
Capítulo I: Caracterización molecular de cultivares de castaño europeo (<i>Castanea sativa</i> Mill.) e híbridos eurojaponeses (<i>Castanea sativa</i> x <i>Castanea crenata</i>), seleccionados para producción de plantas.	44 - 68
Capítulo II: Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo <i>in vitro</i> de tejido adulto de <i>Castanea sativa</i> Mill.	69 - 94
Capítulo III: Variación en el contenido fenólico foliar con respecto a la edad de la planta madre sobre la capacidad morfogénica durante el establecimiento <i>in vitro</i> de variedades de castaño.	95 - 127
Discusión General	128 - 137
Bibliografía	138 - 145
Conclusiones Generales	146 - 147

LISTA DE FIGURAS

Diferencia entre el fruto Castaña y el tipo Marrone. Marrone sin Tabiques (A), Castaña Tabicada (B), Calidad Marrone con facilidad de pelado (C) y Castaña con resto de la testa seminal (D).	5
Fruto de la variedad de castaño Citta di Castello.	6
Fruto de la variedad Bouche Rouche dentro del erizo y hojas y frutos de la variedad.	7
Dendograma obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA. Relaciones genéticas entre los 13 genotipos detectados entre las 9 variedades estudiadas.	56
PCoA obtenido a partir del cálculo de distancia genéticas entre las muestras.	60
Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de contaminación y de Oxidación, de segmentos nodales cultivados <i>in vitro</i> , evaluados a los 80 días desde la introducción.	77
Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de Formación de Callo Basal de segmentos nodales cultivados <i>in vitro</i> , evaluados a los 20 días desde la introducción.	78
Explantos 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 <i>in vitro</i> .	79
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 <i>in vitro</i> , evaluados a los 80 días desde la introducción.	80
Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en el porcentaje de Explantos brotados (A) y Mortalidad (B), de segmentos nodales cultivados <i>in vitro</i> , evaluados a los 80 días desde la introducción.	81
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).	83

Muerte apical (A) y total (B) de explanto en tratamiento con BAP y muerte total de explanto en tratamiento con TDZ (C).	85
Individuo seleccionado de la variedad Marrone di Cuneo, producido a partir de injerto (A) y varetta seleccionada de la misma variedad para el cultivo <i>in vitro</i> (B).	101
Semillas de variedades colectadas y utilizadas para la producción de plantas para cultivo <i>in vitro</i> (A) y planta de 5 meses de edad de la variedad Marrone Citta di Castello seleccionada para el cultivo <i>in vitro</i> (B).	102
Desarrollo morfológico inicial de las yemas de explantos juveniles de castaño (Citta di Castello) entre el día 1 (A) y el día de 10 (B), desde el establecimiento <i>in vitro</i>	105
Desarrollo morfológico de explantos juveniles de castaño (Marrone Chiusa di Pesio). Apertura de yema a los 10 días (A y B), segmento nodal con brote elongado a los 25 (C) y 55 días (D), desde el establecimiento <i>in vitro</i> .	107
Longitud alcanzada por brotes de castaño (Marrone Chiusa di Pesio) a los 55 días de la introducción <i>in vitro</i> (A) y su posterior subcultivo (B).	108
Muerte apical (A) y muerte total (B) de explantos de castaño (Marrone Chiusa di Pesio).	111
Contenido de fenoles totales (mg·g ⁻¹ M.S) promedio en hojas de castaño, colectadas de árboles adultos y juveniles.	112
Cromatograma HPLC de extractos fenólicos de material vegetal juvenil (A) y adulto (B) de castaño (Marrone Val di Susa).	113
Espectro de absorbancia correspondiente a extractos fenólicos de tejido juvenil y adulto de castaño (Marrone Val di Susa).	114
Concentración de Rutina y Ácido Elágico (mg·g ⁻¹ M.S) en extractos fenólicos de material vegetal total juvenil y adulto de castaño.	115

LISTA DE TABLAS

Variedades de castaño en estudio y su procedencia.	49
Variedades de castaño con sus respectivas muestras a partir de semillas.	50
Lista de SSR loci, origen, secuencia del primer y sus respectivas temperaturas de annealing (Tm') usadas en el estudio y las encontradas en la literatura (Tm).	51
Perfil genético de referencia de las variedades italianas y francesas.	53
Perfil Genético para Marrone con los microsatélites CsCAT1, CsCAT3, CsCAT16 y QpZAG119.	53
Descripción de 5 SSR loci en las 62 muestras analizadas.	54
Promedio de alelos encontrados en estudios realizados en castaño utilizando marcadores SSRs.	54
Perfil Genético de los 13 genotipos encontrados al analizar los 9 cultivares de <i>Castanea sativa</i> con los 5 SSR (tamaño de los alelos en pares de base) en estudio.	55
Perfil genético de los cultivares chilenos Castell Borello (CB) realizado en Italia, utilizando los cinco SSRs en estudio.	57
Perfil Genético de los 9 cultivares de <i>Castanea sativa</i> estudiados.	57
Comparación del Perfil Genético de cultivares chilenos con los de referencia.	59
Perfil genético de plantas provenientes de semillas.	62
Comparación de los perfiles obtenidos con los 5 microsatélites entre las muestras provenientes de semillas y la planta madre.	63
Variedades de castaño en estudio y su procedencia.	101
Respuestas morfológicas (%) del total de explantos juveniles y adultos de castaño evaluados en diferentes días de cultivo (de 10 a 55 días) desde su establecimiento <i>in vitro</i> .	106

Longitud promedio de brotes del total de explantos juveniles de castaño (todas las variedades estudiadas) a los 10, 25, 40 y 55 días desde la introducción <i>in vitro</i> , número de brotes con muerte apical y número de brotes subcultivados con su longitud promedio.	108
Porcentaje de contaminación, oxidación y mortalidad del total de explantos de material juvenil y adulto de castaño, evaluados a los 10, 25, 40 y 55 días, desde el establecimiento <i>in vitro</i> .	109



RESUMEN

Castanea sativa Mill., es una especie arbórea de interés silvoagrícola, ampliamente cultivada, principalmente por su fruto, cuya calidad “marrone” es apetecido en el mercado de las *delicatesen*. En Chile, variedades de esta especie fueron introducidas con la finalidad de establecer huertos productivos con productos competitivos a nivel mundial. Esta especie, al igual que otras leñosas, ha visto limitada su propagación vegetativa, principalmente al utilizar explantos provenientes de plantas adultas. Factores como el genotipo y edad de la planta donante influyen en la capacidad morfogénica de los tejidos. A este último factor, se asocian algunos compuestos fenólicos que varían con la ontogenia de los tejidos afectando positiva o negativamente la propagación vegetativa de la especie. Por otra parte, se han utilizado diversas metodología para identificar la gran cantidad de variedades que se ha generado a lo largo del tiempo, siendo la identificación molecular la que ha tenido los mayores avances y ventajas sobre sistema de identificación tradicional, como el morfológico. Dentro de los tipos de marcadores moleculares, los microsatélites son los más utilizados.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del genotipo, la edad y compuestos fenólicos asociados a la edad, en la capacidad morfogénica del establecimiento *in vitro* de variedades de *Castanea sativa*, seleccionadas para producción de plantas, previamente identificadas genéticamente. Para la identificación genética se estudiaron nueve cultivares de interés productivo en fruto y madera, seleccionando 8 árboles, por cultivar, al azar. Los perfiles combinados de los cinco SSR mostraron once genotipos distintos entre los nueve cultivares analizados, verificando errores en la asignación varietal establecida. De los nueve

genotipos estudiados sólo *Bouche Rouche*, *Citta di Castello* y *Castell Borello*, están correctamente identificados. En *Precoce Migoule* hubo diferencias genotípicas intraespecíficas, ya que se detectaron cuatro genotipos distintos. Podrían existir errores de manipulación dentro del huerto lo que se concluye al detectar un ejemplar de *Castell Borello* en la línea de cultivo de *Precoce Migoule*. Por otra parte, los cinco microsatélites utilizados fueron insuficientes para detectar los polimorfismos entre las variedades marrones de referencia y las variedades chilenas identificadas. Antes de iniciar un programa de producción de plantas en variedades de interés, es de suma importancia validar la identidad genética de estas, para evitar problemas posteriores que pueden significar el fracaso del programa establecido.

Para evaluar el efecto del genotipo y de la fuente de citoquinina 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⁻¹ 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⁻¹ 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.

Con respecto al material vegetal, el objetivo fue corroborar la influencia de la edad de la planta madre en la respuesta obtenida al establecimiento *in vitro* y determinar compuestos fenólicos asociados a estas. Las respuestas *in vitro* fueron significativamente distintas entre los explantos juveniles y adultos, corroborando que estos últimos son mucho más difíciles de propagar debido a la baja respuesta y a los altos niveles de contaminación, oxidación y de muerte apical. A su vez, los juveniles lograron ser subcultivados debido a la alta capacidad morfogénica que presentaron. Existe un efecto de la edad sobre los compuestos fenólicos, ya que de los compuestos detectados en los tejidos, el contenido de ácido eláxico es significativamente superior en explantos juveniles con respecto a los adultos y la rutina sólo se detectó en estos últimos. La presencia y cantidad de compuestos fenólicos como el ácido eláxico y la rutina podrían estar influyendo en el establecimiento *in vitro* de explantos adultos y juveniles.

ABSTRACT

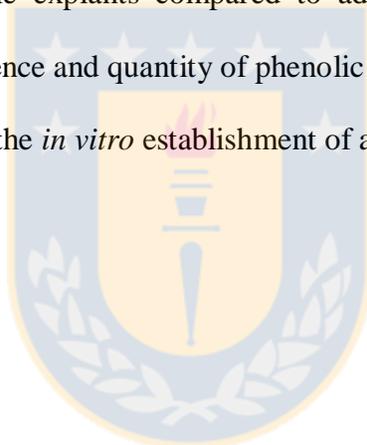
Castanea sativa Mill., is an arboreal species of silvoagricultural interest, widely cultivated, mainly for its fruit, whose "marrone" quality is desired in the delicatessen market. In Chile, varieties of this species were introduced with the purpose of establishing productive orchards with competitive products worldwide. This species, like other woody species, has seen its vegetative propagation limited, mainly when using explants from adult plants. Factors such as the genotype and age of the donor plant influence the morphogenic capacity of the tissues. To this last factor, some phenolic compounds are associated that vary with the ontogeny of the tissues, affecting positively or negatively the vegetative propagation of the species. On the other hand, various methods have been used to identify the large number of varieties that have been generated over time, with molecular identification having the greatest advances and advantages over traditional identification systems, such as morphological identification. Within the types of molecular markers, microsatellites are the most used.

The objective of this study was to evaluate the effect of genotype, age and phenolic compounds associated with age, on the morphogenic capacity of the *in vitro* establishment of *Castanea sativa* varieties, selected for production of plants, previously identified genetically. For genetic identification, nine cultivars of productive interest in fruit and wood were studied, selecting 8 trees, by cultivating, at random. The combined profiles of the five SSR showed eleven different genotypes among the nine cultivars analyzed, verifying errors in the established varietal assignment. Of the nine genotypes studied, only Bouche Rouche, Citta di Castello and Castell Borello are correctly identified. In Precoce Migoule there were intraspecific genotypic differences, since four different genotypes were

detected. There could be errors of manipulation inside the garden, which is concluded when detecting a Castell Borello specimen in the Precoce Migoule culture line. On the other hand, the five microsatellites used were insufficient to detect the polymorphisms between the marrone reference varieties and the Chilean varieties identified. Before starting a program of production of plants in varieties of interest, it is very important to validate the genetic identity of these, to avoid later problems that can mean the failure of the established program.

To evaluate the effect of the genotype and the source of cytokinin, six chestnut varieties from Italy and France and two types of cytokinins were studied, evaluating their effect on parameters of initiation of *in vitro* establishment, such as survival, contamination, callus basal formation, axillary bud opening, among others. The results show that in the same culture conditions the varieties with the best response are 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. On the other hand, the number of explants with sprouted buds was higher in the treatment with 0.5 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP) with 100% in CC and 55% in CP, there being significant difference with the response obtained in the treatment with 0.5 mg L⁻¹ of Thidiazuron (TDZ), where 10% and 15% of explants with sprouted buds were observed, respectively. These results indicate that the genotype and the source of cytokinin influence the response to the *in vitro* establishment of nodal segments of chestnut varieties, therefore, to establish a propagation program it is necessary to adjust a specific protocol for each variety.

With respect to the age of the mother plant, the objective was to corroborate the influence of the age of the mother plant on the response obtained to the establishment *in vitro* and to determine phenolic compounds associated with these. The *in vitro* responses were significantly different between the juvenile and adult explants, corroborating that the latter are much more difficult to propagate due to the low response and the high levels of contamination, oxidation and apical death. In turn, the juveniles managed to be subcultured due to the high morphogenic capacity they presented. There is an effect of age on phenolic compounds, since of the compounds detected in the tissues, the content of ellagic acid is significantly higher in juvenile explants compared to adults and the rutin was only detected in the latter. The presence and quantity of phenolic compounds such as ellagic acid and rutin could be influencing the *in vitro* establishment of adult and juvenile explants.



INTRODUCCIÓN GENERAL

El área silvoagrícola ha ido tomando relevancia en el sentido de utilizar especies vegetales que tengan doble propósito, tanto productos madereros como alimenticios, considerándose la calidad un factor crítico para mantener la competitividad en la industria chilena. Para esto, se requieren variedades que respondan a la alta demanda y que generen inalterablemente productos con características específicas de interés. Para responder a esta necesidad el método de propagación de plantas a utilizar cumple un rol fundamental, principalmente cuando se requiere masificar y transferir toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia. Por otra parte, es importante contar con herramientas moleculares que permitan identificar y asegurar la autenticidad varietal en el caso de especies multipropósito, proceso que puede ser complejo cuando las similitudes morfológicas entre variedades son significativas y en especial cuando para su comercialización la correcta identidad genética es considerada un factor clave de calidad y productividad (Hinrichsen, 2008).

El origen de una variedad en una especie se debe a la variación genética y se define como un rasgo fenotípicamente variable y heredable en una población (King et al., 2012). Por lo tanto, una variedad representa a un grupo de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido seleccionado dentro de una especie, que presentan una expresión de características comunes resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos (UPOV, 2011). Mientras que un cultivar se puede entender como una variedad cultivada, una población de plantas seleccionadas por un carácter en particular o una combinación de caracteres siendo genéticamente uniforme e inflexible, donde se busca que no responda a las presiones de selección durante el cultivo. A menudo a un cultivar se le ha definido exclusivamente como

una línea pura, un clon o una variedad híbrida, lo que no es completamente correcto debido a que también se les considera como cultivar a los conjuntos de plantas cultivadas a partir de semillas derivadas de una polinización controlada y que sean recolectadas de una determinada procedencia en más de una ocasión que puedan distinguirse consistentemente por una o más características a pesar de que las plantas no sean uniforme genéticamente hablando (Brickell et al., 2009).

Una de las especies que se encuentran actualmente formando huertos productivos en Europa es *Castanea sativa* Mill., especie arbórea de interés silvoagrícola, ampliamente cultivada, por su fruto, cuya calidad “marrone” es apetecido en el mercado de las *delicatessen*.

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 y 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 y 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.

El castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) fue introducido en Chile por inmigrantes Europeos hace más de 250 años y se distribuye desde la Región del Maule hasta la Región de La Araucanía (Grau, 2003) con, aproximadamente, 431,3 ha (INE, 2007). Esta especie multipropósito es de gran interés agroeconómico tanto por la producción de madera como por su fruto (Carvalho et al., 2001, Benedetti y Saavedra, 2007). Por una parte, presenta ventajas

importantes para su cultivo en Chile respecto de otros países, producto del clima más benigno, la ausencia de las principales enfermedades y plagas que afectan a la especie, y la calidad de los suelos volcánicos, profundos y fértiles con alto contenido de materia orgánica (Grau, 2004), además de oportunidades concretas de desarrollo productivo, dada su versatilidad de cultivo, variados usos y la existencia de un mercado para su madera y frutos, con demandas incluso para exportación.

En Chile, prácticamente la totalidad de los castaños que conforman tanto huertos frutales como plantaciones con fines forestales son árboles que, en general, no presentan ningún tipo de selección o mejoramiento, produciendo frutos que no reúnen las características demandadas en el mercado internacional (bajo porcentaje de tabicación interna y de poliembrionia) (Pirazzoli, 1993; Grau, 2003). De este modo, las exportaciones de castañas han experimentando una baja, tanto en volumen como en valor (896 Ton en el 2008 con un valor de 1275 mil dólares a 124 Ton el 2010 con un valor de 108 mil dólares), perdiendo relevancia en el sector (Bravo, 2010) y quedando la mayor parte de la producción en el país.

Para potenciar estas alternativas de negocio, se deben superar ciertos inconvenientes, en especial, la falta de homogeneidad y desconocimiento de las variedades cultivadas (Loewe et al., 1998), pero principalmente la falta de variedades *elite* que permitan el desarrollo de un negocio asociado a la propagación y establecimiento de huertos productores de frutos tipo marrone, apetecidos y susceptibles de ser internacionalmente comercializados. Para corregir esto, es imprescindible contar con un número suficiente de plantas de castaño de las variedades adecuadas.

Respecto a las variedades *elite* existen antecedentes de la introducción a Chile de púas de variedades comerciales de castaño por parte del INIA Quilamapu desde Italia y Francia, la

mayoría de tipo marrone. Entre ellos se encuentran Marrone di Chiusa di Pesio, Marrone di Val di Susa, Bouche Rouge, Marrone di cuneo, entre otros, cuyos frutos tienen un pericarpio delgado y ausencia de tabicación (Fig. 1A), es decir, con un tegumento interno (episperma) que no penetra la masa comestible (semilla con cotiledones ruminados) y de fácil eliminación del pericarpio (Fig. 1C), a diferencia de la castaña común (Figs. 1B y 1D), siendo más apetecible para el consumo (Grau, 2003). Las púas introducidas fueron injertadas en árboles de castaño chileno provenientes de semilla comenzando así su establecimiento en el país (Grau, 2003).

Con el tiempo, estas variedades han sido cultivadas en pequeños huertos productivos, siendo el fruto el principal interés en la producción. Ha sido el injerto el método utilizado en la producción de plantas, método de propagación característico en especie como el castaño (Grau, 2003, Fernández-López y Alía, 2008), pero este sistema ha presentado problemas de incompatibilidad tardía entre portainjerto y púa, a lo que se suma el bajo grado de masificación de este sistema. Por tanto, existe un interés en producciones futuras usando técnicas de propagación como el cultivo *in vitro* el cual permitiría la generación de plantas sobre su propio pie y a la vez, mantener el valor genético deseado (Bandyopadhyay et al., 1999, Campbell et al., 2003, Merkle y Nairn, 2005).

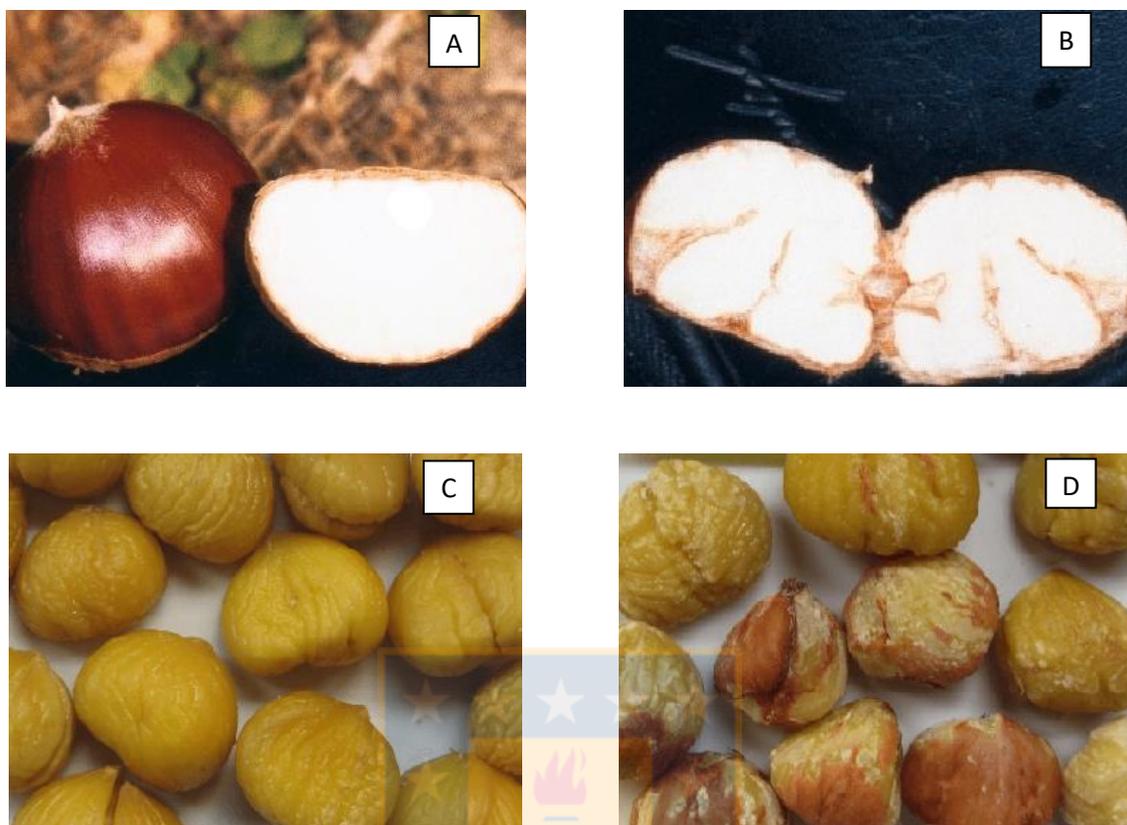


Figura 1. Diferencia entre el fruto Castaña y el tipo Marrone. Marrone sin Tabiques (A), Castaña Tabicada (B), Calidad Marrone: Facilidad de pelado (C) y Castaña con resto de la testa seminal (D). Fuente: Elaboración propia.

El material vegetal de castaño proveniente de Europa fue introducido siguiendo las severas normas de cuarentena, pero no existen antecedentes de una certificación que valide cada variedad ingresada (Grau, 2003). Bounus et al. (2005) realizaron un estudio donde compararon la identidad genética de algunas variedades, encontrando diferencias con respecto al perfil genético utilizado de referencia. La variedad Marrone Montemarrano es una de las que no fue identificada a la que se suman Castell della Madonna, Marrone Fiorentino y algunos árboles dentro de la variedad Castell Borello.

Existen otras variedades de castaño que se cultivan en el país y que no han sido estudiadas, como Marrone Castell Borello, Bouche Rouge, Castell del Río, etc. Por lo tanto, es de gran importancia establecer un sistema que permita garantizar la autenticidad de las variedades antes de establecer un programa de producción de plantas con interés comercial.

1.1 Descripción de algunos cultivares de Castaño caracterizados en Chile.

Marrone di Citta di Castello

Este cultivar se encuentra difundido en la comuna de Citta di Castello, Umbría y Monte Santa Tiberina, en Italia. La mayor producción se da en las zonas donde se sitúa a 600 y 800 metros sobre el nivel del mar. Es un árbol vigoroso, con un fuste con corteza estriada y sus frutos (Fig. 2) son muy grandes, de excelente calidad y calibre, de forma elíptica, con ápice en punta y base redondeada y de color marrone claro (Grau, 2009).



Figura 2. Fruto de la variedad de castaño *Citta di Castello*. Fuente: Elaboración propia.

Bouche Rouge

Es una variedad tardía, de *Castanea sativa*, originaria de la región de Ardèche, Francia. Sus castañas (Fig. 3) son grandes, de gran aspecto, buena calidad, apta para todos los usos (frescas e industriales) y para la exportación (Breisch, 1995).



Figura 3. Fruto de la variedad Bouche Rouche dentro del erizo (A) y hojas y frutos de la variedad (B). Fuente: Elaboración propia.

Marrone di Montemarano

Es un cultivar seleccionado y difundido en la región de Campania, Italia. Es muy precoz y en Chile se destaca por esto superando a todos los demás cultivares que se cultivan en Chillán (Grau, 2009). Su fruto es de muy buena calidad siendo utilizado, principalmente en la industria de la confitería (Grau, 2009).

Marigoule

Híbrido natural entre *Castanea sativa* x *Castanea crenata*. Debido a su gran capacidad de adaptación, se cultiva ampliamente en diferentes regiones productoras de Francia. La mayor producción se da en las zonas donde se sitúa entre 3 y 400 m s.n.m. Es de gran calibre color

pardo brillante, pulpa firme pero de baja palatibilidad. Se parte al procesarla. Tiene buena tolerancia al hongo *Phytophthora sp.* al ser propagada sobre raíz propia y como portainjerto. Su importancia está dada por su calidad de la madera y porque se utiliza como polinizador (Breisch *et al.*, 1995, Grau, 2009).

Précoce de Migoule

Es un híbrido natural entre castaño europeo y japonés (*C. crenata x C. sativa*), de origen Francés. De buen tamaño y madurez temprana. Presenta una forma muy erguida y poco ramificada, puede entrar en producción a los 2 o 3 años. Su productividad es alta, pero puede afectar el calibre (Breisch *et al.*, 1995, Grau, 2009).

Marrone di Cuneo

Variedad que se cultiva en la zona de Cuneo, al norte de Italia, Piemonte. Es de vigor medio y su fruto posee muy buenas cualidades para consumo fresco y uso industrial (Grau, 2009).

1.2 Propagación vegetativa

Existen diversas variedades de *Castanea sativa* capaces de producir frutos con características deseables. La reproducción mediante semillas de estas variedades no es recomendable para el establecimiento de huertos productivos, debido a la alta heterogeneidad que se produce. Por otra parte, cuando se requiere masificar y transferir toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia es necesario contar con un tipo de propagación que lo permita. Tal es el caso de la propagación vegetativa donde las plantas obtenidas son iguales a la planta madre seleccionada (Sánchez *et al.*, 2005). Es así como mediante la clonación de material

seleccionado, se han obtenidos logros con los cuales se han duplicado las ganancias genéticas respecto al mejoramiento por vía sexual (Sánchez et al., 2005). Sin embargo, las variedades de interés de castaño son altamente recalcitrantes (Caboni *et al.*, 1996, Sierra, 2001) a ser reproducidas vegetativamente mediante estacas (Vieitez et al., 1983, Sierra, 2001), lo que dificulta el proceso de producción masiva de individuos *elite* con características deseables.

Actualmente, para la producción de frutos el método de propagación de los cultivares de castaño es mediante injerto (Flores et al., 2001). 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 reducir 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 diferencias entre las distintas variedades dentro de la especie (Valera et al., 1999). Además, el interés por aumentar la producción de plantas requiere de un método de producción que masifique el material vegetal de interés, produzca plantas sobre su propio pie y que evite el riesgo de pérdida de plantas de alta calidad productora por incompatibilidad púa-patrón (Sánchez-Olate et al., 2005).

El cultivo *in vitro* es una técnica de reproducción asexual que permite propagar masivamente individuos *elite* asegurando la mantención de las características deseadas de individuos de origen, ya que al igual que otras técnicas de propagación vegetativa *in vitro* o *ex vitro*, transfiere toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia, la totipotencia de las células vegetales, mediante un manejo adecuado, hace posible la generación de diversos órganos de una planta para obtener de esta manera un individuo completo, genéticamente idéntico al material de origen (Ferl y Paul, 2000). Sin embargo, en leñosas esta

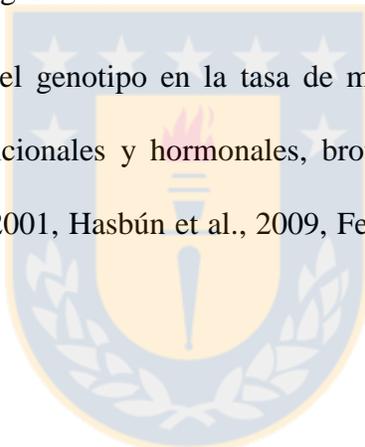
técnica posee un alto costo asociado a altas tasas de mortalidad observada durante la transferencia desde las condiciones *in vitro* a las condiciones de invernadero y/o vivero (Swain et al., 2010). Las plantas producidas *in vitro* poseen características morfo-fisiológicas que dificultan la transición a condiciones *ex vitro*, principalmente una limitada capacidad fotosintética, deficiente desarrollo de la anatomía foliar, escaso desarrollo de mecanismos de manejo de energía lumínica (Pospíšilova et al., 1992, Carvalho et al., 2001, Badr y Desjardins, 2007, Álvarez et al., 2012, Sáez et al., 2013). Una transferencia a condiciones *ex vitro* exitosa supone la aplicación de tratamientos de pre-aclimatación *in vitro*, lo que ha sido reportado como una técnica eficiente en *Castanea sativa* Mill. (Sáez et al., 2012), sin embargo, en variedades *elite* de castaño esto no ha sido estudiado. Las respuesta a los tratamiento *in vitro*, son especie-dependiente e incluso dependientes de la variedad o cultivar (Tichá et al., 1998, Carvalho et al., 2001).

Desde los primeros estudios sobre la morfogénesis *in vitro* y aún en la actualidad se reconoce la capacidad que tienen ciertos grupos de plantas para responder con mayor rapidez a la formación de nuevas estructuras u órganos *in vitro*, repuesta morfogénica que se da ante la presencia de un estímulo. La comprensión de toda la fisiología de las plantas donantes puede ser crítica para establecer protocolos exitosos que dependen del genotipo, las condiciones ambientales, estado fisiológico y ontogénico (Benson, 2000). Para una especie dada, los factores endógenos y ambientales como el genotipo, el tejido y el momento de la escisión, la posición del explante dentro de la planta madre, la fenología, la maduración del árbol, la luz y la temperatura podrían ser limitantes para la regeneración (Bonga et al., 2010, Rutledge et al., 2013).

Efecto del Genotipo

La regeneración *in vitro* depende de la especie, variedad o cultivar y es altamente variable e impredecible, siendo el genotipo uno de los factores más influyentes en la regeneración *in vitro* (Gubis et al., 2003), ya que existen grandes diferencias en la división celular, la capacidad regenerativa en plantas provenientes de una misma especie y en respuesta morfogénica en iguales condiciones de cultivo (Swartz, 1991). Según Vieitez et al. (2007), los resultados en el cultivo *in vitro* de *Castanea sativa* dependen en gran medida de este factor, el cual no sólo influye en la tasa de proliferación y de enraizamiento, sino también el vigor y la aclimatación de las plántulas regeneradas.

Se ha evidenciado el efecto del genotipo en la tasa de multiplicación, en el requerimiento lumínico, requerimientos nutricionales y hormonales, brotación y enraizamiento (Miranda-Fontañña y Fernández-López, 2001, Hasbún et al., 2009, Fernández et al., 2001, Corredoira et al., 2011, Sáez et al., 2012).



Edad planta donante

En las plantas la capacidad morfogénica de los meristemas puede cambiar durante el envejecimiento, siendo la maduración y la edad ontogénica de los árboles el factor limitante más importante, ya que la eficiencia de la regeneración es mucho mayor en los tejidos en las primeras etapas de desarrollo (George et al., 2008) y después de alcanzar una edad crítica, la capacidad de propagación disminuye abruptamente (Ballester et al., 1999). Aunque se han hecho muchos intentos para superar el inherente cambio de fase asociado con el envejecimiento y se ha descrito la revigorización de árboles adultos (Sánchez et al., 1997,

Giovannelli y Giannini, 1999, Von Aderkas y Bonga, 2000), existen todavía barreras para la propagación clonal de árboles adultos seleccionados (Selby et al., 2005, Prakash y Gurumurthi, 2010, Klimaszewska et al., 2011, Xiao et al., 2014) y estas están dadas por la edad del árbol donante, principalmente por el proceso de maduración.

La maduración es un proceso de desarrollo relacionado con la edad en plantas vasculares que afecta a la morfología, la tasa de crecimiento y otros rasgos fisiológicos y de desarrollo, tales como altura y diámetro de los brotes, atributos foliares, conductancia estomática, fotosíntesis, tasas de respiración, capacidad de enraizamiento y respuestas a factores bióticos y abióticos. (Day et al., 2002, Day y Greenwood, 2011). Se han reconocido cuatro fases fenológicas en el desarrollo: 1) la fase embrionaria, 2) la fase vegetativa juvenil postembrionaria, 3) la fase vegetativa adulta, 4) la fase reproductiva adulta (Poethig, 2003). Aunque el cambio de fase más obvio es la transición de la fase vegetativa al desarrollo reproductivo, los árboles exhiben una compleja gama de fases de desarrollo, mostrando transiciones juveniles-adultos en numerosos rasgos morfológicos y fisiológicos que ocurren en tiempos muy diferentes y continúan durante años. Estas transiciones juveniles-adultas se regulan independientemente en grados variables (Day et al., 2002, Poethig, 2003, Brunner y Nilsson, 2004, Day y Greenwood, 2011).

Los tejidos juveniles poseen un alto grado de actividad meristemática y de elongación celular y tienden a tener más plasticidad *in vitro* que los tejidos adultos (explantos provenientes de plantas que han entrado en la etapa reproductiva), como es el caso de la respuesta de cotiledones, hipocótilos y hojas aisladas de material juvenil que son usadas para micropropagación (Giovannelli, 1999, Ballester *et al.*, 2001, San José *et al.*, 2001, Becerra et al., 2004, Giovannelli et al., 2004). A su vez, presentan una mayor capacidad morfogénica, la

cual se manifiesta en respuestas de crecimiento, proliferación y enraizamiento, a diferencia de un tejido maduro el cuál es más difícil de desdiferenciar e inducir a la producción de raíces y brotes (Vidal et al., 2003) .

El castaño no está exento de las barreras que impone la edad al cultivo *in vitro*, fenómeno común en gran parte de las especies leñosas (Vieitez y San-José, 1996). Muchos autores concuerdan en que la maduración y la senescencia parecen ser los responsables de que la capacidad morfogénica decline en muchas especies leñosas, presentando un gradiente de juvenilidad que disminuye desde la base hacia el ápice (Vidal et al., 2003, Corredoira et al., 2011, Hasbún, 2005, Ballester et al., 1999). Con respecto a eso, Ballester et al. (1999) compararon la capacidad de proliferación y formación de raíces en brotes obtenidos *in vitro* en *Castanea sativa* Mill., siendo los provenientes de material vegetal colectado de la base del árbol los que presentaron una mayor capacidad de respuesta en comparación con los de la copa. Por otra parte, Hasbún (2005) y Corredoira *et al.* (2011), confirmaron que los brotes obtenidos de ramas basales de árboles adultos de castaño, son más reactivos para el establecimiento *in vitro* que el material de la copa demostrando que la edad de la planta madre condiciona el establecimiento *in vitro*.

Los gradientes de juvenilidad-madurez ocurren desde la base hasta la punta de los árboles (Greenwood y Hutchinson, 1993, Bonga et al., 2010, Hartmann et al., 2011). Las características juveniles se conservan en tejidos ontogenéticamente jóvenes cerca del eje central en la base del árbol, mientras que la maduración es evidente en tejidos ontogenéticamente más viejos, pero más recientemente producidos, en la parte superior y periférica del árbol (Von Aderkas y Bonga, 2000, Hartmann et al., 2011). Los brotes axilares que están más alejados del tallo son menos juveniles que los brotes formados más cerca del

tallo central, mientras que los tejidos juveniles a menudo se encuentran en los brotes que surgen de las raíces o del tocón del árbol (Bonga et al., 2010, Hartmann et al., 2011, Pijut et al., 2011).

La clonación en árboles adulto de castaño por medio del cultivo *in vitro*, ha sido lograda con relativo éxito a partir de materiales que retienen ciertas características fisiológicas juveniles, tales como brotes basales, epicórmicos o rebrotes de tocón (Sánchez et al., 1997, Hasbún, 2005, Vieitez et al., 2007, Fernández-Lorenzo et al., 1999, Fernández-Lorenzo et al., 2001, Cuenca et al., 2009, Concepción et al., 2005).

A la hora de profundizar en los mecanismos que regulan el proceso de maduración y solventar los problemas actuales que en la mayoría de los casos restringen la aplicación de las técnicas de micropropagación de árboles seleccionados, es importante la búsqueda de posibles marcadores del cambio de fase a nivel morfológico y fisiológico, bioquímico y molecular. Según Vidal et al. (2003), las características morfológicas de brotes y su capacidad de proliferación y enraizamiento pueden utilizarse como marcadores para diferenciar entre explantes de origen juvenil y adulto. Por otra parte, los compuestos fenólicos son usados en plantas leñosas para diferenciar entre fases adultas y juveniles (Zhang et al., 2007), ya que la síntesis de precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos juveniles (De Klerk, 1997).

En *Castanea sativa* Mill., se han descrito diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares asociadas a pérdida de competencia morfogénica con la edad (Ballester et al., 1999, Fernández-Lorenzo et al., 1999, Gil et al., 2003).

Oxidación de tejidos producto de la síntesis de compuestos fenólicos.

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de plantas leñosas, en gran medida está limitado por la ocurrencia de oxidación de los explantes y la liberación de exudados al medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George, 1996, Laukkanen et al., 2000, Murkute y Shanti-Patil, 2003, Tang y Newton, 2004), en especial en material vegetal proveniente de árboles adultos.

Todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de defensa ante situaciones de estrés (Quiñones et al., 2012). Los compuestos fenólicos tienen diversas funciones en las plantas. La más importante, es que gran parte de ellos actúan como antioxidantes que protegen a las plantas contra el estrés oxidativo (Jaleel et al., 2009).

Al introducir *in vitro* material vegetal, se inducen cambios importantes en el metabolismo, la fisiología y el desarrollo, algunos de los cuales pueden tener consecuencias perjudiciales, como la oxidación y la posterior muerte de los tejidos. Esto se debe a que los daños mecánicos que se producen en los explantes durante la esterilización y la preparación para el cultivo *in vitro*, promocionan el exudado y la producción de sustancias fenólicas. Los fenoles son compuestos lábiles que se oxidan muy fácilmente (Debergh y Read, 1991). Como resultado del estrés oxidativo, inmediatamente se producen alteraciones metabólicas que favorecen la formación de radicales libres y sus productos de reacción secundarios tóxicos. La oxidación de estos exudados fenólicos produce enzimas del tipo polifenoloxidasas y tirosinasas, sustancias que causan el ennegrecimiento del medio y que pueden llegar a ser letales para los

explantes. Estas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas, sustancias fitotóxicas que a su vez pueden polimerizarse, afectar las proteínas y en consecuencia, inhibir el crecimiento y la viabilidad de los explantes (Tabiyeh et al., 2006) provocando necrosis de los tejidos (George, 1996, Laukkanen et al., 2000, Murkute y Shanti-Patil, 2003, Tang y Newton, 2004).

Por otra parte, es importante mencionar que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un rol en la regulación del ciclo celular (Foyer y Noctor, 2005, Fehér et al., 2008), por lo cual también son importantes en los tejidos vegetales. Estudios proteómicos recientes revelaron que las proteínas inducidas después del estrés oxidativo, como la ascorbato peroxidasa (Holmes et al., 2006), la dehidroascorbato reductasa, la glutatión transferasa (Lee *et al.*, 2008) y la manganeso superóxido dismutasa mitocondrial (Shi et al., 2008), también estaban conectadas a una mayor actividad de división celular. Estos hallazgos confirman y enriquecen los datos que apoyan el papel funcional de algunas proteínas relacionadas con las ROS en la regulación de la división celular.

Las ROS desempeñan un importante papel de señalización en las plantas (Foyer y Noctor, 2005), aunque en altas concentraciones pueden causar estrés oxidativo (Cassells y Curry, 2001, Gaspar et al., 2002). El estrés oxidativo define las consecuencias de un desajuste entre la producción de ROS y la capacidad de defenderse contra ellos. En algunos tejidos, la protección antioxidante es finita y en el largo plazo algunas células se protegen inadecuadamente contra el daño de los radicales libres. Esto se da, principalmente, por que se produce un desbalance entre procesos pro-oxidantes y antioxidantes esenciales, siendo menor el contenido de estos últimos, lo que promueve el aumento de la producción de radicales libres y la acumulación de productos tóxicos de oxidación secundaria (Jing et al., 2003). Estas

reticulaciones con macromoléculas, causan una disfunción molecular y una disminución progresiva y temporizada de la competencia en el cultivo, que eventualmente conduce a una pérdida de totipotencia (Benson, 2000).

Se ha demostrado que el estrés oxidativo contribuye a la recalcitrancia (Papadakis et al., 2001), provoca varios trastornos fisiológicos del cultivo de tejidos vegetales, como la hiperhidricidad (Gaspar et al., 2002, Cassells y Curry, 2001, Saher et al., 2004) y afecta el desarrollo y las respuestas morfogénicas de los tejidos cultivados *in vitro* (Obert et al., 2005).

Existe una relación directa entre la oxidación de los tejidos cultivados en condiciones de cultivo *in vitro* y la edad del material donante, ya que las plantas muestran diferentes comportamientos dependiendo de su ontogenia, siendo los tejidos juveniles menos propensos a la oxidación que los tejidos adultos (George, 1996). En las plantas adultas o durante la senescencia las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo aumentan, mientras que los niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y peroxidasa de ascorbato, disminuyen (Jiménez et al., 1998, Orendi et al., 2001, Munné-Bosch y Alegre, 2002). La senescencia inducida por el estrés se acompaña con un aumento de ROS y una disminución de las enzimas antioxidantes (Hodges y Forney, 2000, Sandalio et al., 2001, Santos et al., 2001). La fenolización está relacionada con el estado fisiológico de los tejidos o explante; es decir, la edad ontogenética está vinculada a la presencia y acumulación de compuestos fenólicos en las plantas (Hernández y González, 2010).

Compuestos fenólicos y el Ácido Indol Acético (AIA).

Los compuestos fenólicos pueden actuar favoreciendo o limitando la capacidad morfogénica de los tejidos en el cultivo *in vitro* y esta relación está dada por la relación que existe con el

Ácido Indol Acético (AIA). Algunos tipos de fenoles se han relacionado con auxinas en formas distintas de protegerlas de la oxidación, siendo moduladores del catabolismo del AIA. Es el caso de algunos monofenoles como el ácido sináptico y ácido ferúlico que a bajas concentraciones inhiben la acción de AIAoxidasa por lo que deja actuar al AIA en elongación y división celular, crecimiento y subsecuente desarrollo de la planta (Volpert et al., 1995, Arnaldos et al., 2001). Por otra parte, las peroxidasa pueden actuar como catalizadores de la oxidación del AIA dejándolo inactivo, como es el caso de AIA oxidasa que corresponde a una peroxidasa ácida (Debergh y Read, 1991).

Por otra parte, existen tipos de fenoles llamados flavonoides que también pueden actuar como inhibidores del transporte de auxina (Murphy et al., 2000, Peer y Murphy, 2007). Esto se debe a que la estructura química de estos fenoles es similar a un inhibidor natural del transporte de auxina, el Ácido Naftiltalámico, NPA (Brown et al., 2001). La inhibición del transporte de auxina se produce a través de la unión de los flavonoides a proteínas facilitadoras del exflujo de auxinas de la familia PIN (Murphy et al., 2000, Peer et al., 2001, Marko et al., 2004), las cuales afectan a la distribución de las proteínas PIN, encargadas del transporte de la hormona a través de las células y afectando, finalmente, la elongación celular (Buer et al., 2007).

1.3 Identificación de variedades

Las herramientas enfocadas al estudio de la huella genética propia de cada variedad o cultivar se basa en marcadores genéticos. Estos se definen de manera amplia como cualquier variación observable (fenotípica) que se deriva directamente de una variación subyacente a nivel del ADN (Santos, 2011). Los marcadores genéticos, se clasifican en marcadores morfológicos,

basados en los rasgos evaluables visualmente, marcadores bioquímicos, basados en proteínas, marcadores moleculares, aquellos que dependen de un ensayo de ADN (Semagn et al., 2006).

Tradicionalmente para distinguir entre diferentes especies y cultivos los descriptores morfológicos son los más usados, sin embargo, hay casos en que estos criterios son de difícil aplicación, como en el caso de una alta similitud morfológica, estrecha relación genética entre variedades y sus progenitores, etc, a lo que se suma la desventaja de estar influenciados por el ambiente, por interacciones epistáticas y por efectos pleiotrópicos, entre otros (Ye et al., 2008, Busconi, 2006). Los caracteres fenológicos son muy plásticos, por lo que su caracterización debe realizarse en ensayos coetáneos, que permitan la separación de efectos genéticos y ambientales. Según Pigliucci (2001) la plasticidad fenotípica es la propiedad observada en un genotipo de mostrar diferentes fenotipos como respuesta a distintas condiciones ambientales, las tres variables de interés: genotipo, ambiente y fenotipo se relacionan entonces mediante la denominada norma de reacción.

La identificación de variedades de castaño se ha basado, tradicionalmente, en la observación de características morfológicas (Marinoni et al., 2013), siendo diferenciadas mediante la caracterización de fruto, forma y tamaño de las hojas, estructura del árbol (Grau, 2003) y a través de características fenológicas como floración, maduración y caída de frutos (Serdar et al., 2011).

El uso de marcadores morfológicos para castaño han permitido clasificar el fruto en parámetros físicos con respecto al cumplimiento de las características que corresponden al tipo marrone, midiendo para ello el calibre de las castañas (Benedetti et al., 2012). Adicionalmente, el método francés especifica que un cultivar produce un fruto tipo marrone si menos del 12%

de frutos producidos posee poliembrionia, mientras que el método italiano se centra en evaluar las características organolépticas (Grau, 2003).

Otros tipos de marcadores utilizados son los moleculares, los cuales son secuencias identificables de ADN que se encuentran en determinados lugares del genoma (locus) y que están relacionadas con la herencia de una característica o de un gen vinculado a ésta. Un genotipo puede presentar variaciones o diferencias (polimorfismos) entre organismos de una misma especie y estas diferencias resultan de cambios o re-arreglos entre los elementos que conforman el ADN (King et al., 2012). Éstos marcadores tienen herencia mendeliana, detectan variaciones directas a nivel del ADN, identifican individuos dominantes y codominantes y no son afectadas por el ambiente (Valadez y Kahl, 2000). Son observables sin importar el estado de desarrollo del individuo ni el tejido analizado, ya que la información genética está presente en todas las células (King et al., 2012).

El uso de los marcadores moleculares ha aumentado la eficiencia de los programas de mejoramiento silvoagrícola, alcanzando resultados muy importantes en la búsqueda de resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, aumento de cosechas, tasas de crecimiento, entre otros (Ajmone-Marsan et al., 2001).

Existen huellas genéticas que subyacen de la detección de fragmentos variables de ADN con alta diferenciación individual (Kroud, 2008) que puedan ser específicas de una variedad o cultivar, permitiendo distinguir unas de otras. Frecuentemente, un grupo de loci polimórfico es suficiente para la determinación de una huella genética única y pueden ser detectados mediante la utilización de marcadores moleculares como: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o

Secuencias simples repetidas (SSR) u otros que permiten detectar determinadas diferencias (polimorfismos) en las secuencias de ADN (Azofeifa-Delgado, 2006, Prohens et al., 2009).

Los marcadores denominados microsatélites SSRs (Simple Sequence Repeats) son los más empleados en la actualidad en estudios de diversidad genética debido a su alta reproductividad, naturaleza multialélica, forma de herencia codominante y amplia cobertura del genoma (Schlötterer, 2004). Trabajos realizados en especies vegetales con dichos marcadores han aportado una cuantiosa información sobre diversidad genética en poblaciones de especies forestales como nogal (Vahdati et al., 2015), pino (Fady, 2012), encino (Steinkellner et al., 1997) y castaño (Martín et al., 2010, Mattioni et al., 2013, Lusini et al., 2014). Además, se han convertido en las mejores herramientas para los estudios de identificación varietal en especies vegetales o de huella genética (Varshney et al., 2005). En castaño, la identificación de las variedades se está empezando a clarificar mediante el uso de estos marcadores (Gobbin et al., 2007, Martín et al., 2010, Pereira-Lorenzo et al., 2010).

En *Castanea sp.* los marcadores moleculares más utilizados para la caracterización genética han sido los SSR (Botta et al., 1999), caracterizados en *Castanea sativa* Mill. (Marinoni et al., 2003, Buck et al., 2003) y aplicados en estudios de poblaciones naturales, cultivares e incluso híbridos eurojaponeses (*C. crenata* x *C. sativa*), flujo de genes en poblaciones europeas (Botta et al., 2004), logrando detectar niveles variables de diversidad genética y al mismo tiempo casos de sinonimia u homonimia entre cultivares (Botta et al., 1999, Botta et al., 2001, Buck et al., 2003, Marinoni et al., 2003, Yamamoto et al., 2003, Boccacci et al., 2004, Gobbin et al., 2007, Martín et al., 2009, Martín et al., 2010a, Martín et al., 2010b). Se analizaron 53 individuos de cultivares italianos e híbridos eurojaponeses introducidos en Chile, utilizando 7 marcadores SSR, se logró diferenciar entre cultivares estudiados confirmando la identidad de

la mayoría de las muestras, aunque quedaron algunos con dudosa identidad o sin confirmar (Bounous et al., 2005).

Se han utilizado marcadores morfológicos en conjunto con marcadores SSRs con el objetivo de encontrar una correlación de los resultados obtenidos entre estos, concluyéndose que pocos fueron eficaces para discriminar entre cultivares en comparación con los SSR, dejando de manifiesto que no son suficientes por sí solos para generar una certera caracterización genética, debido a que principalmente el ambiente influencia los resultados que se obtienen (Botta et al., 2001, Torello-Marinoni et al., 2013). Además, se les ha dado lugar a los marcadores bioquímicos basados en el uso de isoenzimas (Pereira-Lorenzo et al., 1996, Pereira et al., 1999) y extracción de proteínas que han detectado variabilidad entre poblaciones de distinto origen (Villani et al., 1991) y variabilidad dentro y entre cultivares de castaño (Pereira-Lorenzo y Fernández-López, 1993).

Existen marcadores moleculares de mayor sensibilidad que permiten detectar diferencias al punto de determinar si dos individuos son hermanos o clones. Es el caso de los marcadores AFLP que se utilizan para variadas aplicaciones, como por ejemplo para evaluar la diversidad genética dentro de una misma especie o entre especies estrechamente emparentadas, inferir filogenias a nivel poblacional, generar mapas genéticos y determinar relaciones entre cultivares, logrando detectar diferencias genéticas entre clones de un mismo cultivar o ayudando a solucionar problemas de identificación (Paun y Schönswetter, 2012).

La sensibilidad para detectar polimorfismo a nivel de ADN, reproducibilidad y resolución de los AFLP es al menos igual o superior a la de otros marcadores moleculares (Mueller y Wolfenbarger, 1999). Los AFLP fueron de gran utilidad para la caracterización intercultivar en la especie *C. mollissima*, demostrándose por la estrecha base genética de los cultivares

selectos utilizados en la actualidad (Ovesná, 2005). Además, se ha estudiado la diversidad genética dentro y entre especies de *Castanea* utilizando varios marcadores moleculares donde los AFLP fueron los más eficientes en cuanto polimorfismos detectados, por sobre RAPD, ISSR y SSR (Abdelhamid et al., 2014).

HIPÓTESIS

El genotipo, la edad y compuestos oxidativos presentes en la planta madre, son determinantes en el establecimiento en cultivo *in vitro* de las distintas variedades de Castaño Europeo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del genotipo, la edad y compuestos fenólicos asociados a la edad, en la capacidad morfogénica del establecimiento *in vitro* de variedades de Castaño Europeo, seleccionadas para producción de plantas, previamente identificadas genéticamente.

Objetivos específicos

1. Validar la identidad genética de variedades de castaño Europeo existentes en Chile y seleccionadas para programa de producción de plantas.
2. Evaluar el efecto de genotipo en el establecimiento *in vitro* de las variedades de Castaño Europeo, seleccionadas.
3. Evaluar el efecto de la edad de la planta madre en las respuestas morfogénicas en el establecimiento *in vitro* y determinar compuestos fenólicos que estén asociados a las respuestas obtenidas.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelhamid, S., Cong-Linh, L., Conedera, M. y K pfer P. (2014). The assessment of genetic diversity of *Castanea* species by RAPD, AFLP, ISSR and SSR markers. Turkish Journal of Botany 38, 835-850.
- Ajmone-Marsan, P., Negrini, R., Crepaldi, P., Milanesi, E., Gorni, C., Valentini, A. y Cicogna, M. (2001). Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. Anim. Genet. 32, 281–288.
- Álvarez, C., Sáez, P., Sánchez-Olate, M. y Ríos, D. (2012). Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. Plant Cell, Tiss and Org Cult. 108, 1-9.
- Arnaldos, T.L., Muñoz, R., Ferrer, M.A. y Calderon, A.A. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. Physiologia Plantarum. 113, 315-322.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores molecular en plantas, aplicaciones en frutales del tr pico. Agronom a Mesoamericana. 17 (2), 221-242.
- Ballester, A., San-José, M., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. y Vieitez, 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.
- Ballester, A., Bourrain, L., Corredoira, E., Gonçalves, J.C., L , C-L., Miranda Fonta na, M.E., San-José, M.C., Sauer, U., Vieitez, A.M. y Wilhelm, E. (2001). Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. Forest Snow and Landscape Research. 76(3), 460-467.

- Bandyopadhyay, S., Cane, K., Rasmussen, G. y Hamill, J. (1999). Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalypt species—*Eucalyptus nitens* and *Eucalyptus globulus*. *Plant Science*. 140,189-198.
- Badr, A. y Desjardins, Y. (2007). Sugar uptake and metabolism in tissue cultured potato plantlets cultured in liquid medium. *Acta Horticulturae* 748, 265-273.
- Becerra, D.C., Forero, A.P. y Gongora, G.A. (2004). Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 79, 87-90.
- Benedetti, S. y Saavedra, J. (2007). Caracterización Ambiental y Productiva de Rodales Forestales de Castaño en Chile. Instituto de Investigación Forestal. *INFOR* 13 (11), 11-124.
- Benedetti, S., Gonzalez, M., Garcia, E. y Quiroz, I. (2012). An analysis of the physical and germination parameters of the sweet Chestnut (*Castanea sativa*). Instituto Forestal. Santiago. Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 39 (1), 185-192.
- Benson, E. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 36(3), 141-148.
- Boccacci, P., Akkac, A., Torello-marinoni, D., Bounous, G. y Botta, R. (2004). Typing European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars Using Oak Simple Sequence Repeat Markers. *HortScience*. 39 (6), 1012-1016.

- Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K y Von Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100, 241-254.
- Botta, R., Akkarak, A., Marinoni, D., Bounous, G., Kamper, S., Steinkellner, H. y Lexer, C. (1999). Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Horticulturae*. 494, 277-282.
- Botta, R., Marinoni, D., Beccaro, G., Akkarak, A. y Bounous, G. (2001). Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *Forest Snow and Landscape Research*. 3, 425-428.
- Botta, R., Marinoni, D. y Bounous, G. (2004). Molecular marker and certification. In: R. Kellison, S. Mccord y K. Gatland (Eds). *Proceedings of the Forestry Biotechnology Workshop, Global Biotechnological Forum*. 2-5 March, 2004, Concepción, Chile. Pp 63-72.
- Bounous, G., Akkarak, A., Beccaro, G. L., Botta, R., Torello-Marini, D. y Joublan, J. P. (2005). DNA-Typing of cultivars for the development of a chestnut industry in Chile. *Acta Horticulturae*. 693, 505-510.
- Brickell C.D., Alexander C., David J.C., Hettterscheid, Leslie A.C., Malecot V. y Xiaobai Jin. (2009). *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants*. Eighth edition. International Society for Horticultural Science (ISHS). *Scripta Horticulturae*. 10, 184.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L. y Muday, G.K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 126, 524–535.

- Brunner, A.M. y Nilsson, O. (2004). Revisiting tree maturation and floral initiation in the poplar functional genomics era. *New Phytologist*. 164, 43-51.
- Buck E.J., Hadonou M., James C.J., Blakesley D. y Russel K. (2003). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Resources*. 3(2): 171-173.
- Buer, C., Muday, G., Djordjevic, M. (2007). Flavonoids are differentially Taken Up and Transported Long Distances in *Arabidopsis*. *Plan Physiology*. 145, 478-490.
- Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, N., Falasca, G. y Damiano, C. (1996). Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. *Plant Science*. 118(2), 203-208.
- Campbell, M. M., Brunner, A. M., Jones, H. M. y Strauss, S. H. (2003). Forestry's Fertile Crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal*. 1, 141-154.
- Carvalho, L., Osório, M., Chaves, M. y Amâncio, S. (2001). Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67, 271-280.
- Cassells, A. C. y Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 64 (2-3): 145-157.
- Concepción, O., Nápoles, Lelurllys, Pérez, Aurora T., Peralta, Ninel, Hernández, Martha, Trujillo, R. (2005). Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de

compuestos fenólicos. Cultivos Tropicales, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas La Habana, Cuba. 26 (1): 33-39.

Corredoira, E., Janeiro, L.V. y 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., González, L., Fernández M.R. y Ocaña, L. (2009). Micropropagación de genotipos adultos de *Castanea sativa* Mill. seleccionados por resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. En: Congreso Forestal Español 5. Libro de Resúmenes. Ávila. España. 21-25 Sept 2009. 10p.

Day M.E. y Greenwood M.S. (2011) Regulation of Ontogeny in Temperate Conifers. In: Meinzer, F., Lachenbruch, B. y Dawson, T. (Eds) Size- and Age-Related Changes in Tree Structure and Function. Tree Physiology. 4, 91-120.

Day, M.E., Greenwood, M.S. y Diaz-Sala, C. (2002). Age- and size-related trends in woody plant shoot development: regulatory pathways and evidence for genetic control. Tree Physiology. 22 (8), 507-513.

Debergh, P.C. y Read, P.E. (1991). Micropropagation. En: Debergh, P. y Zimmerman, R. H. (Eds.). Micropropagation: Technology and Application. Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp: 1-13.

De Klerk, G.J., Ter Brugge, J. y Marinova, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 49, 39-44

- Fady, B. (2012). Biogeography of neutral genes and recent evolutionary history of pines in the Mediterranean Basin. *Annals of Forest Science*. 69(4), 421-428.
- Fehér, A., Ötvös, K., Pasternak, T. y Szandtner, A. (2008). The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the cell cycle activation (G0-to-G1 transition) of plant cells. *Plant Signaling & Behavior*. 3(10), 823-826.
- Ferl, R. y Paul A. L. 2000. Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W. y Jones R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp: 312-357.
- Fernández, J., Rodríguez, S. y Vega, M. (2001). Multiplicación de dos cultivares de fruto de *Castanea sativa* Mill. *Actas III Congreso Forestal Español*. 3, 742-749.
- Fernández-López, J. y Alia, R. (2008). Castaño. EUFORGEN. Guía técnica para la conservación genética y utilización del castaño (*Castanea sativa*). Pp 8.
- Fernández-Lorenzo, J., Riguiero, A., y Ballester, A. (1999). Polyphenols as potencial markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology* 19, 461-466.
- Fernández- Lorenzo, J., Rodríguez, S. y Veiga, M. (2001). Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: Libro de Comunicaciones II Congreso Forestal español, Granada 2001, 25-28 Sept., pp. 742-749.
- Flores, J., Santín, P., Sánchez J., Del Pino, F. y Melcón, P. (2001). El castaño: manual y guía didáctica. Instituto de Restauración y Medio Ambiente, S.L. León, España. Pp 327.

- Foyer, C.H. y Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, vol. 17(7), 1866-1875.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis B., *et al.*, Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. y Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology: application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*. 37(3), 263-285.
- George, E.F. (1996). Plant propagation by tissue culture, Part 2. In: Practice. 2 ed. Exegetics Limited, Basingstoke. Pp: 799.
- George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk, G.J. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Vol. 1. 3th Ed. Dordrecht, The Netherlands, Springer.
- Gil, B., Pastoriza, E., Ballester, A. y Sánchez, C. (2003). Isolation and characterization of a cDNA differentially expressed in juvenile-like and mature shoots of *Quercus robur*. *Tree Physiology*. 23, 633-640.
- Giovannelli, A. (1999). Rizogenesi avventizia in frammenti cotiledonari di castagno (*Castanea sativa* Mill.). *Ital. Hort*. 6, 15-18.
- Giovannelli, A. y Giannini, R. 1999. Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae*. 494, 243-245.
- Giovannelli, A., Giannini, R., Bennici, A. y Mori, B. (2004). *In vitro* organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cotyledon explants: responses to growth regulators and developmental aspects. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 40(5), 509-514.

- Gobbin, D., Hohl, L., Conza, L., Jermini, M., Gesler, C. y Conedera, M. (2007). Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. NRC Canada. Genome. 50, 1089-1103.
- Grau, P. (2003). Introducción de Cultivares de Castaño Europeo (*Castanea sativa* Mill.), Híbridos Eurojaponeses (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) y Castaño Japonés (*Castanea crenata* Siebold et Zucc.) a Chile. Chile. Agricultura Técnica 63 (3), 329-335.
- Grau, P. (2004). El castaño en Chile. Investigación/desarrollo en INIA y potencialidades de la especie.
- Grau, P. (2009). Manual de Castaño Europeo. Boletín INIA N° 196.
- Gubis, J., Lajchova, Z., Farago, J. y Jurekova, Z. (2003). Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Czech J. Genet. Plant Breed. 39, 9-14.
- Hasbún, R. (2005). Monitorización (epi)-genética del desarrollo y producción de planta de castaño (*Castanea sativa* Mill.). Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. España. 234 pp.
- Hasbún R., Sánchez-Olate M. y Ríos D. (2009). Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: Sánchez-Olate. M. y 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 - Chile. Pp 108.

- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 31(4), 58-69.
- Hinrichsen, P. (2008). Trazabilidad genética de variedades frutales mediante herramientas moleculares. En: INIA Tierra adentro virtual. 82, 4-7. Noviembre-Diciembre 2008. Chile.
- Hodges, D.M. y Forney, C.F. (2000). The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. Journal of experimental botany. 51, 645–655.
- Holmes, P., Farquharson, R., Hall, P.J. y Rolfe, B.G. (2006). Proteomic analysis of root meristems and the effects of acetohydroxyacid synthase-inhibiting herbicides in the root of *Medicago truncatula*. Journal of Proteome Research. 5(9), 2309-2316.
- 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. Visto: 26 de febrero de 2017.
- Jaleel, C.A., Riadh, K., Gopi, R., Manivannan, P., Inés, J., Al-Juburi, H.J., Zhao, C.X., Shao, H.B. y Panneerselvam, R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. Acta Physiologiae Plantarum. 31, 427–436.

- Jiménez, A., Hernández, J., Pastori, G., Del Rio, L. y Sevilla, F. (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaf. *Plant Physiol.* 118, 1327-1335.
- Jing, H. C., Hille, J. y Dijkwel, P. P. (2003). Ageing in plants: Conserved strategies and novel pathways. *Plant Biology.* 5(5), 455-464.
- King, R.C., Mulligan, P. y Stansfield, W. (2012). *A Dictionary of Genetics.* Oxford University Press. Eighth edition. 680 p.
- Klimaszewska, K., Overton, C., Stewart, D. y Rutledge, R.G. (2011). Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10- year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta.* 233, 635-647.
- Kroud, T. (2008). ADN: Cambios en la ciencia y en la sociedad. Capítulo 2. AKAL (Eds) 200 Pp.
- Laukkanen, H., Rautiainen, L., Taulavuori, E. y Hohtola, A. (2000). Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology.* 20, 467-475.
- Lee, K.H., Kim, Y., Park, C. y Kim, H. (2008). Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Arabidopsis* mutant ntm1-D with disturbed cell division. *Mol Cells* 25(1), 70-77.
- Lusini, I., Velichkov, I., Pollegioni, P., Chiocchini, F., Hinkov, G., Zlatanov, T., Mattioni, C. (2014). Estimating the genetic diversity and spatial structure of Bulgarian *Castanea*

sativa populations by SSRs: implications for conservation. *Conservation Genetics*. 15, 283-293.

Marko, D., Puppel, N., Tjaden, Z., Jakobs, S. y Pahlke, G. (2004). The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signalling cascades regulating cell proliferation. *Molecular nutrition & food research*. 48(4), 318-325.

Marinoni, D., Akkarak, A., Bounous, G., Edwards, K.J. y Botta, R. (2003). Development and characterization of microsatellites markers in *Castanea sativa* (Mill.). *Molecular Breeding*. 11, 127-136.

Marinoni, D., Akkarak, A., Beltramo, C., Guaraldo, P., Boccacci, P., Bounous, G., Ferrara, A.M., Ebone, A., Viotto, E. y Botta, R. (2013). Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes*. 9, 1017–1030.

Martín, M.A., Álvarez, J.B., Mattioni, C., Cherubini, M., Villani, F. y Martín L.M. (2009). Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeats (SSRs) markers. *Annals of Applied Biology*. 154, 389–398.

Martín, M.A., Mattioni, C., Cherubini, M., Turchini, D. y Villani F. 2010a. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*. 6(5), 735-744.

Martín, M.A., Mattioni, C., Cherubini, M., Turchini, D. y Villani, F. (2010b). Genetic characterization of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Annals of Applied Biology*. 157, 37-44.

- Mattioni, C., Martín, M.A., Pollegioni, P., Cherubini, M. y Villani, F. (2013). Microsatellite markers reveal a strong geographical structure in European populations of *Castanea sativa* (Fagaceae): evidence for multiple glacial refugia. *American journal of botany*. 100, 951-961.
- Merkle, S. y Nairn, C. (2005). Hardwood tree biotechnology. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 41(5), 602–619.
- Miranda-Fontañá, M. E. y Fernández-López, J. (2001). Genotypic and Environmental Variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* and *Castanea sativa* Clones in Aptitude to micropropagation. *Silvae Genetica*. 50, 3-4.
- Munné-Bosch, S. y Alegre, L. (2002). Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. *Planta*. 214(4), 608-15.
- Mueller, U. y Wolfenbarger, L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology & evolution*. 14 (10), 389-394.
- Murphy, A., Peer, W.A. y Taiz, L. (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 211, 315–324.
- Murkute, A. y Shanti-patil, M. (2003). Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest*. 23, 29-31.
- Obert, B., Benson, E. E., Millam, S., Pret'ová, A. y Bremner, D. H. (2005). Moderation of morphogenetic and oxidative stress responses in flax *in vitro* cultures by hydroxynonenal and desferrioxamine. *Journal of Plant Physiology*. 162 (5): 537–547.

- Orendi, G., Zimmermann, P., Baar, C. y Zentgraf, U. (2001). Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science*. 161(2): 301-314.
- Ovesná, J., Kucera, L., Jiang, L.J. y Vagnerová, D. (2005). Characterisation of Chinese elite cultivars and genetic resources of chestnut by AFLP. *Biología Plantarum*. 49 (1), 125-127, 2005.
- Papadakis, A. K., Siminis, C. I. y Roubelakis-Angelakis, K. A. (2001). Reduced activity of antioxidant machinery is correlated with suppression of totipotency in plant protoplasts. *Plant Physiology*. 126(1), 434-444.
- Paun, O. y Schönswetter, P. (2012). Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. Austria. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 862, 75-87.
- Peer, W.A., Brown, D.E., Tague, B.W., Muday, G.K., Taiz, L. y Murphy, A.S. (2001). Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 126, 536–548.
- Peer, W.A. y Murphy, A.S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*. 12, 556–563.
- Pereira, M.J., Castro, L.F., Torres-Pereira, J.M. y Lorenzo, S.P. (1999). Isozyme polymorphisms in Portuguese chestnut cultivars. *Acta Horticulturae*. 494, 283–286.
- Pereira-Lorenzo, S. y Fernández-López, J. (1993). Variabilidad intra e intercultivar en cuatro cultivares gallegos de castaño interesantes para la producción de fruto y/o madera. *Congreso Forestal Español*. 11, 207-212.

- Pereira-Lorenzo, S., Fernández-López, J. y Moreno-González, J. (1996). Variability and grouping of Northwestern Spanish chestnut cultivars. II. Isoenzymatic traits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 121, 190-187.
- Pereira-Lorenzo, S., Costa R., Ramos-Cabrer A., Ribeiro C., da Silva M., Manzano G., Barreneche, T. (2010). Variation in grafted european chestnut and hybrids microsatellite revealstwo main origins in the Iberian Peninsula. *Tree Genetics & Genomes*. 6(5), 701-715.
- Pigliucci, M. (2001). Phenotypic Plasticity: Beyond nature and nurture. Book Review. *Heredity* 89(6). 328 pp.
- Poethig, R. S. (2003). Phase change and the regulation of developmental timing in plants. *Science*. 301, 334-336.
- Prakash, M.G. y Gurumurthi, K. (2010). Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 100, 13-20.
- 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 Visto: 26 de febrero de 2017.
- Prohens, J., Muñoz-Falcón, J., Vilanova, S., Castro, A., Ribas, F. y Nuez, F. (2009). Obtención de una huella genética de la berenjena de Almagro. *Horticultura*. 27 (2), 12-15.

- Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*. 27(1), 76-89.
- Rutledge, R., Stewart, D., Caron, S., Overton, C., Boyle, B., MacKay, J. y Klimaszewska, K. (2013). Potential link between biotic defense activation and recalcitrance to induction of somatic embryogenesis in shoot primordia from adult trees of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biology*. 13, 116.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. y Olmos, E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. 120, 152-161.
- Sáez, P., Bravo, L., Latsague, M., Sánchez, M. y 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.
- Sáez, P., Bravo, L., Sánchez-Olate, M., Latsague, M. y Ríos, D. (2013). Light energy management in micropropagated plants of *Castanea sativa*, effects of photoinhibition. *Plant Science*. 201, 12- 24.
- Sánchez, M. C., Ballester, A. y Vieitez, A.M. (1997). Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Annales des Sciences Forestières*. 54, 359-370.
- Sánchez-Olate, M., Ríos, D. y Escobar, R. (2005). La Biotecnología Vegetal y el Mejoramiento Genético de Especies Leñosas de Interés Forestal y sus Proyecciones en Chile, pp 17-28. En: Sánchez-Olate, M. y Ríos, D. (Eds.) *Biotecnología Vegetal en*

Especies Leñosas de Interés Forestal. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción - Chile. 162 pp.

- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomes, M., Romero-Puertas, M. y Del Rio, L.A. (2001). Cadmium- induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*. 52, 2115-2126.
- Santos, J.L. (2011). *Epidemiología Genética. Principios y Métodos*. Editorial Mediterráneo. Primera edición. 233 p.
- Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular plant-microbe interactions*. 14(1), 86-89.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers just a matter of fashion?. *Nature reviews Genetics*. 5, 63-69.
- Serdar, U., Demirsoy, H. y Demirsoy, L. (2011). A morphological and phenological comparison of chestnut (*Castanea*) cultivars ‘Serdar’ and ‘Marigoule’. *Australian Journal of Crop Science*. 5(11), 1311-1317.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. y Ndjiondjop, M. N. (2006). An Overview of Molecular Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology*. 5 (25), 2540-2568.
- Shi, F., Takasaki, H. y Komatsu, S. (2008). Quantitative analysis of auxin-regulated proteins from basal part of leaf sheaths in rice by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Phytochemistry*. 69(3), 637–646.

- Sierra, C. (2001). Propagación vegetativa de *Castanea sativa* Mill. y *Juglans regia* L., a través de estacas. 48 p. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile.
- Steinkellner, H., Lexer, C., Turetschek, E. y Glössl, J. (1997). Conservation of (GA) n microsatellite loci between *Quercus* species. *Molecular Ecology*. 6, 1189-1194.
- Swain, J.E., (2010). Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reproductive biomedicine online*. 21(1), 6-16.
- Swartz, H. (1991). Post culture behaviour: genetic and epigenetic effects and related problems. En: P. Debergh & R. Zimmerman (Eds). *Micropropagation: Technology and Application* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 95-122.
- Tabiyeh, D., Bernard, F. y Shacker, H. (2006). Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae*. 726, 201-204.
- Tang, W. y Newton, R. (2004). Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Science*. 167, 621-628.
- Tichá, I., Cáp, F., Pacosvská, D., Hofman, P., Haisel, D., Capková, V. y Schäfer, C. (1998). Culture on sugar medium enhances photosynthesis capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiology Plant*. 102, 155-162.
- Torello-Marinoni, D., Akkak, A., Beltramo, C., Guaraldo, P., Boccacci, P., Bounous G., Ferrara, A.M., Ebone, A., Viotto E. y Botta R. (2013). Genetic and morphological

characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes*. 9(4), 1017-1030.

UPOV. (2011). Unión Internacional para las Obtenciones Vegetales. ¿Qué es una variedad vegetal? Citado el 25/07/13. Disponible en <http://www.upov.int/overview/es/variety.html>.

Vahdati, K., Pourtaklu, S.M., Karimi, R., Barzehkar, R., Amiri, R., Mozaffari, M. y Woeste, K. (2015). Genetic diversity and gene flow of some *Persian walnut* populations in south-east of Iran revealed by SSR markers. *Plant Systematics and Evolution*. 301, 691-699.

Valadez, E. y Kahl, G. (2000). Huellas de DNA en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundiprensa. D. F., México. 182 p.

Valderrama, E. y Halçartegaray, P. (2012). Cultivo y negocio de castañas tipo marrone en Chile. En: *Redagícola virtual*. 45,50-52. Abril 2012. Chile.

Valera, L., Garay, V., Flores, A. y Sánchez, J. (1999). Aparente incompatibilidad en injertos de *Pinus caribaea* var. hondurensis en el huerto semillero clonal, Santa Cruz de Bucaral, Falcón-Venezuela. *Revista Forestal Venezolana*. 43(1), 25-31.

Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnology*. 23, 48-55.

Vidal, N., Arellano, G., San-José, M. C., Vieitez, A. M. y Ballester, A. (2003). Development stages during the rooting of *in vitro*-cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiology*. 23, 1247-1254.

- Vieitez, A., Ballester, A., Vieitez, M., y Vieitez, E. (1983). *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science*. 58, 457-463.
- Vieitez, A. M. y 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., García-Nimo, M. y Ballester, A. (2007). Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. En: *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (Jain S.M. y Häggman H. eds.), pp. 299-312. Springer, Heidelberg.
- Villani, F., Pigliucci, M., Benedetelli, S. y Cherubini, M. (1991). Genetic Differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations. *Heredity*. 66, 131-136.
- Volpert, R., Osswald, W. y Elstner, E.F. (1995). Effects of cinnamic acid derivates on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*. 38, 19-22.
- Von Aderkas, P. y Bonga, J. (2000). Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiology*. 20, 921-928.
- Xiao, Z. F., Ji N., Zhang, X. Z., Zhang, Y. Z., Wang, Y., Wu, T., Xu, X. y Han, Z. 2014. The lose of juvenility elicits adventitious rooting recalcitrance in apple rootstocks. *Plant Cell Tissue Organ*. 119 (1), 51-63.
- Yamamoto, T., Tanaka, T., Kotobuki, K., Matsuta, N., Suzuki, M. y Hayashi, T. (2003). Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnuts. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78, 197-203.

Zhang, X.Z., Zhao, Y.B., Li, C.M., Chen, D.M., Wang, G.P., Chang, R.F. y Shu, H.R. (2007).
Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *Journal of
Plant Physiology*. 164(5), 574-580.



CAPÍTULO I

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CULTIVARES DE CASTAÑO EUROPEO (*Castanea sativa* Mill.) E HIBRIDOS EUROJAPONESES (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*), SELECCIONADOS PARA PRODUCCION DE PLANTAS.

Carmen Gloria Larson A¹., Rodrigo Hasbún Z.², María Paz Jofré V.¹, Manuel Sánchez-Olate¹, Daniela Torello Marinoni³, Darcy Ríos L.¹

¹Laboratorio Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Forestales y Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción. Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile. ²Laboratorio de Epigenética Vegetal, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Victoria 631, Barrio Universitario, Concepción, Chile. cglarson@udec.cl. ³Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Universidad de Torino, Italia.

En preparación para ser enviado a revista CHILEAN JOURNAL of AGRICULTURAL RESEARCH.

RESUMEN

Las variedades productoras de frutos tipo marrone introducidas a Chile por el INIA Quilamapu, crecen bien en Chile y producen frutos que cumplen con los estándares de calidad establecidos en el mercado internacional. Si bien el material vegetal fue introducido siguiendo severas normas de cuarentena, la identidad de cada variedad no fue chequeada. La identificación de cultivares de castaño en Europa se ha basado, tradicionalmente, en la observación de características morfológicas siendo diferenciadas mediante la caracterización de fruto y a través de características fenológicas como floración, maduración y caída de frutos. Otros marcadores utilizados son los moleculares, siendo los más utilizados para la caracterización genética en especies del género *Castanea* los SSR. De acuerdo a las

observaciones realizadas en campo en un huerto frutal de castaño, seleccionado para iniciar un programa de producción de plantas de distintas variedades, se han podido detectar algunas diferencias fenológicas y fenotípicas de al menos 20% de los árboles dentro de cada hilera de plantación. Lo anterior sustenta la hipótesis de que existen errores de identificación varietal en al menos 15% de los individuos del huerto. En el presente estudio se planteó como objetivo detectar casos de asignación errónea de variedades de *Castanea sativa* Mill. e híbridos (*C. crenata* x *C. sativa*) introducidos desde Europa y cultivados en Chile, seleccionados para programa de producción de plantas. Para ello se utilizaron marcadores moleculares SSRs. Se estudiaron nueve cultivares, seleccionando 8 árboles, por cultivar, al azar. Los perfiles combinados de los cinco SSR mostraron once genotipos distintos entre los nueve cultivares analizados, verificando errores en la asignación varietal establecida. De los nueve genotipos estudiados sólo Bouche Rouche, Citta di Castello y Castell Borello, están correctamente identificados. En Precoce Migoule hubo diferencias genotípicas intraespecíficas, ya que se detectaron cuatro genotipos distintos. Podrían existir errores de manipulación dentro del huerto lo que se concluye al detectar un ejemplar de Castell Borello en la línea de cultivo de Precoce Migoule. Por otra parte, los cinco microsatélites utilizados fueron insuficientes para detectar los polimorfismos entre las variedades marrones de referencia y las variedades chilenas identificadas. Antes de iniciar un programa de producción de plantas en variedades de interés, es de suma importancia validar la identidad genética de estas, para evitar problemas posteriores que pueden significar el fracaso del programa establecido.

PALABRAS CLAVES: Cultivar, certificación genética, *Castanea sativa* Mill.

I. INTRODUCCION

Castanea sativa Mill. es una especie caducifolia, perteneciente a la familia *Fagaceae*. Originaria de Europa fue introducida en Chile hace más de 200 años. Se cultiva entre las latitudes 34 ° y 41 ° Sur, principalmente a lo largo de la pre-cordillera de los Andes. Las condiciones ecológicas de la zona piemontesa chilena son aptas para el desarrollo del castaño para producción de frutos secos y fines madereros. Grau (2004) sostiene que la tasa de crecimiento de los árboles de castaño en Chile es superior a su lugar de origen, producto del clima más benigno, la ausencia de las principales enfermedades y plagas que afectan a la especie, y la calidad de los suelos volcánicos que son profundos y fértiles con alto contenido de materia orgánica. Loewe *et al.* (1998) indican que el rendimiento frutal en Chile es mayor a los promedios europeos, aún con un manejo rústico y sin la utilización de variedades mejoradas de frutos tipo castaña o marrone.

Las variedades productoras de fruto tipo marrone fueron introducidas a Chile en el año 1996 por el INIA Quilmapu (Grau 2003). Se trajeron 18 cultivares desde Italia, Francia y Japón. Las variedades ingresadas fueron 12 *C. sativa*, 4 *C. crenata* y 2 híbridos eurojaponeses de *C. sativa* x *C. crenata*. Estas variedades crecen bien en Chile y producen frutos que cumplen con los estándares de calidad establecidos en el mercado internacional (Bounous 2002, Grau 2003). Si bien el material vegetal fue introducido a Chile siguiendo severas normas de cuarentena, la identidad de cada variedad no fue chequeada. Bounous *et al.* (2005) realizaron un estudio donde compararon la identidad genética de algunas variedades encontrando diferencias con respecto al perfil genético utilizado de referencia. La variedad Marrone Montemarrano es una de las mal identificada, a la que se suman Castell della Madonna, Marrone Fiorentino y algunos árboles de la variedad Castell Borello.

Las 18 variedades ingresadas a Chile difieren tanto por su morfología como su fenología. Dentro de las características morfológicas se considera la tasa de crecimiento, fuste, hojas, flores y características de fruto. Dentro de las fenológicas, están el periodo de brotación, floración, maduración de los frutos ((Breisch, 1995) y caída de las hojas (Serdar *et al.* 2011). Todas las características anteriores son de gran importancia, pero fundamentalmente la selección de variedades está dada por el tipo de fruto, siendo esta característica la que más interesa comercialmente (Grau 2003).

Precoce Migoule y Marigoule son dos variedades introducidas y cultivadas en Chile. En Francia, país de origen, se caracterizan por estar dentro de las precoces y semi-precoces, respectivamente. Grau (2009) estudió la fenología de estas variedades cultivadas en Chile y los resultados concuerdan con el comportamiento que tienen en su país de origen, con respecto a la entrada en floración de los amentos masculinos (Grau, 2009), siendo más precoz Marigoule que Precoce Migoule (Breisch, 1995). Ambas variedades son consideradas buen polinizador.

La identificación de cultivares de castaño en Europa se ha basado, tradicionalmente, en la observación de características morfológicas (UPOV 2011, Marinoni *et al.* 2013) siendo diferenciadas mediante la caracterización de fruto (Grau 2003) y a través de características fenológicas como floración, maduración y caída de frutos (Serdar *et al.* 2011). El uso de marcadores morfológicos para castaño han permitido clasificar el fruto en parámetros físicos con respecto al cumplimiento de las características que corresponden al tipo marrone, midiendo para ello el calibre de las castañas (Benedetti *et al.* 2012).

Otros marcadores utilizados son los moleculares, siendo los más utilizados para la caracterización genética en especies del género *Castanea* los SSR (Botta *et al.* 1999), los cuales se han caracterizado en *Castanea sativa* Mill. (Marinoni *et al.* 2003, Buck *et al.* 2003) y aplicados en estudios de poblaciones naturales de castaño, caracterización de cultivares e incluso híbridos eurojaponeses (*C. crenata* x *C. sativa*), flujo de genes en poblaciones europeas (Botta *et al.* 2004), logrando detectar niveles variables de diversidad genética y al mismo tiempo casos de sinonimia u homonimia entre cultivares (Botta *et al.* 1999, Botta *et al.* 2001, Buck *et al.* 2003, Marinoni *et al.* 2003, Yamamoto *et al.* 2003, Boccacci *et al.* 2004, Gobbin *et al.* 2007, Martín *et al.* 2009, Martín *et al.* 2010a, Martín *et al.* 2010b). En un estudio realizado por Bounous *et al.* (2005) en 53 árboles seleccionados de distintos cultivares italianos y franceses introducidos en Chile, se utilizaron 7 marcadores SSR en el análisis de tipificación demostrando sólo algunos están correctamente identificados.

Se han utilizado marcadores morfológicos en conjunto con marcadores moleculares microsatélites (SSRs) con el objetivo de determinar si existe una correlación de los resultados obtenidos. Los resultados muestran que un bajo porcentaje de marcadores morfológicos fueron eficaces para discriminar entre cultivares en comparación con los SSR, dejando de manifiesto

que no son suficientes por sí solos para generar una certera caracterización genética. Aparentemente, el ambiente tiene influencia en los resultados que se obtienen (Botta *et al.* 2001, Torello-Marinoni *et al.* 2013).

De acuerdo a las observaciones realizadas en campo en un huerto frutal de castaño, seleccionado para iniciar un programa de producción de plantas de distintas variedades, se han podido detectar algunas diferencias fenológicas y fenotípicas de al menos 20% de los árboles dentro de cada hilera de plantación. Lo anterior sustenta la hipótesis de que existen errores de identificación varietal en al menos 15% de los individuos del huerto. Por lo tanto, en la presente investigación se plantea como objetivo general detectar casos de asignación errónea de variedades de *Castanea sativa* Mill. e híbridos (*C. crenata* x *C. sativa*) introducidos desde Europa y cultivados en Chile, seleccionados para programa de producción de plantas.



II. MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y extracción de ADN.

El material se obtuvo de un huerto productor de frutos establecido el 2008, mediante injerto, en la VII región, Linares, Estación Villa Alegre. Se cortaron varetas de ocho individuos en nueve cultivares (Tabla 1), las cuales se limpiaron y guardaron en un congelador a -20°C , hasta el momento de realizar las extracciones de ADN.

Tabla 1. Variedades de castaño en estudio y su procedencia.

Variedad	Origen	Especie
Marigoule	Francia	(<i>C. sativa</i> / <i>C. crenata</i>)
Precoce Migoule	Francia	(<i>C. sativa</i> / <i>C. crenata</i>)
Bouche Rouge	Francia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Montemarano	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Val di Susa	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Citta di Castello	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Castel Borello	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Cuneo	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Chiusa di Pesio	Italia	(<i>C. sativa</i>)

Fuente: Elaboración propia.

El ADN genómico se extrajo utilizando el tejido floemático, aproximadamente 0,05 gr. mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN®). Para la cuantificación del ADN se utilizó el programa GelQuantNET. La integridad y pureza se evaluó mediante geles de agarosa al 1%.

También, se seleccionó una planta proveniente de semilla de Precoce Migoule, Marigoule y Marrone di Citta di Castello (Tabla 2) y dos de Marrone di Val di Susa, para la extracción de ADN y la determinación de la distancia genética con respecto a la planta madre. Las muestras de ADN se enviaron a Italia para su análisis genético.

Tabla 2 .Variedades de castaño con sus respectivas muestras a partir de semillas.

Variedad	Muestra
Marrone di Val di Susa	VS3
Marrone di Val di Susa	VS7
Precoce Migoule	PM1
Marigoule	M1
Marrone di Citta di castello	CC1

Fuente: Elaboración propia.

Análisis con SSRs.

En la certificación de los cultivares asistida por microsatélites (SSR) se utilizaron 5 loci altamente polimórficos y no ligados (Barreneche et al. 2004). Los iniciadores utilizados fueron EMCs38 (Buck *et al.* 2003), CsCAT1, CsCAT3 y CsCAT16 (Marinoni *et al.* 2003) específicos de *C. sativa* Mill y además, se utilizó el iniciador QpZAG119 desarrollado para *Quercus robur* y *Q. petraea* (Steinkellner et al. 1997), adaptado para castaño (Boccacci et al. 2004) (Tabla 3). En todos los casos el iniciador directo se marcó con un fluorocromo (FAM, HEX o NED).

El perfil genético de cada muestra se determinó mediante ensayos de PCR Electroforesis Capilar Fluorescente, con secuenciación en forma simultánea de locus marcados con fluorocromos distintos o con rangos de tamaños diferentes.

La amplificación de los loci SSR por PCR se llevó a cabo con 1,5 ng de ADN en 15 μ L de mezcla de reacción [PCR Buffer (1nM), MgCl₂ (1,5 nM), iniciador directo (0,5 μ M) y reverso (0,1 μ M), dNTPs (0,1 μ M), Taq-ADN polimerasa (AmpliTaq Gold polymerase, Applied-Biosystems) (0,5 μ M) y BSA (8 μ g/ μ L)].

Los ciclos de amplificación se llevaron a cabo en un Termociclador Swift TM ESCO Swift Maxi Thermal Cycler y consistió en un paso inicial de 2 minutos a 90°C, seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura annealing de 55°C para cada par de primers, 45 segundos a 72°C, con un paso final de extensión de 10 minutos a 72°C. Para certificar la amplificación, alícuotas de 5 μ L se sometieron a electroforesis vertical (100 Volt, 100 min) en geles de agarosa al 2%, revelándose los fragmentos con bromuro de etidio (0,5

$\mu\text{g/mL}$) y luz ultravioleta. Se tomaron alícuotas de 2 μL de los productos de amplificación y mezclaron con 3 μl de una solución (10:2:1) de formamida/estandar de tamaño GeneScan-350 ROX/buffer de carga (EDTA 25 mM, dextrana azul (50 mg mL^{-1})). Las muestras se desnaturalizan a 95 °C durante 5 min y analizan en un gel de secuenciación compuesto por acrilamida (4,25%), tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM) y urea (6%) utilizando un secuenciador ABI-PRISM 3100 DNA.

Tabla 3. Lista de SSR loci, origen, secuencia del primer y sus respectivas temperaturas de annealing (T_m') usadas en el estudio y las encontradas en la literatura (T_m).

Locus		Secuencia (5'-3') del iniciador	Motivo repetido	Longitud Producto (pb)	T_m (°C)	T_m' (°C)
CsCAT1 a	F	GAGAATGCCCACTTTTGCA	IMPERFECTO	220	50	57,1
	R	GCTCCCTTATGGTCTCG	(TG)5TA(TG)24			
CsCAT3 a	F	CACTATTTTATCATGGACGG	PERFECT	224	50	57,1
	R	CGAATTGAGAGTTCATACTC	(AG)20			
CsCAT16 a	F	CTCCTTGACTTTGAAGTTGC	PERFECT	143	50	51,8 – 58,6
	R	CTGATCGAGAGTAATAAAG	(TC)20			
EMCs38 b	F	TTTCCCTATTTCTAGTTTGAT	PERFECT	228–270	56	53,2 – 60,4
	R	G ATGGCGCTTTGGATGAAC	(AG)31			
QpZAG119 c	F	GATCAGTGATAGTGCCTCTC		54 - 92	46	55,2
	R	GATCAACAAGCCCAAGGCAC				

a Marinoni *et al.* (2003), b Buck *et al.* (2003), c Steinkellner *et al.* (1997).

Fuente: Elaboración propia.

En el caso de las variedades de referencia el análisis se realizó en Italia con las muestras de ADN de origen de cada variedad en estudio (Tabla 1). Todas las amplificaciones de SSR se realizaron en un volumen de 20 μl que contenía 2 μl de tampón NH_4 10x [160 mM (NH_4) 2SO_4 , Tris-HCl 670 mM (pH 8,8 a 25 ° C), Tween-20 al 0,1%, MgCl_2 2,25 mM. DNTP 250 μM , 0,55 μM de cada cebador, 0,75 U de ADN polimerasa BioTaq (Bioline, Londres, Reino Unido) y 50 ng de ADN extraído de las hojas.

Las PCR se realizaron utilizando un iCycler térmico (Bio-Rad Laboratories) en las siguientes condiciones: una etapa de desnaturalización inicial a 94 ° C durante 3 min; 28 ciclos de 30 s a 94 ° C, 45 s a 52 ° C y 90 s a 72 ° C y una etapa de extensión final de 30 min a 72 ° C.

Para el análisis de microsatélite las muestras se analizaron en 5 SSR seleccionados (Tabla 3). Las muestras se analizaron en un secuenciador capilar 3130 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.). Los datos se procesaron con el software GeneMapper Software 4.0 (Applied Biosystems) y los alelos definidos por su tamaño (en pb), en comparación con el estándar (GeneScan -500 LIZ, Biosistemas Aplicados).

Análisis de datos

Los resultados de la secuenciación se ingresaron en el programa Peak Scanner Software v1.0 donde se obtuvo los alelos (pb) de cada individuo identificando automáticamente todos los amplicones, mediante la comparación de movilidad de cada producto de PCR con los estándares internos y asignándole un tamaño basado en la misma comparación. Los datos resultantes se ingresaron en el programa PowerMarker V3.25 donde se realizó un análisis de los datos. Con el tamaño de los alelos (pb) para cada individuo con respecto a cada partidor se obtiene el perfil genético para cada muestra considerando los cinco microsatélites utilizados.

Se calculó la distancia genética (Nei, 1973) entre las muestras y se realizó un análisis de conglomerados o cluster por medio del programa PowerMarker V3.25 obteniéndose un dendrograma en formato Phylip, el cual fue ingresado al programa TreeView X (Page 1996) donde se generó una representación gráfica de este.

Por otra parte, utilizando el programa GenALEX 6.502 se calculó la distancia genética entre todas las muestras, considerando las muestras de referencia y se hizo un análisis de las principales coordenadas (PCoA) para visualizar la distribución de las muestras.

Para la validación genética de los cultivares en estudio, se compararon los perfiles obtenidos de los cultivares chilenos con los de origen.

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Perfil variedades de origen

Con los cinco microsatélites utilizados se obtuvo el perfil genético de referencia de las 9 variedades seleccionadas (Tabla 4). De acuerdo a los resultados, las variedades Marrone di Val Susa y Marrone di Castel Borello son un caso de sinonimia, correspondiendo a la misma variedades. Igual caso se da entre Marrone Chiusa di pesio y Marrone di Cuneo (Tabla 4). Por otra parte, las variedades italianas Marrone di Val Susa, Marrone Castel Borello, Marrone Città di Castello, Marrone Chiusa Pesio y Marrone di Cuneo coinciden sus perfiles con los partidores CsCAT1, CsCAT3, CsCAT16, EMCs38 y QpZAG119, lo cual se debe a que tienen un origen monoclonal (Marinoni *et al.* 2013) y que el perfil base de los marrones está dado por estos partidores (Tabla 5).

Tabla 4. Perfil genético de referencia de las variedades italianas y francesas.

Cultivar	CsCAT 1		CsCAT 3		CsCAT 16		EMCs 38		QpZAG 119	
Marigoule	186	194	203	224	131	131	240	240	75	75
Precoce Migoule	188	194	203	247	146	146	242	242	75	75
Bouche Rouge	194	223	240	281	133	144	242	256	85	85
Marrone di Montemarano	207	223	224	232	131	144	254	274	85	91
Marrone di Val Susa (Marrone di Castel Borello)	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85
Marrone di Città di Castello	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85
Marrone di Chiusa Pesio (Marrone di Cuneo)	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Perfil Genético para Marrone con los microsatélites CsCAT1, CsCAT3, CsCAT16 y QpZAG119.

CULTIVAR	CsCAT1		CsCAT3		CsCAT16		QpZAG119	
Marrone	215	223	226	240	127	133	63	85

Fuente. Marinoni *et al.* 2013.

Variabilidad de los microsatélites y caracterización de cultivares.

Con el fin de caracterizar la informatividad de los 5 loci SSR para la identificación de castaño, la variabilidad de cada locus se evaluó a través de los genotipos.

Todos los pares de iniciadores utilizados en el análisis (Tabla 3) fueron polimórficos y amplificaron correctamente. Un total de 42 alelos fueron detectados y el número de alelos encontrados por locus varió de 5 (CsCAT1 y QpZAG119) a 10 (CaCAT3), con una media de 7 alelos por locus, siendo el partidor CaCAT3 el más polimórfico (Tabla 5). Este valor fue inferior a los publicados en otros estudios realizados en castaño utilizando SSRs (Tabla 6). Sin embargo, la H_o media=0,87 fue superior a la encontrada por Gobbin *et al.* (2007) y a la encontrada por Marinoni *et al.* (2013) con una media de H_o =0,73 y 0,75, respectivamente.

Tabla 6. Descripción de 5 SSR loci en las 62 muestras analizadas.

Partidor	Rango	N° de Alelos	N° Genotipos	Frecuencia Alélica	N	HE	HO
CsCAT1	186-221	5	5	0.36	62	0,72	0,95
CsCAT3	209-280	10	9	0.35	62	0,80	0,79
CsCAT16	125-146	6	6	0.44	62	0,69	1,00
EMCs38	237-259	9	8	0.40	62	0,70	0,86
QpZAG119	62-89	5	5	0.52	62	0,59	0,74
Media		7	7,2	0.41	62	0,70	0,87

HO, Heterozigosis observada, HE, Heterozigosis esperada. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Promedio de alelos encontrados en estudios realizados en castaño utilizando marcadores SSRs.

	N° alelos promedio	N° SSRs	N° de muestras
Marinonni <i>et al.</i> 2003	8	10	68
Martin <i>et al.</i> 2010b	7,4	7	94
Gobbin <i>et al.</i> 2007	9,75	8	164
Martin <i>et al.</i> 2009	8,7	7	100
Pereira-Lorenzo <i>et al.</i> 2010	11,8	10	574

Fuente: Elaboración propia.

La combinación de perfiles en todos los loci resultó en 13 genotipos de los cuales 3 estuvieron representados por sólo un individuo con un perfil genético único (Tabla 8). Los cultivares Marigoule, Castell Borello y Precoce Migoule fueron los que presentaron más de un genotipo.

Tabla 8. Perfil Genético de los 13 genotipos encontrados al analizar los 9 cultivares de *Castanea sativa* con los 5 SSR (tamaño de los alelos en pares de base) en estudio.

MUESTRAS	CsCAT1	CsCAT3	CsCAT16	EMCs38	QpZAG119
BR701- BR707 y BR709	194/223	240/281	134/144	242/256	85/85
CU710-CU717	215/223	226/240	133/141	242/256	63/91
CP718-CP725	215/223	226/240	131/141	238/242	63/85
VS726-VS733	215/223	229/240	133/141	238/242	63/85
MM767 y MM773	192/192	227/227	129/131	242/259	63/85
M742	186/192	224/224	141/144	240/240	83/83
M743-M749	186/192	224/225	131/144	240/240	83/83
CB736 y CB739	215/223	-----/-----	127/133	238/242	63/85
CB735, CB738, CB740	215/223	228/240	127/133	238/242	63/85
CB734, CB737, CB741, PM755 CC758-CC761	215/223	226/240	127/133	238/242	63/85
PM751-PM754 y PM756	194/217	209/233	129/141	242/242	62/75
PM750	188/194	247/263	131/146	242/242	75/85
PM757	194/194	227/227	141/146	247/257	63/85

PM: Precoce Migoule, M: Marigoule, MM: Marrone Montemarano, BR: Bouche Rouche, CU: Marrone di Cuneo, CP: Marrone di Chiusa di Pesio, VS: Marrone di Val di Susa, CB: Marrone Castell Borello, CC: Marrone di Citta di Castello. Fuente: Elaboración propia.

Al analizar la relación genética mediante el método de agrupamiento UPGMA se hizo la relación genética entre los 13 genotipos detectados, representada por un Dendograma (Fig. 1). En él se logra ver que la muestra PM 755 del cultivar Precoce Migoule es igual a las muestras de Castell Borello CB734, 737 y 741, al igual que todas las muestras de Citta di Castello.

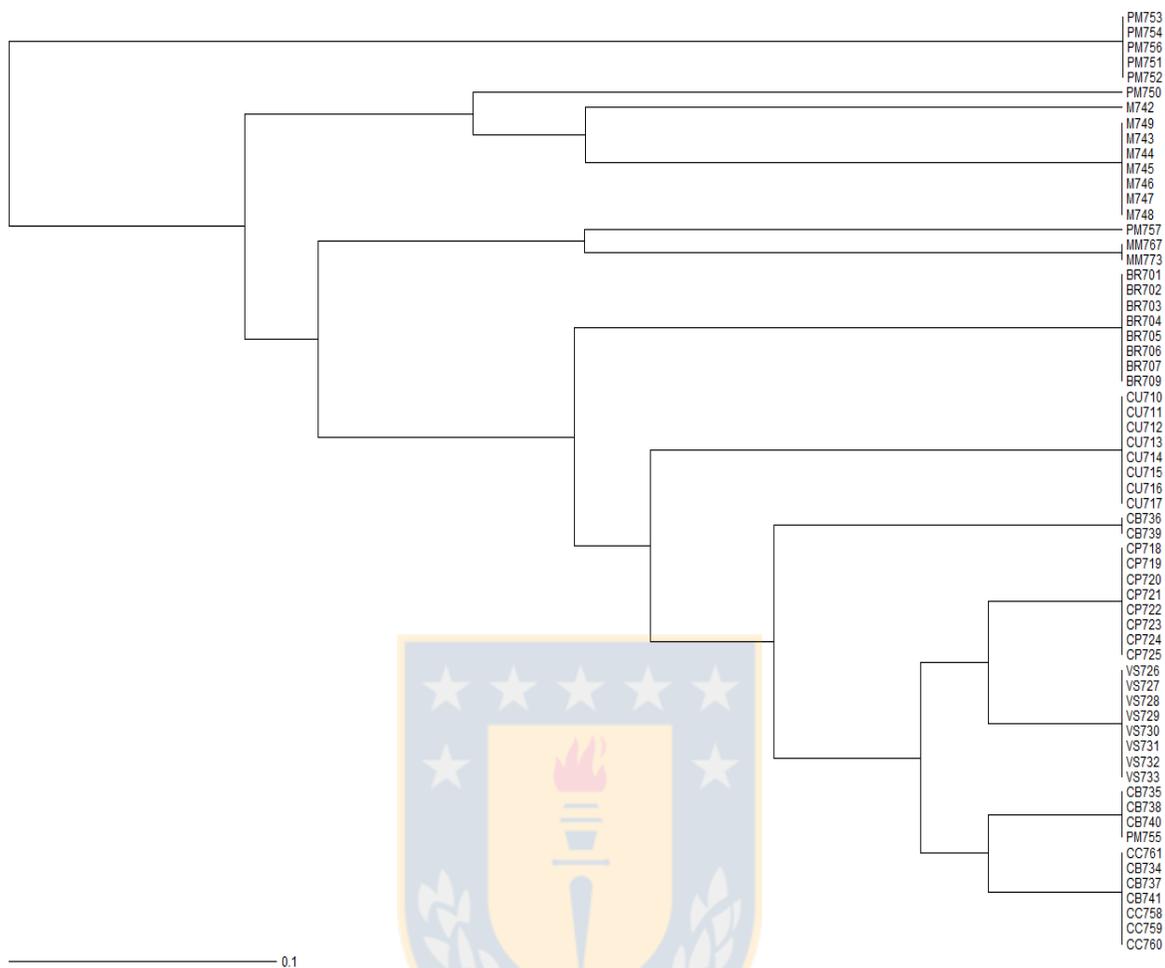


Figura 1. Dendrograma obtenido utilizando el método de agrupamiento UPGMA. Relaciones genéticas entre los 13 genotipos detectados entre las 9 variedades estudiadas. PM: Precoce Migoule, M: Marigoule, MM: Marrone Montemarano, BR: Bouche Rouche, CU: Marrone di Cuneo, CP: Marrone di Chiusa di Pesio, VS: Marrone di Val di Susa, CB: Marrone Castell Borello, CC: Marrone di Citta di Castello. Fuente: Elaboración propia.

Para validar estos resultados o detectar posibles errores en el análisis (PCR o Secuenciación), Muñoz (2013) utilizó marcadores AFLP en las muestras problema, determinando, en el caso de Marigoule, que todas las muestras pertenecen al mismo perfil genético. En el caso de Castell Borello, las muestras estudiadas fueron enviadas a análisis a Italia demostrándose que todos tienen el mismo perfil genético (Tabla 9).

Tabla 9. Perfil genético de los cultivares chilenos Castell Borello (CB) realizado en Italia, utilizando los cinco SSRs en estudio.

GENOTIPO	CsCAT 1		CsCAT 3		CsCAT 16		EMCs 38		Qp ZAG119	
CB736, CB739	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85
CB735, CB738, CB740	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85
CB734, CB737, CB741	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85

Fuente: Elaboración propia.

Los perfiles genéticos corregidos se presentan en la Tabla 10, donde se puede observar que sólo Precoce Migoule presenta problemas dificultando su validez como variedad. En él se detectaron cuatro perfiles genéticos, dos de ellos representados por un solo individuo y además, uno que es igual genéticamente a Castell Borello. Situación similar fue detectada por Bounous *et al.* (2005), donde el perfil genético de un individuo de Castell Borello era distinto del resto, coincidiendo con el de Precoce Migoule. Esto confirma que existen problemas intraespecíficos dentro de algunas variedades, como es el caso de Precoce Migoule, en la cual existen hileras que no son puras, donde todas las plantas no son de la misma variedad.

Tabla 10. Perfil Genético de los 9 cultivares de *Castanea sativa* estudiados.

MUESTRAS	CsCAT1	CsCAT3	CsCAT16	EMCs38	QpZAG119
CB736- CB741, PM750, CC758-CC761	215/223	226/240	127/133	238/242	63/85
CU710-CU717	215/223	226/240	133/141	242/256	63/91
CP718-CP725	215/223	226/240	133/141	238/242	63/85
VS726-VS733	215/223	229/240	133/141	238/242	63/85
MM767 y MM773	192/192	227/227	129/131	242/259	63/85
M742-M749	186/192	224/224	131/144	240/240	83/83
BR701- BR709 y BR709	194/223	240/281	133/144	242/256	85/85
PM751-PM754 y PM756	194/217	209/233	129/141	242/242	62/75
PM757	194/194	227/227	141/146	247/257	63/85
PM755	215/223	226/240	127/133	238/242	63/85

Fuente: Elaboración propia.

Confirmación de los cultivares y relación genética.

Las variedades Marrone Citta di Castello y Marrone Castell Borello, cultivados en Chile fueron confirmadas, por lo que corresponderían a la variedad con la cual se encuentran tipificadas (Tabla 11). Por otra parte, ambos cultivares tienen igual perfil genético con los partidores SSRs utilizados (Tabla 10), considerándolos en un inicio como la misma variedad. Esta situación se debe a que todos los marrones tienen esos alelos con los partidores que se utilizaron (Marinoni *et al.* 2013), los cuales los identifican en esta clasificación. Por lo tanto, es necesario utilizar una mayor cantidad de partidores que logren demostrar los polimorfismos existentes entre estas variedades.

Al hacer un análisis de las coordenadas principales (PCoA), previo cálculo de la distancia genética entre todas las muestras analizadas, se puede ver la distribución de ellas y el agrupamiento que se da entre Castell Borello, Citta di Castello y las muestras Italianas de referencia de Chiusa di Pesio, Marrone di Cuneo, Val Sussa, Castel Borello y Citta di Castello (Fig. 2). Por otra parte, se logra ver la separación entre los cultivares Italianos identificados y Bouche Rouche, este último de origen Francés. También, se detecta una gran distancia de los genotipos tipificados como Precóce Migoule y Marigoule, entre ellos y con respecto al resto de las variedades. Si bien es cierto en las variedades chilenas Marrone di Cuneo, Marrone Val di Sussa y Marrone Chiusa di Pesio no fue validada su identidad genética, existe una cercanía con los marrones identificados (Fig. 2).

Tabla 11. Comparación del Perfil Genético de cultivares chilenos con los de referencia.

Cultivar	CsCAT1		CsCAT3		CsCAT16		EMCs38		QpZAG119		
M. Citta di Castello	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	CONFIRMADO
M. Citta di Castello RE	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	
M. Castell Borello	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	CONFIRMADO
M. Castell Borello RE	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	
M. di Cuneo	215	223	226	240	133	141	242	256	63	91	
M. di Cuneo RE	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	
M. Chiusa di Pesio	215	223	226	240	133	141	238	242	63	85	
M. Chiusa di Pesio RE	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	
M. Val di Susa	215	223	229	240	133	141	238	242	63	85	
M. Val di Susa RE	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85	
M. Montemarrano	192	192	227	227	129	131	242	259	63	85	
M. Montemarrano RE	207	223	224	232	131	144	254	274	85	91	
Marigoule	186	194	224	224	131	144	240	240	83	83	
Marigoule RE	186	194	203	224	131	131	240	240	75	75	
Bouche Rouche	194	223	240	281	133	144	242	256	85	85	CONFIRMADO
Bouche Rouche RE	194	223	240	281	133	144	242	256	85	85	
Precoce Migoule 1	194	217	209	233	129	141	242	242	62	75	
Precoce Migoule 2	188	194	247	263	131	146	242	242	75	85	
Precoce Migoule 3	194	194	227	227	141	146	247	257	63	85	
Precoce Migoule RE	188	194	203	247	146	146	242	242	75	75	

Donde RE corresponde al valor de referencia informado por Bounous y Marinoni.

Fuente: Elaboración propia.

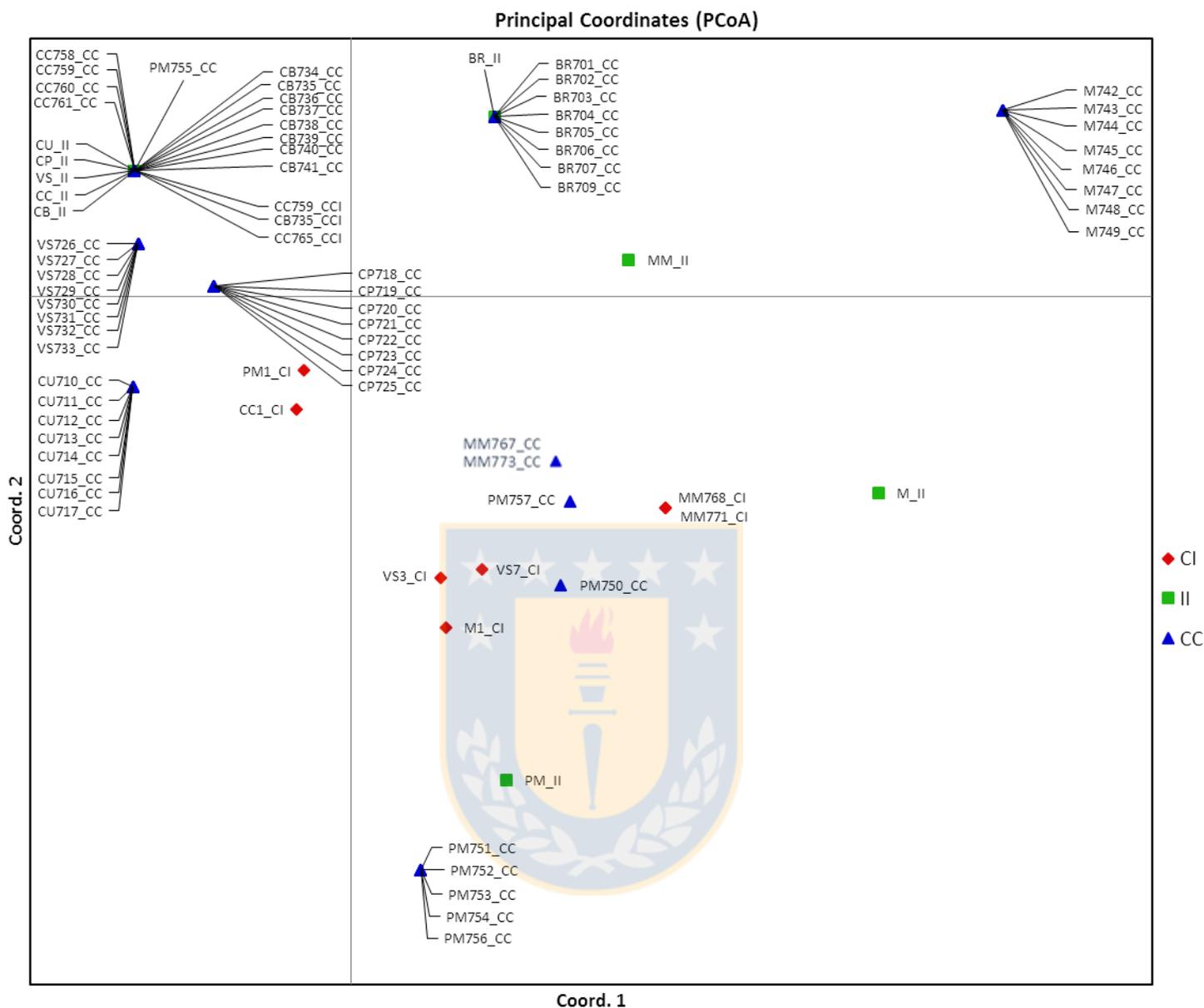


Figura 2. PCoA obtenido a partir del cálculo de distancia genéticas entre las muestras. Código muestras: PM: Precoce Migoule, M: Marigoule, MM: Marrone Montemarano, BR: Bouche Rouche, CU: Marrone di Cuneo, CP: Marrone di Chiusa di Pesio, VS: Marrone di Val di Susa, CB: Marrone Castell Borello, CC: Marrone di Citta di Castello. Código análisis de muestras: CI: Muestras chilenas analizadas en Italia, II: muestras italianas analizadas en Italia y CC: muestras chilenas analizadas en Chile.

Fuente: Elaboración propia.

De acuerdo a la información sobre la sinonimia entre Marrone Chiusa di pesio y Marrone di Cuneo (Tabla 4), esto no coincide con los resultados obtenidos, ya que se observan diferencias

entre los dos genotipos con los partidores EMCs38 y QpZAG119 (Tabla 10, Fig. 2). Además, ninguno de los dos genotipos corresponde a las variedades mencionadas. Por otra parte, al igual que lo detectado por Bounous (2005), el genotipo llamado Marrone Montemarano está incorrectamente tipificado, siendo confirmado con los cinco microsatélites en estudio (Tabla 11). El perfil genético obtenido en este estudio también difiere con el identificado por Bounous (2005).

Al corroborar errores en la tipificación de las variedades cultivadas se reafirma la importancia que tiene validar la identidad genética de las plantas de interés antes de establecer un programa de producción de plantas, ya que las respuestas a los tratamiento *in vitro* son especie-dependiente e incluso dependientes de la variedad o cultivar, por lo que al basarse en protocolos específicos de una variedad y si estos no son los correspondientes, se corre el riesgo de no obtener los resultados esperados (Carvalho *et al.* 2001, Tichá *et al.* 1998).

La fertilización cruzada es una regla imperativa en el castaño (Breisch 1995). Esto se debe a que es una especie autoestéril, por lo que necesita forzosamente recibir polen de otro ejemplar, en lo posible con una concordancia en la floración de los sexos opuestos y que el fruto de éste tenga un cierto valor comercial (Breisch 1995, Bounous 2002, Grau 2009). Las variedades Precoce Migoule y Marigoule se caracterizan por su precocidad al momento de entrar en brotación y además, presentan flores masculinas longistaminada, por lo que son consideradas buenas polinizadoras. Esto es de gran importancia, ya que genera una gran problemática al verificar que estos cultivares no son la variedad en la cual están tipificados (Tabla 11, Fig. 2), por lo tanto no estarían cumpliendo su función dentro del huerto.

A lo anterior, se suma el hecho de que la selección de polinizadores es muy importante, ya que existe una considerable influencia del origen del polen en las características del fruto (Metaxas 2013, Shang 2016). Esto significa que, si una flor de un castaño tipo marrone es fecundada por un polen de una variedad tradicional altamente tabicada, existe una alta probabilidad que la castaña del árbol marrone tenga tabiques u otras características fenotípicas similares a las del progenitor macho. Por ello es la importancia de seleccionar plantas polinizadoras con buenas características de su semilla, tales como frutos de alto calibre, castañas poco tabicadas, fácil desprendimiento de la cáscara, buen sabor, etc. (Zhang *et al.* 2016).

Variabilidad de plantas derivadas de semillas.

El perfil genético obtenido en Italia para las plantas provenientes de semilla (Tabla 12) se utilizó para ver qué tan distante son estas muestras con respecto a la planta madre y determinar su posible polinizador (Fig. 2). En la distribución de estas muestras se detecta un patrón similar de distancia entre estas plantas y su respectiva planta madre (Fig. 2), es decir, todas mantiene una distancia dada por más de un partidor (Tabla 13).

Se puede ver que PM1 y CC1 están más cercanos a los genotipos chilenos Chiusa di Pesio y Marrone di Cuneo y las muestras VS3, VS7 y M1, cercanos a PM 750 y PM 757 (Figura 2).

Tabla 12. Perfil genético de plantas provenientes de semillas.

Muestra	Variedad	CsCAT1		CsCAT3		CsCAT16		EMCs38		QpZAG 119	
VS3	M. Val di Susa	207	207	224	226	142	144	242	242	63	106
VS7	M. Val di Susa	194	207	224	226	142	142	242	246	63	106
PM1	Precoce Migoule	215	223	228	236	131	133	238	260	63	75
M1	Marigoule	194	207	224	226	144	146	242	242	63	63
CC1	M. Citta di Castello	194	215	226	226	131	133	242	242	63	85

Fuente: Elaboración propia.

La distancia que se observa entre las muestras de semillas de Val di Susa (VS3 y VS7) y que está dada por la diferencia en el perfil genérico entre las dos muestras, fue detectada por el partidor CsCAT1 en el primer alelo y EMCs38 en el segundo (Tabla 112). A su vez, la distancia entre estas dos muestras y la planta madre está dada por grandes diferencias en el perfil genético. Sólo coinciden las tres muestras con el partidor QpZAG 119 en el primer alelo y VS3 con la planta madre en el partidor EMCs38 en el segundo alelo (Tabla 13).

Tabla 13. Comparación de los perfiles obtenidos con los 5 microsátélites entre las muestras provenientes de semillas y la planta madre.

Variedad	CsCAT1		CsCAT3		CsCAT16		EMCs38		QpZAG119	
M. Val di Susa VS3	207	207	224	226	142	144	242	242	63	106
M. Val di Susa VS7	194	207	224	226	142	142	242	246	63	106
M. Val di Susa	215	223	226	240	133	141	238	242	63	85
Precoce Migoule PM1	215	223	228	236	131	133	238	260	63	75
Precoce Migoule	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85
Marigoule M1	194	207	224	226	144	146	242	242	63	63
Marigoule	186	192	224	224	131	144	240	240	83	83
M. Citta di Castello CC1	194	215	226	226	131	133	242	242	63	85
M. Citta di Castello	215	223	226	240	127	133	238	242	63	85

Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados demuestran la variabilidad que hay entre plantas de una misma variedad, pero provenientes de semilla. Debido a esto, al establecer un huerto con plantas provenientes de propagación sexual se obtiene una desuniformidad muy grande, la cual se puede apreciar no sólo en el tipo de fruto que producen, sino además en la forma de los árboles, época de floración, madurez del fruto, etc. (Grau 2009).

IV. CONCLUSIONES

Las variedades Marrone Citta di Castello, Marrone Castell Borello y Bouche Rouche cultivadas en Chile están correctamente tipificadas.

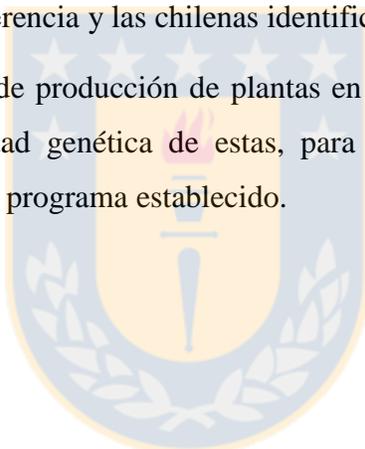
Las variedades Marrone di Cuneo, Marrone Chiusa di pesio, Marrone Montemarano, Marigoule y Marrone Val di Sussa, no pudieron ser identificadas.

Todas las variedades estudiadas, excepto Precoce Migoule, no tuvieron diferencias genotípicas intracultivar.

Podrían existir errores de manipulación dentro del huerto lo que se concluye al detectar un ejemplar de Castell Borello en la línea de cultivo de Precoce Migoule.

Los cinco microsatélites utilizados fueron insuficientes para detectar los polimorfismos entre las variedades marrones de referencia y las chilenas identificadas.

Antes de iniciar un programa de producción de plantas en variedades de interés, es de suma importancia validar la identidad genética de estas, para evitar problemas posteriores que pueden significar el fracaso del programa establecido.



V. BIBLIOGRAFIA

- Barreneche, T., M. Casasoli, K. Russell, A. Akkak, H. Meddour, C. Plomion, F. Villani and A. Kremer. 2004. Comparative mapping between *Quercus* and *Castanea* using simple-sequence repeats (SSRs). *Theoretical and applied genetics*. 108:558–566.
- Boccacci, P., A. Akkak, D. Torello-marinoni, G. Bounous and R. Botta. 2004. Typing European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars Using Oak Simple Sequence Repeat Markers. *Torino, Italia. Horticultural Science*. 39 (6): 1012-1016.
- Botta, R., A. Akkak, D. Marinoni, G. Bounous, S. Kamper, H. Steinkellner and C. Lexer. 1999. Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. *Acta Horticulturae*. 494: 277-282.
- Botta, R., D. Marinoni, G. Beccaro, A. Akkak and G. Bounous. 2001. Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. *Forest Snow and Landscape Research*. 3: 425-428.
- Botta, R., D. Marinoni and G. Bounous. 2004. Molecular marker and certification. In: R. Kellison, S. Mccord y K. Gatland (Eds). *Proceedings of the Forestry Biotechnology Workshop, Global Biotechnological Forum*. 2-5 March, 2004, Concepción, Chile. pp. 63-72.
- Bounous, G. 2002. *Il castagno: coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo*. Prima edizione. Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE Edagricole S.r.l. Bologna, Italia. 311 p.
- Bounous, G., A. Akkak, G. L. Beccaro, R. Botta, D. Torello-Marini and J. P. Joublan. 2005. DNA-Typing of cultivars for the development of a chesnut industry in Chile. *Acta Horticulturae (ISHS)*. 693: 505-510.
- Breisch, H., A. Boutitie, J. Reyne, G. Salesses and P. Vaysse. 1995. *Châtaignes et marrons*. CTIFL, Paris. 240 pp.
- Buck, E.J., M. Hadonou, C.J. James, D. Blakesley and K. Russel. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes*. 3: 239-241.

- Gobbin, D., L. Hohl, L. Conza, M. Jermini, C. Gesler and M. Conedera. 2007. Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. NRC Canada. Genome. 50: 1089-1103.
- Grau, P. 2003. Introducción de Cultivares de Castaño Europeo (*Castanea sativa* Mill.), Híbridos Eurojaponeses (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) y Castaño Japonés (*Castanea crenata* Siebold et Zucc.) a Chile. Primeros Resultados. Chile. Agricultura Técnica. 63 (3): 329-335.
- Grau, P. 2004. El castaño en Chile. Investigación/desarrollo en INIA y potencialidades de la especie.
- Grau, P. 2009. Manual de Castaño Europeo. Boletín INIA N° 196. 80 pp.
- Loewe, V., M. Toral, M. González, G. Pineda, C. Delard and M. Subiri. 1998. Silvicultura de especies no tradicionales: una mayor diversidad productiva. Informe Final. 129 p. Documento de Trabajo N° 199. INFOR. Santiago, Chile.
- Marinoni, D., A. Akkarak, G. Bounous, K.J. Edwards and R. Botta. 2003. Development and characterization of microsatellites markers in *Castanea sativa* (Mill.). Molecular Breeding. 11: 127-136.
- Marinoni, D., A. Akkarak, C. Beltramo, P. Guaraldo, P. Boccacci, G. Bounous, A.M. Ferrara, A. Ebone, E. Viotto and R. Botta. 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). Tree Genetics & Genomes. 9:1017-1030.
- Martín, M.A., J.B. Álvarez, C. Mattioni, M. Cherubini, F. Villani and L.M. Martín. 2009. Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeats (SSRs) markers. Annals of Applied Biology. 154: 389-398.
- Martín, M.A., C. Mattioni, M. Cherubini, D. Turchini and F. Villani. 2010a. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. Tree Genetics & Genomes. 6(5): 735-744

Martín, M.A., C. Mattioni, M. Cherubini, D. Turchini and F. Villani. 2010b. Genetic characterization of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Annals of Applied Biology*. 157: 37-44.

Metaxas, AM. 2013. Chestnut (*Castanea* spp.) cultivar evaluation for commercial chestnut production in Hamilton County, Tennessee. (Tesis) Universidad de Tennessee en Chattanooga, EE.UU.

Muñoz, F. 2013. Aplicación de marcadores AFLP en la ratificación de casos de asignación errónea de individuos a cultivares de *Castanea sativa* Mill. e híbridos (*C. crenata* X *C. sativa*). Tesis grado. Concepción, Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Ingeniería en Biotecnología. 38 pp.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70:3321-3323.

Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Application in the Biosciences*. 12: 357-358.

Serdar, U., Demirsoy, H. y Demirsoy, L. 2011. A morphological and phenological comparison of chestnut (*Castanea*) cultivars ‘Serdar’ and ‘Marigoule’. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (11):1311-1317.

Steinkellner, H., S. Fluch, E. Turetschek, C. Lexer, R. Streiff, A. Kremer, K. Burg y J. Glössl. 1997. Identification and characterization of (GA/CT)_n microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*. 33:1093-1093.

Torello-Marinoni, D., A. Akkak, C. Beltramo, P. Guaraldo, P. Boccacci, G. Bounous, A.M. Ferrara, A. Ebone, E. Viotto and R. Botta. 2013. Genetic and morphological characterization of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) germplasm in Piedmont (north-western Italy). *Tree Genetics & Genomes*. 9: 1017-1030.

UPOV. 2011. Unión Internacional para las Obtenciones Vegetales. ¿Qué es una variedad vegetal? Citado el 25/07/13. Disponible en <<http://www.upov.int/overview/es/variety.html>>.

Yamamoto, T., T. Tanaka, K. Kotobuki, N. Matsuta, M. Suzuki and T. Hayashi. 2003. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnuts. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78:197–203.

Zhang, X., Yuan D., Zou F., Fan X., Tang J. y Zhu Z. 2016. A Study on the Xenia Effect in *Castanea henryi*. Horticultural Plant Journal. 2(6): 301-308.



CAPÍTULO II

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^{1.}, Rodrigo Hasbún Z.^{2.}, María Paz Jofré V.^{1.}, Manuel Sánchez-Olate¹ & Darcy Ríos L.¹

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

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

Corresponding: CARMEN GLORIA LARSON ARRIAGADA cglarson@udec.cl

El material incluido en este capítulo dio origen a la publicación Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en la etapa de iniciación de cultivo *in vitro* de tejido adulto de *Castanea sativa* Mill. CARMEN GLORIA LARSON A^{1.}, RODRIGO HASBÚN Z.^{2.}, MARÍA PAZ JOFRÉ V.^{1.}, MANUEL SÁNCHEZ-OLATE¹ & DARCY RÍOS L.¹ Revista Gayanna Botánica, 74(1).

RESUMEN

Castanea sativa Mill. es una especie de interés agroforestal ampliamente cultivada en Europa, cuya producción actual esta principalmente enfocada en la obtención de fruto calidad marrone, 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 marrone, es aun 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⁻¹ 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⁻¹ 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, *Castanea sativa* Mill.

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 establish 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⁻¹ 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⁻¹ 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, *Castanea sativa* Mill.

INTRODUCCIÓN

El castaño europeo (*Castanea sativa* Mill.) fue introducido en Chile por inmigrantes Europeos hace más de 250 años y forma parte del paisaje de la precordillera 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 *et al.* 2005).

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*

in vitro de *Castanea sativa* ha generado resultados exitosos en cuanto a su introducción y multiplicación (Conçalves *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). Corredora *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 estos no son permanentes (Sánchez *et al.* 2004).

En la actualidad, los principales focos de investigación han estado asociados a *Castanea sativa* y alguno 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, Corredora *et al.* 2011), el genotipo (Park *et al.* 1998), reguladores del crecimiento (Conçalves *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 (Fernández *et al.* 2001, 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 su 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 "marrone" y como fruto "castaña". Esta diferencia constituye un criterio fundamental en la cotización comercial del fruto, debido a que el marrone presenta características de calidad que permite su utilización especialmente en la industria de procesamiento, lo que permite una mejor valorización del fruto marrone (Grau 2003).

Por otra parte, los reguladores de crecimiento son los encargados de inducir respuestas morfológicas, 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 (Kyojuka 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 explantes 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 marrone, 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 $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ y a $20^{\circ}\text{C} \pm 1$, 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 los primeras etapa 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 DISCUSION

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).

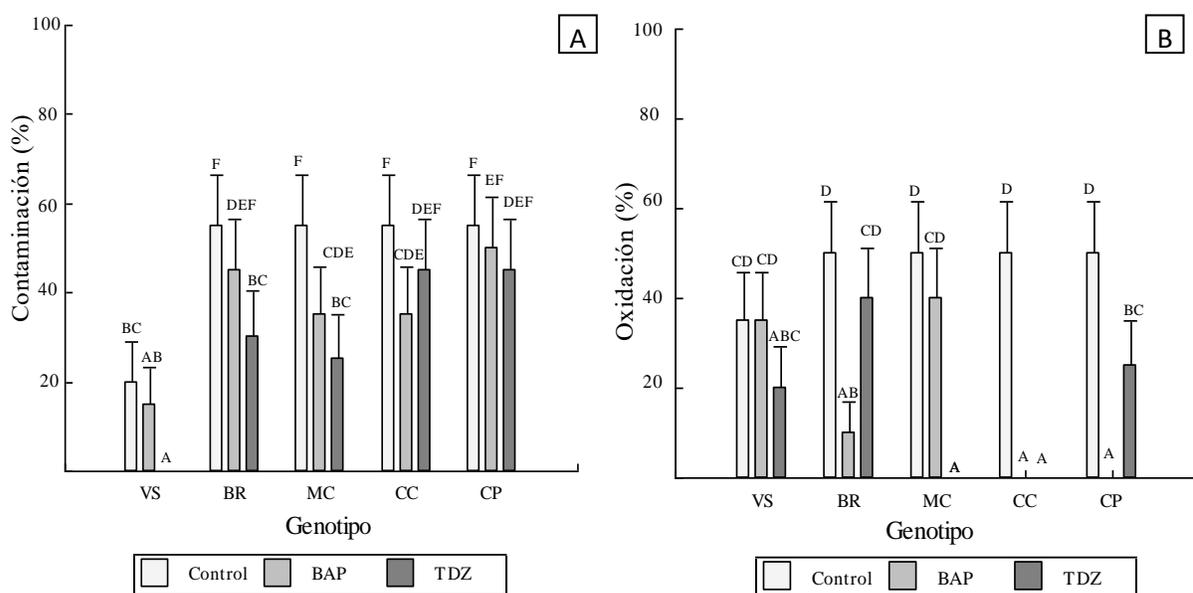


FIGURA 1. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de contaminación (A) y de Oxidación (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción.

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.

FIGURE 1. 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 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 explantes 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).

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).

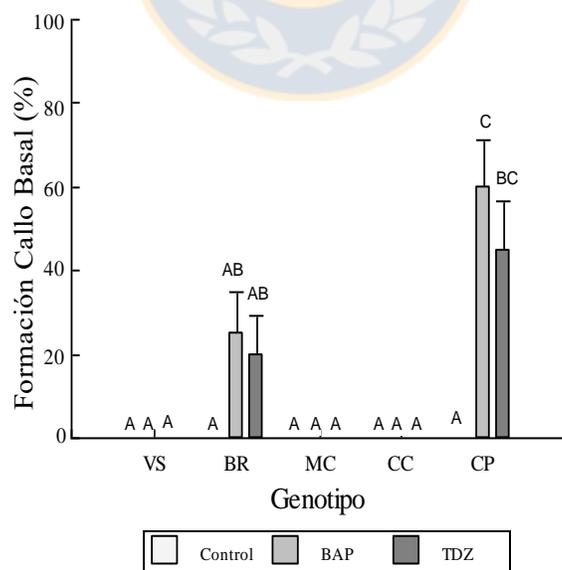


FIGURA 2. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de Formación de Callo Basal de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 20 días desde la introducción.

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.

FIGURE 2. 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 Tuckey test ($P < 0,05$). Vertical bars correspond to standard error.

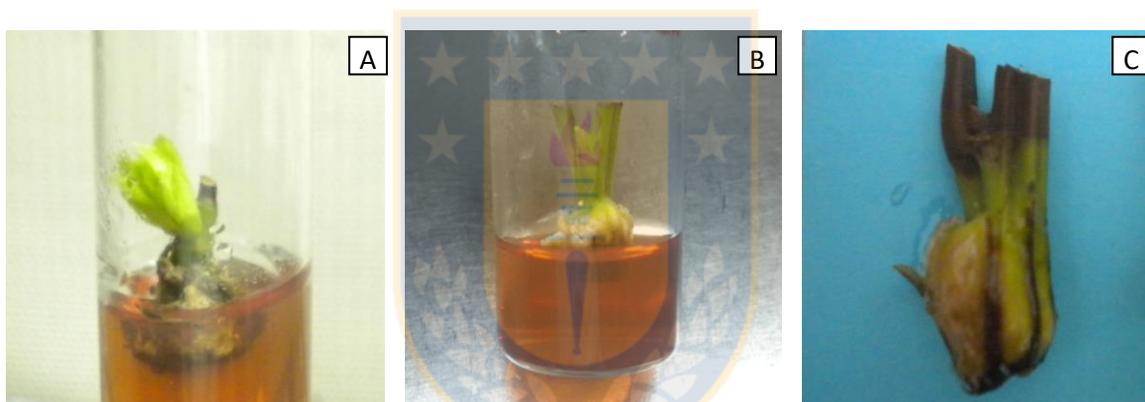


FIGURA 3. Explanto con formación de callo basal de las variedades Chiusa di Pesio (A) y Bouche Rouche (B y C) a 20 días desde el establecimiento en cultivo *in vitro*.

FIGURE 3. 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.

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).

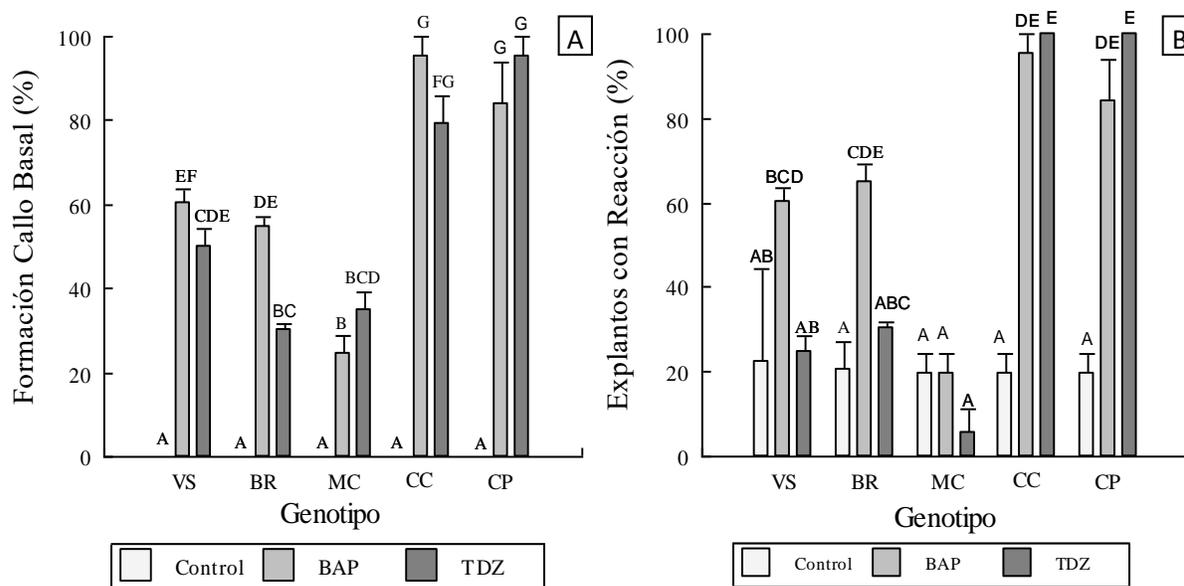


FIGURA 4. Efecto del genotipo y la fuente de citoquinina en el porcentaje de Formación de Callo Basal (A) y Reacción de yema axilar (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción.

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.

FIGURE 4. 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.

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 (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 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).

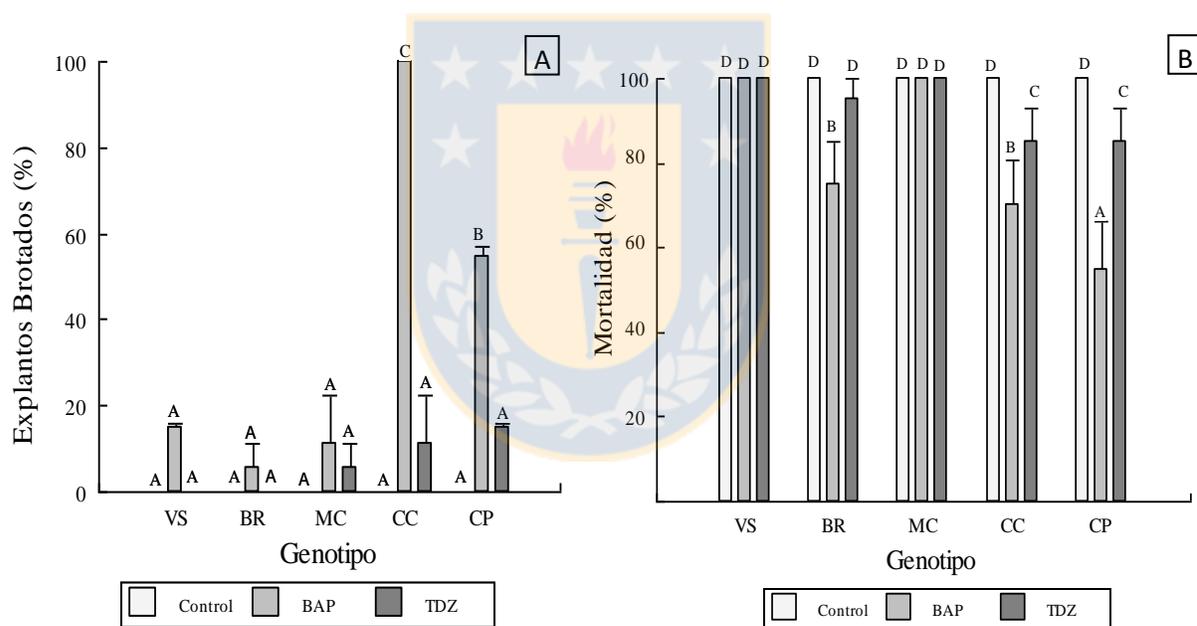


FIGURA 5. Efecto del genotipo y fuente de citoquinina en el porcentaje de Explantos brotados (A) y Mortalidad (B), de segmentos nodales cultivados *in vitro*, evaluados a los 80 días desde la introducción.

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.

FIGURE 5. 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.

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 las posterior proliferación de brotes están fuertemente determinadas por el genotipo (Bhau & Wakhlu 2001, Gajdosová *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).

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 anormalidades 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).

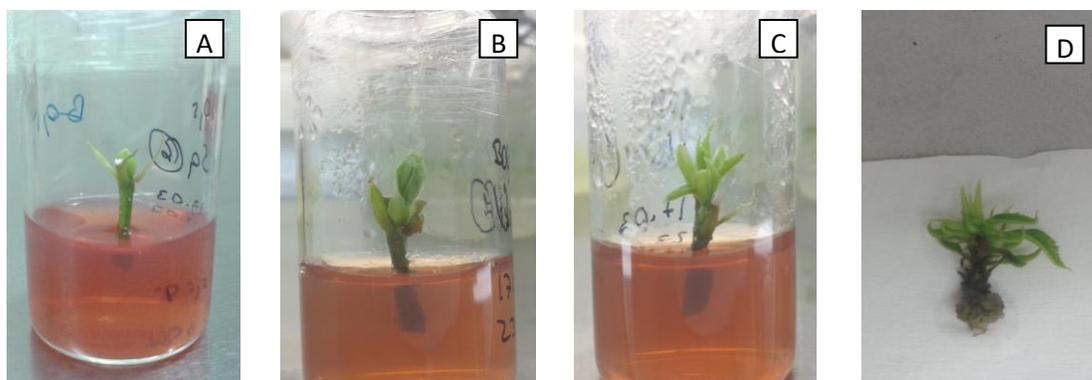


FIGURA 6. Proceso de brotación de la variedad Citta di Castello (CC), desde el inicio de Reacción de yemas (A), Elongación de yemas (B), Apertura de yema (C) y Elongación de brote (D).

FIGURE 6. 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.

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).

Es importante mencionar que, en general esta variable fue muy alta en todas las variedades evaluadas y esto puede deberse, 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 morfogénica 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).

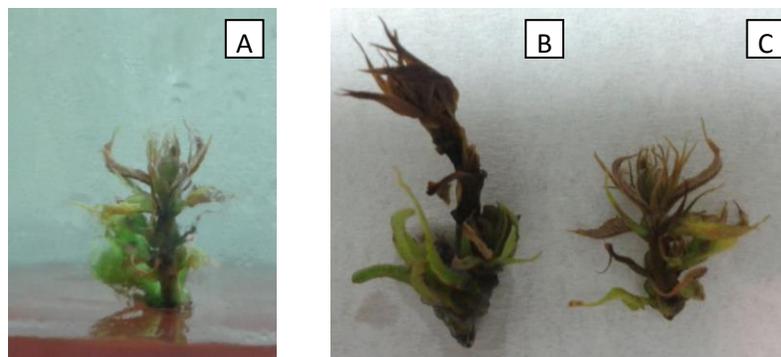


FIGURA 7. Muerte apical (A) y total (B) de explanto en tratamiento con BAP y muerte total de explanto en tratamiento con TDZ (C).

FIGURE 7. Apical death (A) and total death (B) of BAP treated explants, and total death of explants in the TDZ treated (C).

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 superior 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.

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, 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 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. De acuerdo eso, 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 concuerdan 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 Bio Bio por financiamiento de Tesis doctoral. También estamos muy agradecidos por la colaboración de Seminario S.A. al proporcionar material vegetal para este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- BADR, A. & Y. DESJARDINS. 2007. Sugar uptake and metabolism in tissue cultured potato plantlets cultured in liquid medium. In: J.M. Santamaría & Y. Desjardins (eds.), II International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants. Acta Horticultura 748: 265-273.
- BALLESTER, A., M. SAN-JOSÉ, N. VIDAL, J. FERNÁNDEZ-LORENZO & A. VIÉITEZ. 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., C. SERRANO & E. HODSON DE JARAMILLO. 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. & J. SAAVEDRA. 2007. Caracterización Ambiental y Productiva de Rodales Forestales de Castaño en Chile. En: Ciencia e Investigación Forestal, CIFOR 13(1): 111-123.
- BHAU, B.S. & A.K. WAKHLU. 2001. Effect of genotype, explant type and growth regulators on organogenesis in *Morus alba*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 66(1): 25-29.
- BLAKESLEY, 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.
- 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.

- BRETAGNE, B., M.C. CHUPEAU, Y. CHUPEAU & G. FOUILLOUX. 1994. Improved flax regeneration from hypocotyls using thidiazuron as a cytokinin source. *Plant Cell Rep.*, 14: 120-124.
- CABONI, E., P. LAURI, N. TONELLI, G. FALASCA & C. DAMIANO. 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.
- CONÇALVES, J.C., G. DIOGO & S. AMANCIO. 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
- CORREDOIRA, E., L.V. JANEIRO & M.C. SAN JOSÉ. 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., A. BALLESTER & A. M. VIEITEZ. 2000. *In vitro* adventitious bud regeneration from internode segments of beech. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 213-220.
- DE MELO, W., G. BARBANTE, J. KRAUS, R. PESCADOR & R. MAMORU. 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. & S. MORINI. 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., S. RODRÍGUEZ & M. VEIGA. 2001. Multiplicación de dos cultivares de fruto de *Castanea sativa* Mill. *Actas III Congreso Forestal Español*, Mesa 3: 742-749.
- GAHAN, P.B. & E.F. GEORGE. 2008. Adventitious regeneration. In: E. George, M. Hall & G. De Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, pp: 335-401. Springer, Netherlands.
- GAJDOŠOVÁ, A., M.G. OSTROLUCKÁ, G. LIBIAKOVÁ & E. ONDRUŠKOVÁ. 2007. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. In: S.M. Jain & H. Häggman (eds.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, pp: 457-464. Springer, Netherlands.

- GARCIA, J.L, N. AVIDAN, A. TRONCOSO, R. SARMIENTO & S. LAVEE. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae* 85(4): 271-284.
- GEORGE, E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture, Part 2. In: Practice. 2 ed. Exegetics Limited, Basingstoke, pp: 799.
- GIL, B., E. PASTORIZA, A. BALLESTER & C. SÁNCHEZ. 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. & R. GIANNINI. 1999. Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae* 494: 243-245.
- GLOCKE, P., G. COLLINS & M. SEDGLEY. 2006. 6-Benzylamino purine stimulates *in vitro* shoot organogenesis in *Eucalyptus erythronema*, *E. stricklandii* and their interspecific hybrids. *Scientia Horticulturae* 109(4): 339-344.
- GRAU, P. 2003. Introducción de Cultivares de Castaño Europeo (*Castanea sativa* Mill.), Híbridos Eurojaponeses (*Castanea crenata x Castanea sativa*) y Castaño Japonés (*Castanea crenata* Siebold et Zucc.) a Chile. Primeros resultados. *Agricultura Técnica* 63(3): 329-335.
- GUO, B., B. HAIDER, A. ZEB, L. L. XU & Y. H. WEI. 2011. Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology* 10(45): 8984-9000.
- HARTMANN, H., D. KESTER, F. DAVIES & R. GENEVE. 2010. HARTMANN & KESTER'S Plant Propagation: Principles and Practices. 8th edition. Pearson Higher Ed USA. 928 pp.
- HASBÚN, R., M. SÁNCHEZ-OLATE & D. RÍOS. 2009. Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: M. Sánchez-Olate & D. Ríos (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. & J. E. PREECE. 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. Visto: 26 de febrero de 2017.

- JORDAN, M., J. VELOZO & A. M. SABJA. 1996. Organogenesis *in vitro* of *Nothofagus alpina* (P. et E.) Oerst, Fagaceae. *Plant Cell Reports* 15(10): 795-798.
- KADOTA, M. & Y. NIIMI. 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., K. AGARWAL & S. KUMAR. 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., B. BECKER & D. DUCKSTEIN. 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. & G. MCGRANAHAN. 1992. Micropropagation of Persian Walnut (*Juglans regia* L.). In: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 18:137-150. High Technology and Micropropagation II. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- MIRANDA-FONTAÍÑA, M.E. & J. FERNÁNDEZ-LÓPEZ. 2001. Genotypic and Environmental Variation of *Castanea crenata* x *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. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15(3): 473-497.
- MURTHY, B.N.S., S.J. MURCH & P.K. SAXENA. 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., M. SINGH, U. JAISWAL & V.S. JAISWAL. 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., J.D. BARRETT & J.M. BONGA. 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., M. ROCANO, J. SALAZAR & C. TORRES. 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 Visto: 26 de febrero de 2017.
- RÍOS, D., F. AVILÉS, M. SÁNCHEZ-OLATE, R. ESCOBAR & G. PEREIRA. 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., M. MUÑOZ, R. HASBÚN, A.L. ALARCÓN & M. SÁNCHEZ-OLATE. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Castanea sativa* Mill. a partir de ejes embrionarios aislados desde semillas de cultivares selectos. En: M. Sánchez-Olate & D. Ríos (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., CL. KEVERS & TH. GASPAR. 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., L. BRAVO, M. LATSAGUE, M. SÁNCHEZ & D. RÍOS. 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., M. AFRIN, A.K.M. MOHIUDDIN & A.M. SHOHAELL. 2015. *In vitro* Regeneration of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.). *Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences* 4(2): 1-8.
- SAMPATHKUMAR, A., A. YAN, P. KRUPINSKI & E.M. MEYEROWITZ. 2014. Physical forces regulate plant development and morphogenesis. *Current Biology* 24(10): 475-483.
- SANCHEZ, M. & A. VIEITEZ. 1991. *In vitro* morphogenetic competence of basal sprouts and crown branches of mature chestnut. *Tree Physiology* 8: 59-70.

- SÁNCHEZ-OLATE, M., D. RÍOS, R. RODRÍGUEZ, M.E. MATERÁN & G. PEREIRA. 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., W.A. MACKAY & T.D. DAVIS. 2003. Reduction of flower abscission and leaf senescence in cut phlox inflorescence by thidiazuron. Acta Horticulturae 628: 837-841.
- SANKHLA, N., W.A. MACKAY & T.D. DAVIS. 2005. Effect of thidiazuron on senescence of flowers in cut inflorescences of *Lupinus densiflorus* Benth. Acta Horticulturae 669: 239-243.
- SEDLAK, J. & F. PAPERSTEIN. 2009. *In vitro* proliferation of newly bred Czech pear cultivars. Acta Horticulturae 839: 87-92.
- SERDAR, U., H. DEMIRSOY & L. DEMIRSOY. 2011. A morphological and phenological comparison of chestnut (*Castanea*) cultivars 'Serdar' and 'Marigoule'. Australian Journal of Crop Science 5(11):1311-1317.
- SHTEREVA, L., R. VASSILEVSKA-IVANOVA, T. KARCEVA & B. KRAPTCHEV. 2014. Micropropagation of six Paulownia genotypes through tissue culture. Journal of Central European Agriculture 15(4): 147-156.
- TAIZ, L. & E. ZEIGER. 2012. Auxin: The first discovered plant growth hormone. In: L. Taiz & E. Zeiger (eds.), Plant Physiology, Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts U.S.A. pp: 545-578.
- VALDERRAMA, E. & P. HALÇARTEGARAY. 2012. Cultivo y negocio de castañas tipo marrone en Chile. En: Redagícola virtual 45: 50-52. Abril 2012. Chile.
- VALDÉS, A.E., B. FERNANDEZ & M.L. CENTENO. 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., C. FENNELL & N. TAYLOR. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. Acta Horticulturae 725: 55-61.
- VIDAL, N., B. BLANCO & B. CUENCA. 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. SÁNCHEZ, J. AMO-MARCO & A. BALLESTER. 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. M. & M. C. SAN-JOSÉ. 1996. Adventitious shoot regeneration from *Fagus sylvatica* leaf explants *in vitro*. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 32(3): 140-147.

VIEITEZ, A., M. SÁNCHEZ, M. GARCÍA-NIMO & A. BALLESTER. 2007. Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. In: S.M. Jain & H. Häggman (eds.), *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*, pp: 299-312. Springer, Heidelberg.

WEI, Y.D., H.G. ZHENG & J.C. HALL. 2000. Role of auxínica herbicide-induced ethylene on hypocotyl elongation and root/hypocotyl radial expansion. *Pest Management Science* 56(5): 377-387.

ZHOU, J., H. MA, F. GUO & X. LUO. 1994. Effect of thidiazuron on somatic embryogenesis of *Cayratia japonica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36(1): 73-79.



CAPITULO III

Variation in the foliar phenolic content with respect to the age of the mother plant on the morphogenic capacity during *in vitro* establishment of chestnut varieties (*Castanea sativa* Mill.)

Carmen Gloria Larson A.¹, Rodrigo Hasbún Z.², María Paz Jofré V.¹, Karina Crisóstomo¹, Manuel Sánchez-Olate¹, Evelyn Bustos¹ & Darcy Ríos L.¹

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

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

Capítulo en revisión para ser enviado a Revista Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el contenido fenólico foliar con respecto a la edad de la planta madre sobre la capacidad morfogénica durante el establecimiento *in vitro* de variedades de *Castanea sativa*. Se utilizaron segmentos nodales de cinco árboles que pertenecen a nueve variedades de castaño (adulto) y cinco plantas de un año de edad provenientes de semillas de las mismas 9 variedades (juvenil). Se utilizó como medio de cultivo el medio MS con nitratos reducidos a la mitad, suplementado con sacarosa al 30g·l⁻¹, agar 7g·l⁻¹ y 0,5mg·l⁻¹ de BAP y Sequestrene al 0,015% p/v. Se cuantificaron mediante espectrofotometría y determinaron por HPLC compuestos fenólicos foliares presentes en la planta madre adulta y juvenil al

momento de extraer los explantos para la introducción *in vitro*. Los resultados muestran diferencias significativas en las respuestas morfogénicas, siendo el material juvenil de todas las variedades estudiadas, el que respondió al establecimiento *in vitro* en términos de formación de callo basal, apertura y elongación de yema axilar, llegando a la etapa de subcultivo el 90% de los explantes utilizados. Además, fue significativamente inferior la tasa de oxidación, contaminación y mortalidad observada. En adultos, independiente de la variedad, la alta mortalidad (64%) se inició como necrosis apical afectando el total del explanto. Esto se reflejó en el contenido de fenoles totales foliares, siendo significativamente mayor en tejido juvenil ($37\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$) con respecto al tejido adulto ($20\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{ DW}$). El compuesto con mayor presencia detectado en hojas de plantas juveniles fue el ácido elágico con $33,83\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M.S}$ (91,4%), mientras que en hojas de plantas adultas fue rutina con $8,09\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M.S}$ (40,5%) y ácido elágico con $5,55\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M.S}$ (27,8%). El mayor contenido de ácido elágico favorecería las respuestas morfogénicas en los tejidos juveniles, dada su naturaleza antioxidante y antimicrobiana que tiene en las plantas.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, compuestos fenólicos, edad planta madre, *Castanea sativa* Mill.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the foliar phenolic content with respect to the age of the mother plant on the morphogenic capacity during the *in vitro* establishment of varieties of *Castanea sativa*. Nodal segments of five trees belonging to nine varieties of chestnut (adult) and five plants of one year of age from seeds of the same 9 varieties (juvenile) were used. The MS medium was used as a culture medium with nitrates reduced by half, supplemented with sucrose at $30\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, agar $7\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ of BAP and Sequestrene at 0.015% w / v. They were quantified by spectrophotometry and determined by HPLC foliar phenolic compounds present in the adult and juvenile mother plant at the moment of extracting the explants for the *in vitro* introduction. The results show significant differences in the morphogenic responses, being the juvenile material of all the varieties studied the one that responded to the *in vitro* establishment in terms of basal callus formation, opening and elongation of the axillary bud, reaching the subculture stage 90 % of the explants used. In addition, the rate of oxidation,

contamination and mortality observed was significantly lower. In adults, regardless of the variety, the high mortality (64%) started as apical necrosis affecting the total of the explant. This was reflected in the content of total foliar phenols, being significantly higher in juvenile tissue ($37\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) with respect to adult tissue ($20\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ DW.). The compound with the highest presence detected in leaves of juvenile plants was ellagic acid with $33.83\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M.S}$ (91.4%), while in leaves of adult plants it was rutin with $8.09\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M. S}$ (40.5%) and ellagic acid with $5.55\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{M.S}$ (27.8%). The higher content of ellagic acid would favor morphogenic responses in juvenile tissues, given its antioxidant and antimicrobial nature in plants.

Key words: *In vitro* culture, phenolic compounds, mother plant age, *Castanea sativa* Mill.



I. INTRODUCCION

La propagación de especies agroforestales, mediante cultivo *in vitro*, es de gran interés, ya que para muchas especies los rasgos de rendimiento deseables sólo se expresan adecuadamente a nivel fenotípico después de que el árbol ha alcanzado cierto grado de madurez (Campbell et al. 2003; Merkle y Nairm 2005). Sin embargo, la clonación de individuos adultos se ve afectada por las características morfofisiológicas que acompañan a la madurez; como la reducción de la tasa de crecimiento y la falta de capacidad de enraizamiento (Vidal et al. 2003).

Los tejidos juveniles, con alto grado de actividad celular, tienden a tener más plasticidad *in vitro* que los adultos (Ikeuchi et al. 2016), como es el caso de la respuesta de cotiledones, hipocótilos y hojas aisladas de material juvenil cuando se usan como explantes para la micropropagación (Giovannelli 1999; Ballester et al. 2001; San José et al. 2001; Becerra et al. 2004; Giovannelli et al. 2004). A su vez, presentan una mayor capacidad morfogénica, que se manifiesta en respuestas de crecimiento, proliferación y enraizamiento de los microtallos generados; a diferencia de un tejido maduro más difícil de desdiferenciar e inducir brotes y raíces adventicias (Vidal et al. 2003).

El cultivo *in vitro* de individuos adultos de castaño (*Castanea sativa* Mill.), se ha logrado con relativo éxito a partir de materiales con menor edad ontogénica y con características fisiológicas juveniles, tales como: brotes basales, brotes epicórmicos o rebrotes de tocón (Sánchez et al. 1997; Fernández-Lorenzo et al. 1999; Fernández-Lorenzo et al. 2001; Concepción et al. 2005; Hasbún 2005; Vieitez et al. 2007; Cuenca et al. 2009;). Sin embargo, no siempre es posible disponer de este tipo de material vegetal. Una de las formas de establecer material proveniente de árboles adultos es realizando tratamientos para reactivar o revigorar estos tejidos, aunque tales tratamientos no son permanentes (Sánchez et al. 2004).

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de plantas leñosas, en gran medida está limitado por la ocurrencia de oxidación de los explantes y la liberación de exudados al medio de cultivo. Esto, constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (George 1996; Laukkanen et al. 2000; Murkute y Shanti-Patil 2003; Tang y Newton 2004), en especial en material vegetal proveniente de árboles adultos.

Al profundizar en los mecanismos que regulan el proceso de maduración y solventar los problemas actuales que en la mayoría de los casos restringen la aplicación de técnicas de micropropagación de árboles seleccionados, es importante la búsqueda de posibles marcadores del cambio de fase a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Según Vidal et al. (2003), las características morfológicas de brotes generados *in vitro* y su capacidad de proliferación y enraizamiento pueden utilizarse como marcadores para diferenciar entre explantes de plantas juveniles y plantas adultas. Por otra parte, los compuestos fenólicos han sido usados en plantas leñosas para diferenciar entre fases adultas y juveniles (Zhang et al. 2007), ya que la síntesis de precursores de fenoles es más activa y compleja en tejidos maduros que en tejidos jóvenes (De Klerk 1997). Está demostrado que algunas especies leñosas, tienen altos niveles de fenoles asociados con el crecimiento secundario y la lignificación y alguno de estos compuestos fenólicos se enlazan a las proteínas, las inactivan e inhiben el crecimiento de los tejidos (Vaughn y Duke 1984).

Existe una relación directa entre la oxidación de los tejidos *in vitro* y la edad del material donante, ya que las plantas muestran diferentes comportamientos dependiendo de su ontogenia, siendo los tejidos juveniles menos propensos a la oxidación, que los tejidos adultos (George 1996). Esto puede deberse a que en las plantas adultas, o durante la senescencia, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño oxidativo aumentan, mientras que los niveles de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y peroxidasa de ascorbato disminuyen (Jiménez et al. 1998; Orendi et al. 2001; Munné-Bosch y Alegre 2002). Además, la senescencia inducida por el estrés se acompaña de un aumento de ROS y una disminución de enzimas antioxidantes (Hodges y Forney 2000; Sandalio et al. 2001; Santos et al. 2001).

Los compuestos fenólicos pueden actuar favoreciendo o limitando la capacidad morfogénica de los tejidos y esta característica está dada por la relación que existe con el Ácido Indol Acético (AIA) (Volpert et al. 1995; Arnaldos et al. 2001; Ma et al. 2016). Algunos tipos de fenoles se han relacionado en forma positiva con las auxinas al actuar protegiendo a esta fitohormona de la oxidación, siendo moduladores del catabolismo del AIA (antioxidantes que inhiben la oxidación del AIA) (Ma et al. 2016). Es el caso de algunos monofenoles como el ácido sinápico y el ácido ferúlico, que a bajas concentraciones inhiben la acción de la AIA oxidasa, por lo que deja actuar al AIA en la elongación y junto con las citoquininas, en la

división celular; el crecimiento y subsecuente desarrollo de la planta (Volpert et al. 1995; Arnaldos et al. 2001). La AIA oxidasa es una peroxidasa, la cual, entre otras funciones celulares, regula el contenido endógeno de AIA (Beffa et al. 1990) al actuar como catalizador de su oxidación, dejándolo inactivo (Debergh y Read 1991).

Existen fenoles (flavonoides) que también pueden actuar como inhibidores del transporte de auxinas (Murphy et al. 2000; Peer y Murphy 2007). Esto se debe a que tienen una estructura química similar a la del Ácido Naftiltalámico (NPA), un inhibidor natural del transporte de auxina (Brown et al. 2001). La inhibición del transporte de auxina se produce a través de la unión de los flavonoides a proteínas facilitadoras del exflujo de auxinas de la familia PIN (proteínas transportadoras) (Murphy et al. 2000; Peer et al. 2001; Marko et al. 2004), afectando la disponibilidad de estas proteínas para el transporte de auxinas a través de las células (Buer et al. 2007), y finalmente la elongación celular.

Murphy et al. (2000), Brown et al. (2001) y Aloni et al. (2003) informaron la presencia de flavonoides que inhibían el flujo de salida de su sitio de síntesis y el transporte basipetal de la auxina endógena. Otros autores se han referido a la función protectora de algunos compuestos fenólicos, principalmente como antioxidantes (Valdés et al. 2011; El-Soud et al. 2013; Khan et al. 2017) y como biocida (Vekiari et al. 2009).

De acuerdo a lo anterior se puede deducir que la dificultad para propagar vegetativamente una planta adulta está relacionada con la síntesis de compuestos fenólicos, en relación con la edad de la planta, los cuales están asociados a la capacidad morfogénica de los tejidos. En base a ello el objetivo de este estudio es corroborar la influencia de la edad de la planta madre de castaño en la respuesta obtenida al establecimiento *in vitro* y determinar posibles compuestos de origen fenólico asociados a estas respuestas.

II. MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se seleccionaron al azar 8 árboles cultivados de cinco variedades de castaño (Tabla 1) desde un huerto productor de frutos, establecido el 2008 en la región del Maule, Provincia de Linares, Estación Villa Alegre (Fig. 1a), que se encontraban en la etapa de producción de frutos.

TABLA 1. Variedades de castaño en estudio y su procedencia.

Variedad	Origen	Especie
Bouche Rouge	Francia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Val di Susa	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Citta di Castello	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Cuneo	Italia	(<i>C. sativa</i>)
Marrone di Chiusa di Pesio	Italia	(<i>C. sativa</i>)

Como material juvenil se utilizaron plantas de cinco meses de edad (Fig. 2A) provenientes de semillas (Fig. 2B), colectadas de las variedades cultivadas en el huerto, mencionado anteriormente.

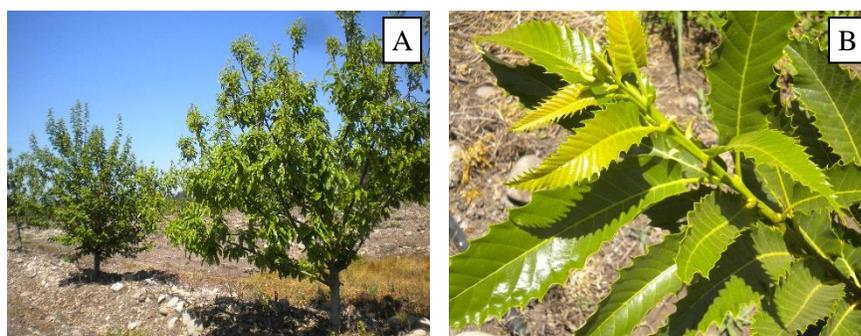


FIGURA 1. Individuo seleccionado de la variedad Marrone di Cuneo, producido a partir de injerto (A) y vareta selecciona de la misma variedad para el cultivo *in vitro* (B).

Fuente: Elaboración propia.

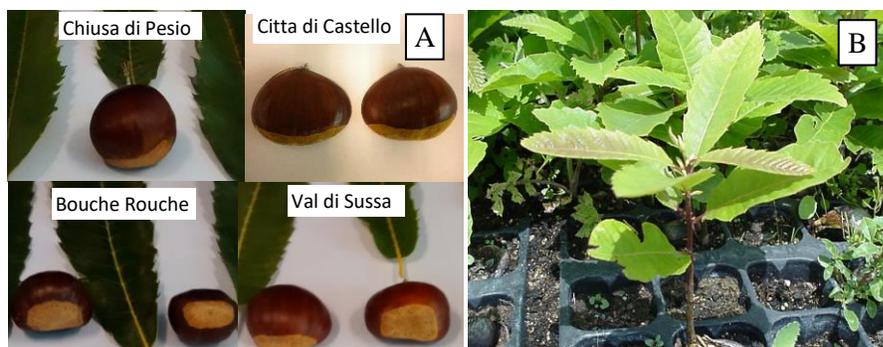


FIGURA 2. Semillas de variedades colectadas y utilizadas para la producción de plantas para cultivo *in vitro* (A) y planta de 5 meses de edad de la variedad Marrone Citta di Castello seleccionada para el cultivo *in vitro* (B). Fuente: Elaboración propia.

Análisis estadístico: En todos los experimentos se empleó un diseño completamente aleatorio. Los datos fueron analizados mediante Análisis de Varianza que evaluó el efecto de la edad en la respuesta obtenida. 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.

Se evaluó el efecto de la edad y se comparó el contenido total de fenoles y la presencia de compuestos fenólicos específicos en material vegetal adulto y juvenil.

Por tipo de material se tuvieron 5 repeticiones y la unidad muestral estuvo formada por 40 explantos tanto para el material adulto como para el material juvenil.

Establecimiento *in vitro* de material adulto y juvenil de castaño.

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron segmentos nodales de aproximadamente 3 cm, de plantas adultas y juveniles, las cuales fueron colectadas simultáneamente a mediados de primavera (Octubre). Se lavaron con agua potable corriente y detergente comercial. Posteriormente, se les realizó asepsia superficial en cámara de flujo laminar, según metodología descrita por Vieitez et al. (2007), con hipoclorito de sodio al 0,6% v/v durante 8 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril (1, 2 y 3 minutos). Los segmentos nodales se colocaron sobre papel absorbente estéril, se les eliminó la base, el ápice y las hojas dejando sólo una yema lateral. Posteriormente se transfirieron a frascos transparentes de 20 ml, que contenían 3 ml de medio de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962) modificado para

castaño (nitratos reducidos a la mitad), suplementado con sacarosa al $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, agar $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Bencil amino purina (BAP) y Sequestrene al 0,015% p/v. Se mantuvieron en condiciones de ambiente controlado con fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 25°C en el día, 20°C en la noche, por 55 días de cultivo.

A los 10, 25, 40 y 55 días de cultivo se evaluó el porcentaje de contaminación (fúngica y/o bacteriana), oxidación, explantos con reacción (aumento de tamaño de yema lateral), explantos con formación de callo basal y apertura de yema. Además, se determinó el número de microtallos mayores a 1 cm de largo, la longitud del tallo mayor (cm) y el efecto de la edad en el establecimiento *in vitro*.

Cuantificación de fenoles foliares totales de castaño.

Los compuestos fenólicos se extrajeron a partir de las hojas de las varetas seleccionadas para la obtención de los segmentos nodales para el cultivo *in vitro*, de plantas adultas y juveniles. El material fresco se pesó y se secó a 65°C . La extracción se realizó con 100 ml de metanol al 80% durante 24 horas en condiciones de oscuridad. Se utilizaron 50 mg de hojas secas. El extracto obtenido se utilizó para la cuantificación de fenoles totales foliares y la identificación de los compuestos fenólicos mayoritarios.

Los fenoles totales se cuantificaron como equivalentes de ácido gálico según el método modificado por Dastmalchi et al. (2007). Se utilizó el reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (agente oxidante) y se cuantificó por espectrofotometría (760 nm), basado en la reacción colorimétrica de reducción-oxidación. Este método determina la concentración total de fenol mediante la extrapolación de la curva de ácido gálico estándar. El contenido de fenoles totales se expresó $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masa seca.

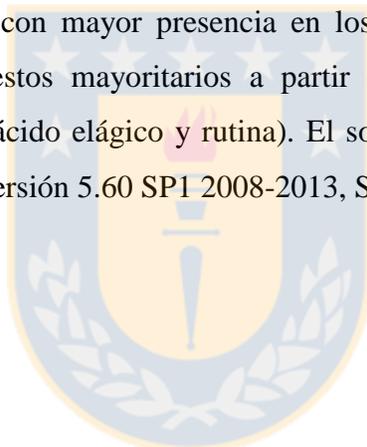
Identificación de compuestos fenólicos foliares por HPLC.

El análisis y caracterización de los compuestos fenólicos aislados se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD). El instrumento utilizado corresponde a un sistema Nexera X2 marca Shimadzu compuesto por Unidad desgasificadora DG-20A 5R, Bomba cuaternaria LC-30 AD, muestreador Automático SIL 30AC, horno para columna CTO-20AC, detector de arreglo de fotodiodos (YL 9160 PDA

Detector). Se utilizó una columna analítica Kromasil 100-C18 (25x046 cm DI y 5 μ m tamaño de partícula).

Los solventes empleados fueron acetonitrilo (ACN) grado HPLC (MERK) y agua purificada con un sistema miliporo Mili-Q. Los extractos fenólicos fueron previamente filtrados (0,22 μ m) y se analizaron con un gradiente de elusión con ACN en agua pH 2,5. El volumen de inyección fue de 30 μ L y el flujo de 1 ml·min⁻¹. Se registraron los espectros de absorbancia a 254 μ m.

Para la identificación de los compuestos fenólicos, se inyectaron bajo las mismas condiciones experimentales estándares de ácido elágico y rutina. Se realizó un perfil de los compuestos presentes en los dos tipos de material utilizado (juvenil y adulto). A partir de los cromatogramas, se obtuvieron los tiempos de retención, además de los mínimos y máximos de absorción de los compuestos con mayor presencia en los tejidos analizados. Se realizó la cuantificación de los compuestos mayoritarios a partir de las curvas de calibración (0-0,2 mg·ml⁻¹) de los estándar (ácido elágico y rutina). El software de procesamiento de datos corresponde a Labsolutions, Versión 5.60 SP1 2008-2013, Shimadzu Corporation.



III.RESULTADOS Y DISCUSIONES

Establecimiento *in vitro* de material adulto y juvenil de castaño.

Respuesta morfogénica

Al evaluar la respuesta al cultivo *in vitro*, se observó un aumento de volumen de la yema en el 100% de los explantos introducidos (Fig. 3; Tabla 2), dentro de los diez primeros días. Además, para el 43% de éstos se detectó apertura de la yema. Una respuesta diferente se registró en los provenientes de material adulto, para los que se observó hinchamiento de la yema en un 48% y un 25% con inicio de apertura, a partir del día 25. A los 40 días, un total de 52% de explantos presentaron aumento de volumen de la yema, manteniéndose hasta el último día de evaluación (55) llegando sólo a la etapa de apertura el 45% de los explantos evaluados (Tabla 2).

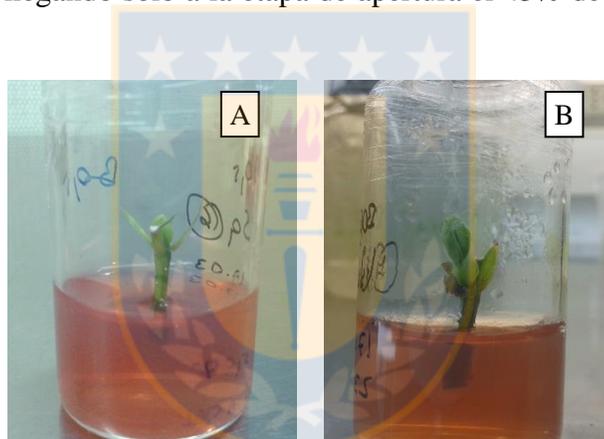


FIGURA 3. Desarrollo morfológico inicial de las yemas de explantos juveniles de castaño (Citta di Castello) entre el día 1 (A) y el día de 10 (B), desde el establecimiento *in vitro*.

Fuente: Elaboración propia.

La formación de callo basal se inició primero en el tejido adulto. Al décimo día de iniciado el cultivo *in vitro* el 17% de los explantos presentaba callo en su base. Esta situación se revertió a partir del día 25, donde la presencia de callo basal en los explantos juveniles fue significativamente superior a la de los explantos adultos (Tabla 2), llegando al 90% y 52%, respectivamente, a los 55 días de cultivo.

TABLA 2. Respuestas morfológicas (%) del total de explantos juveniles y adultos de castaño evaluados en diferentes días de cultivo (de 10 a 55 días) desde su establecimiento *in vitro*.

Día de cultivo	<i>Explanto con reacción (%)</i>		<i>Formación de callo basal (%)</i>		<i>Yemas Abiertas (%)</i>	
	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto
10	100 ^b	5 ^a	0 ^a	17 ^b	43 ^b	0 ^a
25	100 ^b	48 ^a	88 ^b	47 ^a	90 ^b	24 ^a
40	100 ^b	52 ^a	88 ^b	52 ^a	90 ^b	44 ^a
55	100 ^b	52 ^a	90 ^b	52 ^a	90 ^b	45 ^a

Letras diferentes correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre material juvenil y adulto de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

Existe la teoría de que el callo basal compensa parcialmente la ausencia de sistema radicular (Gebhart et al. 1993; Meier-Dinkel et al. 1993) y puede actuar como sumidero de hormonas y nutrientes, suministrándolos reguladamente a las yemas en desarrollo (Hasbún 2005) o bien atrapa algunos componentes que ayudarían a la planta a superar ciertos síntomas de deficiencia, al momento del establecimiento *in vitro* (Vieitez et al. 1989).

Al analizar la respuesta al establecimiento *in vitro* a partir de la tasa de explantos con apertura de yemas, se observó un 43% de yemas abiertas en segmentos nodales juveniles, a partir del día 10 (Tabla 2). Desde el día 25 presentaron elongación, formando un brote de aproximadamente 3 cm de longitud y apertura de yema en el 90% de los explantos (Fig. 3). En cambio, la respuesta del material adulto fue significativamente inferior llegando sólo a tener el 45% de yemas abiertas (Tabla 2), sin presentar elongación ni brotación.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Basto et al. (2012) para segmentos nodales de individuos adultos de *Cedrela montana Moritz ex Turcz.*, en los que tuvieron una baja respuesta organogénica (solo 6,7% con yema axilar elongada). Resultados similares se informaron en *Rosa hybrida* (Ibrahim y Debergh 2001), *Aerides maculosum* (Murthy y Pyati 2001), *Cajanus cajan* (Dayal et al. 2003), *Morus alba* (Thomas 2003), *Acacia mangium* (Monteuuis 2004), *Platanus occidentalis* (Sun et al. 2009) y *Jatropha curcas* L. (Mazumdar et al. 2010). Según Famiani et al. (1994) los explantos juveniles muestran más potencial de regeneración al tener células menos diferenciadas y más activas metabólicamente. Por lo tanto, bajo condiciones hormonales y nutricionales adecuadas, muestran una mayor respuesta a la

proliferación celular y regeneración de tejidos con fines organogénicos. Por otra parte, la baja capacidad de respuesta en el material adulto puede deberse a una pérdida de competencia morfogénica asociada a diferencias morfológicas, bioquímicas y moleculares (Gil et al. 2003). Todo tejido maduro pierde potencial morfogénico debido a la determinación celular que lleva a una especialización del tejido, lo que reduce la plasticidad y la capacidad de diferenciación de las células (Basto et al. 2012). En etapa de madurez los genes se expresan en forma diferencial con respecto a los tejidos juveniles (García et al. 2000). Hay evidencia de que las citoquininas disminuyen durante la maduración del árbol, así reduce la división celular y la inducción del brote y acelera el envejecimiento de los tejidos (Valdés et al. 2003). Las auxinas, directamente relacionadas con la estimulación y desarrollo de las yemas vegetativas, también se ven afectadas por la edad, principalmente, su transporte dentro de los tejidos (Sampathkumar et al. 2014).

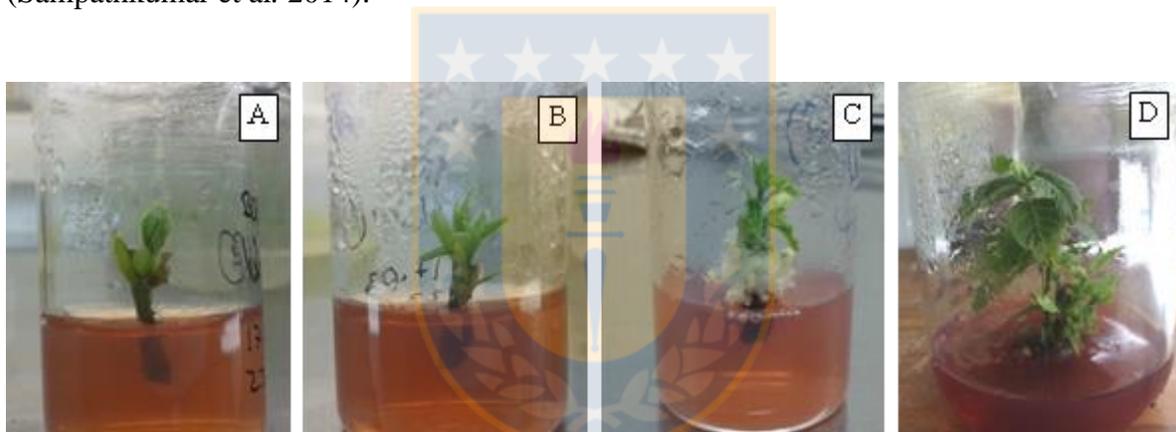


FIGURA 4. Desarrollo morfológico de explantos juveniles de castaño (Marrone Chiusa di Pesio). Apertura de yema a los 10 días (A y B), segmento nodal con brote elongado a los 25 (C) y 55 días (D), desde el establecimiento *in vitro*. Fuente: Elaboración propia.

En la Fig. 4 se observa el proceso morfológico de los explantos juveniles. A partir del día 10 de la introducción *in vitro*, en los segmentos nodales se observan las yemas abiertas; siendo variable el avance de este proceso, en algunos explantos la yema está en inicio de apertura (4A) y en otros la apertura es más avanzada (4B). A los 25 días se observa una marcada elongación de 1,3 cm como promedio (4C), lo que permite establecer los subcultivos a partir de la propagación masal (Tabla 3). A los 55 días se observan brotes con mayor elongación y el desarrollo de nuevos brotes desde el callo basal (4D).

Con respecto al desarrollo de los brotes, a partir del día 25 se inició el subcultivo y a partir del día 40 se contabilizaron microtallos con muerte apical (Tabla 3). Esto último indujo el desarrollo de microtallos adventicios a partir del callo basal (Fig. 4D).

TABLA 3. Longitud promedio de brotes del total de explantos juveniles de castaño (todas las variedades estudiadas) a los 10, 25, 40 y 55 días desde la introducción *in vitro*, número de brotes con muerte apical y número de brotes subcultivados con su longitud promedio.

Día	Longitud promedio brote (cm)	Nº brotes con muerte apical	Nº brotes subcultivados	Longitud promedio de brotes subcultivados (cm)
10	0	0	0	0
25	1,3	0	3	1,2
40	1,5	8	19	1,6
55	2,5	3	14	1,7

Fuente: Elaboración propia.

El tamaño de los brotes subcultivados aumentó desde 1,3 a 2,5 cm de longitud promedio (Tabla 3), llegando en algunos casos a longitudes cercanas a los 6 cm (Fig. 5A).



FIGURA 5. Longitud alcanzada por brotes de castaño (Marrone Chiusa di Pesio) a los 55 días de la introducción *in vitro* (A) y su posterior subcultivo (B).

Fuente: Elaboración propia.

Contaminación, oxidación y mortalidad de brotes de castaño in vitro

En la tabla 4 aparecen los resultados obtenidos al comparar el porcentaje de contaminación (bacteriana y fúngica) a partir del día 25 de iniciado el establecimiento *in vitro* de segmentos

nodales del total de explantos juveniles y adultos. Existen diferencias significativas, siendo mayores las contaminaciones en el tejido adulto (36%).

TABLA 4. Porcentaje de contaminación, oxidación y mortalidad del total de explantos de material juvenil y adulto de castaño, evaluados a los 10, 25, 40 y 55 días, desde el establecimiento *in vitro*.

Día	<i>Contaminación (%)</i>		<i>Oxidación (%)</i>		<i>Mortalidad (%)</i>	
	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto
10	7 ^a	9 ^a	0 ^a	6 ^b	7 ^a	5 ^a
25	14 ^a	12 ^a	0 ^a	28 ^b	10 ^a	35 ^b
40	23 ^a	36 ^b	0 ^a	28 ^b	12 ^a	52 ^b
55	26 ^a	36 ^b	0 ^a	28 ^b	14 ^a	64 ^b

Letras diferentes correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas entre material juvenil y adulto de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento de asepsia fue igual para los dos tipos de tejido, por lo que los resultados son indicativos de contaminación de tipo endógena, dada por bacterias y hongos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Basto et al. (2012) en *Cedrela montana* que informaron niveles de contaminación en el cultivo *in vitro* significativamente superiores para explantos adultos respecto a los juveniles. Similares resultados obtuvieron Méndez-Álvarez y Abdelnour-Esquivel (2014) en *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell, con niveles de contaminación de segmentos nodales adultos superiores al 40%, con distintos métodos de desinfección. Por su parte, Seth et al. (2005) en *Casuarina equisetifolia* Forst., refirieron que la tasa de contaminación en explantos adultos fue de 20% a 100%, dependiendo de la época de colecta y fue nula en material juvenil.

Al analizar el nivel de oxidación por tipo de explanto (Tabla 4), sólo en los explantos adultos se observó oxidación, que se mantuvo desde el día 25 hasta el término del periodo de evaluación (28%). Estos resultados coinciden con los obtenidos en olivo (*Olea europea*), donde explantos ontogénicamente juveniles tuvieron menor oxidación que los adultos (Roussos y Pontikis 2001; 2001a). En *Malosorbis florentina*, los tejidos obtenidos de plantas juveniles y los colectados de la base de árboles adultos (ontogénicamente juveniles) tuvieron

un porcentaje menor de oxidación comparados con los obtenidos de la zona superior de plantas adultas (Martini y Papafotiou 2013).

La oxidación de tejidos vegetales es una característica constante del cultivo *in vitro* (Benson 2000), pero la capacidad de responder ante este estrés depende en gran medida del tipo de tejido y principalmente, de la edad de éste (Dertinger et al. 2003; Munné-Bosch y Alegre 2002). Se sabe que existe una fuerte correlación entre la tolerancia al estrés y la capacidad antioxidante de plantas (Şen 2012). Según Munné-Bosch y Alegre (2002) es característico de los tejidos adultos presentar una disminución en las defensas antioxidantes. Tal es el caso de la disminución de las actividades antioxidantes de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutathion reductasa (GR), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Ye et al. 2000; Orendi et al. 2001; Munné-Bosch y Alegre, 2002; Dertinger et al. 2003), lo que dificulta la eliminación de las ROS de los tejidos, provocando una acumulación de estas con la edad (Benson 2000; Procházková y Wilhelmová 2007).

Durante la madurez de la planta, antes de entrar en la senescencia, comienza la disminución de compuestos antioxidantes existiendo una relación directa entre el estrés oxidativo y el envejecimiento en las plantas. Esto se demostró en *Cisztuz cluzii* Dunal, al observarse que las plantas de mayor edad presentaron menor actividad fotosintética, menor nivel de clorofila y los niveles de defensa antioxidante cloroplástica más bajos, junto con un aumento en la oxidación de lípidos, sin presentar síntoma de senescencia, durante o después del estudio (Munné-Bossh y Alegre 2002).

Al evaluar la tasa de mortalidad de segmentos nodales de *Castanea sativa*, en todas las variedades estudiadas, se pudo observar que en los explantos adultos fue significativamente mayor, con 64% al día 55, en comparación al 14% para explantos juveniles (Tabla 4). La muerte de los explantos se inició con una necrosis en el ápice, que se extendió hacia la base, comprometiendo el resto de los tejidos (Fig. 6).

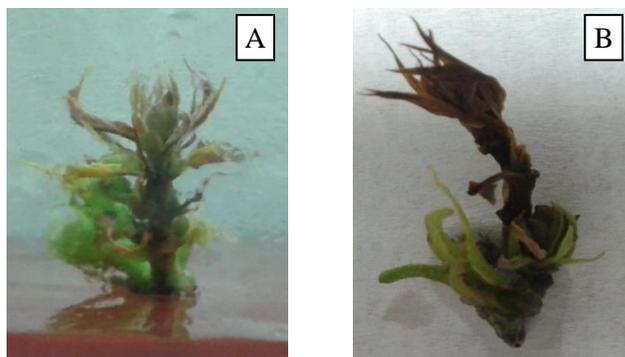


FIGURA 6. Muerte apical (A) y muerte total (B) de explantos de castaño (Marrone Chiusa di Pesio). Fuente: Elaboración propia.

La necrosis apical es un trastorno fisiológico que se observa comúnmente en cultivos *in vitro* y afecta a una amplia gama de plantas (Bairu et al. 2009a; Srivastava y Joshi 2013). Los primeros síntomas visibles de esta anomalía son el oscurecimiento del ápice seguido de la necrosis basipetala. Posteriormente, ocurre la senescencia y la muerte de las yemas apicales y finalmente del resto del explanto (Srivastava y Joshi 2013). Esta alteración puede deberse a diversos factores como deficiencia de nutrientes (calcio y boro), concentración de citoquininas, medio de cultivo, concentración de nutrientes, aireación, agente gelificante, pH y período de subcultivo (Bairu et al. 2009a).

Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos por Giovannelli y Giannini (1999) al introducir *in vitro* segmentos nodales de *Castanea sativa* Mill. El 50% de los explantos adultos presentó necrosis apical y posterior muerte, mientras para los juveniles lograron 100% de establecimiento, con respuesta morfogénica. En *Castanea sativa* la necrosis apical se asocia a una deficiencia de calcio y ausencia de citoquininas en el desarrollo de brotes (Piagnani et al. 1996; Bairu et al. 2009b) y a un déficit de citoquinina durante el desarrollo de raíces (Bairu et al. 2009b).

Según Vieitez et al. (1989) en cultivos de castaños y robles en crecimiento vigoroso, se observó el desarrollo de callo basal sugiriendo que este callo puede funcionar como un sumidero que atrapa algunos componentes que ayudan a la planta a superar ciertos síntomas de deficiencia, como la muerte apical. De acuerdo a los resultados obtenidos sólo el 52% de los explantos adultos logró formar callo basal (Tabla 2) y la mortalidad fue del 64% (Tabla 4). En el caso de los juveniles, la formación de callo fue en el 90% de los explantos (Tabla 2) y la

mortalidad del 14% (Tabla 4). De lo anterior se podría deducir que el callo basal formado podría beneficiar a los explantos durante el establecimiento *in vitro*.

Cuantificación de fenoles foliares totales de castaño.

En la Fig. 7 se muestra el contenido de compuestos fenólicos totales de tejido adulto y juvenil de castaño (Chiusa di Pesio). El análisis estadístico reveló que existe una significativa influencia de la edad del tejido en el contenido de compuestos fenólicos de los explantes. El tejido juvenil presentó mayor contenido de fenoles totales ($37 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ M.S}$) en comparación con el tejido adulto ($20 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ M.S}$).

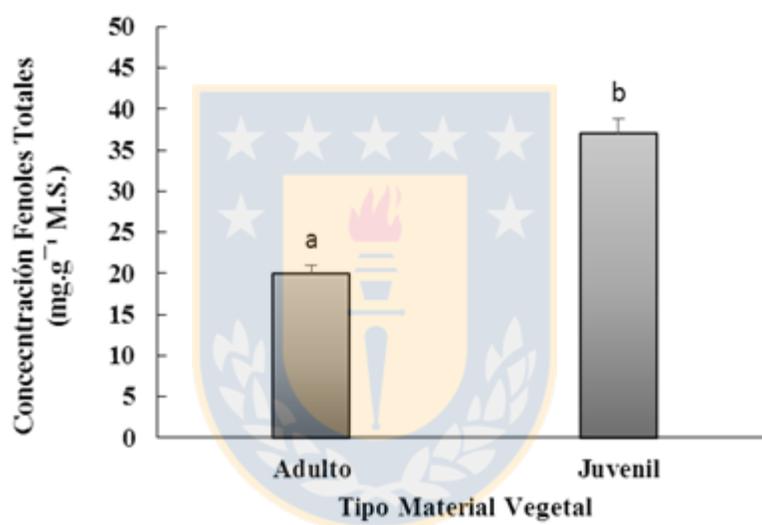


FIGURA 7. Contenido de fenoles totales ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ M.S}$) promedio en hojas de castaño, colectadas de árboles adultos y juveniles. Letras diferentes en las barras correspondientes a la misma variable de respuesta indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Las barras verticales corresponden al error estándar. Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados son similares a los descritos en *Zingiber zerumbet* (L.) donde el contenido total de fenoles fue mayor en hojas juveniles que en adultas (Ghasemzadeh et al. 2016). Resultados diferentes obtuvieron Roussos y Pontikis (2001, 2001a) en árboles de olivo (*Olea europea*) y Concepción et al. (2005) en guayaba (*Psidium guajava* L.), donde explantos juveniles tuvieron menor contenido de fenoles totales que los adultos. La correlación del contenido de fenoles foliares en castaño, con la respuesta obtenida en el establecimiento *in*

in vitro de explantos juveniles y adultos (Tabla 2), permite inferir que los fenoles presentes en el material juvenil favorecieron el desarrollo morfológico de los explantos en el cultivo de tejidos.

El análisis del perfil cromatográfico de compuestos fenólicos en material joven y adulto de castaño (Marrone Val di Sussa) (Fig. 8), muestra que el 90% de los compuestos son del mismo tipo en el tejido joven (Fig. 8A). En cambio, en el material adulto aparece mayor variedad de compuestos fenólicos (Fig. 8B).

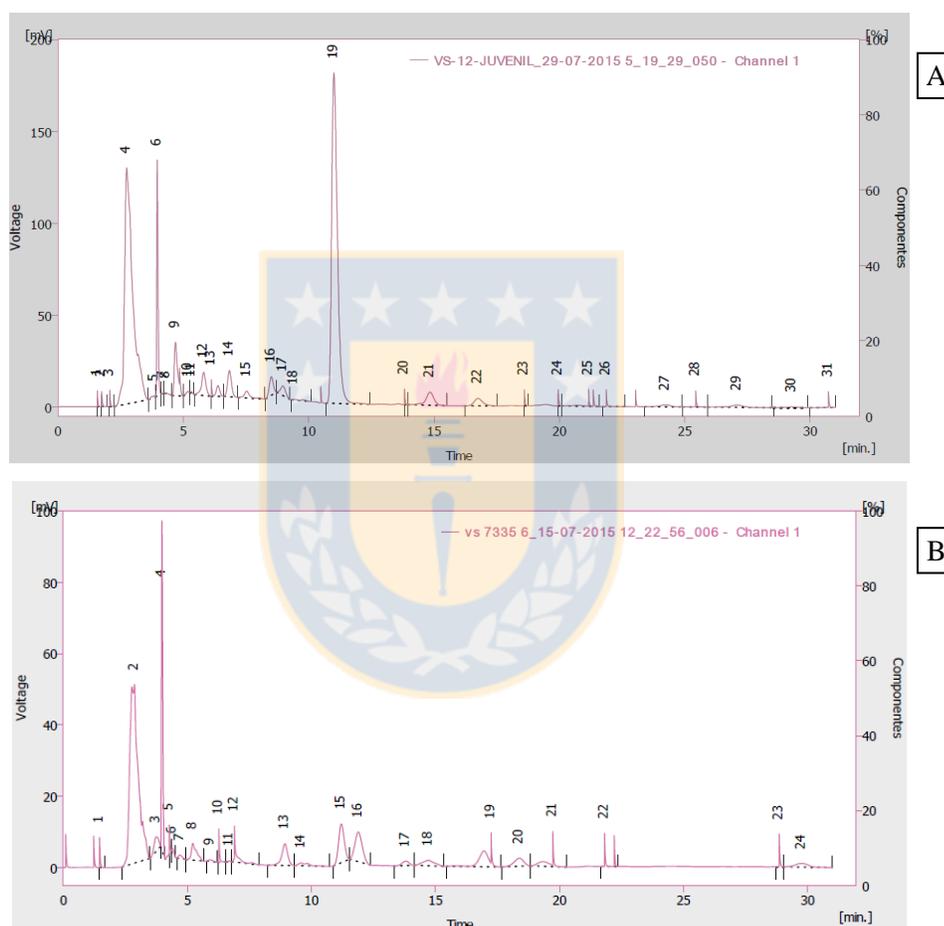


FIGURA 8. Cromatograma HPLC de extractos fenólicos de material vegetal juvenil (A) y adulto (B) de castaño (Marrone Val di Sussa). Fuente: Elaboración propia.

En la Fig. 9A aparece el espectro UV del extracto fenólico obtenido de material juvenil. El análisis del mismo permite confirmar que el compuesto mayoritario en el tejido analizado corresponde a ácido elálgico. El análisis de los espectros UV de extractos provenientes de

tejido adulto corroboró la presencia mayoritaria de dos compuestos, que por sus tiempos de retención corresponden a ácido elágico (Fig. 9B) y rutina (Fig. 9C), respectivamente.

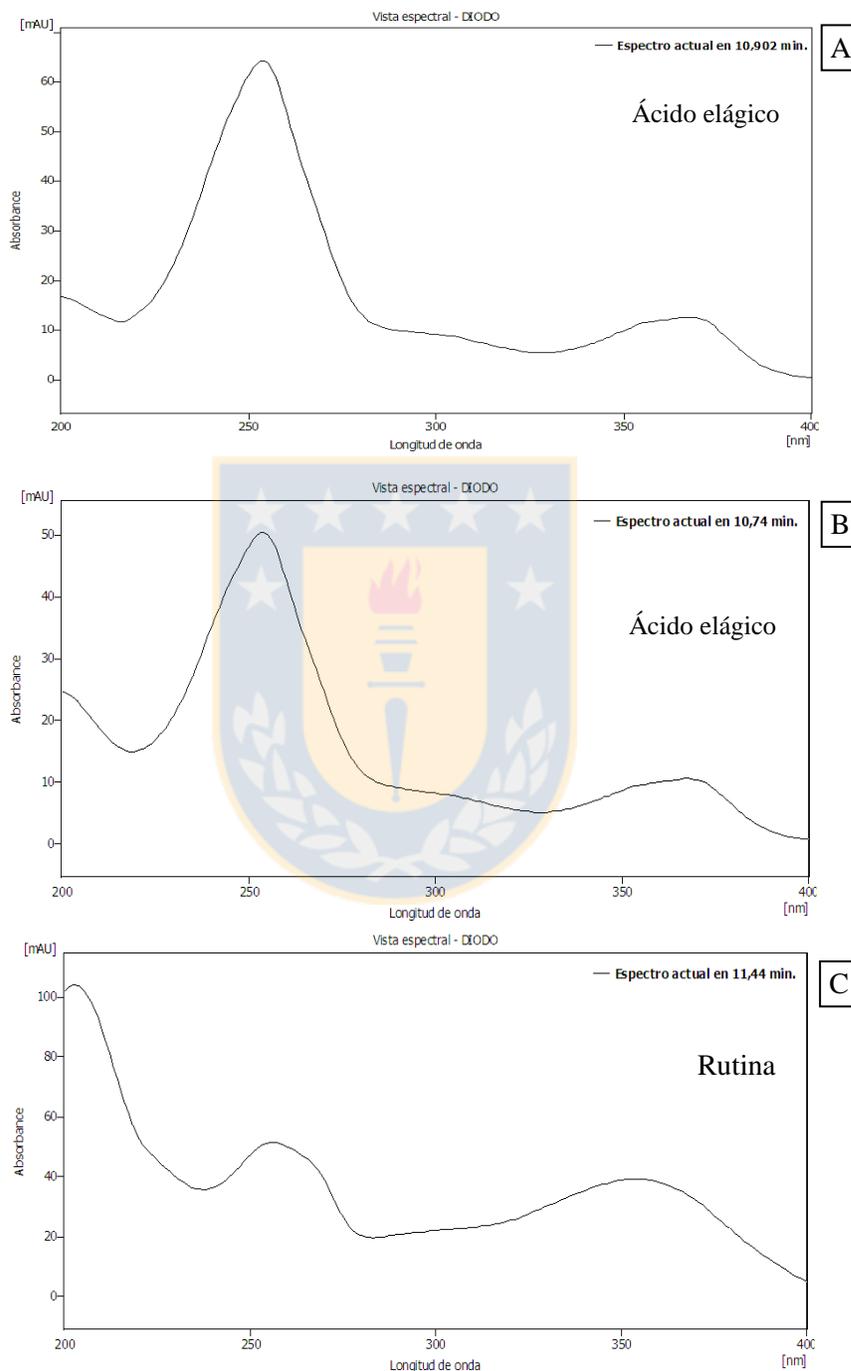


FIGURA 9. Espectro de absorbancia correspondiente a extractos fenólicos de tejido juvenil y adulto de castaño (Marrone Val di Susa). El compuesto mayoritario en el tejido juvenil con

tiempo de retención de 10,902 minutos corresponde a ácido elágico (máximos de absorbancia a 253,7 nm y 365,3 nm) (A). Los compuestos mayoritarios en el tejido adulto, correspondiente a ácido elágico (B) con máximos de absorbancia a 253,7 nm y 365,3 nm de longitud de onda y tiempo de retención de 10,74 minutos y rutina (C) con máximos de absorbancia a 204,4 nm - 257,4nm - 354,9 nm de longitud de onda y tiempo de retención 11,44 minutos. Fuente: Elaboración propia.

En la Fig. 10 aparecen los resultados de la cuantificación del contenido de rutina y ácido elágico en extractos de material juvenil y adulto de castaño. Se puede observar que en el material juvenil el ácido elágico corresponde al 90% aproximadamente del total de compuestos fenólicos presentes en este tejido; siendo significativamente superior al detectado en extractos de tejido adulto. Por otra parte, la rutina sólo fue cuantificables en extractos provenientes de tejido adulto.

Resultados similares se observaron en *Dimorphandra mollis* (Lucci y Mazzafera 2009) y en *Zingiber zerumbet* (L.) (Ghasemzadeh et al. 2016), donde se registró un aumento de la concentración de rutina con la edad del tejido.

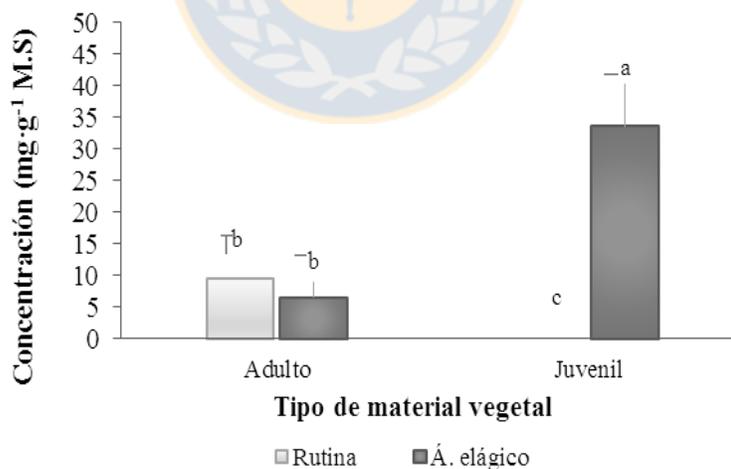


FIGURA 10. Concentración de Rutina y Ácido Elágico ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ M.S) en extractos fenólicos de material vegetal total juvenil y adulto de castaño.

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. Fuente: Elaboración propia.

Correlación entre las respuestas morfogénicas observadas en el establecimiento *in vitro* de segmentos juveniles y adultos de castaño con el contenido de rutina y ácido elágico.

Las respuestas *in vitro* fueron significativamente distintas entre los explantos juveniles y adultos, corroborando que este último es mucho más difícil de propagar debido a la baja respuesta y a los altos niveles de contaminación, oxidación y de muerte apical, lo que termina en la muerte total del explanto. Al analizar los compuestos fenólicos presentes en cada uno de los tejidos, se pudo identificar la presencia de ácido elágico en cantidades significativamente superiores en el tejido juvenil.

El ácido elágico (EA) es un ácido polifenólico natural que se encuentra en más de 46 frutas diferentes y otros alimentos de origen vegetal (Amakura et al. 2000), y puede estar presente en forma libre en especies vegetales como producto del metabolismo o encontrarse como precursor de un tipo de tanino condensado como son los elagitaninos (Kaponen y Happonen 2007). Es de gran importancia al tener la capacidad de proteger a las plantas contra el estrés por su actividad antioxidante (Valdés et al. 2011; El-Soud et al. 2013; Khan et al. 2017) y de protección contra patógenos y plagas (Vekiari et al. 2009).

El ácido elágico fue designado por McPherson et al. (2013) como predictor de resistencia a *Phytophthora ramorum* en *Quercus agrifolia* Nee, al identificar este compuesto en el floema de árboles adultos putativamente resistentes a este patógeno y no así en los árboles susceptibles a él. Por otra parte, Zhou et al. (2007) demostraron que dos glicósidos de ácido elágico aislados de *Gleditzia sinensis* Lam. (*Fabaceae*) exhibieron actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo de ráfaga de arroz *Magnaporthe grisea*.

Si relacionamos el alto contenido de ácido elágico en las hojas de plantas juveniles (Fig. 10) y su característica de biocida, podríamos responder el por qué es más baja la contaminación observada en los explantos proveniente de estas plantas, a diferencia de los explantos adultos cuyas hojas presentaron una cantidad significativamente inferior de este compuesto y cuyo establecimiento *in vitro* se vio afectado por una alta contaminación microbiana (Tabla 4). Por otra parte, al analizar la oxidación de los explantos, fue significativamente inferior en los tejidos juveniles (Tabla 4), lo que podría estar relacionado con la actividad antioxidante del ácido elágico, esto podría responder por qué el tejido juvenil no presentó explantos oxidados a diferencia de los adultos.

Otro compuesto fenólico que se logró identificar sólo en el tejido adulto fue la rutina, flavonoide natural presente en las plantas (Liang et al. 2005), el cual afecta negativamente el desarrollo morfológico de los tejidos, ya que puede reducir compuestos como el calcio, magnesio, nitrógeno, hierro y zinc (Hussain y Reigosa 2014), afectando el crecimiento de las raíces e induciendo la senescencia temprana de los tejidos (Hepler 2005; Himelblau y Amasino 2001; Imai et al. 2008). Por otra parte, este flavonoide actúa como inhibidor del transporte de auxina (Murphy et al. 2000; Peer y Murphy 2007) lo que afecta la disponibilidad de la hormona en los tejidos en desarrollo (Sampathkumar et al. 2014). Considerando lo anterior, la baja capacidad morfogénica observada en el tejido adulto de castaño pudo deberse a los contenidos de rutina. La presencia de este flavonoide en los tejidos, pudo inhibir el transporte de auxinas, que están directamente relacionadas con la estimulación y desarrollo de las yemas vegetativas. Murphy et al. (2000), Brown et al. (2001) y Aloni et al. (2003) informaron que los flavonoides inhiben el flujo de salida de su sitio de síntesis y el transporte basipetal de auxina endógena. Por otra parte, también se podría asociar el contenido de rutina con la alta mortalidad observada, producto de la necrosis apical en los explantos adultos, ya que este compuesto está asociado a una reducción del calcio y en *Castanea sativa* la necrosis apical se asoció a una deficiencia de este elemento (Piagnani et al. 1996; Bairu et al 2009b).

IV. CONCLUSIONES

Explantos provenientes de plantas adultas presentaron mayor oxidación, contaminación y mortalidad que los provenientes de plantas juveniles.

Explantos provenientes de plantas juveniles presentaron mayor respuesta morfogénica en el cultivo *in vitro*, evaluada en la capacidad de reacción al establecimiento, formación de callo basal y formación de brotes.

Existe un efecto de la edad del tejido sobre los compuestos de tipo fenólico, ya que en el caso del ácido elálgico el contenido es significativamente superior en los explantos juveniles con respecto a los adultos y la rutina sólo se detectó en los tejidos adultos.

La presencia y cantidad de compuestos fenólicos como la rutina y el ácido elálgico podrían estar influyendo en las respuestas observadas en el establecimiento *in vitro* de explantos adultos y juveniles de castaño.



V. REFERENCIAS

- Amakura Y, Okada M, Tsuji S, Tonogai Y (2000) High performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *J. Chrom.* 896: 87-93.
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ulrich CI (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta.* 216(5):841-53.
- Bairu MW, Stirk WA, Staden JA (2009) Factors contributing to *in vitro* shoot-tip necrosis and their physiological interactions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 98:239-248.
- Bairu MW, Jain N, Stirk WA, Dolezal K, Staden JV (2009) Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany.* 75:122-127.
- Ballester A, Bourrain L, Corredoira E, Gonçalves JC, Lê CL, Miranda Fontañña ME, San-José MC, Sauer U, Vieitez AM, Wilhelm E (2001) Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. *For. Snow Landsc. Res.* 76:460-467.
- 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.
- Becerra DC, Forero AP, Gongora GA (2004) Age and physiological condition of donor plants affect *in vitro* morphogenesis in leaf explants of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. *Plant Cell Tiss. Org.* 79:87-90.
- Beffa R, Martin H, Pilet P (1990) *In vitro* Oxidation of indol acetic acid by Soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots. *Plant Physiology* 94: 485-491.
- Benson E (2000) Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* 36(3):141-148.

- Brown DE, Rashotte AM, Murphy AS, Normanly J, Tague BW, Peer WA, Taiz L, Muday GK (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 126:524-535.
- Buer CS, Imin N, Djordjevic MA (2010) Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *Journal of Integrative Plant Biology.* 52 (1):98-111.
- Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss SH (2003) Forestry's Fertile Crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal*, 1:141-154.
- Concepción O, Nápoles L, Pérez AT, Peralta N, Hernández M, Trujillo R (2005) Efecto de tres antioxidantes en el cultivo *in vitro* de ápices de guayaba (*Psidium guajava* L.). Relación entre el origen del explante y el contenido de compuestos fenólicos. *Cultivos Tropicales*, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba. 26 (1):33-39.
- Cuenca B, González L, Fernández MR, Ocaña L (2009) Micropropagación de genotipos adultos de *Castanea sativa* Mill. seleccionados por resistencia a *Phytophthora cinnamomi*. En: Congreso Forestal Español 5. Libro de Resúmenes. Ávila. España.
- Dastmalchi K, Dorman H, Kosar M, Hiltunen R (2007) Chemical composition and *in vitro* antioxidant evaluation of a water soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Lebens Wissen un Technol.* 40: 239-248.
- Dayal S, Lavanya M, Devi P, Sharma KK (2003) An efficient protocol for shoot regeneration and genetic transformation of Pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Mill. sp.) using leaf explants. *Plant Cell Reports.* 21:1072-1079.
- Debergh PC, Read PE (1991) Micropropagation. En: Debergh, P. y Zimmerman, R. H. (Eds.). *Micropropagation: Technology and Application.* Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp: 1-13.
- De Klerk GJ, Ter Brugge J, Marinova S (1997) Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in Malus 'Jork 9'. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 49:39-44.

- Dertinger U, Schaza U, Schulze E (2003) Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum*. 119:19-29.
- El-Soud WA, Hegab MM, Abdelgawad H, Zinta G, Han A (2013) Ability of ellagic acid to alleviate osmotic stress on chickpea seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 71: 173-183.
- Famiani F, Ferradini N, Staffolani P, Standardi A (1994) Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M26 apple rootstock. *Journal of Horticultural Science*. 69:679-685.
- Fernández-Lorenzo J, Riguiero A, Ballester A (1999) Polyphenols as potencial markers to differentiate juvenile and mature chestnut shoot cultures. *Tree Physiology*. 19:461-466.
- Fernández- Lorenzo J, Rodríguez S, Veiga M (2001). Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: Libro de Comunicaciones II Congreso Forestal español, Granada 2001, 25-28 Sept., pp. 742-749.
- García JL, Avidan N, Troncoso A, Sarmiento R, Lavee S (2000) Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Scientia Horticulturae*. 85(4): 271-284.
- Gebhart K, Fruhwacht-Wilms V, Weisgerber H (1993) Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes. *Annales des Sciences Forestieres*. 50:323-329.
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture, Part 2. In: Practice. 2 ed. Exegetics Limited, Basingstoke, Pp: 799.
- 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*. 23:633-640.
- Giovannelli A (1999) Rizogenesi avventizia in frammenti cotiledonari di Castagno (*Castanea sativa* Mill.). *Ital. Hort*. 6:15-18.

- Giovannelli A, Giannini R (1999) Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae*. 494:243-245.
- Giovannelli A, Giannini R, Bennici A, Mori B (2004) *In vitro* organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cotyledon explants: responses to growth regulators and developmental aspects. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 40(5):509-514.
- Ghasemzadeh A, Jaafar HZE, Ashkani S, Rahmat A, Juraimi AS, Puteh A, Mohamed MTM (2016) Variation in secondary metabolite production as well as antioxidant and antibacterial activities of *Zingiber zerumbet* (L.) at different stages of growth. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 16:104.
- Gutiérrez D, Ürtiz CH, García y Mendoza A (2008) Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. UAQ. México. Pp. 1-5.
- Hasbún R (2005) Monitorización (epi)-genética del desarrollo y producción de planta de castaño (*Castanea sativa* Mill.). Tesis doctoral. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. España. 234 pp.
- Hepler PK (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*. 17:2142-2155.
- Himelblau E, Amasino RM (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*. 158(10):1317-1323.
- Hodges DM, Forney CF (2000) The effects of ethylene, depressed oxygen and elevated carbon dioxide on antioxidant profiles of senescing spinach leaves. *J. Expt. Bot*. 51:645-655.
- Hussain MI, Reigosa MJ (2014) Higher peroxidase activity, leaf nutrient contents and carbon isotope composition changes in *Arabidopsis thaliana* are related to rutin stress. *Journal of Plant Physiology*. 171(15):1325-1333.
- Ibrahim R, Debergh PC (2001) Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.). *Scientia Horticulturae*. 88: 41-57.

- Ikeuchi M, Ogawa Y, Iwase A, Sugimoto K (2016) Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. The Company of Biologists Ltda. 143, 1442-1451 doi:10.1242/dev.134668
- Imai K, Suzuki Y, Mae T, Makino A (2008) Changes in the synthesis of Rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx. *Annals of Botany*. 101(1):135-144.
- Jiménez A, Hernández J, Pastori G, Del Rio L, Sevilla F (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescent of pea leave. *Plant Physiol*. 118:1327-1335.
- Kaponen JM, Happonen AM (2007) Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:1612-1619.
- Khan A, Nazar S, Lang I, Nawaz H, Hussain MA (2017) Effect of ellagic acid on growth and physiology of canola (*Brassica napus* L.) under saline conditions. *Journal of Plant Interactions*. 12(1): 520–525.
- Liang H, Sagawa Y, Li QX (2005) Effects of rutin on vegetative growth of mung bean (*Vigna radiata*) seedlings and its interaction with indoleacetic acid. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. 31(4): 361-368.
- Lucci N, Mazzafera P (2009) Distribution of rutin in fava d'anta (*Dimorphandra mollis*) seedlings under stress. *Journal of Plant Interactions*. 4(3): 203-208.
- Ma D, Li Y, Zhang J, Wang C, Qin H, Ding H, Xie Y, Guo T (2016) Accumulation of Phenolic Compounds and Expression Profiles of Phenolic Acid Biosynthesis-Related Genes in Developing Grains of White, Purple, and Red Wheat. *Front Plant Sci*. 7: 528.
- Marko D, Puppel N, Tjaden Z, Jakobs S, Pahlke G (2004) The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signalling cascades regulating cell proliferation. *Mol Nutr Food Res*. 48(4):318-325.

- Martini A, Papafotiou M (2013) Effects of plant growth regulators and environmental factors on *in vitro*: Propagation of *Malosorbus florentina*. Propagation of Ornamental Plants. 13(3):112-122.
- Mazumdar P, Basu A, Paul A, Mahanta C, Sahoo L (2010) Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Jatropha curcas* L. South Afri. J. Bot. 76(2):337-344.
- Mcpheerson BA, Mori SR, Opiyo SO, Conrad AO, Wood DL, Bonello P (2014) Association between resistance to an introduced invasive pathogen and phenolic compounds that may serve as biomarkers in native oaks. Forest Ecology and Management. 312: 154-160.
- 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.
- Méndez-Álvarez D, Abdelnour-Esquivel A (2014) Establecimiento *in vitro* de *Terminalia amazonia* (Gmel.) Excell. Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica). 11(27): 7-21
- Merkle S, Nairn C (2005). Hardwood tree biotechnology. *In vitro* Cell Dev Biol Plant. 41:602-619.
- Monteuuis O (2004) *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In vitro* Cellular and Developmental Biology Plant. 40(1):102-107.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2002) Plant aging increases oxidative stress in chloroplasts. Planta. 214(4):608-15.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plants. 15:473-479.

- Murphy A, Peer W, Taiz L (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 211:315-324.
- Murthy HN, Pyati AN (2001) Micropropagation of *Aerides maculosum* Lind. (*Orchidaceae*). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 37: 223-226.
- Orendi G, Zimmermann P, Baar C, Zentgraf U (2001) Loss of stress-induced expression of catalase3 during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana* is restricted to oxidative stress. *Plant Science*. 161(2):301-314.
- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 126:536-548.
- Peer WA, Murphy AS (2007) Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*. 12: 556–563.
- Piagnani C, Zocchi G, Mignani I (1996) Influence of Ca²⁺ and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. *Plant Sci*. 118:89-95.
- Procházková D, Wilhelmová N (2007) Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. *Biol. Plant*. 51:401-406.
- Roussos PA, Pontikis CA (2001) Oxidative browning in 'Koroneiki' olive explants as influenced by oxidative enzyme activities and endogenous phenolic compounds. *J. Hort. Sci. Biotechnol*. 76:441-446.
- Roussos PA, Pontikis CA (2001a) Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*. 66(6):298-303.
- Sampathkumar A, Yan A, Krupinski P, Meyerowitz EM (2014) Physical forces regulate plant development and morphogenesis. *Current Biology*. 24(10):475-483.
- Sánchez MC, Ballester A, Vieitez AM (1997) Reinvigoration treatments for the micropropagation of mature chestnut trees. *Ann. Sci. For*. 54:359-370.

- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomes M, Romero-Puertas M, Del Rio LA (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *52(364):2115-26*.
- San José MC, Ballester A, Vieitez AM (2001) Effect of thidiazuron on multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary nodes of chestnut. *J. Hortic. Sci. and Biotech. 76: 588-595*.
- Santos R, Herouart D, Sigaud S, Touati D, Puppo A (2001) Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact. 14(1): 86-89*.
- Seth R, Kendurkar S, Nadgauda R (2007) *In vitro* clonal propagation of *Casuarina equisetifolia* Forst. From mature tree-derived explants. *Current Science. 92(3): 287-290*.
- Şen A (2012) Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. In: Amr El-Missiry M., (Eds) Antioxidant Enzyme. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. InTech, pp.59-88.
- Srivastava A, Joshi A (2013) Control of Shoot Tip Necrosis in Shoot Cultures of *Portulaca grandiflora* Hook. *Not Sci Biol. 5(1):45-49*.
- Sun Y, Zhao Y, Wang X, Qiao G, Chen G, Yang Y, Zhou J, Jin L, Zhuo R (2009) Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment. *Acta Physiologia Plantarum. 31: 33-41*.
- Thomas TD (2003) Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. *Biologia Plantarum. 46: 529-533*.
- Valdés AE, Centeno ML, Fernández B (2003) Changes in the branching pattern of *Pinus radiata* derived from grafting are supported by variations in the hormonal content. *Plant Sci. 165: 1397-1401*.

- Valdés AJA, Buenrostro-Figueroa JJ, Guilera-Carbo AA, Prado-Barragán A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2011) Ellagitannins: biosynthesis, biodegradation and biological properties. *Journal of medicinal plant research*. 5(19): 4696-4703.
- Vekiari SA, Lambrinea H, Merkouri P, Gordon M, García-Macías P (2009) Ellagic Acid in Chestnut Wood. *Acta Hort.* 815: 95-98.
- Vidal N, Arellano G, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2003) Development stages during the rooting of *in vitro* cultured *Quercus robur* shoots from material of juvenile and mature origin. *Tree Physiol.* 23:1247–1254.
- Vieitez A, Sánchez M, García-Nimo M, Ballester A (2007) Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. En: *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (Jain S.M. y Häggman H. eds.), pp. 299-312. Springer, Heidelberg.
- Vieitez AM, Sanchez C, San-José C (1989) Prevention of shoot tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae*. 41:101–109.
- Volpert R, Osswald W, Elstner EF (1995) Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*. 38:19-22.
- Ye Z, Rodríguez R, Tran A, Hoang H, De Los Santos D, Brown S, Vellanoweth RL (2000) The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 158:115-127.
- Zhang XZ, Zhao YB, Li CM, Chen DM, Wang GP, Chang RF, Shu HR (2007) Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *Journal of Plant Physiology*. 164(5): 574-580.
- Zhou L, Li D, Jiang W, Qin Z, Zhao S, Qiu M, Wu J (2007) Two ellagic acid glycosides from *Gleditsia sinensis* Lam. with antifungal activity on *Magnaporthe grisea*. *Nat Prod Res.* 21(4):303-309.

DISCUSION GENERAL

El área silvoagrícola ha ido tomando una importancia de relevancia en el sentido de utilizar especies vegetales que tengan doble propósito y que respondan a la creciente demanda de productos como madera y alimentos, considerándose la calidad un factor crítico para mantener la competitividad de la industria chilena (Grau, 2009). *Castanea sativa* Mill. surge como una especie de interés, ya que variedades de esta especie, introducidas a Chile desde Europa, son ampliamente cultivadas por su fruto cuya calidad marrone es apetezido en el mercado de las delicatessen a nivel mundial.

Por otra parte, en esta especie se han utilizado diversos sistemas para identificar la gran cantidad de variedades que ha generado a lo largo del tiempo, siendo la identificación molecular la que ha tenido los mayores avances y mayores ventajas sobre otro sistema de identificación, como el morfológico. Dentro de los tipos de marcadores moleculares, los Microsatélites son los más utilizados.

Cuando se requiere masificar y transferir toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia es necesario contar con un tipo de propagación que lo permita. Tal es el caso de la propagación vegetativa donde las plantas obtenidas son iguales a la planta madre seleccionada (Sánchez et al., 2005). Esta especie, al igual que otras leñosas, es altamente recalcitrante a ser reproducida vegetativamente (Vieitez et al., 1983, Caboni et al., 1996, Sierra, 2001), lo que dificulta el proceso de producción masiva. Factores como el genotipo y edad de la planta donante influyen en la capacidad morfogénica de los tejidos (Ballester et al. 1999, Gubis et al. 2003, George et al. 2008). A este último factor, se asocian algunos compuestos fenólicos que varían con la ontogenia de los tejidos afectando positiva o

negativamente la propagación de un explanto (Volpert et al. 1995, George 1996, Arnaldos et al. 2001, Hernández y González, 2010).

Desde los primeros estudios sobre la morfogénesis *in vitro* y aún en la actualidad se reconoce la capacidad que tienen ciertos grupos de plantas para responder con mayor rapidez a la formación de nuevas estructuras u órganos *in vitro*, repuesta morfogénica que se da ante la presencia de un estímulo. La comprensión de toda la fisiología de las plantas donantes puede ser crítica para establecer protocolos exitosos que dependen del genotipo, las condiciones ambientales, estado fisiológico y ontogénico (Benson, 2000). Para una especie dada, los factores endógenos y ambientales como el genotipo, el tejido y el momento de la escisión, la posición del explante dentro de la planta madre, la fenología, la maduración del árbol y compuestos de origen fenólico en la planta madre podrían ser limitantes para la regeneración (Bonga et al., 2010, Rutledge et al., 2013). 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 y 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 (Kyoizuka, 2007).

Las variedades productoras de frutos tipo marrone fueron introducidas a Chile, forman parte de algunos huertos productivos y producen frutos que cumplen con los estándares de calidad establecidos en el mercado internacional (Bounous, 2002, Grau, 2003). Si bien el material vegetal fue introducido a Chile siguiendo severas normas de cuarentena, la identidad de cada variedad no fue chequeada. Evidencias de asignación errórea han sido evidenciadas en Chile en huertos de producción de frutos de castaño (Bounous et al., 2005), por lo que es necesario

validar la identidad genética de las variedades con interés productivo antes de iniciar un sistema de producción de plantas.

Los Microsatélites son los más utilizados para la caracterización genética en *Castanea* sp. (Botta et al., 1999) y estos se han caracterizados en *Castanea sativa* Mill. (Marinoni et al., 2003, Buck et al., 2003) y aplicados en estudios de poblaciones naturales, cultivares e incluso híbridos eurojaponeses (*C. crenata* x *C. sativa*), flujo de genes en poblaciones europeas (Botta et al., 2004), logrando detectar niveles variables de diversidad genética y al mismo tiempo casos de sinonimia u homonimia entre cultivares (Botta et al., 1999, Botta et al., 2001, Buck et al., 2003, Marinoni et al., 2003, Yamamoto et al., 2003, Boccacci et al. 2004, Gobbin et al. 2007, Martín et al., 2009, Martín et al., 2010a, Martín et al., 2010b).

Los resultados validaron la hipótesis de asignación errónea y mal etiquetado de las muestras, ya que de los nueve cultivares sólo tres (Bouche Rouge, Castell Borello y Citta di Castello) estaban correctamente identificados. Esto es de gran importancia, ya que errores de este tipo se constatan años después, cuando se empieza a obtener las primeras producciones y es difícil revertir el error (Grau, 2009). Al calcular la distancia genética entre todas las muestras analizadas, se obtuvo un agrupamiento entre las muestras de Bouche Rouge, Marrone Citta di Castello y Castell Borello con su respectivo cultivar, verificando la correcta identificación de estas variedades. También logra hacer una separación entre los cultivares Italianos identificados y Bouche Rouche, este último de origen Francés. Precoce Migoule tuvo diferencias genotípicas intracultivar, detectándose cuatro genotipos, uno de ellos igual a Castell Borello. Esto último podría deberse a problemas de manejo y manipulación dentro del huerto.

Al corroborar errores en la tipificación de las variedades cultivadas se reafirma la importancia que tiene validar la identidad genética de las plantas de interés antes de establecer un programa de producción de plantas, ya que las respuestas a los tratamiento *in vitro* son especie-dependiente e incluso dependientes de la variedad o cultivar, por lo que al basarse en protocolos específicos de una variedad y si estos no son los correspondientes, se corre el riesgo de no obtener los resultados esperados (Tichá et al., 1998, Carvalho et al., 2001).

El perfil genético obtenido en Italia para las plantas provenientes de semilla se utilizó para ver qué tan distante son estas muestras con respecto a la planta madre y determinar su posible polinizador. En la distribución de estas muestras se detecta un patrón similar de distancia entre estas plantas y su respectiva planta madre, es decir, todas mantienen una distancia dada por más de un partidador. PM1 sólo coincide con su planta madre con el partidador CsCAT1, con CsCAT 16 en el segundo alelo y con EMCs38 y QpZAG119 en el segundo. Por otra parte, Marigoule coincide con CsCAT 3 en el primer alelo, siendo la muestra más distante con su planta madre. CC1 coincide con QpZAG119, CsCAT 3 en el primer alelo y con CsCAT16 y EmCs38 con el segundo alelo. PM1 y CC1 se acercan más a los genotipos chilenos Chiusa di Pesio y Marrone di Cuneo y las muestras VS3, VS7 y M1, cercanos a PM 750 y PM 757. La distancia que se observa entre las muestras de semillas de Val di Sussa (VS3 y VS7) y que está dada por la diferencia en el perfil genérico entre las dos muestras, fue detectado por el partidador CsCAT1 en el primer alelo y EMCs38 en el segundo. A su vez, la distancia entre estas dos muestras y la planta madre está dada por grandes diferencias en el perfil genético. Sólo coinciden las tres muestras con el partidador QpZAG 119 en el primer alelo y VS3 con la planta madre en el partidador EMCs38 en el segundo alelo.

Estos resultados demuestran la variabilidad que hay entre plantas de una misma variedad, pero provenientes de semilla. Debido a esto, al establecer un huerto con plantas provenientes de propagación sexual se obtiene una desuniformidad muy grande, la cual se puede apreciar no sólo en el tipo de fruto que producen, sino además en la forma de los árboles, época de floración, madurez del fruto, etc. (Grau 2009).

Castanea sativa Mill. es una especie autoestéril, por lo que necesita forzosamente recibir polen de otro ejemplar, en lo posible con una concordancia en la floración de los sexos opuestos y que el fruto de éste tenga un cierto valor comercial. (Breisch, 1995, Bounous, 2002, Grau, 2009). Las variedades Precoce Migoule y Marigoule se caracterizan por su precocidad al momento de entrar en brotación y además, presentan flores masculinas longistaminada, por lo que son consideradas buenas polinizadoras. Esto es de gran importancia, ya que genera una gran problemática al verificar que estos cultivares no son la variedad en la cual están tipificados, por lo tanto no estarían cumpliendo su función dentro del huerto.

Al evaluar el efecto del genotipo y la fuente de citoquinina, para el porcentaje de contaminación de explantos en las variedades Val di Susa, Citta di Castello y Chiusa di Pesio, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con BAP y TDZ, además, en Bouche Rouche y Marrone di Cuneo 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 Val di Susa y Citta di Castello no hubo diferencias entre los tratamientos con BAP y TDZ, a diferencia de Bouche Rouche, Marrone di Cuneo y Chiusa di Pesio, donde sí existieron diferencias. En el caso de Bouche Rouche y Chiusa di Pesio el mayor porcentaje de oxidación se dio con TDZ y en Marrone di Cuneo 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 Bouche Rouche que tuvo mayor formación de callo basal con BAP. Esto no permite concluir un efecto de la fuente de citoquinina. Con respecto al genotipo sí hubo un efecto en la respuesta obtenida, ya que las variedades Citta di Castello y Chiusa di Pesio fueron significativamente superiores en la formación de callo basal y la reacción de explantos. Los resultados expuestos coinciden con los obtenidos en otras investigaciones, donde la tasa de multiplicación (Miranda-Fontaíña & Fernández-López, 2001, Hasbún et al., 2009), tasa de brotación (Corredoira et al., 2011), requerimientos lumínicos y respuesta al enraizamiento adventicio, 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).

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 Citta di Castello y Chiusa di Pesio. 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, Bouche Rouche, Val di Sussa y Marrone di Cuneo, 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.

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 y 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*.

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 y 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.

Al evaluar el efecto de la edad de la planta madre, las respuestas *in vitro* fueron significativamente distintas entre los explantos juveniles y adultos, corroborando que este último es mucho más difícil de propagar debido a la baja respuesta y a los altos niveles de contaminación, oxidación y de muerte apical, lo que termina en la muerte total del explanto.

Las tasas de respuesta, formación de callo basal y brotación llegó al 90% en los explantos juveniles siendo significativamente superior a los observados en los explantos adultos (52%). Además, estos explantos llegaron a etapas de subcultivo, logrando tener explantos con brotes cercanos a los 6 cm de longitud y sus tasas de contaminación y oxidación fueron significativamente inferiores que los obtenidos en los explantos adultos.

La mortalidad, iniciada con la necrosis apical en los explantos fue significativamente superior en los explantos adultos, concordando estos resultados con los obtenidos por Giovannelli y Giannini (1999) con la introducción *in vitro* de segmentos nodales de *Castanea sativa* Mill., donde el 50% de los explantos adultos presentó necrosis apical y posterior muerte, a diferencia de los juveniles los cuales el 100% logró establecerse y tener una respuesta morfogénica.

La necrosis apical es un trastorno fisiológico que se observa comúnmente en cultivos *in vitro* y afecta a una amplia gama de plantas (Bairu et al., 2009, Srivastava y Joshi, 2013). En *Castanea sativa* Mill. se asocia a una deficiencia de calcio y ausencia de citoquininas en el desarrollo de brotes (Piagnani et al., 1996, Bairu et al., 2009) y a una deficiencia de citoquinina durante el desarrollo de raíces (Vieitez et al., 1989, Bairu et al., 2009). Según Vieitez et al. (1989) en cultivos de castaños y robles en crecimiento vigoroso se observó el desarrollo de callo basal sugiriendo que este callo puede funcionar como un sumidero que atrapa algunos componentes que ayudarían a la planta a superar ciertos síntomas de

deficiencia, como la muerte apical. De acuerdo a los resultados obtenidos sólo el 52% de los explantos adultos logró formar callo basal y la mortalidad fue del 64%. En el caso de los juveniles, la formación de callo fue del 90% de los explantos y la mortalidad fue del 14%. De lo anterior se podría deducir que el callo basal formado podría beneficiar a los explantos durante el establecimiento *in vitro*.

Al analizar los compuestos fenólicos presentes en cada uno de los tejidos foliares de las plantas madres, en el tejido juvenil se detectó uno en gran cantidad, superior al resto de los compuestos presentes, el cual se identificó como ácido elágico. Si relacionamos este compuesto y su característica de biocida, podríamos responder el por qué es más baja la contaminación observada en los explantos proveniente de estas plantas, a diferencia de los explantos adultos cuyas hojas presentaron una cantidad significativamente inferior y cuyo establecimiento *in vitro* se vio afectado por una alta contaminación microbiana.

Por otra parte, al analizar la oxidación de los explantos, la cual fue significativamente inferior en los tejidos juveniles y consideramos la actividad antioxidante del ácido elágico, esto podría responder por qué el tejido juvenil no presentó explantos oxidados a diferencia de los adultos.

La rutina fue el compuesto que sólo se detectó en las hojas de plantas adultas. Este flavonoide natural presente en las plantas (Liang et al., 2005), afecta negativamente el desarrollo morfológico de los tejidos, ya que puede reducir compuestos como el calcio, magnesio, nitrógeno, hierro y zinc (Hussain y Reigosa, 2014), afectando el crecimiento de las raíces e induciendo la senescencia temprana de los tejidos (Himmelblau y Amasino, 2001, Hepler, 2005, Imai et al., 2008). Por otra parte, este flavonoide actúa como inhibidor del transporte de

auxina (Murphy et al., 2000, Peer y Murphy, 2007) lo que afecta la disponibilidad de la hormona en los tejidos en desarrollo (Sampathkumar et al., 2014).

Considerando todo lo anterior con respecto a la rutina, podríamos responder la baja capacidad morfogénica observada en el tejido adulto con la presencia de este flavonoide en los tejidos asociándolo directamente a la interacción de este compuesto fenólico con el transporte de auxina. Esto debido a que las auxinas están directamente relacionadas con la estimulación y desarrollo de las yemas vegetativas, las cuales se verían afectadas en su transporte dentro de los tejidos adultos (Sampathkumar et al., 2014). Murphy et al. (2000), Brown et al. (2001) y Aloni et al. (2003) reportaron que los flavonoides inhiben el flujo de salida de su sitio de síntesis y el transporte basipetal de auxina endógena. Por otra parte, también se podría asociar el contenido de rutina a la alta mortalidad observada, producto de la necrosis apical, en los explantos adultos, ya que este compuesto está asociado a una reducción del calcio y en *Castanea sativa* Mill. la necrosis apical se asocia a una deficiencia de éste elemento (Piagnani et al. 1996, Bairu et al. 2009).

BIBLIOGRAFÍA

- Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M. y Ulrich, C.I. (2003). Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta*. 216(5), 841-53.
- Arnaldos, T.L., Muñoz, R., Ferrer, M.A. y Calderon, A.A. (2001). Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananasa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*. 113, 315-322.
- Bairu, M.W., Jain, N., Stirk, W.A., Dolezal, K. y Staden, J.V. (2009). Solving the problem of shoot-tip necrosis in *Harpagophytum procumbens* by changing the cytokinin types, calcium and boron concentrations in the medium. *South African Journal of Botany*. 75, 122-127.
- Ballester, A., San-José, M., Vidal, N., Fernández-Lorenzo, J. y Vieitez, 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.
- Benson, E. (2000). Special symposium: *In vitro* plant recalcitrance. *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 36(3), 141-148.
- Blakesley, 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.

- Boccacci, P., Akkac, A., Torello-marinoni, D., Bounous, G. y Botta, R. (2004). Typing European Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars Using Oak Simple Sequence Repeat Markers. Torino, Italia. Hort.Science. 39 (6), 1012-1016.
- Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K y Von Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 100, 241-254.
- Botta, R., Akkac, A., Marinoni, D., Bounous, G., Kamper, S., Steinkellner, H. y Lexer, C. (1999). Evaluation of microsatellite markers for characterizing chestnut cultivars. Acta Horticulturae, 494, 277–282.
- Botta, R., Marinoni, D., Beccaro, G., Akkac, A. y Bounous, G. (2001). Development of a DNA typing technique for the genetic certification of chestnut cultivars. Forest Snow and Landscape Research. 3, 425-428.
- Botta, R., Marinoni, D. y Bounous, G. 2004. Molecular marker and certification. In: R. Kellison, S. Mccord y K. Gatland (Eds). Proceedings of the Forestry Biotechnology Workshop, Global Biotechnological Forum. pp. 63-72.
- Bounous, G. (2002) Il castagno: coltura, ambiente ed utilizzazioni in Italia e nel mondo. Prima edizione. Edizioni Agricole de Il Sole 24 ORE Edagricole S.r.l. Bologna, Italia. 311 p.
- Bounous, G., Akkac, A., Beccaro, G. L., Botta, R., Torello-Marinoni, D. y Joublan, J. P. 2005. DNA-Typing of cultivars for the development of a chesnut industry in Chile. Acta Horticulturae (ISHS) 693, 505-510.
- Breisch, H., Boutitie, A., Reyne, J., Salesses, G. y Vaysse, P. (1995). Châtaignes et marrons. CTIFL, Paris. 240 pp.

- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L. y Muday, G.K. (2001). Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 126, 524–535.
- Buck, E.J., Hadonou, M., James, C.J., Blakesley, D. y Russel, K. (2003). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in European chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Molecular Ecology Notes*. 3, 239-241.
- Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, N., Falasca, G. y Damiano, C. (1996). Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in walnut. *Plant Science*. 118(2), 203-208.
- Carvalho, L., Osório, M., Chaves, M. y Amâncio, S. (2001). Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67, 271-280.
- Corredoira, E., Janeiro, L.V. y 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.
- D'onofrio, C. y 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.
- George, E.F. (1996). Plant propagation by tissue culture, Part 2. In: Practice. 2 ed. Exegetics Limited, Basingstoke. Pp: 799.
- George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk, G.J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. Vol. 1. 3th Ed. Dordrecht, The Netherlands, Springer.

- Giovanelli, A. y Giannini, R. (1999) Effect of serial grafting on micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Acta Horticulturae*. 494, 243-245.
- Grau, P. (2003). Introducción de Cultivares de Castaño Europeo (*Castanea sativa* Mill.), Híbridos Eurojaponeses (*Castanea crenata* x *Castanea sativa*) y Castaño Japonés (*Castanea crenata* Siebold et Zucc.) a Chile. Primeros Resultados. Chile. *Agricultura Técnica*. 63 (3): 329-335.
- Grau, P. (2004). El castaño en Chile. Investigación/desarrollo en INIA y potencialidades de la especie.
- Grau, P. (2009). Manual de Castaño Europeo. Boletín INIA N° 196. 80 pp.
- Gobbin, D., Hohl, L., Conza, L., Jermini, M., Gesler, C., Conedera, M. (2007). Microsatellite-based characterization of the *Castanea sativa* cultivar heritage of southern Switzerland. *NRC Canada. Genome* 50: 1089-1103.
- Gubis, J., Lajchova, Z., Farago, J. y Jurekova, Z. (2003). Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Czech J. Genet. Plant Breed.* 39, 9-14.
- Guo, B., Haider, B., Zeb, A., Xu, L. L. y Wei, Y. H. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*. 10 (45), 8984-9000.
- Hasbún R., Sánchez-Olate M. y Ríos D. (2009). Micropropagación de dos cultivares de *Castanea sativa* Mill. En: Sánchez-Olate. M. y 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 - Chile. Pp 108.

- Hepler, P.K. (2005). Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*. 17, 2142-2155.
- Hernández, Y. y González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 31(4), 58-69.
- Himmelblau, E. y Amasino, R.M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology*. 158(10), 1317-1323.
- Hinrichsen, P. (2008). Trazabilidad genética de variedades frutales mediante herramientas moleculares. En: INIA Tierra adentro virtual, 82:4-7. Noviembre-Diciembre 2008. Chile.
- Hussain, M.I. y Reigosa, M.J. (2014). Higher peroxidase activity, leaf nutrient contents and carbon isotope composition changes in *Arabidopsis thaliana* are related to rutin stress. *Journal of Plant Physiology*. 171(15), 1325-1333.
- Imai, K., Suzuki, Y., Mae T. y Makino, A. (2008). Changes in the synthesis of Rubisco in rice leaves in relation to senescence and N influx. *Annals of Botany*. 101(1), 135-144.
- Kadota, M. y Niimi, Y. (2003). Effect of cytokinin types and their concentration on shoot proliferation and hyperhydricity *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72, 261-265.
- Kothari, S.L., Agarwal, K. y 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.
- Liang, H., Sagawa, Y. y Li, Q.X. (2005). Effects of rutin on vegetative growth of mung bean (*Vigna radiata*) seedlings and its interaction with indoleacetic acid. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. 31(4), 361-368.
- Marinoni, D., Akkak, A., Bounous, G., Edwards, K.J., Botta, R. (2003). Development and characterization of microsatellites markers in *Castanea sativa* Mill. *Molecular Breeding*. 11, 127-136.
- Martín, M.A., Álvarez, J.B., Mattioni, C., Cherubini, M., Villani, F. y Martín, L.M. (2009). Identification and characterisation of traditional chestnut varieties of southern Spain using morphological and simple sequence repeats (SSRs) markers. *Annals of Applied Biology*. 154, 389-398.
- Martín, M.A., Mattioni, C., Cherubini, M., Turchini, D. y Villani, F. (2010a). Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genic microsatellite markers. *Tree Genetics & Genomes*. 6(5), 735-744.
- Martín, M.A., Mattioni, C., Cherubini, M., Turchini, D. y Villani, F. (2010b). Genetic characterization of traditional chestnut varieties in Italy using microsatellites (simple sequence repeats) markers. *Annals of Applied Biology*. 157, 37-44.
- Miranda-Fontañá, M. E. y Fernández-López, J. (2001). Genotypic and Environmental Variation of *Castanea crenata* x *C. sativa* and *Castanea sativa* Clones in Aptitude to micropropagation. *Silvae Genetica*. 50, 3-4.

- Murphy, A., Peer, W.A. y Taiz, L. (2000). Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta*. 211, 315-324.
- Peer, W.A. y Murphy, A.S. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends in Plant Science*. 12, 556-563.
- Piagnani, C., Zocchi, G. y Mignani, I. (1996). Influence of Ca²⁺ and 6-benzyladenine on chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *in vitro* shoot-tip necrosis. *Plant Science*. 118, 89-95.
- Rutledge, R., Stewart, D., Caron, S., Overton, C., Boyle, B., MacKay, J. y Klimaszewska, K. (2013). Potential link between biotic defense activation and recalcitrance to induction of somatic embryogenesis in shoot primordia from adult trees of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biology*. 13, 116.
- Sampathkumar, A., Yan, A., Krupinski, P. y Meyerowitz, E.M. (2014). Physical forces regulate plant development and morphogenesis. *Current Biology*. 24(10), 475-483.
- Sánchez-Olate, M., Ríos, D. y Escobar, R. (2005). La Biotecnología Vegetal y el Mejoramiento Genético de Especies Leñosas de Interés Forestal y sus Proyecciones en Chile, pp 17-28. En: Sánchez-Olate, M. y Ríos, D. (Eds.) *Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal*. Departamento de Silvicultura. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Concepción. Concepción – Chile.
- Shtereva, L., R. Vassilevska-Ivanova, T. Karceva y B. Kraptchev. (2014). Micropropagation of six Paulownia genotypes through tissue culture. *Journal of Central European Agriculture*. 15(4), 147-156.

- Sierra, C. (2001). Propagación vegetativa de *Castanea sativa* Mill. y *Juglans regia* L., a través de estacas. 48 p. Tesis de Ingeniero Forestal. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Concepción, Chile.
- Srivastava, A. y Joshi, A. (2013). Control of Shoot Tip Necrosis in Shoot Cultures of *Portulaca grandiflora* Hook. *Notulae Scientia Biologicae*. 5(1), 45-49.
- Tichá, I., Cáp, F., Pacosvská, D., Hofman, P., Haisel, D., Capková, V. y Schäfer, C. (1998). Culture on sugar medium enhances photosynthesis capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiology Plant*. 102, 155-162.
- Vieitez, A., Ballester, A., Vieitez, M., y Vieitez, E. (1983). *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science*. 58, 457-463.
- Vieitez, A.M., Sanchez, C. y San-José, C. (1989). Prevention of shoot tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae*. 41, 101-109.
- Vieitez, A., Sánchez, M., García-Nimo, M. y Ballester, A. (2007). Protocol for micropropagation of *Castanea sativa* Mill. En: *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (Jain S.M. y Häggman H. eds.), pp. 299-312. Springer, Heidelberg.
- Volpert, R., Osswald, W. y Elstner, E.F. (1995). Effects of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*. 38, 19-22.
- Yamamoto, T., Tanaka, T., Kotobuki, K., Matsuta, N., Suzuki, M., Hayashi, T. (2003). Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnuts. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78, 197-203.

CONCLUSIONES GENERALES

Todas las variedades estudiadas, excepto Precoce Migoule, no presentan diferencias genotípicas intracultivar.

En el caso de Precoce Migoule, podrían existir errores de manipulación dentro del huerto, ya que se detectó un ejemplar de Castell Borello en la línea de cultivo de esta variedad.

Los cinco microsatélites utilizados fueron insuficientes para detectar los polimorfismos entre las variedades marrones de referencia y las chilenas identificadas.

En la etapa inicial del establecimiento *in vitro* de las variedades seleccionadas, la contaminación está relacionada al genotipo y 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 incide en la respuesta al establecimiento *in vitro* y está directamente relacionada con la edad del material vegetal utilizado.

Los explantos provenientes de plantas adultas presentan mayor oxidación, contaminación y mortalidad que los provenientes de plantas juveniles.

Explantos provenientes de plantas juveniles presentan mayor respuesta morfogénica en el cultivo *in vitro* evaluada en la capacidad de reacción al establecimiento, formación de callo basal y formación de brotes.

La presencia y cantidad de compuestos fenólicos como la rutina y el ácido elágico podrían estar influyendo en las respuestas observadas en el establecimiento *in vitro* de explantos adultos y juveniles.

El contenido de ácido elágico es significativamente superior en los explantos juveniles con respecto a los adultos y la rutina se detectó sólo en los tejidos adultos.

