Estudio anatómico de la formación de callo en estacas e injertos de nogal *(Juglans regia* L.*)*[1]

Claudia Botti G.[2] y Carlos Muñoz S.[3]

INTRODUCCION

El nogal es una de las especies de difícil injertación. Maurer (1970) señala que las condiciones ambientales, el estado fisiológico de las plantas y la técnica empleada son factores determinantes del éxito logrado en la injertación. La mayoría de los autores (Sitton, 1931; Cerny, 1965; Hartmann, 1973, 1974), coinciden en señalar que la producción de callo es indispensable para la formación de la unión.

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la evolución en la formación del callo, desde el punto de vista histológico, bajo condiciones controladas de temperatura.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en estacas e injertos sin raíz de *Juglans regia* L.

Estacas. Las estacas de patrón fueron obtenidas de plantas de un año de nogal tipo Eureka. Las de púa se obtuvieron de la parte basal de ramillas de la temporada, provenientes de árboles en producción (15 años) tipos Eureka y Payne.

Injertos. Estacas de patrón del mismo origen ya mencionado, fueron injertados con púas de árboles en producción tipo Eureka, las que fueron colectadas el 28 de agosto de 1977 y almacenadas en frío hasta su empleo.

La injertación se realizó de banco el 10 de agosto de 1977 mediante empalme inglés siguiendo las recomendaciones dadas por Garner (1967).

Para inducir la formación de callo, el 10 de agosto, estacas e injertos (Figura 1) fueron colocados horizontalmente, en una cámara de temperatura controlada, entre aserrín esterilizado y húmedo a una temperatura de 28°C de acuerdo a lo propuesto por Sitton (1931), quien estableció que ésta es la temperatura óptima para la formación de callo en *Juglans nigra.*

Los muestreos se efectuaron cada tres días durante un total de 40, tomando 4 estacas y 2 injertos en cada ocasión, las que fueron fija-

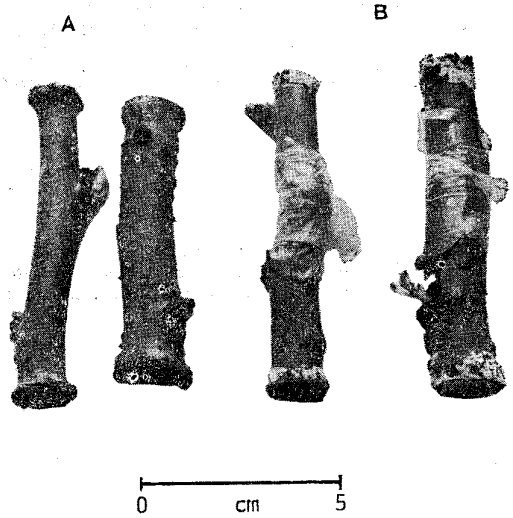

Figura 1 — A: Estacas aisladas de patrón con 10 días de estratificación.
B: Injertos sin raíz con 10 días de estratificación. (Foto: Carlos Muñoz S.).

[1]Trabajo presentado a las XXVII Jornadas Agronómicas. Valdivia, Chile.
Recepción originales: 17 de marzo de 1978.
[2]Ing. Agr., Profesor Adjunto Morfoanatomía, Facultad de Agronomía, Universidad de Chile, Casilla 1004, Santiago, Chile.
[3]Ing. Agr., Programa Frutales y Viñas, Estación Experimental La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Casilla 5427, Santiago, Chile.

das en FAA, 70% (Formalina-ácido acético-alcohol etílico 5 : 5 : 90 v/v/v).

Las observaciones se hicieron en cortes transversales y longitudinales de los extremos de las estacas y en la zona de unión de los injertos, los que se obtuvieron mediante un micrótomo de congelación y se tiñeron con rojo neutro.

RESULTADOS Y DISCUSION

Anatomía del tallo.

Los cortes transversales mostraron abundantes células parenquimáticas en la médula de tipo lamelar, con gran cantidad de almidón especialmente en las células de la vaina medular. Xilema primario aplastado contra esta vaina y xilema secundario formado por gran cantidad de traqueidas, vasos grandes normalmente solitarios, ocasionalmente en grupos de 3 a 4; células parenquimáticas rodeando los vasos (paratraqueal vasicéntrico y en bandas uniseriadas); radios xilemáticos muy abundantes uni o biseriados. Cambium vascular notorio de 4-5 corridas de células. Floema muy abundante y bien desarrollado con gran cantidad de fibras en bandas distribuidas en todo este tejido, tubos cribosos, células acompañantes y células parenquimáticas, abundantes radios floemáticos uni o biseriados cuyas células muestran gran contenido de almidón y otras sustancias ergásticas. Grupos de fibras pericíclicas de paredes muy gruesas y lignificadas limitan el floema con la corteza. Esta está formada por células parenquimáticas que bajo la peridermis forman 5-6 corridas de células de paredes bastante engrosadas, con gran contenido de almidón. El resto de la corteza está formada por células parenquimáticas de paredes delgadas con abundantes cristales tipo drusas y almidón en su interior. La peridermis está formada por felodermis, felógeno y 7-8 corridas de células corchosas suberizadas y presenta abundantes lenticelas.

No se observaron grandes diferencias anatómicas en los distintos tipos de estacas empleadas, salvo en las proporciones en que se encuentran los distintos tejidos. En el patrón, el grosor de la corteza (corteza y floema) es de casi el doble que en Eureka y Payne y la médula es de menor diámetro. La única diferencia anatómica importante es la presencia de esclereidas en las estacas de púa Eureka y Payne, las que se presentan uniendo las bandas de fibras pericíclicas, formando casi un cilindro de células muy esclerificadas.

Formación del callo en las estacas.

Se observó gran variación en la iniciación de la formación de callo y en el origen de él en las distintas estacas observadas, tanto entre los tipos estudiados como dentro de cada tipo.

Estacas de patrón. Los primeros indicios de división celular se observaron a los 4 días de estratificación a partir de células del felógeno, corteza y parenquimáticas del floema. Dos días más tarde, en algunas estacas, fue posible observar un pequeño callo a simple vista, originado de los mismos tejidos, principalmente de la corteza cercana al floema, inmediatamente sobre la corrida de fibras pericíclicas. El cambium vascular presentó sólo un pequeño aumento poco aparente.

A los 10 días de estratificación las estacas de patrón tenían grandes callos (Figuras 1a y 2b) originados, principalmente, por la división celular del cambium vascular. La corteza, células parenquimáticas del floema y felógeno, también intervenían, pero en menor grado. En algunas estacas se observó posteriormente un pequeño callo originado de la médula, coincidiendo con lo observado por Hallatou, Malo y Fisher (1977) en paltos, pero sin que esta formación tenga la importancia que llega a tener en esta última especie.

Todos los callos se desarrollan, en un comienzo, en forma independiente debido a que esta especie muestra abundante tejido esclerenquimático en el floema, lo que impide una división celular continua de este sector.

La diferenciación en tejido vascular comenzó en las estacas de patrón a los 16 días de estratificación, a partir de células del cambium vascular. Este proceso comenzó siempre con la aparición de vasos y traqueidas en sentido horizontal (perpendiculares a los del xilema normal) en ciertos sectores del cambium vascular cercanos al callo por él originado. Cuatro días más tarde, esta misma condición se presentó en diferentes sectores del interior de los callos. A los 19 días de estratificación, en una estaca ya se observó gran cantidad de elementos traqueales en el interior del callo formado por el cambium vascular (Figura 2c).

Púas. Las estacas de Eureka y Payne presentaron gran variación en cuanto al origen y a la cantidad de callo formado, pero siempre la cantidad formada fue notoriamente inferior a la observada en las estacas de patrón.

La iniciación de la división celular ocurrió 2 a 6 días más tarde que en el patrón y especialmente a partir de células del cambium vascular.

Se observó diferenciación celular en una sola estaca (tipo Eureka), a los 27 días de estratificación, en el centro del callo originado del floema. El cambium vascular, aunque muy aumentado, no mostraba ninguna alteración (Cuadro 1).

La diferencia en la producción de callo

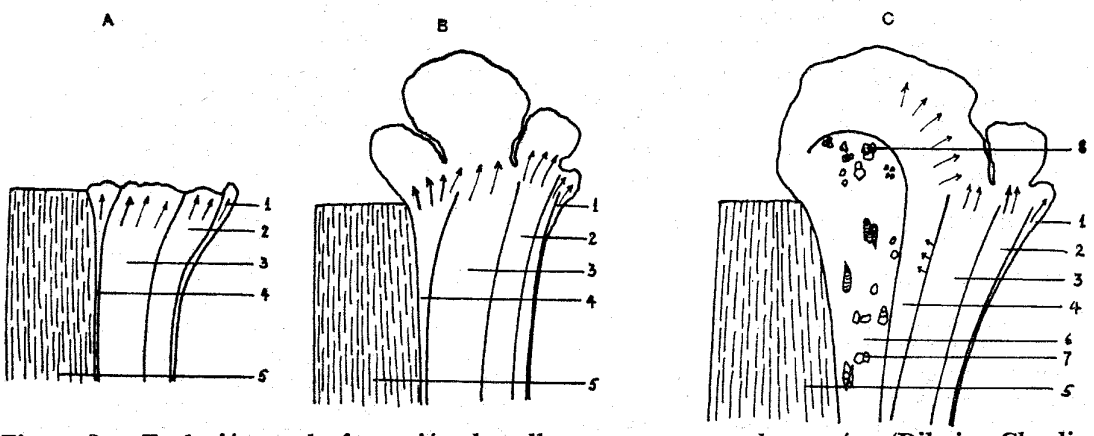

Figura 2 — Evolución en la formación de callo en una estaca de patrón. (Dibujo: Claudia Botti G.).

A — 6 días de estratificación. B — 10 días de estratificación. C— 19 días de estratificación.
1 felógeno. 2 corteza. 3 floema. 4 cambium vascular. 5 xilema. 6 cambium vascular en diferenciación. 7 elementos vasculares del cambium vascular. 8 elementos vasculares del callo.

Cuadro 1 — Evolución en la formación de callo y su diferenciación en tejido vascular en estacas e injertos de nogal estratificados en aserrín a 28°C de temperatura.

Días desde Estratificación	*FORMACION DE CALLO EN ESTACAS AISLADAS*						*FORMACION DE CALLO EN INJERTOS*			
	Tejidos comprometidos en la formación de callo[1]			*Diferenciación celular*			*Tejidos comprometidos en la formación de callo*[1]		*Diferenciación celula*	
	Patrón	*Púa Eureka*	*Púa Payne*	*Patrón*	*Púa Eureka*	*Púa Payne*	*Patrón*	*Púa*	*Patrón*	*Púa*
4	Felógeno Corteza Parénquima del floema			No	No	No	——	——	No	No
6	Corteza Felógeno Parénquima del floema Cambium vasc.	Cambium vasc. Corteza Felógeno		No	No	No	——	——	No	No
10	Cambium vasc. Corteza Floema Felógeno	Felógeno Cambium vasc. Corteza		No	No	No	Cambium vasc. Parénquima del floema, Corteza	Corteza, Felógeno	No	No
16-20	Cambium vasc.	Corteza Felógeno Cambium vasc.		Sí	No	No	Cambium vasc. Parénquima del floema, Corteza	Corteza Felógeno Floema	Sí	No
27	Cambium vasc.	Floema Cambium vasc.		Sí	Sí	No	Cambium vasc. Corteza Parénquima del floema	Cambium vasc. Corteza, Floema	Sí	No
31	Cambium vasc.	Corteza Cambium vasc.		Sí	No	No	Cambium vasc. Parénquima del floema Corteza	Cambium vasc. Corteza, Floema	No	Sí[2]

[1]Enumerado en orden de importancia.
[2]En una sola muestra.

entre las estacas de patrón y las de púa, pudo estar influenciada por la condición juvenil del patrón o por el estado de latencia de las yemas, ya que las púas fueron conservadas a baja temperatura hasta su empleo, en cambio, los patrones crecían en condiciones naturales. Fue así como 17 días después de iniciada la estratificación, las estacas de patrón mostraron un brote de 2,5 cm de largo, en cambio, las yemas de las púas no mostraron actividad durante todo el período que duró la estratificación.

Formación del callo en los injertos.

La formación del callo comenzó 6 a 10 días después de la injertación coincidiendo con lo encontrado por Nedev (1969).

El callo se originó en el patrón, por la división del cambium vascular, células parenquimáticas del floema y corteza. En la púa se formó por la división celular de la corteza y felógeno, observándose nuevamente en ambos casos, gran variación en la cantidad de callo formado. Aun cuando la cantidad formada fue siempre mayor en el patrón, no se observó una evolución progresiva como ocurrió en las estacas aisladas. Es así como algunos injertos aún después de 24 días, casi no tenían callo y presentaban, por lo tanto, una unión débil.

El proceso de diferenciación de tejido vascular también fue muy variable, tanto así, que en el patrón de algunos injertos comenzó a los 16 días de la injertación (Figura 3) y en otros, recién a los 28. En las púas se presentó formación de tejido vascular en un solo caso, 31 días después de la injertación, sin embargo, el patrón de este injerto mostró escasa formación de callo y sin diferenciación de tejido vascular (Cuadro 1). Nedev (1969) observó elementos vasculares a los 20-25 días después de la injertación y Hartmann (1974) menciona la formación de un pasaje funcional de tejido vascular, 8 semanas después de la injertación, pero no especifica la fecha de comienzo de la diferenciación.

Puesto que no fue posible detectar diferencias anatómicas cuando hubo o no formación de callo, la condición fisiológica de las plantas empleadas parece ser determinante, especialmente en las púas, ya que en todos los casos, la formación de callo en el patrón fue mucho más abundante que en las púas.

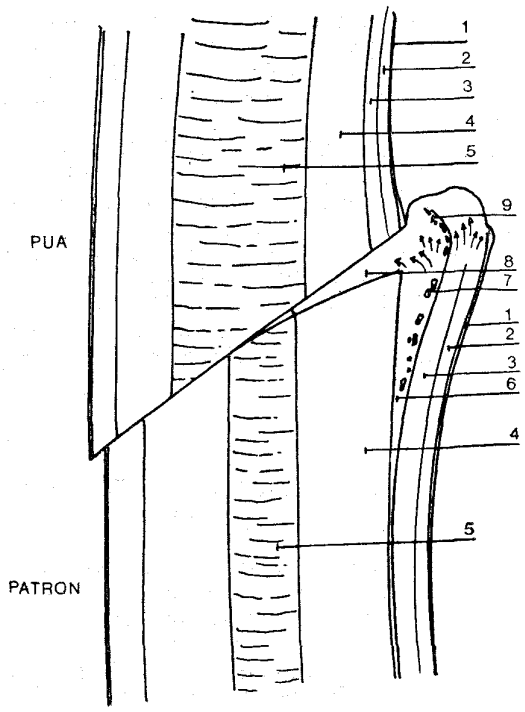

Figura 3 — Callo formado en un injerto a los 16 días de estratificación. (Dibujo: Claudia Botti G.).

1 peridermis
2 corteza
3 floema
4 xilema
5 médula
6 cambium vascular
7 cambium vascular en diferenciación
8 prolongación del callo en la unión
9 elementos vasculares del callo

El crecimiento del callo está relacionado, según Hartmann (1976) con la cantidad de hidratos de carbono de reserva presentes en las ramillas de las que se obtienen las púas. Doley y Leyton (1970) por su parte, señalan que los reguladores de crecimiento (AIA) y los azúcares, controlan el crecimiento del callo. Variaciones en algunos de los factores mencionados pueden explicar la gran variabilidad que se presentó en la producción de callo.

RESUMEN

Se estudió la evolución en la formación de callo y su diferenciación en tejido vascular en estacas de patrón (tipo Eureka) y de púa (tipo Eureka y Payne) y en injertos sin raíz de nogal (*Juglans regia* L.), estratificadas en aserrín, bajo condiciones controladas de temperatura. Las principales observaciones fueron:

— Se presentó una gran variación en la cantidad de callo formado, tanto en estacas aisladas de patrón y de púa, como en injertos. Sin embargo, no se observaron diferencias anatómicas cuando hubo o no formación de callo, lo que sugiere que el estado fisiológico en que se encuentran los tejidos al momento de injertar es importante de considerar.
— La cantidad y rapidez de formación de callo fue siempre mayor en el patrón que en las púas, tanto en las estacas aisladas como en las injertadas, sin embargo, en las injertadas se observó una formación de callo de menor intensidad y de una evolución menos homogénea.
— Los tejidos comprometidos en la formación de callo, fueron el felógeno, corteza y células parenquimáticas del floema y cambium vascular, siendo este último el principal tejido generador de callo.
— La diferenciación en tejido vascular fue muy irregular. Sólo se presentó en el patrón tanto en estacas como en injertos, después de 16 días de estratificación.

SUMMARY

ANATOMICAL STUDY OF CALLUS FORMATION ON WALNUT (*Juglans regia* L.) CUTTINGS AND GRAFTS

Callus formation and its differentiation on vascular tissue in walnut (*Juglans regia* L.) stock cuttings (Eureka type), scion (Eureka and Payne type) and non-rooted grafts, stratified in sawdust under controlled temperature conditions were studied. The main observations were:

— A great variation in callus formation, both in cuttings as in non-rooted grafts, was observed; however no anatomical differences were detected. This suggests that the physiological stage of the tissues is important when grafting.
— Callus formation was always greater in stocks than in scion, both in non grafted as in grafted cuttings. A less homogeneous and intensive callus evolution being observed in the latter.
— Tissues involved in callus formation were phellogen, cortex, phloem parenchymatic cells and vascular cambium, being the latter the major callus generator tissue.
— Differentiation on vascular tissue was irregular and started after 16 days of stratification, both on stocks cuttings as on grafted stocks.

LITERATURA CITADA

CERNY, L. 1965. Veredelung der Walnuss und anderer Holzarten in der Zeit der ecliten Winterruhe. Biologia Plantarum (PRAHA). 7 (3): 226-237.

DOLEY, D. and LEYTON, L. 1970. Effects of growth regulating substances and water potential on the development of wound callus in *Fraximus*. New Phytol. 69-87-102.

GARNER, R. J. 1967. The grafter's handbook. Oxford University Press. New York. 263 p.

HALLATOU, M., MALO, S. E. y FISHER, J. E. 1977. Injerto de cuña en aguacates jóvenes y naturaleza de la unión. *In:* Resúmenes de los trabajos presentados al XXV Congreso de la Soc. Amer. de Ci. Hort. Quito-Ecuador.

HARTMANN, W. 1973. The problem of walnut grafting. Studies from the technical, histological and physiological viewpoint. Dissertation, Universitat Holenhein, German Fed. Rep. 136 p.

————. 1974. Histologisch —anatomische Untersuchungen du Verwachsengevargangas von *Juglans regia und Juglans nigra*. Mitteilunter Rebe und Ukin Obstban und Fruchteverwertung. 24 (2/3): 175-186.

————. 1976. (Importance of carbohydrate reserves in successfull grafting). Obstban und Fruchteverwertung. 26 (2/3): 179-194.

MAURER, K. N. 1970. Die Walnussveredlung-Ruckblick und Ausblick. Klosterneuburg. 20: 132-58.

NEDEV, N. 1969. (Studies on the duration of the stages of union in walnut budding). Grad. Lozar Nauka. 6 (2): 3-9.

SITTON, B. G. 1931. Vegetative propagation of the black walnut. Mich. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. 119. 21 p.