



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-323

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

INJERTO EN VERDE DE VARIEDADES DE CASTAÑO DE FRUTO SOBRE VITROPLANTAS ACLIMATADAS

CUENCA VALERA BEATRIZ¹, LARIO LEZA, F.J.¹, LUQUERO RAMOS LAURA², OCAÑA BUENO LUIS²,

¹TRAGSA. Vivero de Maceda. bcuenca@tragsa.es

²TRAGSA. Departamento de Tecnología de la Información. Subdirección de Soporte Técnico a Innovación.

Resumen

Las variedades de castaño de fruto tradicionales son ontogénicamente viejas y por tanto, difíciles de enraizar. Por ello, el sistema de producción de castaño de fruto es el injerto, normalmente, empleando híbridos resistentes a *Phytophthora cinnamomi*, producidos vegetativamente (acodo, estaquillado semiherbáceo o micropropagación). La producción de planta injertada requiere 2 o 3 años con un prendimiento medio del 65%, de modo que tras 3 años un 35% de plantas son sólo portainjertos no reutilizables por las deformaciones debidas al injerto. Para mejorar estos rendimientos, se injertaron en verde 8 variedades gallegas, sobre portainjertos híbridos producidos *in vitro*. Los brotes de las variedades se cosecharon durante el verano con diámetro 2-5 mm, para obtener púas herbáceas. Éstas se injertaron sobre vitroplantas herbáceas recién aclimatadas bajo atmósfera de niebla. El éxito del injerto fue superior al 75%, con la púa injertada reemprendiendo crecimiento en 15 días. Los injertos fallidos se podaron y recuperaron para portainjertos sin deformaciones aparentes. El injerto en verde reduce el tiempo necesario para obtener planta injertada a 1 año, obtiene mayores tasas de prendimiento, y permite reutilizar los portainjertos en caso de fallo del injerto al ser estos muy juveniles, con tejidos verdes y alta capacidad de rebrote.

Palabras clave

Castanea, in vitro, Phytophthora, portainjertos, variedades tradicionales

1. Introducción

El injerto en verde, también llamado microinjerto *ex vitro*, para diferenciarlo del microinjerto que se realiza *in vitro* con material vegetal en micropropagación, es una técnica que combina las ventajas de los ciclos cortos de injertado del microinjerto *in vitro*, con la facilidad e independencia de las condiciones de asepsia del injerto tradicional (FERNÁNDEZ-LORENZO & CRECENTE-CAMPO, 2009). El microinjerto *in vitro* tiene diversas aplicaciones en fruticultura (HUSSAIN et al., 2014): la producción de plantas libres de virus (NAVARRO, 1988; ZILKA et al., 2002); el estudio de la incompatibilidad en combinaciones de injertos (ESPEN et al., 2005; DARIKOVA et al., 2011); la mejora en la regeneración de plantas completas (ONAY et al., 2007; WANG et al., 2010); el indexaje de virosis (KAPARI-ISAIA et al., 2002; PATHIRANA & MCKENZIE, 2005a); o el intercambio de material vegetal entre países (LLACER, 2009).

El injerto en verde o microinjerto *ex vitro* se emplea también con estos objetivos, aunque menos frecuentemente. WALTER et al. (1990) y PATHIRANA & MCKENZIE, (2005b) emplean este tipo de injerto para el indexaje de virosis, y D´KHILI et al. (1996) para el estudio de compatibilidad en vid. RAHARJO & LITZ (2005) emplean esta técnica en aguacate para rescatar material mejorado recalitrante al cultivo *in vitro* y FERNÁNDEZ-LORENZO & CRECENTE-CAMPO (2009) para propagar material adulto de variedades y mejorar el enraizamiento de clones recalitrantes de castaño. En el caso de la vid, el injerto en verde comenzó realizándose sobre vitroplantas, pero la gran cantidad de yemas del portainjerto obligaba a una intensa labor de



desyemado, por lo que pasó a realizarse sobre estaquillas enraizadas en invernadero. Las yemas se toman de vitroplantas aclimatas y se injertan con la técnica de hendidura simple (MARTIN & COLLAS, 1995). En el caso del castaño, FERNÁNDEZ-LORENZO & CRECENTE-CAMPO (2009) emplean plántulas de semilla como portainjertos.

El prendimiento del injerto en verde suele ser fácil y rápido por encontrarse la planta en plena actividad vegetativa y por el empleo de planta joven (plántulas) o rejuvenecidas (vitroplantas) como portainjerto. Sin embargo, en la actualidad, la bibliografía sólo ofrece referencias al uso de esta técnica para la producción de planta comercial en el caso de la vid (MARTIN & COLLAS, 1992) y del género *Citrus* spp. (THERMOZ, 1998), si bien nos consta que viveros Coulié en Francia emplea este sistema en la producción regular de planta injertada sobre portainjertos híbridos del INRA (COULIÉ, comunicación personal).

En el vivero de TRAGSA se injerta todos los años, una importante cantidad de castaños en taller, habitualmente mediante *chip budding* (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al. 2014), por ser esta técnica flexible en cuanto al período de tiempo en que se puede realizar (desde abril a mayo), y por la fácil conservación de las púas a injertar, que son recogidas durante el invierno y conservadas en la nevera. Este tipo de injerto, no obstante, requiere portainjertos de al menos 2 savias, con diámetro de al menos 1 cm, alcanza unos prendimientos medios en torno al 65%, y los injertos fallidos suponen pérdidas de planta, en cuya recría se ha invertido tiempo y recursos.

2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es desarrollar la técnica del injerto en verde en taller o microinjerto ex vitro, de las variedades tradicionales gallegas sobre vitroplantas joven de los portainjertos más habituales, buscando incrementar los rendimientos obtenidos en vivero con el injerto de invierno y minimizando las pérdidas de portainjertos.

3. Metodología

Portainjertos: se emplearon plantas aclimatadas en proceso de recría producidas mediante micropropagación, Los cultivos *in vitro* fueron multiplicados (CUENCA et al., 2015) durante los meses de Septiembre y Octubre de 2015, puestos a enraizar en condiciones fotoautotróficas (CUENCA et al., 2017) en Noviembre, y dispuestos en aclimatación en Enero de 2016. En el mes de Abril se trasplantaron a macetas de 2l en una mezcla de turba rubia y vermiculita en proporción 3:1, adicionada con 2 g/l de abono de liberación lenta Osmocote® Exact 15-9-11 + 2 MgO + TE, y las macetas dispuestas en condiciones de invernadero para su recría. En el mes de julio, las plantas alcanzaron un diámetro de entre 3 y 5 mm, que se consideró adecuado para poder ser injertadas (Figura 1a). Los portainjertos producidos fueron los híbridos 7521, P011, P042, P043, C004, C042, C053, y un clon de *Castanea crenata* (CC14).

Púas: se tomaron de plantas madres injertadas con las variedades tradicionales gallegas cultivadas en macetas de 30 l bajo invernadero con sombreado. De estos pies, el vivero se provee habitualmente de la madera para realizar el injerto tipo *chip budding*. Las plantas fueron podadas a principios del Marzo para cosechar la madera de invierno, y los brotes emitidos en la primavera se descabezaron para promover la brotación lateral de un mayor número de brotes de menor diámetro, compatible con el diámetro de los portainjertos en fase de recría (Figura 1b). Las variedades podadas fueron Amarelante, De Parede, Famosa, Garrida, Negral, Longal, Rapada, Ventura y Xudía. En el mes de julio, se tomaron los brotes herbáceos de los pies madres y se prepararon las púas cortando segmentos de unos 4 cm, portadores de una hoja y una yema en la axila de esta, con 3 cm por debajo de la yema y 0,5-1 cm por encima. El corte por encima de la yema se hizo en bisel con el plano inclinado hacia el lado contrario de la yema, para facilitar el escurrido del agua evitando la pudrición de la yema, y la hoja fue recortada dejando

únicamente el tercio basal. Las yemas se conservaron hasta su uso clavadas individualmente en tacos de lana de roca empapados en agua.



Figura 1. a. Portainjertos en recría en el momento adecuado para ser injertados. b. Planta madre de púas de variedad Xudía en plena brotación.

Injertado: los portainjertos fueron descabezados con tijera a la altura adecuada para que su diámetro se aproximara lo más posible al de la púa a injertar (Figura 2a), y con bisturí se practicó una hendidura en el extremo del tallo en el sentido de mayor diámetro (Figura 2b). La púa fue tallada en doble bisel con el bisturí con cuidado de mantener intacto el cambium, y colocada en la hendidura de modo que la yema estuviera en el lado opuesto a la última de portainjerto. Los posibles brotes y hojas por debajo del injerto se eliminaron salvo la última hoja, más cercana al injerto para que actuara de tira-savia. La unión de púa y portainjerto se mantuvo con una mini pinza de madera de unas 2 cm (Figura 2c).

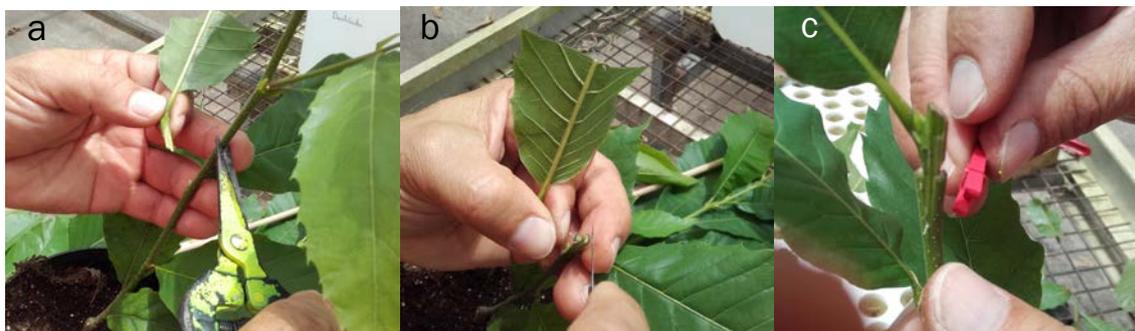


Figura 2. a. Descabezado del portainjerto y preparación de púa. b. Hendido del portainjerto. c. Colocación de la pinza en la unión púa-portainjerto

Con cada variedad se injertaron entre 80 y 100 plantas, repartidas proporcionalmente entre los portainjertos disponibles de cada genotipo de modo que de cada combinación variedad/portainjerto se injertaron entre 5 y 22 plantas dependiendo de la disponibilidad de cada clon de portainjerto. Las diferentes combinaciones púa/portainjerto se distribuyeron de manera aleatoria en la mesa de cultivo de la zona de nebulización (fog system con 90% de HR), donde se mantuvieron durante un mes, momento en que se hizo una primera comprobación del prendimiento. Si la herida estaba en proceso de cicatrización, se advertía la formación de callo en los márgenes de la herida. En ese caso, los injertos pasaron al invernadero para su desarrollo y al cabo del segundo mes se retiró la pinza. En caso de fallo del injerto, las plantas se podaron por encima de la última yema rebrotada y se dispusieron en el invernadero para su recría.

A los dos meses desde el injerto, se contabilizaron los injertos prendidos de cada combinación. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos en el injertado tradicional del vivero en la misma campaña, en la que no se injertaron todas las mismas

combinaciones. Por este motivo se compararon solamente los prendimientos obtenidos en las combinaciones injertadas en los dos sistemas, y la media de sólo estas combinaciones. Los resultados se han analizado mediante ANOVA previa transformación angular de los porcentajes de prendimiento y las diferencias entre medias se han estimado usando el test de la Diferencia Mínima Significativa (SOKAL & ROHLF, 1981) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

4. Resultados y discusión

Una vez injertadas, las plantas pasaron un mes bajo el fog-system con una humedad relativa en torno al 90%. Esto impidió que la yema injertada se deshidratara, y la porción de hoja se mantuvo verde durante todo el período. Al cabo de los 15 días se apreciaron las primeras evidencias de cicatrización de la herida, con la aparición de callo en los puntos de contacto del cambium de púa y portainjerto. Al cabo de un mes esta unión era completa en muchos de los casos, y en los casos en los que el injerto falló, la hoja había caído, la púa aparecía necrosada, y generalmente la yema inmediatamente por debajo del injerto había desarrollado brote. RAHARJO & LITZ (2005) en aguacate también observaron que el reanudación del crecimiento de la yema se producía al cabo de 2,7-3,6 semanas, siempre después de que se diera la unión del injerto, y considera la supervivencia definitiva del injerto a los 40 días. En castaño FERNANDEZ-LORENZO & CRESCENTE-CAMPO (2009) observan también el prendimiento microinjerto ex vitro entre los 40 y 60 días.

En ese momento, pudo realizarse fácilmente el destrío de planta injerto prendida y de planta a podar para reciclarla como portainjerto. Los injertos prendidos en las condiciones normales de invernadero, al cabo de otro mes, presentaban reanudación del crecimiento de la púa injertada (Figura 3a). En cuanto a los injertos fallidos, fueron podadas por encima del último brote, que continuó su desarrollo (Figura 3b) produciendo plantas que no reflejaron apenas deformación lo que ha permitido su venta como portainjertos o su empleo para injertar en chip budding en la siguiente primavera.



Figura 3. a. Injerto prendido reemprendiendo el crecimiento. b. Portainjerto recuperado tras el fallo del injerto. c. Plantas injertadas con el procedimiento en verde desarrollando en el invernadero con detalle de la cicatrización del injerto

Los prendimientos alcanzados al injertar en verde cada una de las combinaciones variedad/portainjerto a los dos meses de la realización del injerto (Tabla 1), muestran diferencias significativas entre variedades ($p=0,0000$, DMS = 8,39) siendo Xudía, Rapada, Amarelante y De Parede las variedades que presentan los prendimientos medios más altos (>80%). Los prendimientos más bajos son los obtenidos por Famosa (datos no mostrados), Longal (58,61%) y Garrida (52,12%).

Tabla 1. Prendimientos de los injertos en verde de las diferentes combinaciones variedad/portainjerto

CLON	Xudía Xudía	Negral Negral	Longal Longal	Ventura Ventura	De Parede Pared	Amarelante Amarelante	Garrida Garrida	Rapada Rapada	Media Media portainjerto portainjerto
7521	83,33	66,67	75,00	66,67	83,33	66,67	33,33	66,67	67,71
P011	80,00	85,00	80,00	85,00	94,74	100,00	78,95	94,74	87,30
P042	100,00	81,82	36,36	63,64	90,00	80,00	62,50	90,00	75,54
P043	100,00	75,00	75,00	100,00	100,00	87,50	50,00	100,00	85,94
C004	100,00	90,91	81,82	81,82	81,82	90,91	63,64	85,71	84,58
C042	66,67	66,67	33,33	50,00	66,67	100,00	60,00	80,00	65,42
C053	100,00	83,33	66,67	100,00	100,00	80,00	40,00	100,00	83,75
CC14	93,33	66,67	40,00	46,67	53,85	93,33	28,57	100,00	65,30
Media comunes	95,33	74,70	58,61	75,40	85,44	81,50	42,88	91,33	75,65
Media variedad	90,42	77,01	61,02	74,22	83,80	87,30	52,12	89,64	76,94

El prendimiento de Famosa fue muy bajo, con muchas púas totalmente deshidratadas y necrosadas. Dado que en ensayos previos en 2015, el injerto de esta variedad había mostrado prendimientos similares a los de Ventura (datos no mostrados), indagamos cual podía ser la causa y concluimos que la púa pasó demasiado tiempo cortada antes de ser injertada y esto podría ser causa de los malos resultados de la variedad. Por este motivo, se decidió sacarla del ensayo. El prendimiento es también significativamente distinto ($p=0,0001$, DMS = 7,85) al emplear diferentes portainjertos, obteniéndose los prendimientos medios más altos al injertar sobre P011 y P043 (>85%), y los más bajos al injertar sobre *C. crenata* (65,30%) y sobre 7521 (67,71%).

Los prendimientos obtenidos por FERNÁNDEZ-LORENZO & CRESCENTE-CAMPO (2009) para las variedades Loura y Parede oscilaron entre 60 y 90%, lo que es coherente con los resultados de este. Estos autores, sin embargo, emplearon plántulas de semilla como portainjertos y estimularon el prendimiento en algunos de los casos, con la aplicación de giberelina en el punto de injerto, lo que se observó tuvo un efecto positivo en el prendimiento y desarrollo posterior de la yema. RAHARJO & LITZ (2005) consiguen prendimiento en aguacate entre el 52 y el 76%.

Al comparar los datos de injerto en verde con los obtenidos en la misma campaña mediante el sistema de injerto *chip budding* (el habitual en el sistema de producción del vivero) (Tabla 2), se observa que el prendimiento medio en verde (75,65%) es mayor que en *chip budding* (63,97%), aunque sin diferencias significativas ($p=0,5919$). La combinación variedad-injerto, sí muestra diferencias significativas en los dos sistemas de injerto ($p=0,0132$ DMS=38,78). Respecto a los prendimientos medios sobre cada portainjerto, los resultados son mejores para el injerto en verde excepto en el caso de 7521, que muestra mejores prendimientos en el injerto tradicional. Si comparamos los prendimientos medios de las diferentes variedades, los resultados en verde son superiores o equivalente para las variedades Xudía, Longal, Ventura, De Parede y Rapada, siendo mejores los resultados con el injerto tradicional para las variedades negral, Amarelante y Garrida.

Tabla 2. Prendimientos obtenidos en la campaña 2016 al injertar por la técnica *chip budding*



7521	71,43	66,67	66,67	100,00	39,13	100,00	88,89	83,33	74,34
P042	---	---	66,67	72,73	51,72	80,00	---	---	74,22
P043	---	---	0,00	33,33	0,00	100,00	---	---	33,33
C053	42,86	100,00	0,00	100,00	60,00	80,00	77,78	---	73,97
CC14	0,00	66,67	33,33	70,00	40,00	60,00	66,67	0,00	48,33
Media comunes	57,14	83,33	33,33	76,52	37,71	90,00	83,33	83,33	63,97
Media variedad	59,45	66,82	56,95	74,87	42,33	72,21	66,27	66,15	64,15

Independientemente de que el injerto en verde consiguiera prendimientos tan buenos o mejores que el injerto tradicional, este tipo de injerto presentó otras ventajas, como la de acortar en al menos un año el ciclo para la producción de planta comercial. Las plantas injertadas en verde, alcanzaron en el otoño una altura superior a los 60 cm en un 75% de los casos, con un desarrollo del injerto mayor de 20 cm que se considera el mínimo comercial en el vivero (Figura 3c). De este modo, las vitroplantas repicadas en octubre, y trasplantadas en abril, son injertadas en julio y en ese mismo otoño, tienen tamaño comercial y están disponibles para la venta. En el injerto tradicional, los portainjertos procedentes de estaquillado semiherbáceo, se estaquillan en junio, en marzo del año siguiente se trasplantan, y en abril-mayo del año siguiente se injertan, lo que supone un mínimo de tres campañas para obtener injertos comerciales. En el caso de que procedan de cultivo *in vitro*, el ciclo puede acortarse un año, pero sigue siendo necesario un año de recría de la planta antes de que esta tenga diámetro suficiente para ser injertada.

Varios autores señalan esta misma ventaja de la técnica de injerto en verde (HUSSAIN et al., 2014; MARTIN & COLLAS, 1992; FERNÁNDEZ-LORENZO & CRECENTE-CAMPOS, 2009), e incluso señalan la posibilidad de producir planta durante todo el año si el proceso se realiza bajo condiciones controladas como es el caso de FERNÁNDEZ-LORENZO & CRECENTE-CAMPO (2009). En nuestro caso, por simplicidad y reducción de costes, todo el proceso se realizó en invernadero, con condiciones de alta humedad durante el primer mes tras el injertado, y aun así los prendimientos son más que aceptables. RAHARJO & LINTZ (2005) mantienen también los injertos en invernadero pero protegiéndolos con bolsas de plástico individuales selladas con Parafilm®, lo que supone un proceso más complicado que el que proponemos en nuestro trabajo. Más sencillo aún es el proceso llevado a cabo en la viña por MARTIN & COLLAS (1992) quienes también mantienen la unión con una pinza en vez de Parafilm® y usan condiciones de invernadero, pero además realiza el prendimiento del injerto y el enraizado de la estaquilla simultáneamente.

Por otra parte, la herida de injerto es muy pequeña, y la cicatrización muy buena (Figura 3c, detalle), con lo que la posibilidad de infecciones por chancro son muy reducidas. Además, los rendimientos en cuanto a nº de injertos/persona.día, se incrementaron considerablemente al eliminarse los trabajos de atado y aplicación de pasta cicatrizante sobre el injerto. En el injerto tradicional, considerando la totalidad de las tareas (recogida de púa, preparación de esta, transporte de portainjertos, injertado, atado, aplicación de mastic, etiquetado y colocación de injertos en el invernadero) se obtuvieron unos rendimientos de 80 injertos/persona.día, mientras que con la técnica de injerto en verde, este rendimiento se incrementó hasta 200. Finalmente, los portainjertos en los que el injerto falló, pudieron ser podados por encima de la última yema viva, y continuar crecimiento generando un patrón sin deformación aparente, que puede volverse a injertar, en el mismo plazo que los portainjertos criados específicamente para el injerto tradicional, de modo que podemos plantear un sistema de producción donde la totalidad de la planta se injerte en verde, y los fallos de este tipo de injerto, se reinjerten por el sistema tradicional al año siguiente, reduciendo considerablemente los costes y los deshechos de planta.



5. Conclusiones

El injerto en verde de vitroplantas de castaño, produce prendimientos tan buenos o mejores que el injerto tradicional, pero además acorta el ciclo de producción de planta injertada, reduce los costes, y los desperdicios de planta, por lo que en el Vivero de TRAGSA, se ha adoptado este sistema de injerto como el habitual para posteriores campañas.

6. Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente a través del programa FEDER ININTERCONECTA 2013/2014 (proyecto INTEGRACASTANEA EXPO0064828/ITC-20133040) apoyado por el CDTI y cofinanciado con fondos FEDER. Los autores agradecen a Jean Coulié la información proporcionada sobre el sistema de producción de castaño mediante injerto en verde.

7. Bibliografía

CUENCA, B.; ALDREY, A.; BLANCO, B.; VIDAL, N. 2015. Use of a Continuous Immersion System (CIS) for micropropagation of chestnut in photoautotrophic and photomixotrophic conditions. En: Park, Y.S. y Bonga. J.M. (eds). Proceedings of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on “Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies”. Página 112-116. Vitoria-Gasteiz, España. Publicado on line: <http://www.iufro20902.org>.

CUENCA, B.; LUQUERO, L.; OCAÑA, L.; VIDAL, N. 2017. Propagación de castaño a gran escala usando micropropagación fotoautotrófica. VII Congreso Forestal Español. Plasencia. Junio 2017.

DARIKOVA, J.A.; SAVVA, Y.V.; VAGANOV, E.A.; GRACHEVA. M.; KUZNETSOVA, G.V. 2011. Grafts of Woody Plants and the Problem of Incompatibility Between Scion and Rootstock (a review). Journal of Siberian Federal University. Biol. 14: 54-63.

D´KHILI, B.; BOUBALS, D.; GRENANA, S. 1996. Étude de l´incompatibilité au greffage chez la vigne. Bulletin de l´O.I.V. 1996: 757-788.

ESPEN, L.; COCUCCHI, M.; SACCHI, G.A. 2005. Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts. Tree Physiol. 25: 1419-1425.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; MIRANDA-FONTAÍÑA, M.E.; RAMOS-RODRIGUEZ, S.; LÓPEZ-VILLAMOR, A.; LÓPEZ-MUÑOZ, I. 2014. Técnicas de producción de plantas. En: Guía de cultivo do castiñeiro para producción de castaña. Xunta de Galicia. Consellería do Medio Rural e do Mar. Fernández-López, J. (ed). pp: 43-75.

FERNÁNDEZ-LORENZO, J. L., CRECENTE-CAMPO, S. 2009. In vivo serial micrografting of *Castanea sativa* in short cycles. In: *I European Congress on Chestnut-Castanea 2009* 866. pp. 291-296.

HUSSAIN, G., WANI, M. S., MIR, M. A., RATHER, Z. A., & BHAT, K. M. 2014. Micrografting for fruit crop improvement. *African Journal of Biotechnology*, 13 (25): 2474-2483.



KAPARI-ISAIA, T.H.; MINAS, G.J.; POLYKARPOU, D.; IOSEPHIDOU, E.; ARSENI, S.P.; KIRIAKOU, A. 2002. Shoot-tip Grafting *in vitro* for Elimination of Viroids and Citrus psorosis virus in the Local Arakapas Mandarin in Cyprus. Fifteenth IOCV Conference.

LLACER, G. 2009. Fruit breeding in Spain. Acta Hort. 814: 43-56.

MARTIN, C.; COLLAS, A. 1992. De la culture *in vitro* a la production de greffés-soudés issus du greffage herbacée de la vigne. Progrès Agricole et Viticole, 109 n° 3: 61-67.

NAVARRO, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. Acta Hort. 227: 43-55.

ONAY, A.; TIKAT, E.; IŞIKALAN, C.; NAMLI, S. 2007. Micrografting of Pistachio (cv. Siirt). In: Mohan Jain, S.; Häggman, H. (eds). Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, The Netherlands. pp. 289-298.

PATHIRANA, R.; MCKENZIE, M.J. 2005a. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using *in vitro* micrografting . Plant Cell Tiss. Organ Cult. 81:11-18.

PATHIRANA, R.; MCKENZIE, M.J. 2005b. A modified green-grafting technique for large scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.) Scientia Horticulturae, 107: 97-102.

RAHARJO, S.H.T.; LITZ, R.E. 2005. Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). Plant Cell Tissue and Organ Culture 82: 1-9.

SOKAL, R.R. ; ROHLF, F.J. ; 1981. Biometry : the principles and practice of statistics and biological research. Ed. Freeman. And Company. New York.

THERMOZ, J. P. 1999. La greffe bouture herbacée des plantes ligneuses, application aux Citrus. *agritrop.cirad*.

WANG, G.; LI, X.; CHEN, Q.; TIAN, J. 2010. Studies on factors affecting the microshoot grafting survival of walnut. Acta Hort. 861: 327-331.

WALTER, B.; BASS, P.; LEGIN, R.; MARTIN, C.; VERNY, R.; COLLAS, A.; VESSELLE, G. 1990. The use of green grafting technique for the detection of virus like diseases of the grapevine. Journal of Phytopathology, 128: 137-145.

ZILKA, S. FAINGERSH, E.; ROTBAUM, A.; TAM, Y.; SPIEGEL, S.; MALCA, N. 2002. *In vitro* production of virus-free pear plants. Acta Hort. 596: 477-479.

