

PRIMEROS ENSAYOS DE INDUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *QUERCUS SUBER* L.

M. A. Bueno y J. A. Manzanera*

CIT-INIA, Departamento de Sistemas Forestales, Apdo. 8111, 28080 Madrid. *Dept.de Silvopascicultura, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Univ. Politécnica de Madrid. Ramiro de Maeztu s.n., Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España.

RESUM

En aquest treball s'ha estudiat la susceptibilitat dels embrions, l'endosperma i els òvuls de la surera, *Quercus suber* L., a l'embriogènesi somàtica amb diverses concentracions de 2,4-D. S'han obtingut mostres amb periodicitat quinzenal al llarg de tot el període de desenvolupament del fruit, des del juny fins al setembre. Els embrions formen cal·lus, dels quals s'obtenen embrions de tipus globular, embrions cardíacs, i embrions somàtics amb cotiledons en diversos graus de desenvolupament. Els explants d'endosperma i els òvuls no desenvolupats no van mostrar, en general, una capacitat de resposta adequada.

RESUMEN

Se ha estudiado la susceptibilidad de embriones, endospermo y óvulos de alcornoque (*Quercus suber* L.) a la inducción de embriogénesis somática con distintas concentraciones de 2,4-D y a lo largo del período de desarrollo del fruto, tomando las muestras quincenalmente, desde junio a septiembre. En embriones se formó callo, del cual se obtuvieron estructuras organizadas de tipo globular, corazón y embriones somáticos con cotiledones en diversos grados de desarrollo, mientras que los explantos de endospermo y óvulos no desarrollados no mostraron, en general, capacidad de respuesta adecuada.

ABSTRACT

Susceptibility of cork oak (*Quercus suber* L.) embryos, endosperm and ovules to somatic embryogenesis induction has been studied. 2,4-D at different concentrations was tested. Samples were collected every two weeks, along the fruit development period, from June till September. The embryos formed callus, from which globular and heart and torpedo-shaped structures and somatic embryos at different developing degrees were obtained.

Key words: cork oak, *Quercus suber*, somatic embryogenesis, tissue culture, vegetative propagation.

INTRODUCCIÓN

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es una especie de destacado papel ecológico y forestal en la Europa mediterránea, especialmente en Portugal y España. También tiene suma importancia económica e industrial, por su producción de corcho, material de especiales características físico-mecánicas y tecnológicas, que lo hacen indispensable para determinadas manufacturas (industria corcho-taponera, mobiliario y decoración, aislamientos, etc.).

La propagación del alcornoque, tanto vegetativa como de semilla para repobla-

ción, presenta numerosas dificultades, por lo que nos hemos planteado la búsqueda de sistemas alternativos de propagación, tales como el cultivo de tejidos y la embriogénesis somática. En trabajos anteriores (Pardos 1981, Manzanera y Pardos 1990) se ha estudiado la micropropagación de individuos juveniles y de adultos rejuvenecidos. La embriogénesis somática se vislumbra como uno de los métodos de propagación del futuro, pues combina aspectos favorables del empleo de semillas, método tradicionalmente utilizado en el ámbito forestal, con el uso de clones procedentes de individuos sobresalientes. Hasta la fecha, la embriogénesis somática ha sido muy escasamente estudiada en esta especie (Maataoui y Espagnac, 1987), y sin llegar a obtener la regeneración de plántulas. Por estas razones, nos hemos propuesto estudiar la inducción de embrioides somáticos en alcornoque, con vistas a su futura aplicación a la mejora genética de esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como material vegetal se tomaron embriones inmaduros, porciones de endospermo y óvulos en bellotas de ocho alcornoces de buena producción de la finca La Herguijuela (Cáceres), designados por 1H, 3H, 7H, 8H, 9H, 10H, 11H y 12H. Se efectuaron recolecciones a lo largo de todo el período de desarrollo del fruto, con una periodicidad quincenal, desde el fin de la floración, que tuvo lugar en mayo y junio, hasta la maduración, en septiembre. Las fechas de recolección fueron: 25 de junio, 9 y 23 de julio, 6 y 20 de agosto, y 4 y 18 de septiembre. Se recogieron unas 50 bellotas por árbol, se prepararon pelando la cúpula y se esterilizaron con una solución de ClONa 2%, más unas gotas de Tween 20, en cámara de flujo laminar. A continuación se lavaron tres veces, durante 10 min, con agua destilada estéril.

Las bellotas se diseccionaron con ayuda de una lupa binocular, para extraer el embrión, porciones de endospermo y óvulos no desarrollados, que se cultivaron en medio con la siguiente composición: macronutrientes de Sommer *et al.* (1975), micronutrientes de Murashige-Skoog (1962) y los siguientes cofactores: ácido ascórbico (2 mg/l), ácido nicotínico (1 mg/l), glutamina (500 mg/l), pantotenato cálcico (1 mg/l), piridoxina (1 mg/l) y tiamina (1 mg/l). Como fuente de carbono se utilizó sacarosa (30 g/l). Como reguladores de crecimiento se emplearon: ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-bencil adenina (BA), ácido naftalén-acético (ANA), ácido giberélico (GA3) y ácido abscísico (ABA). El pH del medio de cultivo se ajustó entre 5,5 y 5,7, con NaOH 0,5N ó ClH 0,1N. Se esterilizó en autoclave a 0,6 atmósferas (115°C) durante 20 min, excepto la glutamina, GA3 y ABA, que se esterilizaron por filtración con filtros Millipore de 0,22, y se añadieron al medio de cultivo después de autoclave.

La mitad de los explantos se cultivaron en medio solidificado con agar (8 g/l) dispensado en placas de Petri, y la otra mitad se cultivó en medio líquido, en matraces Erlenmeyer de 100 ó 250 ml, con 25 ó 50 ml de medio, respectivamente. Se establecieron 5 explantos por tratamiento y tipo de medio (sólido o líquido). Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en agitación a 100 rpm.

Para el desarrollo de los embriones somáticos se compararon los siguientes tratamientos: ABA (1 mg/l) GA3 (1 mg/l) BA (0,1 mg/l) combinados con ANA (0,01 mg/l); y GA3 (1 mg/l) con BA (0,1 mg/l) y ANA (0,01 mg/l), añadidos al medio de cultivo basal sólido. Como material vegetal se emplearon embriones somáticos

formados en medio sólido, de las recolecciones 1ª a 5ª. Los tratamientos duraron un mes. A continuación, se transfirieron a medio basal sólido, en el que se sustituyó la glutamina por uno de los cuatro tratamientos de aminoácidos siguientes: asparagina (500 mg/l); arginina (500 mg/l); glutamina (500 mg/l) como control; y la combinación de asparagina (167 mg/l) con arginina (167 mg/l) y glutamina (167 mg/l).

Los cultivos se incubaron en cámara climática con fotoperíodo de 16 hr, y 5.000 lux de irradiancia. La temperatura diurna fue de 25 °C y la nocturna, de 22 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recolección del material vegetal

El objeto de efectuar recolecciones periódicas del material vegetal fue estudiar la capacidad de reacción de los distintos explantos iniciales ensayados, y la posible variación de la misma en el tiempo, en función del desarrollo de los explantos.

En la primera recolección (25 de junio), casi todo el material eran flores femeninas, al poco tiempo de la polinización, con óvulos poco desarrollados y que no mostraban diferencias de tamaño entre ellos. Apenas se pudieron distinguir unos pocos embriones. En la segunda recolección (9 de julio), se empezaron a observar embriones de pequeño tamaño, con el típico estadio de «corazón», envueltos en un endospermo fluido. Ya en la tercera recolección (23 de julio), algunos embriones estaban bastante desarrollados, ocupando completamente la cavidad del óvulo. En algún caso en que el endospermo no había sido consumido en su totalidad, éste poseía una consistencia sólida o gelatinosa. Un aspecto similar presentaron los embriones observados en la cuarta y quinta recolecciones (6 y 20 de agosto), aunque con progresivo aumento de tamaño. En la sexta y séptima recolecciones (4 y 18 de septiembre), los embriones mostraban un tamaño similar al de la madurez, llenando

Tabla 1: Respuestas embriogénicas en cultivos de óvulos (o) y endospermo (e) en medio sólido.

2.4-D (mg/l)	Recolección				
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª
0,5	+(o)	-(o)		-(e)	-(e)
1	-(o)	-(o)	-(e)	-(e)	-(e)
5	(o)	-(o)		-(e)	-(e)
10	-(o)	-(o)	-(e)	-(e)	-(e)

- = sin respuesta
 = formación de callo
 + = inducción de embriones
 o = óvulos
 e = endospermo

totalmente el volumen de la bellota. Para su establecimiento en cultivo, hubieron de ser seccionados en rodajas.

Tipo de explanto inicial

Las respuestas de los tres tipos de explanto inicial empleado se reflejan en las Tablas 1 (porciones de endospermo y óvulos), 2 y 3 (embriones). El endospermo no dio, en ningún caso, lugar a una respuesta positiva, salvo en un tratamiento, en el que se formó callo, de color blanco cremoso (Tabla 1). Los óvulos no desarrollados dieron lugar en dos tratamientos a la formación de callo, y sólo en uno de éstos se indujo la aparición de embriogénesis somática.

En cambio, partiendo de embriones zigóticos, las respuestas a la acción inductora del tratamiento se manifestaron mucho más abundantemente, formándose primero estructuras globulares (Fig. 1 y 2), que más tarde dieron lugar a embriones somáticos (Fig. 3), tanto en medio líquido (Tabla 2) como sólido (Tabla 3). En ambos tipos de medio de cultivo, se puede observar que el material vegetal que dio mejores respuestas a la inducción de embriogénesis somática fue el recolectado en el mes de agosto. También las recolecciones de septiembre dieron bastantes resultados positivos. En junio y julio, en cambio, hubo mayor número de explantos que no respondieron al tratamiento. Nuestros resultados contrastan con los de Gingas y Lineberger (1989), que constataron una capacidad embriogénica muy delimitada en el tiempo en embriones de *Quercus rubra*. Estos sólo dieron lugar a la formación de embriones somáticos cuando fueron recogidos entre cuatro y siete semanas después de la fertilización, que tuvo lugar en junio, reduciéndose drásticamente su capacidad regenerativa fuera de dicho período. Nuestra especie, al mostrar una floración difusa y una fructificación anual y bianual, presenta en una misma época distintos grados de desarrollo del embrión. Además, salvo cuando éste es de tamaño muy reducido,

Tabla 2.- Respuestas embriogénicas en cultivos de embriones zigóticos en medio líquido.

2.4-D (mg/l)	Recolección						
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª
	(Porcentaje de cultivos embriogénicos)						
0,5	0			75(+)	100(+)	50(*)	100(*)
1	0	50(**)	66,7(+)	80(#)	100(+)	50(*)	66,7(*)
5	0	0	100()	50()	100(#)	50()	100()
10	0				00(+)	0	100()

- = sin respuesta organogénica

= callo

+ = formación de estructuras globulares

= embriones somáticos en estadio de corazón

* = embriones somáticos cotiledonares

Tabla 3.- Respuesta embriogénica en cultivos de embriones zigóticos en medio sólido.

2.4-D (mg/l)	Recolección						
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*
(Porcentaje de cultivos embriogénicos)							
0,5	50(*)	20(#)	50(*)	85,7(+)	100(*)	80(*)	100(*)
1	50(**)	20(*)	50(+)	85,7(+)	100(*)	80(*)	100(*)
5	25(*)	0	20(**)	71,4(+)	100(+)	40(*)	100(+)
10	0	0	40(+)	85.7(*)	100(+)	40(*)	0

- = sin respuesta organogénica
 = formación de callo
 + = formación de estructuras globulares
 # = embriones somáticos en estadio de corazón
 * = embriones somáticos cotiledonares
 ** = embriones somáticos germinando

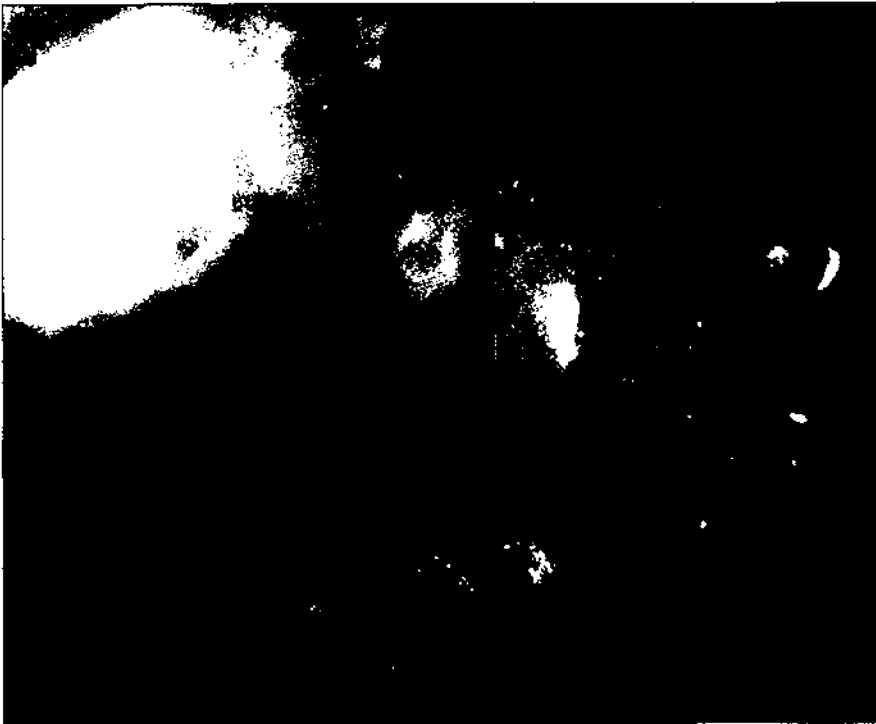
**Figura 1.-** Formación de estructuras globulares y de tipo corazón en callo inducido a partir de un embrión zigótico inmaduro.



Figura 2.- Detalle de la formación de estructuras globulares en callo

tiene buena capacidad embriogénica en un amplio rango de estadios de desarrollo. Por otra parte, la mayoría de los embriones somáticos se originaron directamente, o bien indirectamente a través de callo, a partir del hipocótilo, aunque los cotiledones también mostraron actividad embriogénica.

Influencia del 2,4-D en la inducción de embriogénesis somática

En experimentos anteriores con embriones de roble se estudió la actividad inductora de embriogénesis en los reguladores de crecimiento BA (1 mg/l), BA combinado con ANA (0,1 a 10 y 0,01 a 2 mg/l, respectivamente), y 2,4-D (1 mg/l). De todos ellos, el 2,4-D fue el mejor (datos no publicados). Por ello, se ha ensayado como único inductor, en las siguientes concentraciones: 0,5, 1, 5 y 10 mg/l, añadido al medio de cultivo. El tratamiento duró un mes, al cabo del cual se pasaron los explantos a medio base, sin reguladores de crecimiento, para permitir la expresión de la embriogénesis inducida. La Tabla 4 muestra que, en cualquier concentración, el 2,4-D fue un buen inductor de embriogénesis. En el medio líquido no se apreciaron diferencias, mientras que en medio sólido, las concentraciones de 0,5 y 1 mg/l dieron mayor porcentaje de cultivos embriogénicos que los tratados con 5 y 10 mg/l. Según observaciones de otros autores (Sung, 1988), el 2,4-D juega un papel estimulador de

Tabla 4.- Porcentaje de embriones somáticos inducidos por acción del 2,4-D.

Medio	Concentración de 2,4-D (mg/l)			
	0,5	1	5	10
Líquido	75,0%	71,4%	70,5%	70,0%
Agar	68,6%	71,4%	43,3%	47,2%

la división celular y del potencial embriogénico (Steward *et al.* 1964), pero se convierte en inhibidor del posterior desarrollo de las células embriogénicas (Halperin, 1970). Chalupa (1990), en cambio, trabajando con *Quercus robur*, obtuvo embriogénesis empleando BA solo o combinado con GA3, pero la adición de 2,4-D resultó ineficaz. En nuestro caso, algunos embriones somáticos llegaron a desarrollarse durante el tratamiento con 2,4-D, antes de pasarse los cultivos a medio sin reguladores de crecimiento.

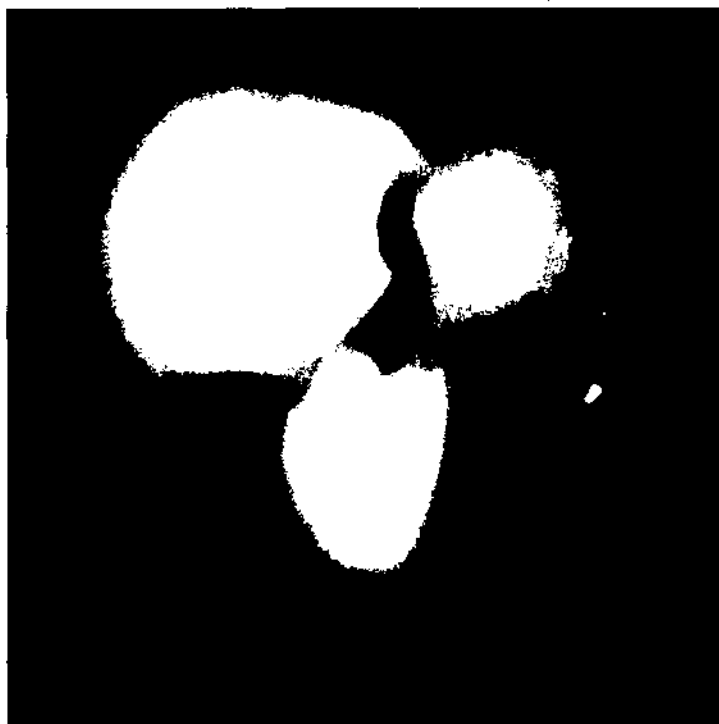
**Figura 3.-** Embrión somático desarrollado, obtenido en explanto de cotiledón.

Tabla 5.- Germinación de embriones somáticos con reguladores de crecimiento y aminoácidos.

Recolección												
1 ^a				2 ^a				3 ^a				
Reguladores de crecimiento												
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
GLN	*	*	*	*	**	*		**				*
ARG	*	*	*	*		**	**		*	**	**	**
3Am	*	**	**	**		**		**	*	**	**	**
ASN	*	*	*	*			**		*	*	*	*

1 = BA (0,1 mg/l) + ANA (0,01 mg/l)
2 = GA3 (1mg/l)
3 = ABA (1 mg/l)
4 = GA3 (1 mg/l) + BA (0,1 mg/l) + ANA (0,01 mg/l)

GLN = Glutamina
ARG = Arginina
ASN = Asparagina
3Am = GLN + ARG + ASN

* = embriones somáticos desarrollados
** = embriones somáticos germinados

Desarrollo de los embriones somáticos

Después de las fases de inducción de embriogénesis con 2,4-D y de su expresión en medio basal, se estudió el efecto de varios reguladores de crecimiento y aminoácidos en el desarrollo de los embriones somáticos.

A los 25 días del pase a medio con uno de dichos tratamientos con aminoácidos, se empezó a observar la germinación de embriones somáticos en varios de los tratamientos, como muestra la tabla 5. En la mayor parte de los casos se desarrolló la radícula, aunque también pudo observarse en algunos el desarrollo del epicótilo.

CONCLUSIONES

Los experimentos llevados a cabo han confirmado que los embriones inmaduros son un buen material de partida para obtener embriogénesis somática. El 2,4-D, en cualquiera de las concentraciones empleadas, pero particularmente a razón de 0,5 a

1 mg/l, es un buen inductor de la misma. El desarrollo y la germinación de los embriones somáticos obtenidos se ha conseguido en varios tratamientos de reguladores de crecimiento y de aminoácidos, con resultados parecidos, sin que pueda destacarse ninguno de ellos como el mejor. Estos resultados sugieren la necesidad de ulteriores estudios para optimizar la obtención de embriones somáticos en alcornoque.

Agradecimientos

Deseamos manifestar nuestro más sincero agradecimiento a Estrella Tortosa, por su desinteresada ayuda en las técnicas de microscopía electrónica.

Bibliografía

- CHALUPA, V. 1990. Plant regeneration by somatic embryogenesis from cultured immature embryos of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) *Plant Cell Reports*, 9: 398-401.
- GINGAS, V.M. & LINEBERGER, R.D. 1989. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 17: 191-203.
- HALPERIN, W. 1970. Embryos from somatic plant cells. *Proc. Intl. Soc. Cell Biol. Symp.* 9: 169-191.
- MAÂTAOUI, M. EL, & ESPAGNAC, H. 1987. Néof ormation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissus de chêne liège (*Quercus suber* L.). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 304, Série III, 3, 83- 88.
- MANZANERA, J.A. & PARDOS, J.A. 1990. Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21: 1-8.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plnt.* 15: 473- 497.
- PARDOS, J.A. 1981. *In vitro* plant formation from stem pieces of *Quercus suber* L. *Coll Int sur la Culture in vitro des Essences Forestières*. IUFRO (AFOCEL Ed.) Fontainebleau, France. 186-190.
- SOMMER, H.E. *et al.* 1975. Differentiation of plantlets in longleaf pine (*Pinus palustris* Mill.) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.* 136: 196-200.
- STEWART *et al.* 1964. Growth and development of cultured plant cells. *Science* 143: 20-27.
- SUNG G. 1988. Gene expression in embryogenesis. *Hort. Science*, 23:513-515.