

CULTIVO IN VITRO DEL ALCORNOQUE

M. Toribio y C. Celestino

Unidad de Mejora Forestal y Viveros, Servicio de Investigación Agraria, Comunidad de Madrid, Apdo. 127 Alcalá de Henares 28880.

RESUM

Aquest article revisa l'estat actual dels estudis dirigits a la micropropagació de *Quercus suber* L., i enquadra la seva possible aplicació en programes de millora genètica. Dels cultius d'embrions i segments nodals sorgeixen algunes de les primeres dades sobre el comportament d'aquesta espècie. La concentració de sals en general, i de potassi en particular, en el medi mineral condicionen el creixement, així com les d'auxina i citoquinina. A partir de segments nodals, amb material procedent d'individus joves i adults, s'ha obtingut la regeneració de plantes completes. En el tractament del cultiu del callus s'assenyala l'aparició d'embriogènesi somàtica.

RESUMEN

El presente artículo revisa el estado actual de los estudios encaminados a la micropropagación de *Quercus suber* L., encuadrando su posible aplicación en programas de mejora genética. De los cultivos de embriones y segmentos nodales surgen algunos de los primeros datos sobre el comportamiento de esta especie. La concentración de sales en general, y de potasio en particular, en el medio mineral condicionan el crecimiento, así como las de auxina y citoquinina. A partir de segmentos nodales, con material procedente de individuos jóvenes y adultos, se ha obtenido la regeneración de plantas completas. En el tratamiento del cultivo del callo se señala la aparición de embriogénesis somática.

ABSTRACT

Vegetative plant propagation is mainly used in the operational line of Forest Tree Improvement Programs to capture all the genetic potential, including the non-additive component of the genetic variance. In the case of genus *Quercus*, it could be also used to avoid the problems derived from installation and yielding of seed orchards. The tissue culture based micropropagation arises as an alternative technique to solve the problems of space and time associated with the classical techniques of asexual propagation. This article reviews the work done with cork-oak in this field. Up to date there are few papers dealing with in vitro culture of *Quercus suber* L. Embryo culture has been tried to determine the minimum requirements of the species and its morphogenic potential. Plantlet regeneration has been obtained following axillary budding on nodal segments from juvenile and rejuvenated tissues, elongation and rooting of microcuttings. Main problems arise on transplanting soil the neoformed plants. Callus culture has been achieved from cotyledons

and epicotyl segments from young seedlings. In booth cases also somatic embryogenesis has been reported. This fact opens a new way for micropropagating cork-oak, which is discussed.

Key words: cork-oak, micropropagation, plant regeneration, *Quercus suber* L., somatic embryogenesis, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

En los programas de mejora genética forestal, la línea operativa (producción a gran escala de planta selecta) suele llevarse a cabo a través de semilla, tras la selección de genitores, el establecimiento de huertos semilleros y los necesarios ensayos de progenie. Existen excepciones notables a esta regla, como es el uso extendido de la propagación vegetativa en especies de los géneros *Salix*, *Populus* y *Cryptomeria*.

Los programas de mejora basados en la propagación asexual presentan ventajas sobre los que utilizan la vía sexual en la fase operativa. La más importante es la rápida fijación de todo el potencial genético de los individuos seleccionados, incluidos los efectos debidos a la componente no aditiva de la variación genética (McKead y Weir, 1984). Existen otras ventajas, entre las que cabe señalar el potencial para obtener la máxima uniformidad en la plantación, con lo que se simplificarían los problemas de gestión de masa, y la capacidad para acelerar la obtención de los beneficios de las acciones de mejora (Libby y Rauter, 1984).

A pesar de sus ventajas, las acciones basadas en la clonación de individuos sobresalientes no se han empezado a acometer extensivamente en los programas de mejora de muchas especies forestales, hasta el comienzo de la última década. La razón fundamental reside en los problemas biológicos que presenta la propagación vegetativa de la mayoría de las especies, relacionados principalmente con el proceso de maduración (Toribio, 1986a).

La propagación a gran escala por vía sexual presenta problemas, principalmente ligados a los procesos de floración y fructificación, que dificultan o no hacen rentable la instalación y el rendimiento de los huertos semilleros. Es este el caso de las quercíneas y especialmente del alcornoque, especie que presenta una acusada vecería.

La técnica de la propagación vegetativa utilizada con fines operativos es el enraizamiento de estaquillas. En los últimos años esta técnica ha alcanzado un considerable desarrollo en cuanto a su aplicación a especies forestales, presentando buenos resultados de cara a la consecución de programas basados en la clonación.

Las técnicas de cultivo *in vitro* vienen a unirse a las convencionales, proporcionando una serie de ventajas añadidas. Entre ellas, cabe destacar la rapidez en la propagación masiva de clones y la economía de espacio. Asimismo existe la posibilidad de conseguir respuestas que no se pueden lograr *in vivo*, en principio sin

problemas estacionales, con lo cual se podría adaptar la salida de la producción a las necesidades del mercado o de la gestión (Hartmann y Kester, 1983). También con estas técnicas se puede lograr un sistema de almacenamiento a largo plazo de

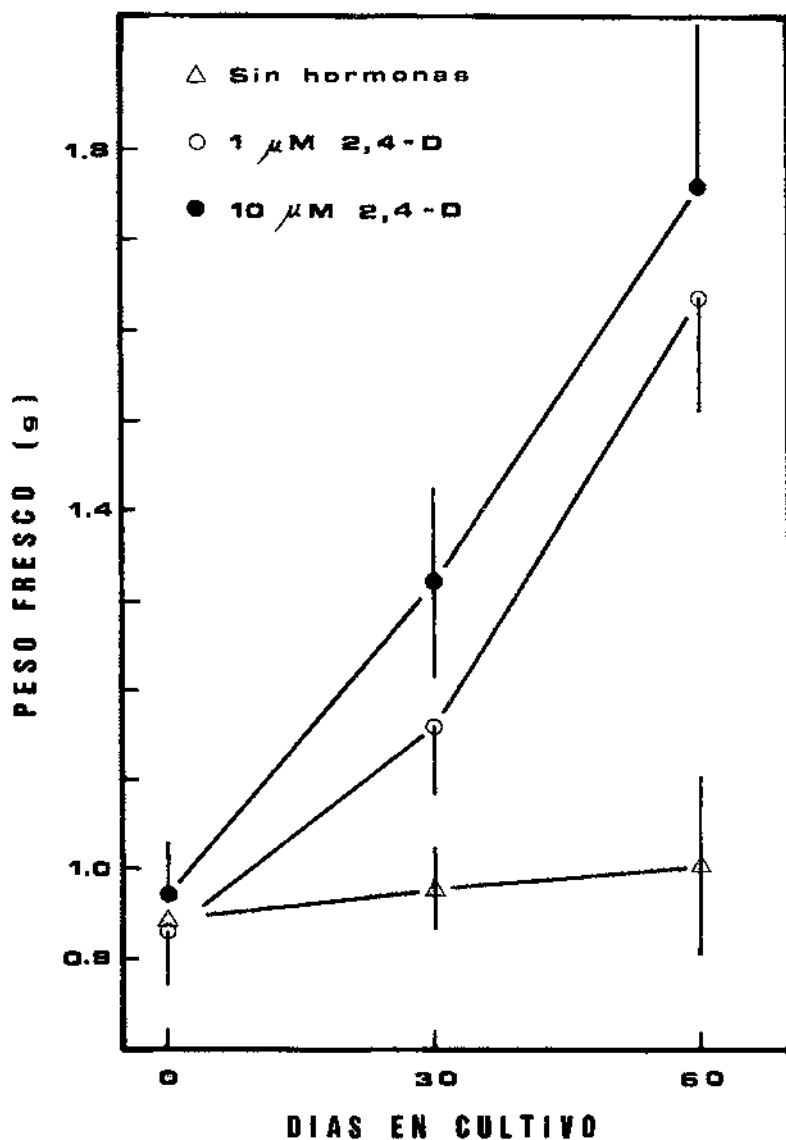


Figura 1. Curvas de crecimiento de explantos cultivados en medios con presencia o ausencia de auxina. Los repicados se efectuaron mensualmente al mismo medio inicial. Las barras verticales representan el error estándar. (Toribio, 1986b).

material vegetal, una vía de intercambio de dicho material libre de patógenos y un medio para controlar el estado de maduración de los clones.

Frente a estas ventajas, una vez salvado el escollo de la regeneración de plántulas, existen dos inconvenientes importantes. Por una parte, y debido a la variación somaclonal que se produce *in vitro*, puede perderse la identidad de los propágulos producidos por la planta donante, y por tanto la uniformidad dentro del clon. Por otra parte, debido a las metodologías del cultivo *in vitro* y a las necesidades de personal especializado, la técnica puede resultar cara para su aplicación a gran escala.

ORGANOGENÉISIS IN VITRO: CULTIVO DE EMBRIONES

Al igual que en otras quercíneas, los trabajos que reseñan el cultivo *in vitro* del alcornoque son escasos (Bellarosa, 1989). Uno de los explantos que primero se suelen introducir *in vitro* con el fin de explorar las posibilidades morfogénicas de la especie, son los embriones extraídos de la semilla, los cuales a menudo presentan buenas respuestas por su carácter extremadamente juvenil.

Bellarosa (1982) cultivó embriones en medio Durzan, modificado en el sentido de incrementar la concentración de nitrógeno total igualando las proporciones amonio-nitrato, así como la de potasio, con el fin de estudiar la influencia de una citoquinina (6-benciladenina, BA) y una auxina (ácido α -naftalenacético, NAA) sintéticas sobre el desarrollo.

Sus resultados sugieren en primer lugar que los tejidos de alcornoque cultivados *in vitro* pueden ser susceptibles a la concentración de sales del medio. En dicho medio diluido a la mitad, se obtiene un crecimiento más normal y rápido. El papel de los reguladores del crecimiento no queda claro, pero parece que la presencia de citoquinina favorece la formación de yemas axilares, no existiendo una incidencia sobre formaciones adventicias. Éstas sí aparecen cuando además se encuentra presente la auxina, la cual también bloquea el crecimiento. Un dato adicional es que el tejido que muestra mayor reactividad es el del tallo hipocotilo. Sin embargo los ligamientos cotiledonares no muestran actividad meristemática, en contraste con lo que sucede en otras fagáceas como el castaño.

La puesta a punto de la técnica de cultivo de embriones puede ser de utilidad, caso de interesar el establecimiento de bancos de germoplasma de la especie, así como para servir de modelo de desarrollo en las líneas de embriogénesis somática.

OBTENCIÓN DE PLÁNTULAS

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha sólo existen dos trabajos que señalan la consecución de plántulas de alcornoque *in vitro*. Ambos utilizan el mismo tipo de explanto inicial, segmentos nodales, y siguen una vía de gran utilidad en la mi-

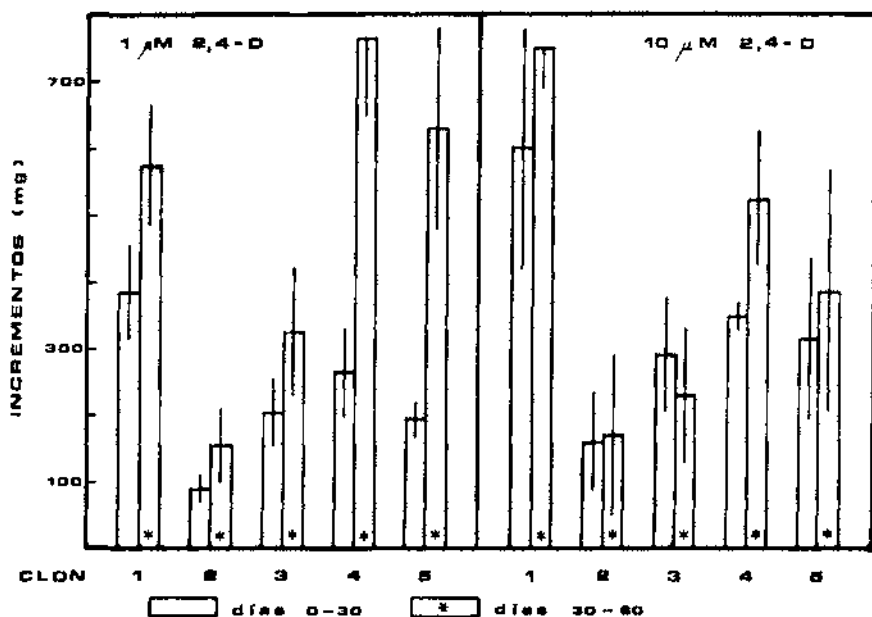


Figura 2. Respuestas de distintos clones con respecto a la formación de callo. Por clon se entiende un grupo de explantos tomados de la misma bellota. Los repicados se efectuaron mensualmente al mismo medio inicial. Incrementos: diferencias en peso fresco entre los días señalados en cultivo. Las barras verticales representan el error estándar (Toribio, 1986b).

cropropagación de especies forestales: la inducción del crecimiento de yemas axilares, su alargamiento, enraizamiento y posterior paso a tierra.

Pardos (1982) cultivó explantos procedentes de plantas de entre seis y doce meses de edad en medio MS, estudiando el papel de la auxina (NAA) y la citoquinina (BA) en el desarrollo de yemas axilares. Constató que la auxina condiciona la extensión de la respuesta, mientras que la citoquinina interviene en la intensidad de la misma. Parece que el condicionamiento auxínico es muy preciso, ya que las concentraciones del orden de $0,5 \mu\text{M}$ de NAA provocan la brotación hasta en el 92% de los explantos, mientras que con concentraciones superiores o en ausencia de hormona prácticamente no se obtiene respuesta. La posición original del segmento nodal en la planta donante, también determina el porcentaje de explantos que forman yemas, desapareciendo este efecto cuando el explanto no se en-

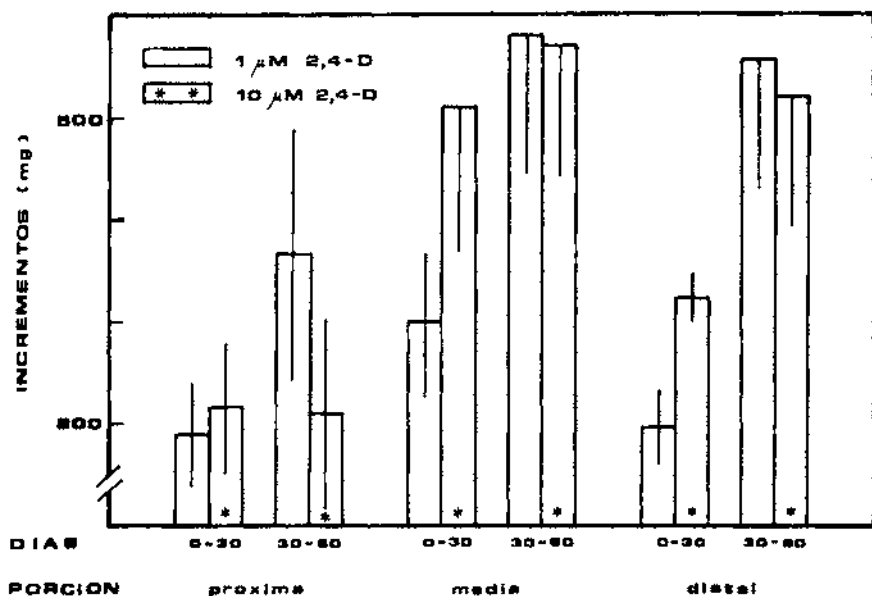


Figura 3. Capacidad proliferativa de los explantos dependiente de su posición inicial en el cotiledón. Los explantos de la porción denominada «próxima» son los más cercanos al embrión. Los repicados se efectuaron mensualmente al mismo medio inicial. Incrementos: diferencias en peso fresco entre los días señalados en cultivo. Las barras verticales representan el error estándar (Toribio, 1986b).

cuenta desprovisto de hojas. Este hecho sugiere al autor la posible existencia de un condicionamiento endógeno del proceso.

El alargamiento de los tallos neoformados fue espontáneo, mostró una gran variabilidad y fue, en términos generales, menor en aquellos explantos cultivados en los medios con concentraciones de citoquinina más alta. Éste suele ser el paso que presenta características limitantes en la mayoría de protocolos de micropropagación de especies leñosas, ya que condiciona la siguiente fase de enraizamiento.

La capacidad de formar raíces depende del tamaño de la microestaquilla, requiriéndose un mínimo de 10 mm de longitud. El mejor tratamiento (35% de enraizamiento) resultó ser el cultivo en el medio MS sin diluir con 1mg/l de ácido indolil-3-butírico (IBA) durante 7 días, con posterior transferencia al mismo medio sin hormona y carbón activo al 0,3 %. La raíz formada, gruesa, larga y sin ramificaciones, debe presentar problemas de funcionalidad, ya que las plántulas transferidas a diferentes mezclas de sustratos no duran más de tres meses.

El paso a tierra es otra de las fases más delicadas de la micropropagación in vitro. Así lo constata Manzanera (1988) en su trabajo sobre la micropropagación del alcornoque. Este autor ha estudiado con detalle factores que influyen en los distintos pasos necesarios para la obtención de plántulas a partir de segmentos nodales, tanto procedentes de plantas jóvenes como de brotes de cepa de individuos adultos. Este último material, presumiblemente rejuvenecido, presenta algunas diferencias de respuestas en relación con el material joven; sin embargo se ha logrado obtener su propagación vegetativa, lo cual abre una vía importante para la clonación de fenotipos seleccionados.

La relación de estos estudios con los mencionados previamente parece consolidar un dato importante en relación al cultivo in vitro de esta especie: su sensibilidad a los medios con alto contenido en sales, y la posible necesidad de cantidades relativamente altas de potasio.

La utilización de distintas formas de macronutrientes ha señalado que existen clones con composiciones preferidas, pero existe una formulación, la de Sommer, de «amplio espectro», uniformemente válida para todos los clones.

Los distintos pasos necesarios para lograr la micropropagación muestran unos requisitos similares a los de otras especies leñosas. Tanto para la fase inicial de inducción, como para la de multiplicación es necesaria la presencia de citoquinina y auxina. El alargamiento de los brotes neoformados no parece presentar dificultades especiales cuando el medio contiene bajas concentraciones de auxina y citoquinina, no influyendo en el ulterior proceso de enraizamiento.

Cultivando las microestaquillas en medio con IBA, en concentraciones de este último algo más elevadas cuando el material procede inicialmente de brotes de cepa que cuando proviene de planta joven, durante siete días y transfiriéndolas a medio sin hormonas, se obtienen raíces a los veinte o treinta días. Elevando la concentración de sacarosa en el medio se obtienen mejores porcentajes de enraizamiento, hasta el 70% de los explantos.

Los resultados de estos estudios resultan muy prometedores de cara a la posible micropropagación comercial de la especie, de gran interés sobre todo en el caso de material procedente de individuos adultos.

CULTIVO DEL CALLO: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El cultivo de callo es uno de los más antiguos del cultivo de tejidos vegetales. Siguiendo esta vía se ha logrado regenerar plántulas en un cierto número de especies leñosas, aunque es una vía no carente de dificultades ligadas fundamentalmente a la capacidad de organogénesis y a la estabilidad genética de los cultivos. Sin embargo el cultivo de callo es paso en gran medida obligado para otras posibilidades del cultivo in vitro, principalmente de los cultivos celulares con todas las tecnologías a ellos asociadas (fusión de protoplastos, transformación genética, etc.), y la embriogénesis somática.

Nosotros hemos estudiado las condiciones de inducción de callo en cotiledo-

nes aislados de bellota madura (Toribio, 1986b). Este tipo de tejidos juveniles en muchos casos suele presentar una gran reactividad *in vitro*, de tal manera que simplemente las lesiones producidas por los cortes de formación del explanto inicial (*wounding effect*) son estímulo suficiente para inducir la proliferación de callo. En el caso del alcornoque no es así y se requiere la presencia de una auxina para la formación de callo. La hormona utilizada por nosotros, el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) mostró la misma efectividad a las dos concentraciones ensayadas (Fig. 1), sugiriendo que la proliferación de callo se puede desencadenar con la mínima presencia hormonal. Al igual que sucede para muchos otros tipos de respuesta y en las más diversas especies, las condiciones del explanto inicial, fundamentalmente el genotipo, determinan la inducción y el crecimiento del callo (Fig. 2). Otro factor que incide en la formación de callo es la posición relativa del explanto inicial con respecto al cotiledón entero. La parte media resulta ser más reactiva (Fig. 3) habiéndose achacado esta misma circunstancia en nogal a una distribución diferencial en las reservas de carbohidratos (Rodríguez, 1982). Fun-



Figura 4. Respuesta organogénica en fragmentos de cotiledón. Los explantos permanecieron durante 30 días en medio MS con $1 \mu\text{M}$ de BA y $10 \mu\text{M}$ de NAA, siendo repicados mensualmente a medio sin hormonas. Además de la formación de callo sobre las superficies de corte, se obtuvo rizogénesis adventicia en un 40% de los explantos (Toribio, 1986b).

damentalmente en la dosis más alta de 2,4-D ($10 \mu\text{M}$) los callos sufrían oscurecimiento, tal vez debido a la composición del medio de cultivo (Murashige y Skoog, 1962).

La capacidad de este tipo de explantos se muestra al separarlos con otro estímulo hormonal. Cultivados en medio MS con $1 \mu\text{M}$ de NAA durante 30 días y transferidos posteriormente a medio sin hormonas, se forma una cierta cantidad



Figura 5. Embriogénesis somática sobre fragmentos de cotiledón de alcornoque. Los explantos iniciales se cultivaron en medio MS con $20 \mu\text{M}$ de BA y $10 \mu\text{M}$ de NAA durante 30 días, siendo repicados mensualmente a medio sin hormonas. Se apreció un desarrollo generalizado de una superficie nodular verdosa, fundamentalmente en las zonas de corte. En dos de veinte explantos se desarrollaron embrioides somáticos (Toribio, 1986b).

de callo en las superficies de corte y aparecen raíces adventicias hasta en el 40% de los explantos (Fig. 4).

En medios con 20 μM de BAP y 10 μM de NAA la cantidad de callo producido fue pequeña, manifestándose como ligeras alteraciones nodulares y verdosas en la superficie del explanto, apareciendo la formación de embrioides somáticos (Fig. 5). Los embrioides mostraron un incipiente desarrollo foliar y la presencia de signos de poliembrionía, no lográndose crecimiento ulterior.

El fenómeno de la poliembrionía es un aspecto habitual e indeseado en la embriogénesis somática en cultivo in vitro, habiéndose señalado también en alcornoque por otros autores (El Maataoui y Espagnac, 1987). Estos autores cultivaron segmentos nodales procedentes de plantas de seis a ocho meses de edad en un medio MS suplementado con glucosa 111 μM , 1 g.l⁻¹ de hidrolizado de caseína, IBA 10 μM y BA también a una concentración cercana a 10 μM . Sobre dichos explantos apareció un callo que produjo al cabo de cinco a siete semanas unas formas esféricas fácilmente escindibles, aproximadamente sobre el 3% de los explantos. Estas formas desarrollaron claros embrioides somáticos, tras pasar por los típicos estados globular y torpedo con polos radicales y apicales perfectamente definidos, primordios cotiledonares y trazas vasculares de conexión.

Sin embargo estos embrioides enseguida forman embrioides secundarios, fundamentalmente próximos al polo radical, que distorsionan su normal estructura. En adición, aunque la raíz empieza a alargarse, aparece una dormición apical que impide la evolución normal del embriode.

Con estos estudios se ha abierto una vía de gran potencial para la micropropagación del alcornoque. La embriogénesis somática, según está ampliamente reconocido, puede ser la oportunidad futura de clonación a gran escala de muchas especies. En razón de su origen presenta por un lado la capacidad de multiplicación importante que abarataría el coste de las técnicas; por otra parte, al lograr plántulas mediante unos procesos de ontogénesis similares a los naturales, éstas presentarían menores problemas de estructura y de estabilidad genética (Berlyn et al., 1986).

Bibliografía

- BELLAROSA, R. (1982). In vitro culture of *Quercus suber* L. embryos. Coll. Int. Culture in vitro des essences forestières. Fontainebleau, France 1981. AFOCEL (Association Forêt-Cellulose), pp. 119-126.
- BELLAROSA, R. (1989) Oak (*Quercus* spp.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 5. Trees II. Springer-Verlag. pp. 387-401.
- BERLYN, G.P. et al. (1986). Tissue culture and the propagation and genetic improvement of conifers. *Tree Physiol.*, 1: 227-240.
- EL MAATAOUI, M. & ESPAGNAC, H. (1987). Néofornation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissus de chêne liège (*Quercus suber* L.). C.R. Acad. Sc. Paris t. 304, Sér. 111 n° 3: 83-88.
- HARTMANN, H.T. & KESTER, D.E. (1983). Plant propagation. Principles and Practices 4th. Ed. New Jersey. Prentice/Hall Int. Inc.

- LIBBY, W.J. & RAUTER, R.M. (1984). Advantages of clonal forestry. *For. Chron.* 60(3): 145-149.
- MACKEAND, S.E. & WEIR, R.J. (1984). Tissue culture and forest productivity. *J. For.* 82(4): 213-218.
- MANZANERA, J.A. (1988). Micropropagación del alcornoque (*Quercus suber* L.) Tesis doctoral. E.T.S.I. Montes, U.P. de Madrid.
- PARDOS, J.A. (1982). In vitro plants formation from stem pieces of *Quercus suber* L. Coll. Int. Culture in vitro des essences forestières. Fontainebleau, France 1981. AFOCEL (Association Forêt-Cellulose) pp. 186-190.
- RODRÍGUEZ, R. (1982). Callus initiation and root formation from in vitro culture of walnut cotyledons. *Hort Sci.*, 17: 195-196.
- TORIBIO, M. (1986 a). El control del proceso de maduración: una necesidad para la selvicultura clonal. *Montes*, 12: 22-28.
- TORIBIO, M. (1986 b). Callus initiation and primary morphogenic responses from *Quercus suber* L. cotyledons cultured in vitro. Proc. 18th IUFRO World Congress, Juhljana, Yugoslavia, Div. 2 vol. II, pp. 863.