CLONACIÓN DE ÁRBOLES SELECCIONADOS DE ALCORNOQUE (*QUERCUS SUBER L.*) MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

I. HERNÁNDEZ; C. CELESTINO; M. TORIBIO

Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA)
Comunidad de Madrid. Apdo. 127, 28800 Alcalá de Henares (Madrid)
Correo electrónico: mariano.toribio@imia.comadrid.es

RESUMEN

La clonación de árboles adultos, en los que se puede llevar a efecto la selección fenotípica evaluando con fiabilidad los caracteres de interés, resulta a menudo imposible. En este trabajo referimos la regeneración completa, mediante embriogénesis somática, de plantas clónicas de árboles seleccionados de alcornoque. Se tomaron ramas de cinco árboles seleccionados en la finca "La Almoraima" (Cádiz), en las que se forzó la brotación. En las hojas brotadas se indujo la formación de embriones somáticos siguiendo un protocolo que establecimos previamente. Las hojas procedentes de los cinco árboles dieron lugar a cinco líneas embriogénicas, las cuales han sido la fuente de material para los estudios de conversión. En cada trasplante mensual a medio fresco de dichas líneas, se aislaron los embriones que mostraban maduración espontánea. Al cabo de ocho repicados se recolectaron 1.352 de estos embriones. Después de 8 semanas en frío, germinaron un 41% en promedio, variando según genotipos entre un 32 y un 58 %. Las plantas resultantes se transfirieron a condiciones *ex vitro*, mostrando crecimiento activo un 49 % de las mismas, entre el 31 y el 59 % dependiendo del genotipo. Aunque el paso más crítico ha sido la transferencia a condiciones de baja humedad ambiental, se han conseguido aclimatar completamente algunas plantas.

P.C.: *Quercus suber L.*, embriogénesis somática, conversión.

SUMMARY

Cloning mature forest trees, in which reliable phenotypic selection based on desired traits could be carried out, is often impossible. In this work we refer the complete regeneration by somatic embryogenesis, of clonal plants from selected cork oak trees. Branches of five selected trees were collected in "La Almoraima" (Cádiz) and later they were forced to sprout. The formation of somatic embryos was induced in expanding leaves following a protocol that we defined previously. Leaves coming from the five trees gave origin to five embryogenic lines, that have been the material source for the conversion studies. Embryos that showed spontaneous maturation were isolated from these lines at each monthly subculture to fresh medium. After eight subcultures, 1.352 mature embryos were gathered. Following 8 weeks in cold storage, 41 % in average of these embryos germinated, ranging from 32 to 58 % depending on the genotype, when they were placed in germinating conditions. The resulting plants were transferred to *ex vitro* conditions, 49 % of them showing active growth, ranging from 31 to 59 % depending on the genotype. Although some plants have been completely acclimatised, the transfer to low humidity conditions remains the most critical step.

K.W.: *Quercus suber L.*, somatic embryogenesis, conversion.

INTRODUCCIÓN

Actualmente es importante el desarrollo de métodos de propagación vegetativa encaminados a la mejora genética, especialmente la posibilidad de generar progenies clonales a partir de individuos seleccionados (Merkle, 1995). Uno de estos métodos, la regeneración por embriogénesis somática, permite altas tasas de multiplicación sin condicionantes estacionales, automatización del proceso y obtención de plantas con perfecta conexión vascular raíz-tallo. La embriogénesis somática comienza a ser una realidad práctica en especies forestales, concretamente en un género de gran importancia silvícola tradicionalmente considerado como recalcitrante, el género *Quercus*.

El alcornoque (*Quercus suber L.*) tiene un elevado interés económico en la producción de corcho, producto demandado principalmente en la industria vinícola, que requiere la producción de tapones de corcho de gran calidad. También posee valor ecológico, ganadero y social, ya que los alcornocales en su mayoría son dehesas o montes pastables y además, en zonas como Andalucía y Extremadura, el alcornoque representa una buena opción de reforestación por ser un monte capaz de absorber mayor cantidad de mano de obra que otras masas forestales en su explotación para la obtención de corcho (López Quero, 1995). La obtención de corcho de alta calidad para la industria del vino podría llevarse a cabo por el desarrollo de plantaciones forestales clonales de alto valor (Park *et al*. 1998), resultando la embriogénesis somática una herramienta importante en esta estrategia de mejora genética.

Se ha obtenido embriogénesis en alcornoque a partir de cotiledones de embrión cigótico (Toribio & Celestino 1989), segmentos nodales de planta joven (El Mâataoui & Espagnac, 1987), embriones cigóticos completos (Bueno *et al.* 1992), hojas de planta joven (Fernández–Guijarro *et al*. 1995), anteras (Bueno *et al*. 1997) y amentos (Toribio *et al*. 2000). Una de las limitaciones que presenta la embriogénesis somática, al igual que otros métodos de propagación vegetativa, radica en la dificultad, en la mayoría de los casos, de tener éxito al realizarla a partir de tejidos de árboles adultos, momento en el que sería posible y más fácil realizar una selección fenotípica con la seguridad de evaluar los caracteres de interés (Merkle, 1995). Siguiendo protocolos similares al utilizado para la inducción de embriones somáticos en hoja de planta joven de alcornoque, es posible obtenerlos a partir de hoja de árbol adulto (Toribio *et al*. 2000; Hernández *et al*. 2000), de los que se han conseguido plantas, algunas de las cuales se encuentran creciendo activamente en suelo (Celestino *et al*., 1999). También hemos obtenido embriones somáticos a partir de hoja de alcornoques seleccionados (Hernández *et al.*, 1999). En este trabajo presentamos la conversión de los embriones somáticos y aclimatación de plantas clónicas de dichos alcornoques seleccionados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inducción de embriogénesis somática

Se recogieron ramas de 5 alcornoques seleccionados en la finca “La Almoraima” (Cádiz), con las denominaciones ALM 3, ALM 4, ALM 5, ALM 6 y ALM 80. Las ramas se pusieron en condiciones de alta humedad en invernadero para forzar la brotación. Las hojas brotadas, con tamaños entre 0.5 y 1.5 cm, fueron recolectadas y esterilizadas con etanol (70%) durante 30 s y lejía comercial (10 %) durante 10 m. A continuación se indujo la embriogénesis somática en las hojas siguiendo el protocolo descrito en Hernández *et al*. (1999), mejorado a partir del descrito en Fernández-Guijarro et al (1995), aplicado con éxito en la inducción de embriogénesis somática en hoja de planta joven y árbol adulto. El tratamiento comienza con una fase inicial en la que las hojas se cultivan en un medio compuesto de macronutrientes de Gamborg (1966) diluidos a la mitad y el resto de componentes de Murashige & Skoog (1962), 10 gl^{-1} de sacarosa y 6 gl^{-1} de agar, durante 7 días en oscuridad y a 25 ±1 ºC. A continuación se realiza el tratamiento de inducción que consta de tres fases en las que se utiliza el mismo medio de cultivo base, compuesto por los macronutrientes de Schenk & Hildebrandt (1972), resto de componentes de Murashige & Skoog (1962), 30 gl^{-1} de sacarosa, 6 gl^{-1} de agar, y variando la concentración de los reguladores de crecimiento BAP y ANA y las condiciones de cultivo: en la primera fase se añade al medio 10 μM de BAP y 50 μM de ANA. Se mantienen durante 30 días en oscuridad y a 25 ±1 ºC. En la segunda fase las hojas se transfieren a medio de cultivo con las concentraciones de los reguladores reducidos a 0,5 μM de BAP y 0,5 μM de ANA. Se mantienen en estas condiciones durante 30 días en luz (fotoperiodo de 16 h) y a 25 ±1 ºC. La última fase consiste en el repicado de las hojas al medio base sin reguladores de crecimiento, manteniéndose en las condiciones anteriores. Las líneas embriogénicas obtenidas se mantienen en proliferación mediante transferencia mensual a medio fresco sin reguladores del crecimiento.

Conversión y aclimatación

En los sucesivos repicados a medio fresco se aislaron los embriones que maduraban espontáneamente, reconociéndolos por ser más grandes que el resto de embriones y carecer de embriogénesis secundaria. Se mantuvieron en oscuridad a 4 ±1ºC durante 8 semanas en medio de cultivo base sin reguladores. A continuación se colocaron en condiciones de germinación (fotoperiodo de 16 h de luz y 25 ±1ºC) en el mismo medio base. Transcurridos 30 días las plantas germinadas se transfirieron a condiciones *ex vitro*, colocándolas en macetas con una mezcla de turba, arena y corteza de pino (1:1:3) y 3 gl^{-1} de osmocote. Se mantuvieron en cámaras de cultivo en condiciones de humedad relativa alta, un primer ciclo de 30 días en cámara fresca (termoperiodo de 12 ±1ºC noche y 20 ±1ºC día) y a continuación un ciclo de otros 30 días en cámara cálida (25 ±1ºC). En laboratorio se terminaron de aclimatar, quitando paulatinamente las campanas individuales que mantienen alta humedad. Posteriormente se colocaron en condiciones de vivero bajo cubierta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de ocho repicados a medio fresco de cada una de las líneas embriogénicas de los cinco árboles plus, aislamos un total de 1.352 embriones maduros, variando en función del genotipo entre 217 y 322. Se ha obtenido un promedio de germinación del 41 %, variando según genotipos entre 32 (ALM 80) y 58 % (ALM 3) (Tabla 1). El análisis de varianza realizado muestra una influencia muy significativa del genotipo [F(4,32)= 7,02; p= 0,0003].

Tabla 1. Germinación de embriones somáticos obtenidos a partir de hoja de cinco alcornoques seleccionados. N: número total de embriones maduros aislados de los cultivos de embriones somáticos en proliferación. % G: porcentajes promedios de germinación ± DT (número de repeticiones de al menos 20 embriones).

GENOTIPO	N	% G
ALM 3	246	58.5 ± 11.3 (8)
ALM 4	290	37.6 ± 8.7 (8)
ALM 5	217	43.8 ± 15.7 (6)
ALM 6	322	32.9 ± 15.4 (8)
ALM 80	277	32.1 ± 13.4 (7)

La influencia del genotipo sobre la germinación se pudo también comprobar en estudios de conversión en planta de embriones somáticos obtenidos a partir de embrión cigótico de seis genotipos y de hoja de tres árboles adultos (Celestino *et al.* 1999; Hernández *et al.* 1999).

Un total de 305 plantas germinadas fueron transferidas a condiciones *ex vitro* transplantándolas a sustrato y obteniendo un porcentaje promedio de crecimiento activo al cabo de 60 días en cámara de cultivo del 49 %, variando según genotipo entre 31 y 59 %, correspondiendo dichos porcentajes a los genotipos ALM 80 y ALM 3 respectivamente (Tabla 2). No se ha observado influencia del genotipo sobre esta variable.

Tabla 2. Crecimiento activo de vitroplantas. N: número total de las plantas transferidas a condiciones *ex vitro*, transplantándolas a sustrato. % CA: porcentaje medio ±DT de plantas que muestran crecimiento activo al cabo de 60 días en cámaras de cultivo, en condiciones de humedad relativa alta, 30 días con termoperiodo (12 ±1ºC noche y 20 ±1ºC día) y 30 días a temperatura constante (25 ±1ºC). Tres repeticiones por genotipo. A: número de plantas totalmente aclimatadas mantenidas en umbráculo.

GENOTIPO	N	% C A	A
ALM 3	70	58.6 ± 23.7	10
ALM 4	56	50 ± 24.9	10
ALM 5	71	53.5 ± 1.6	2
ALM 6	72	44.4 ± 10.3	3
ALM 80	36	30.6 ± 14.5	0

Podemos destacar que el genotipo con porcentaje de germinación más bajo (ALM 80) también ha sido el peor en cuanto a porcentaje de crecimiento activo. Del mismo modo el genotipo ALM 3 ha

tenido el mayor porcentaje en las dos variables estudiadas.

La actuación más crítica ha sido la transferencia paulatina a condiciones de baja humedad ambiental, habiendo causado las mayores pérdidas en el proceso. Sin embargo, por el momento, un total de 25 plantas aclimatadas, procedentes de diferentes genotipos, crecen en condiciones de vivero bajo cubierta (Tabla 2).

CONCLUSIONES

Como se muestra en este trabajo, es posible obtener plantas clónicas de alcornoques seleccionados totalmente aclimatadas. Esto supone un gran avance en el uso de la embriogénesis somática como herramienta importante para la mejora genética, especialmente de especies forestales, resultando muy útil en ensayos de evaluación genética, conservación de recursos genéticos, regeneración de plantas transgénicas, etc., además de las aplicaciones operativas propias del proceso, como la posibilidad de propagar en masa material selecto. Del mismo modo estos resultados suponen el punto de partida para continuar con el mejoramiento de los protocolos de las distintas etapas de la embriogénesis somática, especialmente de los procesos de maduración, germinación y aclimatación de las plantas, cuello de botella del proceso. Además existe la posibilidad de aplicación a otras especies relacionadas, como es el caso de *Quercus robur*, en la que, con un protocolo parecido al del alcornoque, ya se han conseguido embriones somáticos a partir de hoja de planta joven (Cuenca *et al.* 1999).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Servicio de Material Genético de la DGCONA y a "La Almoraima, S.A." la autorización y facilidades para la obtención de material seleccionado. Al INIA la financiación del Proyecto SC98-030 y la beca predoctoral de I. Hernández.

BIBLIOGRAFÍA

BUENO, MA., ASTORGA, R., MANZANERA, JA.; (1992). *Plant regeneration through somatic embryogenesis in Quercus suber*. Physiol. Plant 85:30-34.

BUENO, MA., GÓMEZ, A., BOSCAIU, M., MANZANERA, JA., VICENTE, O.; (1997). *Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (Quercus suber)*. Physiol. Plant 99:335-341.

CELESTINO, C., TORIBIO, M., HERNÁNDEZ, I., MARTÍNEZ, I., HORNERO, J.; (1999). *Conversión en planta de embriones somáticos de Quercus suber L.* III Reunión Sociedad de cultivo in vitro de tejidos vegetales. 11-12 Noviembre, Torremolinos, Málaga, p.52.

CUENCA, B., SAN-JOSÉ, MC., MARTÍNEZ, MT., BALLESTER, A., VIEITEZ, AM.; (1999). *Somatic embryogenesis from stem and leaf explant of Quercus robur L*. Plant Cell Rep. 18:538-543.

EL MÂATAOUI, M. & ESPAGNAC, H.; (1987). *Néoformation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissues de chêne liège (Quercus suber L.).* CR Acad. Sci. Paris Sér. III 304:83-88.

FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B., CELESTINO, C., TORIBIO, M.; (1995). *Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of Quercus suber L.* Plant Cell Tissue Organ Cult. 41:99-106.

GAMBORG, OL.; (1966). Aromatic metabolism in plants. II. *Enzymes of the shikimate pathway in suspension cultures of plant cells*. Can. J. Biochem. 44:791-799.

HERNÁNDEZ, I., TORIBIO, M., CELESTINO, C., HORNERO, J., MARTÍNEZ, I.; (1999). *Inducción de embriogénesis en hojas de árboles "plus" de alcornoque (Quercus suber L.).* III Reunión Sociedad de cultivo in vitro de tejidos vegetales. 11-12 Noviembre, Torremolinos, Málaga, p.50.

HERNÁNDEZ, I., CELESTINO, C., MARTÍNEZ, I., MANJÓN, JL., DÍEZ, J., FERNÁNDEZ-GUIJARRO, B., TORIBIO, M.; (2000). *Cloning mature cork oak (Quercus suber L.) trees by somatic embryogenesis*. Revista Melhoramento (en revisión).

LÓPEZ QUERO, M.; (1995). *Análisis estratégico del sector del corcho*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid.

MERKLE, SA.; (1995). *Strategies for dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees*. Plant Tissue Cult. Biotech. 1:112-121.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F.; (1962). *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15:473-497.

PARK, YS., BARRET, JD. & BONGA, JM.; (1998). *Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones.* In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 34:231-239.

SCHENK, RU. & HILDEBRANDT, AC.; (1972). *Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures*. Can. J. Bot. 50:199-204.

TORIBIO, M. & CELESTINO, C.; (1989). *Cultivo in vitro del alcornoque*. Scientia Gerundensis 15:11-21.

TORIBIO M., CELESTINO C., GALLEGO J. AND MARTÍNEZ I.; (2000). *Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees*. In: Ó Ríordáin, F. (ed). Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In Vitro Techniques. COST Action 822, Report of Activities 1998. European Communities, EUR 19237. pp 236-237.