

# PROPAGACIÓN CLONAL DE ÁRBOLES DE ALCORNOQUE VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

M.A. BUENO<sup>1</sup>, J.A.MANZANERA<sup>2</sup>, B. PINTOS<sup>1</sup>

1. INIA-CIFOR. Carretera de la Coruña Km 7,5. 28040. Madrid.
2. IMIA. Finca "El Encín". Alcalá de Henares. 28800 Madrid.

## **RESUMEN.**

Los métodos biotecnológicos pueden ser una alternativa al escaso éxito obtenido con la aplicación de los métodos clásicos en la propagación vegetativa del alcornoque. La propagación vía embriogénesis somática es un sistema adecuado para la clonación de árboles superiores, pudiendo obtenerse una proliferación ilimitada a partir de un único explanto inicial.

El trabajo que aquí se presenta profundiza en las bases científicas para la optimización de la técnica con el objetivo de la transferencia de tecnología al sector forestal.

Tanto la inducción, proliferación y maduración de embriones somáticos son etapas fundamentales del proceso. Cuando los embriones son transferidos desde el medio de inducción, rico en reguladores de naturaleza auxínica, a un medio sin reguladores de crecimiento, el meristemo apical del embrión somático comienza a desarrollarse. Es en este momento cuando el embrión puede germinar, sin embargo una germinación precoz suele conducir a plantas débiles, lo que incide en una baja tasa de conversión de las mismas. Por ello, es necesario que durante la maduración se produzca el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos, incrementándose su peso y tamaño. De esta manera tras la germinación se conseguirán plántulas con vigor en condiciones *ex vitro*.

En este trabajo se analizó el efecto de diferentes aminoácidos en la inducción y proliferación. Los resultados demuestran que de los aminoácidos ensayados: arginina, asparagina y glutamina, la glutamina es la que más favorece la inducción y proliferación del material embriogénico.

**Palabras clave:** *Quercus suber*, embriogénesis somática, propagación clonal.

## **SUMMARY**

Biotechnology can be an alternative to the application of conventional methods of vegetative propagation of cork oak. Propagation by somatic embryogenesis is an adequate system for the clonation of selected trees and proliferation can be unlimited from a single initial explant.

This work deepens in the optimisation of this technique for the transfer to the forest sector.

Induction, proliferation and maturation of somatic embryos are fundamental steps in the process. When embryos are transferred from an auxin-rich induction medium to a plant growth regulator free-medium, the apical meristem of the somatic embryo starts development. At this step, the embryo is able to germinate but this precocious germination produces weak plants, leading to a low conversion rate. Therefore, maturation is necessary, including the weight and size increment of the embryo. Plantlets are then more vigorous and able to survive in *ex vitro* conditions.

In this work, amino acid effect on induction and proliferation has been analysed. Our results show that the glutamine favour induction and proliferation of the embryogenic material better than the other amino acids studied: arginine and asparagine.

**Key words:** *Quercus suber*, somatic embryogenesis, clonal propagation.

## **INTRODUCCIÓN.**

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual se forman estructuras embrionarias, a partir de células somáticas sin necesidad de que exista una fecundación previa. Estas estructuras son denominadas embriones somáticos.

La inducción de embriogénesis somática en *Quercus suber* L. se consiguió por primera vez a partir de segmentos de entrenudos sin yemas ni hojas de plántulas de 6 a 8 meses EL MAËTAOUI, (1987) consiguiendo embriogénesis recurrente, sin lograr el desarrollo en planta de los embriones, que solo alargaron la raíz. BUENO *et al.*(1992) indujeron embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros y consiguieron la germinación de los embriones somáticos obtenidos.

Posteriormente se describió la inducción de embriogénesis somática en *Quercus suber* a partir de hojas de plántulas FERNÁNDEZ- GUIJARRO *et al.* (1995).

A pesar de los avances conseguidos en el desarrollo de la técnica de producción de embriones somáticos, es necesario optimizar los protocolos de proliferación y maduración para la producción masiva de plantas. Dado que los porcentajes de inducción de embriogénesis son elevados, es necesaria la optimización tanto para la proliferación como para la maduración de los embriones somáticos de *Quercus suber* L.

En este trabajo, nuestro objetivo fue analizar el efecto de diferentes aminoácidos tales como la glutamina, la asparagina y la arginina, tanto en el proceso de inducción de la embriogénesis, como en la proliferación de los embriones somáticos de *Quercus suber* L.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Como material vegetal de partida para llevar a cabo la inducción de la embriogénesis somática, se partió de embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber* L. Se recolectaron bellotas inmaduras de alcornoque de dos procedencias distintas:

- Finca “La Herguijuela” (Cáceres).
- El Pardo (Madrid).

La recolección del material vegetal se realizó cada 15 días aproximadamente, desde mediados del mes de julio hasta mediados del mes de octubre del año 2000. Se tomaron bellotas inmaduras de 10 alcornocues distintos (5 de la finca “La Herguijuela” y 5 del monte del Pardo).

Las bellotas recolectadas fueron peladas quitándolas la cúpula y dejando el ovario intacto; posteriormente estos ovarios fueron sometidos a una desinfección superficial con las siguientes etapas:

- inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (2% de cloro activo), con unas gotitas de Tween 20 durante 20 minutos,
- tres lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar el hipoclorito de sodio,
- finalmente, los embriones inmaduros fueron extraídos de los ovarios en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar.

Los embriones inmaduros extraídos de los ovarios, se pusieron en un medio base con macronutrientes de SOMMER *et al.* (1975), micronutrientes y vitaminas de MURASHIGE & SKOOG (1962), como fuente de carbono se utilizó sacarosa (30 g/l) y como agente gelificante se empleó agar (8 g/l). Este medio estaba suplementado con ácido 2, 4 diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 0,5 mg/l, que es utilizado con frecuencia para inducir procesos de embriogénesis en distintos cultivos de tejidos vegetales. El pH del medio de cultivo se ajustó entre 5.5 -5.7 y se esterilizó en el autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

Para inducir la embriogénesis somática, los embriones se mantuvieron en este medio durante 1 mes, en una cámara climática con fotoperiodo de 16 horas y 5000 lux de irradiancia. La temperatura fue de  $25\pm 1$  °C. Al cabo de la segunda y tercera semana de cultivo empezaron a aparecer los primeros embriones somáticos que fueron transferidos a diferentes medios de proliferación que consistían en medio base Sommer suplementado con distintos aminoácidos (glutamina, asparagina y arginina) o sin aminoácidos (medio control).

Se tomaron datos relativos al peso (en mg) y al área proyectada por cada embrión (en  $\text{mm}^2$ ) en cada uno de los explantos de los diferentes tratamientos, tanto en el momento en que se ponen en cultivo como a los 30 días de cultivo, para tratar de determinar qué aminoácidos resultan más eficaces para la proliferación de embriones somáticos. Con estos valores se calculó el incremento de peso (IP) y de área (IA).  $IP=(P1-P0)/P0$ , donde  $P0$ = peso a tiempo cero y  $P1$ = peso al mes de cultivo, (lo mismo para el IA).

## **RESULTADOS.**

A los 30 días de cultivo de los embriones somáticos de *Quercus suber* L. en medios con distintos aminoácidos, se determinó el incremento tanto en peso como en área que tuvieron estos embriones. Los resultados se muestran en la figura 1, donde se puede observar como en el tratamiento con glutamina, se produce un incremento del peso cerca de 60 veces el peso inicial del embrión. Este elevado incremento del peso del explanto es debido tanto al aumento del tamaño del embrión, como a la inducción de nueva embriogénesis repetitiva.

En cuanto al incremento del área de los explantos, se comprobó que el tratamiento con glutamina es el que produce un mayor incremento de área y por lo tanto de tamaño, respecto al resto de los tratamientos.

Figura 1. a) Incremento del peso del explanto en cada uno de los tratamientos ensayados,  
b) incremento del área de cada explanto en cada uno de los tratamientos ensayados.

## **CONCLUSIONES**

- Los resultados demuestran que la glutamina en el medio de cultivo, incrementa tanto el peso como el tamaño de los explantos respecto al resto de los tratamientos con otros aminoácidos y respecto al control, favoreciendo a su vez la maduración de los embriones somáticos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- BUENO, M.A, ASTORGA R. & MANZANERA, J.A; (1992). *Plant regeneration through somatic embryogenesis in Quercus suber*. *Physiologia Plantarum* 85: 30-34.
- EL MAËTAOUI, M & ESPAGNAC, H; (1987). *Néoformation de structures de type embryons somatiques sur des cultures de tissus de chêne liège (Quercus suber L.)*. *C.R.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 and Organ Culture*, 4: 99-106.

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

SOMMER, H.E., BROWN, C.L & KORMANIK, P.P; (1975). *Differentiation of plantlets in longleaf pine (Pinus palustris Mill.) tissue cultured in vitro*. *Bot. Gaz.* 136: 196-200.