MICROPROPAGACIÓN DE CLONES SELECCIONADOS DE *QUERCUS ROBUR* L.

J.L. FERNÁNDEZ-LORENZO, E. OTERO y M. VEIGA

Dpto. de Producción Vexetal. Escola Politécnica Superior de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela. Campus Universitario s/n. 27002 Lugo

Resumen: Se ha iniciado la micropropagación de cuatro clones de *Quercus robur* L. -'Trobo 1', '2' y '3' (T1, T2, T3) y 'Muíños' (MU)- a partir de material de árboles adultos seleccionados por su aptitud forestal. Los explantos iniciales, nudos y ápices, se obtuvieron por forzado de segmentos de rama tomados de partes bajas del tronco (2 metros en T1, T2 y T3; 0,5 y 2 metros en MU), evaluándose el efecto de diferentes condiciones de forzado sobre la brotación: conservación en frío (4°C) o uso directo, aplicación de BA (6-benciladenina) sobre las yemas y disposición horizontal, sobre perlita, o vertical, con la base sumergida en agua. La combinación 'conservación en frío/horizontal' y 'uso directo/vertical' aportan los mejores resultados. Durante la fase de multiplicación, los medios GD (GRESSHOFF & DOY, 1972) y WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981), complementados con 0,2 mg·L^{-1} BA, aportan tasas de multiplicación semejantes para los clones ensayados (T2 y T3). Igualmente, se ensayó el efecto de la disposición –horizontal o vertical- de los explantos sobre el medio de cultivo, sin diferencias significativas entre ambos tratamientos. En la fase de enraizamiento, los clones T y el material de MU tomado a 2 metros enraizan significativamente mejor en un medio GD suplementado con 3 mg·L^{-1}AIB (ácido-3-indolbutírico), con respecto a 1,5 mg·L^{-1}AIB, mientras en el material de MU tomado a 0,5 metros se obtienen resultados semejantes para ambas concentraciones, lo que sería explicable desde por el efecto topofísico.
P.C.: micropropagación, *Quercus robur*, forzado de segmentos de rama, topófisis.

Summary: The micropropagation of 4 clones of *Quercus robur* L. (T1, T2, T3 and MU) was initiated from selected adult trees of forestry value. The initial explants, nodes and shoot tips, were obtained after forcing of branch segments taken from basal parts of the tree (2 metres-height in T1, T2 and T3, and 0,5 and 2 metres-height in MU). The effect of various 'forcing' conditions was tested: cold storage (4°C) or 'direct use', application of BA (6-benzyladenine) on buds and horizontal (on perlite-containing trays) or vertical (the base dipped in water) disposition of branch segments. The combination 'cold storage/horizontal' and 'direct use/vertical' yielded the best results. GD and WPM media, supplemented with 0,2 mg·L^{-1} BA, were tested on T2 and T3 during the multiplication stage, yielding similar multiplication rates for both clones. Furthermore, the effect of the explant position (horizontal or vertical) on the culture medium was tested for all clones, with no significant differences between both treatments. Concerning *in vitro* rooting, clones 'T' and MU explants taken at 2m-height rooted significantly better if rooting medium was supplemented with 3 mg·L^{-1} IBA as compared to 1,5 mg·L^{-1} IBA, whilst MU explants from 0,5 m-height showed similar rooting rates with both concentrations, what could be explained in terms of topophysis.
K.W. micropropagation, *Quercus robur*, forcing of branch segments, topophysis.

INTRODUCCIÓN

El roble común (*Quercus robur* L.) es una especie recalcitrante a la propagación. Entre los métodos de rejuvenecimiento o revigorización empleados para conseguir su micropropagación se encuentra el forzado de segmentos de rama (VIÉITEZ *et al*., 1994). Este material se recoge normalmente durante el período de reposo vegetativo y se conserva en frío durante 3 meses. El éxito de dicho proceso es primordial, especialmente cuando el material de partida es escaso, por lo que el estudio de las condiciones óptimas para el forzado resulta de crucial importancia. Asimismo, la altura a la que se recogen los segmentos de rama en el tronco puede ser determinante sobre el éxito de la multiplicación *in vitro*, especialmente en lo que se refiere a la capacidad de enraizamiento. Cuanto más cercano al tronco y a la base del árbol se recoge el material, mayor facilidad de propagación suele mostrar, lo que se explica por el fenómeno de topófisis (BONGA, 1982). Ahora bien, los experimentos sobre topófisis, especialmente en roble, se limitan normalmente a la obtención de brotes epicórmicos como fuente de explantos (EVERS *et al*., 1990), o a la comparación entre la capacidad de multiplicación de material tomado de la copa del árbol en comparación con brotes de la base (renuevos o rebrotes de cepa) (SÁNCHEZ, 1991; EVERS *et al*., 1996). Sin embargo, el material tomado a distintas alturas en las partes bajas del tronco debería expresar también estas diferencias topofísicas.
En el presente trabajo se pretende la micropropagación de clones interesantes por su aptitud forestal a partir de material tomado de árboles adultos, evaluando principalmente las condiciones de 'forzado' y las posibles diferencias en la capacidad de propagación (especialmente, capacidad de enraizamiento adventicio *in vitro*) en función de la altura a la que se toman los segmentos de rama, utilizando medios para establecimiento, multiplicación y enraizamiento que ya se han mostrado eficaces en la micropropagación de esta especie (VIÉITEZ *et al*., 1994).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal: El material para micropropagación se obtiene a partir de segmentos de rama de unos 20 cm de longitud y 1-2 cm de diámetro, tomados de 4 árboles adultos de 40-50 años de *Quercus robur* L., seleccionados por su aptitud forestal. Dichos segmentos se recogieron durante el reposo vegetativo -Enero- y/o al final de éste -Marzo- (Tabla 1).

Tabla 1. Material vegetal de *Quercus robur* utilizado en este trabajo

Denominación del clon	Fecha de recogida	Altura de recogida (m)
'Trobo 1' (T1)	Enero	1,5
	Marzo	1,7
'Trobo 2' (T2)	Enero	2,4
	Marzo	2,4
'Trobo 3' (T3)	Enero	2,2
	Marzo	2,0
'Muíños' (MU)	Enero	0,5
		2,0

Este material se lavó exhaustivamente y se trató con una solución fungicida (benomilo + captán: 1,2 mg·L^{-1} + 0,3 mg·L^{-1}). Los segmentos recogidos en Enero se almacenaron en bolsas de polietileno negro, a 4°C durante 2-3 meses y los recogidos en marzo se utilizaron directamente para la obtención de explantos.

Métodos: Siguiendo la metodología de VIÉITEZ *et al*. (1994), con el fin de obtener brotes que se utilizarán como material de partida para la micropropagación, los segmentos de rama se sometieron a un 'forzado' de la brotación mediante su introducción en cámara de cultivo en las siguientes condiciones: temperatura de 25°C día-20°C noche, fotoperíodo de 16 h, densidad de flujo radiante (DFR) de 30 µmol·m^{-2}·s^{-1}, aportada por tubos fluorescentes de luz blanca fría (OSRAM^{R}, L. 40W) y una humedad relativa del 80%. Los brotes axilares obtenidos se utilizaron como fuente de explantos.

Durante esta etapa se han realizado los siguientes ensayos: a) efecto de la disposición de los segmentos de rama: Horizontal, extendidos sobre bandejas con perlita humedecida vs. Vertical, en botes con agua destilada, sumergiendo la base de los segmentos; b) efecto de la aplicación de BA, aportándose sobre las yemas una gota de una solución acuosa de 1,0 mg·L^{-1} BA; efecto de la conservación: a 4°C durante 2-3 meses vs. uso directo. La Tabla 2 muestra el número de segmentos empleado para cada ensayo, condicionado por la disponibilidad del material en campo.

Tabla 2. Tratamientos para el'forzado' y número de segmentos por clon y tratamiento

		Disposición							
		Horizontal				Vertical			
		Frío		Uso directo		Frío		Uso directo	
Clon	sg/clon	BA	0	BA	0	BA	0	BA	0
T1	11	-	1	1	2	1	1	3	2
T2	14	1	1	2	2	2	1	2	3
T3	10	1	1	2	2	1	1	1	1
MU	10	1	2	-	-	3	4	-	-

Para cada ensayo, se evaluó la producción de brotes a lo largo de 9 semanas.

-Establecimiento *in vitro*: los brotes obtenidos del forzado son cortados, defoliados y sometidos a desinfección superficial mediante inmersión sucesiva en etanol 70° durante 1 min e hipoclorito de Sodio (0,8% Cl activo) durante 15 min, seguido de tres lavados en agua destilada estéril. A partir de los brotes se obtienen explantos nodales y apicales de 15-20 mm que se implantan verticalmente en tubos de ensayo de vidrio (24 x 150 mm) que contienen 15 ml de medio,

compuesto por las sales y vitaminas de GRESSHOFF & DOY (1972), Fe-EDTA de MURASHIGE & SKOOG (1972), 3% sacarosa, 0,7% Difco-Bacto-Agar (medio base) y 1,0 $mg \cdot L^{-1}$ BA (6-benciladenina). El pH del medio se ajustó a 5,5 previamente a la esterilización en autoclave, que tuvo lugar a 121°C, 20 min y 108 kPa. Los cultivos se introducen en cámara de crecimiento, en las condiciones especificadas previamente para el forzado, realizándose transferencias a medio fresco con la misma composición a los 14 y 28 días. A los 42 días se determinaron los porcentajes de contaminación, la reactividad (porcentaje de explantos que desarrollan nuevos brotes), la tasa de multiplicación, el número de brotes mayores de 8 mm/explanto reactivo y la longitud del brote más largo/expl. reactivo. Con respecto a la contaminación, se evaluó el efecto sobre ésta de las condiciones de forzado del material de partida.

-Multiplicación *in vitro*: los brotes desarrollados sobre los explantos reactivos se subcultivaron cada 28 días sobre medio base, suplementado con 0,2 $mg \cdot L^{-1}$ BA, con transferencias a medio fresco a los 14 días. Se registraron las tasas de multiplicación a lo largo de los seis primeros subcultivos, tras los cuales se realizaron los siguientes ensayos: a) efecto de la composición del medio base: se compararon los medio GD y WPM (LLOYD & MCCOWN, 1981) en los clones T2 y T3; b) efecto de la disposición de los explantos sobre el medio: horizontal ó vertical. En estos ensayos se evaluó la tasa de multiplicación, el número de brotes mayores de 8 mm/explanto reactivo y la longitud del brote más largo/expl. reactivo. Cada experimento constó de 3 repeticiones con 10-15 explantos por repetición.

-Enraizamiento *in vitro*: al final de un ciclo de multiplicación se tomaron brotes apicales de 20-25 mm, eliminándose las hojas basales y el callo, que se introdujeron en un medio de enraizamiento, compuesto por 1/3 de los macronutrientes de GD, micronutrientes y vitaminas de GD, Fe-EDTA de MURASHIGE & SKOOG (1972) e igual concentración de agar y sacarosa que para la fase de multiplicación. Se ensayó la adición al medio de dos concentraciones de AIB (ácido-3-indolbutírico), 1,5 y 3 $mg \cdot L^{-1}$. A los 7 días de la introducción en este medio, los brotes se transfirieron a un medio fresco sin AIB. Para el clon 'Muíños' se registraron las tasas de enraizamiento obtenidas en función de la altura del árbol a la que se tomaron los segmentos de rama (0,5 y 2,0 m). A los 28 días se evaluaron las tasas de enraizamiento, el número de raíces por explanto y la longitud de la raíz más larga de cada brote enraizado. Cada experimento constó de 3 repeticiones con 8-12 explantos por repetición.

-Aclimatación (*ex vitro*): los brotes enraizados se transfirieron a un sustrato compuesto de turba rubia, bajo túnel de propagación, con humedad relativa inicial del 90%, realizándose una fertilización semanal con un fertilizante N-P-K (8:2:3) a razón de 5 mL/planta. A los 30, 45 y 60 días se cuantificó el porcentaje de supervivencia.

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (SPSS) y test de comparación de medias: t-Student, en función del tipo de ensayo

RESULTADOS

Tratamientos de forzado:

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en función del tratamiento de forzado realizado, expresados como el número de brotes obtenidos por segmento. La tabla 4 muestra que para algunos de los factores, solos o considerados dos a dos, existen diferencias significativas en cuanto a la producción de brotes. Si se consideran conjuntamente los factores disposición y conservación, se observa que la conservación en frío + disposición horizontal y el uso directo + disposición vertical aportan resultados netamente mejores que las restantes combinaciones. Con respecto a la adición de BA a las yemas, el material no tratado se comporta significativamente mejor cuando se considera el conjunto de los clones. Dentro del material tratado con BA, aquel que se dispone horizontalmente aporta mejores resultados que el que se coloca verticalmente.

Establecimiento:

A los 42 días de la puesta en cultivo, los explantos expresan porcentajes de reactividad que varían entre el 33% y el 100%. El porcentaje de contaminación se muestra altamente dependiente de la disposición previa del material durante el forzado (datos no mostrados), de tal modo que los explantos procedentes de segmentos en disposición horizontal muestran tasa de contaminación significativamente mayores ($p<0,005$) que aquellos que proceden de los dispuestos verticalmente.

Tabla 3. Media de brotes/segmento obtenidos en función del clon y del tratamiento de forzado.

	Disposición							
	Horizontal				Vertical			
	Frío		Uso directo		Frío		Uso directo	
Clon	BA	0	BA	0	BA	0	BA	0
T1	-	17	0	9	0	1	14,3	2,5
T2	16	30	4,5	2,5	0	0	8	5,7
T3	0	11	3,5	11,5	0	0	10	15
MU	3	28	-	-	2	13	-	-

Multiplicación:

Con respecto al efecto de la formulación del medio base utilizado durante la fase de multiplicación, la Figura 1 muestra que, aunque los valores medios de las tasa de multiplicación obtenidos en medio GD son mayores que aquellos obtenidos en WPM para los dos clones estudiados (T2 y T3), no existen diferencias significativas entre ambos medios. En cuanto al número de brotes mayor de 8 mm por explanto reactivo, tampoco se observan diferencias significativas. Sí difieren significamente los datos de la longitud del brote más largo en el caso del clon Trobo II, en el que el medio GD aporta los mejores resultados (datos no mostrados).

Tabla 4. Valores de F y significación de los efectos sobre la producción de brotes de las condiciones de forzado en los clones 'T'. n.s.: no significativo; * significativo para $p<0,1$.

Factores	F	Sign.
Clon	13,46	n.s.
Conservación	10,08	n.s.
Aplicación de BA	53,52	*
Disposición	16,61	n.s.
BA x Conservación	35,23	n.s.
BA x Disposición	89,20	*
BA x Clon	4,62	n.s.
Conservación x Disposición	96,18	*
Conservación x Clon	50,16	*
Disposición x Clon	29,30	n.s.

En relación con la disposición de los explantos sobre el medio, no se observan diferencias significativas para ninguno de los clones estudiados en cuanto a las tasas de multiplicación obtenidas (Figura 2). En el clon Muíños, la disposición horizontal aportó resultados significativamente mejores en cuanto al número de brotes obtenidos mayores de 8 mm (datos no mostrados).

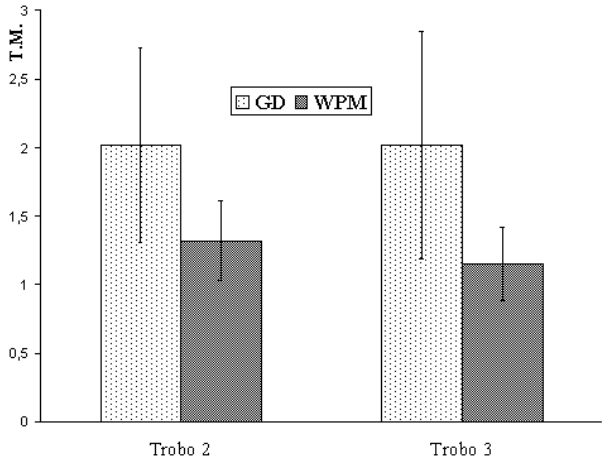

Figura 1. Tasa de multiplicación en función del medio de cultivo utilizado. Las barras verticales representan la desviación estándar. No existen diferencias signifi-cativas según el test t-Student.

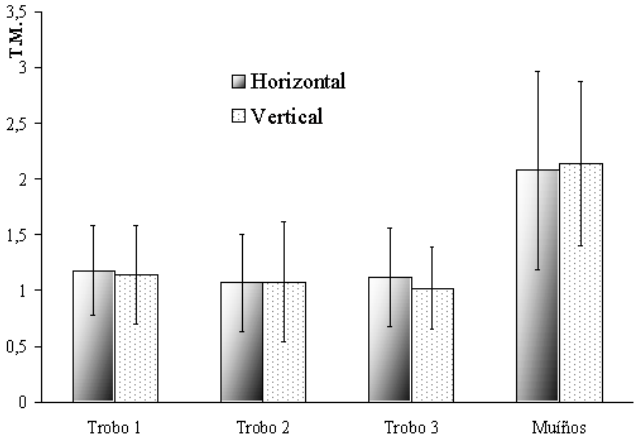

Figura 2. Tasa de multiplicación en función de la disposición de los explantos en el medio. Las barras verticales representan la desviación estándar. No existen diferencias significativas entre tratamientos según el test t-Student

Enraizamiento:

Los resultados de los ensayos de enraizamiento se muestran en la Figura 3. Globalmente, se consiguen mayores porcentajes de enraizamiento cuando se duplica la concentración de AIB en el medio. Las diferencias son significativas en el caso de Trobo 1 y del material de Muíños tomado a 2 metros. El hecho de que los explantos procedentes del mismo árbol (MU), pero obtenidos de brotes tomados a una menor altura (0,5 m), expresen una capacidad de enraizamiento semejante para ambas concentraciones parece expresar una menor necesidad de estímulo auxínico, debido a un estado ontogenético diferente en cuanto a este factor.

Los porcentajes de supervivencia durante la aclimatación variaron entre un 20% y un 42% no existiendo diferencias significativas en función de la concentración empleada para el enraizamiento (datos no mostrados).

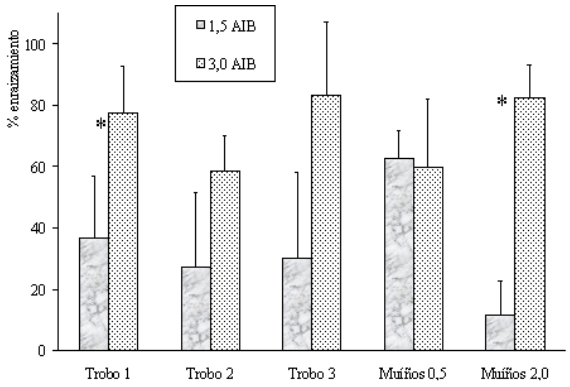

Figura 3. Poncentaje de enraizamiento en función de la concentración de AIB (mg·L-1). Las barras verticales representan el error estándar. *Diferencias signifi-cativas para P<0,05, según t-Student.

CONCLUSIONES

Durante el forzado, la disposición sobre perlita es más aconsejable para el material que se ha conservado en frío, mientras que en el material de uso directo se consiguen mejores resultados disponiendo verticalmente los segmentos de rama. Esta última disposición permite obtener unos porcentajes de contaminación compara-tivamente más bajos. Para la fase de multiplicación se aconseja el uso del medio GD, aunque WPM puede aportar tasas de multiplicación semejantes. No existen diferencias en las tasas de multiplicación en función de la disposición vertical u horizontal de los explantos sobre el medio. La aplicación de $3mg \cdot L^{-1}$ de AIB al medio de enraizamiento aporta en general mayores porcentajes de enraizamiento que $1,5\ mg \cdot L^{-1}$. En el clon Muíños, los explantos procedentes de material tomado a 0,5 m muestran una necesidad menor de estímulo auxínico, en términos de concentración, que aquellos tomados a 2 m, lo que parece expresar un efecto topofísico sobre la capacidad rizogenética.

Agradecimientos: A la Excma. Diputación Provincial de Lugo por el préstamo de material de laboratorio utilizado para el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

GRESSHOFF, PM & DOY, CH (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum. Planta* 107,161-170.

LLOYD, G & MCCOWN, B (1981). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 30, 421-427.

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

VIEITEZ, AM, SÁNCHEZ, MC, AMO-MARCO, JB, BALLESTER, A (1994). Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37, 287-295.

EVERS, P, HAANSTRA, L, VERMEER, E, VAN EEDEN, S (1996). Influence of reversed phase change on micropropagation of *Quercus robur. Plant Tissue Cult. and Biotech.* vol.2(3), 148-153.

BONGA, JM (1982). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: *Tissue Culture in Forestry*. Ed. JM Bonga & DJ Durzan. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publ., The Hague, 387-412.

SÁNCHEZ, MC (1991). Propagación *in vitro* de material adulto de castaño y roble: desarrollo de métodos de rejuvenecimiento. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Comp., 203 p.