

INDUCCION DE EMBRIOGENESIS SOMATICA EN ROBLE (*QUERCUS ROBUR L.*)

J. A. MANZANERA

Dpto. de Silvopascicultura, Unidad de Anatomía y Fisiología Vegetales, ETSI Montes.
Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid

RESUMEN

Se ha inducido la formación de embriones somáticos en roble. Como explantos iniciales se emplearon entrenudos y fragmentos de hoja de plántulas, embriones cigóticos maduros e inmaduros, y óvulos no desarrollados. Se observaron estructuras globulares y de corazón en hipocótilo, y cotiledones de embriones inmaduros cultivados en «Woody Plant Medium» (WPM) sólido, suplementado con 6-bencil adenina (BA) 0,44 μM y ácido α -naftalenacético (ANA) 0,05 μM , o con BA 4,44 μM . También se obtuvo callo embriogénico, formado por acción del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 4,52 μM en medio basal líquido, suplementado con glutamina (3,42 mM).

PALABRAS CLAVE: Roble

Quercus robur

Embriogénesis somática

INTRODUCCION

El roble (*Quercus robur L.*) es una de las especies más comunes de los bosques europeos. Ocupa la clímax en muchos ecosistemas forestales, y su madera es muy apreciada por la industria. Además, también puede emplearse con funciones ornamentales en parques y jardines.

Sin embargo, su propagación vegetativa presenta enormes dificultades al mejorador forestal y al selvicultor, pues enraiza mal de estaquilla cuando la planta madre tiene una edad superior a los 3 a 5 años (Kleinschmit *et al.*, 1975). Únicamente se ha conseguido el enraizamiento de brotes de cepa de árboles apeados o de tallos herbáceos procedentes de injertos (Evans, 1984). Algunos autores han intentado su micropropagación (Chalupa, 1984; Evers *et al.*, 1988; Vieitez *et al.*, 1985) y, más recientemente, se ha intentado la embriogénesis de otras especies del género (Gingas, Lineberger, 1989; El Maataoui, Espagnac, 1987; Srivastava, Steinhauer, 1982).

El presente trabajo tiene como objetivo la obtención de embriogénesis somática en explantos de roble, con vistas a su aplicación a la propagación vegetativa de esta especie.

Recibido: 2-1-91

Aceptado para su publicación: 18-6-91

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron bellotas maduras en noviembre de 1988, bellotas inmaduras en julio de 1989, y hojas e internodios de plántulas de uno o dos meses de edad. Se esterilizaron con un baño de etanol 70° durante 30 segundos, seguido de ClONa 2 p. 100 durante 20 minutos y 4 baños con agua destilada estéril.

En todos los experimentos se usó la fórmula de sales minerales y vitaminas del «*Woody Plant Medium*» (WPM) como medio basal (Lloyd, McCown, 1980), bien solidificado con agar (8 g/l), o bien líquido. Se esterilizó en autoclave a una atmósfera (121° C) durante 20 minutos. Los reguladores de crecimiento ácido indol-3-acético (AIA), 2,4-D, ácido α -naftalén acético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) (sal potásica), 6-bencil adenina (BA), kinetina (Kin) y 2-isopentenil adenina (2iP), el ácido ascórbico y la glutamina se añadieron al medio después de autoclave, esterilizándolos con filtros de 0,22 μ . El medio sólido se dispensó en placas de Petri de 90 mm de diámetro, y el medio líquido en erlenmeyers de 50 ó 300 ml, con 10 ó 50 ml de medio, respectivamente. Los explantos cultivados en medio líquido se agitaron a 140 rpm.

Los cultivos se incubaron a temperaturas de 25° C de día, y 20° C de noche, con un fotoperíodo de 16 horas y una irradiancia de 80 μ E/m²/s, proporcionada por lámparas fluorescentes Gro-lux.

Experimento 1: Inducción de callo en cotiledones de embriones maduros

En el experimento 1, los cotiledones de embriones maduros se sometieron a una inmersión de tres horas en una solución 1 mM de uno de los siguientes tratamientos: AIA, 2,4-D, ANA y AIB, solos o en combinación con BA. A continuación, se transfirieron a medio basal. Se emplearon 20 repeticiones por tratamiento.

Experimento 2: Crecimiento de callo de cotiledón de embriones maduros

A los 30 días, la mitad de los explantos de callo obtenidos en los tratamientos de inducción con ANA, 2,4-D y 2,4-D más BA 1 mM, del experimento anterior, se transfirieron a medio sólido, suplementado con uno de los siguientes reguladores de crecimiento: BA 4,44 μ M; 2iP 4,91 μ M; Kin 4,64 μ M y BA 22,2 μ M con ANA 5,37 μ M. La otra mitad se trató con un baño de una hora en una de las siguientes soluciones: BA 0,5 mM; 2iP 0,5 mM; Kin 0,5 mM; BA 1 mM con ANA 0,2 mM, y a continuación se pasó a medio basal. Se emplearon entre 18 y 24 repeticiones por tratamiento.

Experimento 3: Inducción de callo en entrenudos de tallo y fragmentos de hoja

En el experimento 3 se usaron como explantos entrenudos de tallo y fragmentos de hoja de plántulas germinadas en invernadero, de cuatro meses de edad. Los entrenudos se colocaron en posición horizontal, y los fragmentos de hoja, con el envés hacia abajo, y se cultivaron en medio sólido con las combinaciones de reguladores de crecimiento siguientes: 2,4-D 0, 4,52 y 9,04 μ M, y BA 0, 4,44 y 22,20 μ M. El callo obtenido se transfirió a medio sólido con BA 44,44 μ M más ANA 10,74 μ M.

Experimento 4: Inducción de embriogénesis en óvulos y embriones cigóticos inmaduros

Se emplearon como explantos óvulos y embriones inmaduros recolectados el 13 de julio, aproximadamente un mes y medio después de la polinización, y se sometieron a los siguientes

tes tratamientos: BA 0,44 μ M, más ANA 0,05 μ M; BA 4,44 μ M; BA 44,44 μ M más ANA 10,74 μ M y 2,4-D 4,52 μ M. La mitad de los explantos se mantuvieron en oscuridad total, y la otra mitad en condiciones habituales de 16 horas de fotoperíodo. Después de tres semanas, la mitad de los explantos de cada tratamiento se transfirieron a medio sólido fresco con la misma composición, salvo los tratados con BA 44,44 μ M y ANA 10,74 μ M, que se transfirieron a medio basal. La otra mitad de los explantos se transfirió a medio basal líquido suplementado con glutamina 3,42 mM.

RESULTADOS

Experimento 1: Inducción de callo en cotiledones de embriones maduros

Las respuestas morfológicas a los distintos tratamientos de inducción de callo en cotiledón de embriones maduros se recogen en la Tabla 1. El 2,4-D fue el regulador de crecimiento de tipo auxínico que mejor indujo la formación de callo, solo o combinado con BA. También se obtuvo callo con ANA. En cambio, el AIA y el AIB indujeron la formación de raíces adventicias (Fig. 1).

Experimento 2: Crecimiento de callo de cotiledones de embriones maduros

Los resultados de crecimiento de callo se reflejan en la Tabla 2. La BA dio mejores resultados que las otras dos citoquininas empleadas. No obstante, en ninguno de los tratamientos se observaron respuestas organogénicas.

Experimento 3:

En entrenudos de tallo y fragmentos de hoja se observó la formación de callo por acción del 2,4-D. La mejor concentración fue 4,52 μ M (Tabla 3). Este callo fue transferido al cabo

TABLA 1

INDUCCION DE CALLO DE COTILEDONES DE EMBRIONES CIGOTICOS MADUROS

Callus induction on the cotyledons of mature zygotic embryos

TRATAMIENTO	RESPUESTA
AIA (1 mM)	Formación de callo escasa Raíces adventicias (25 p. 100 de los explantos)
AIB (1 mM)	Formación de raíces adventicias
ANA (1 mM)	Formación de callo blanco desmenuzable Formación de raíces adventicias
2,4-D (1 mM)	Callo amarillento desmenuzable
AIA (1 mM) + BA (1 mM)	Escasa formación de callo modular verde
AIB (1 mM) + BA (1 mM)	Necrosis
ANA (1 mM) + BA (1 mM)	Necrosis
2,4-D + (1 mM) + BA (1 mM)	Formación de callo, blanco desmenuzable y verde compacto

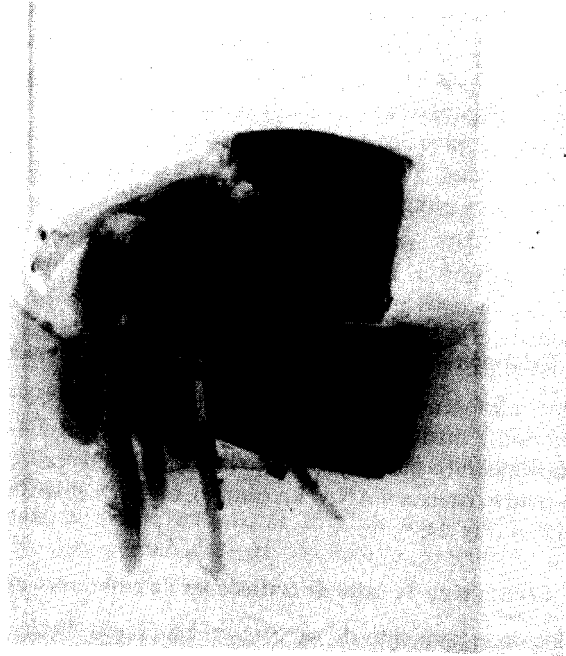


Fig. 1.—Cotiledón de embrión maduro con raíces adventicias, formadas por acción del AIA 1 mM (x3).
Cotyledon from mature embryo with adventitious roots formed by 1 mM AIA (x3).

TABLA 2
CRECIMIENTO DE CALLO EN COTILEDONES DE EMBRIONES MADUROS
Callus growth on the cotyledons of mature embryos

TRATAMIENTO DE INDUCCION	TRATAMIENTO MORFOGENICO			
	BA (4,44)	2iP (4,91)	Kin (4,64)	BA + ANA (22,2 + 5,37)
EN EL MEDIO (μ M)				
2,4-D	++	—	—	++
2,4-D + BA	±	±	+	—
ANA	—	—	±	—
	PULSO DE 1h			
	BA 0,5 mM	2iP 0,5 mM	Kin 0,5 mM	BA + ANA 1 mM + 0,2 mM
2,4-D	++	±	±	+
2,4-D + BA	—	+	+	++
ANA	±	±	+	+

— sin respuesta
 ± callo escaso
 + formación de callo
 ++ abundante formación de callo

TABLA 3
INDUCCION DE CALLO EN ENTRENUDOS Y FRAGMENTOS DE HOJA

Callus induction on internode and leaf pieces

			2,4-D (μ M)	
			0	9,04
			0	4,52
ENTRENUDOS				
BA (μ M)	0	0	++	++
	4,44	—	+	0
	22,20	±	++	0
HOJAS				
BA (μ M)	0	0	++	++
	4,44	±	+	±
	22,20	—	±	—

0 sin reacción al tratamiento

— callo necrosado

± callo escaso

+ regeneración de callo

++ regeneración de callo abundante

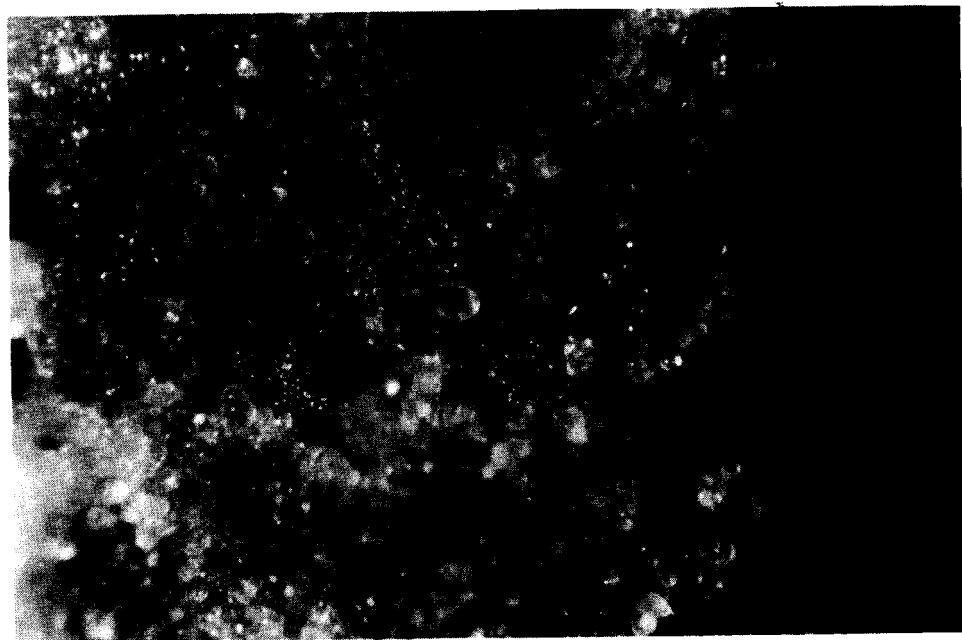


Fig. 2.—Estructuras globulares formadas en la epidermis del óvulo en WPM con BA 0,44 μ M y ANA 0,05 μ M en oscuridad (x20).

Globular structures formed on the ovule epidermis in WPM supplemented with 0,04 μ M and 0,05 μ M NAA in darkness (x20).

de un mes a medio con BA 44,44 μM y ANA 10,74 μM , con objeto de inducir organogénesis, pero no se obtuvo ninguna respuesta.

Experimento 4:

Ocho días después del comienzo del tratamiento se observó una abundante proliferación de estructuras globulares en la epidermis de óvulos cultivados en oscuridad en medio con BA 0,44 μM y ANA 0,05 μM (Figura 2). También se observó, pero en menor cantidad, en los tratamientos con BA 4,44 μM y 2,4-D 4,52 μM . Los óvulos cultivados en BA 44,44 μM y ANA 10,74 μM no sobrevivieron.

En hipocótilo y en el extremo proximal de los cotiledones de los embriones inmaduros cultivados en BA 4,44 μM , tanto en oscuridad como a la luz, se apreció al cabo de dos semanas de tratamiento la aparición de embriones somáticos en fase de corazón (Figura 3). En el caso de los cultivos bajo iluminación, los explantos adquirieron pigmentación verdosa. En el tratamiento de BA 0,44 μM más ANA 0,05 μM a la luz, también se observaron estructuras embrioides (Tabla 4). Los explantos subcultivados en medio sólido se comportaron como en el primer subcultivo. En el caso del tratamiento con BA 44,44 μM y ANA 5,74 μM , no se obtuvo ningún resultado.

El tratamiento con 2,4-D indujo la formación de un callo desmenuzable, apto para la obtención de cultivos en suspensión líquida. A los 13 días del inicio del cultivo en medio líquido, un 66,67 p. 100 de los explantos de callo mostró la formación de numerosos em-

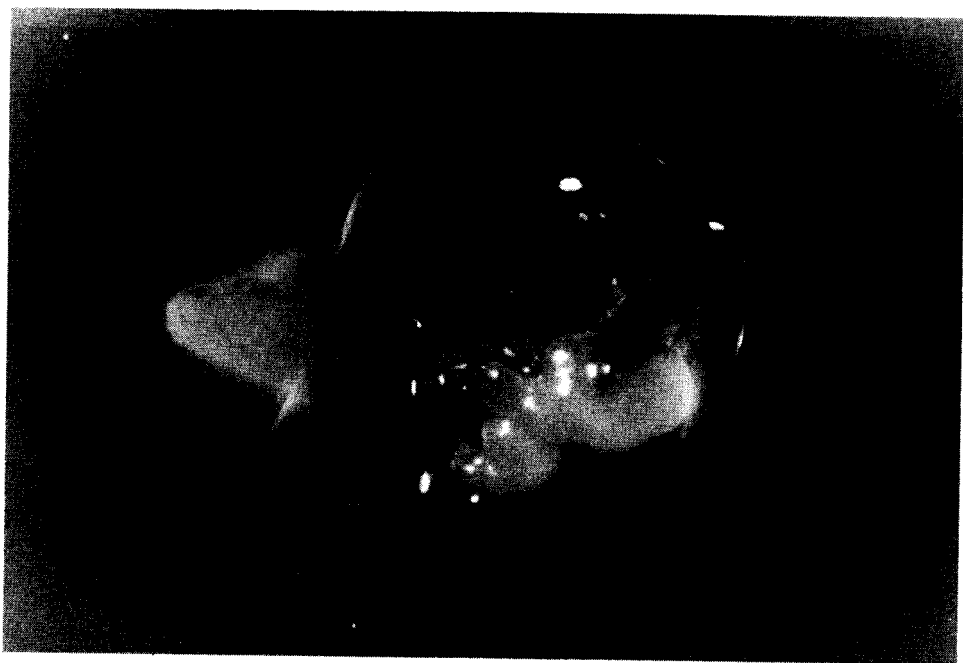


Fig. 3.—Embrión somático en la fase de corazón, formado sobre cotiledón de embrión cigótico inmaduro en WPM sólido con BA 4,44 μM (x5).

Heart - shaped somatic embryo formed on the cotyledon of an immature zygotic embryo in WPM supplemented with BA 4,44 μM (x5).

TABLA 4

EMBRIOGENESIS SOMATICA EN OVULOS Y EMBRIONES CIGOTICOS INMADUROS

Somatic embryogenesis on immature zygotic embryos and ovules

TRATAMIENTO	EXPLANTO INICIAL	NUM.	RESPUESTA	PORCENTAJE (p. 100)
OSCURIDAD				
BA 0,44 μ M	embriones cigóticos	10	E.S.	20,00
+ 0,05 ANA	óvulos	38	callo; E.G.	52,63
BA 4,44 μ M	embriones cigóticos	7	E.S.	100,00
	óvulos	31	callo	32,26
BA 44,44 μ M	embriones cigóticos	9	—	—
+ 10,74 ANA	óvulos	30	—	—
2,4-D 4,52 μ M	embriones cigóticos	7	callo	57,14
	óvulos	39	callo	23,07
LUZ				
BA 0,44 μ M	embriones cigóticos	7	E.S.	85,71
+ 0,05 ANA	óvulos	34	callo	23,35
BA 4,44 μ M	embriones cigóticos	9	E.S.	88,89
	óvulos	43	—	—
BA 44,44 μ M	embriones cigóticos	7	—	—
+ 10,74 ANA	óvulos	25	—	—
2,4-D 4,52 μ M	embriones cigóticos	7	callo	57,14
	óvulos	36	callo	47,22

E.S. = embriones somáticos

E.G. = estructuras globulares

briones somáticos, en estado globular y corazón. Los otros tratamientos se comportaron igual que en medio sólido.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 muestran que los embriones maduros sólo fueron aptos para la formación de raíces adventicias, pero no pudo obtenerse organogénesis de meristemos caulinares ni embriogénesis en ninguno de los tratamientos. Únicamente el 2,4-D, solo o combinado con BA, y el ANA promovieron la inducción de callo, pero éste no manifestó ninguna potencialidad organogénica, a pesar de los tratamientos con las diferentes citoquininas empleadas.

Otros autores (Civinová, Sladky, 1987) han conseguido organogénesis adventicia en entrenudos y hojas de roble tratadas con elevadas concentraciones de BA y ANA. En el experimento 3, también se emplearon entrenudos y explantos de hoja de plántulas, pero no se obtuvieron más respuestas que la formación de un callo nodular, especialmente en el tratamiento con 2,4-D 4,52 μ M. La BA no afectó a la inducción de dicho callo. El trata-

miento posterior del mismo con BA 44,44 μM más ANA 10,74 μM no dio ningún otro tipo de respuesta.

Por contraste, los resultados del experimento 4 muestran que los embriones inmaduros y óvulos no desarrollados manifestaron una buena capacidad embriogénica. Este hecho coincide con los resultados obtenidos en *Quercus rubra*, en el que el estado de desarrollo del embrión juega un papel fundamental (Gingas, Lineberger, 1989). También se ha observado embriogénesis en óvulos no desarrollados (no fertilizados o abortivos), nucela o callo nucelar en otras especies leñosas, como *Citrus* sp. (Gmitter, Moore, 1986). En nuestro caso, las estructuras globulares formadas sobre óvulos de roble no llegaron a dar lugar al posterior desarrollo de embriones somáticos.

CONCLUSIONES

El factor más importante para las respuestas organogénicas fue el tipo de explanto inicial. Los embriones maduros, entrenudos de tallo y hojas de plántulas sólo formaron callo y, esporádicamente, raíces. En cambio, los explantos que dieron mejores respuestas fueron los embriones inmaduros y óvulos.

La única diferencia destacable entre los cultivos en oscuridad y a la luz fue que los óvulos dieron un mayor número de estructuras globulares en el primer caso.

La BA sola (4,44 μM) o a menor concentración (0,44 μM) combinada con ANA (0,50 μM) estimuló la embriogénesis en hipocótilo y cotiledones de embriones inmaduros, y menos frecuentemente en óvulos. Las concentraciones más altas de BA y ANA (44,44 y 10,74 μM , respectivamente) fueron inhibitorias.

La acción del 2,4-D fue estimuladora de formación de callo embriogénico en embriones inmaduros. Dicho callo, cultivado en medio líquido suplementado con glutamina, dio lugar a la formación de embriones somáticos. Estos resultados permiten pensar en una posible aplicación a cultivos en gran escala.

SUMMARY

Induction of somatic embryogenesis in pedunculate oak (*Quercus robur* L.)

Somatic embryogenesis of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) has been successfully attempted. Internodes and leaf pieces from seedlings, mature and immature embryos, undeveloped ovules and ovular tissues were used as initial explants. Globular and heart-shaped somatic embryos were obtained on hypocotyls and cotyledons of immature zygotic embryos cultured on solid WPM supplemented with 0.44 μM BA and 0.05 μM NAA, or 4.44 μM BA, or from embryo-derived callus cultured in liquid medium supplemented with glutamine (3.42 μM), after induction with 4.52 μM 2,4-D.

Abbreviations: BA = 6-benzyl adenine
2,4-D = 2,4 dichlorophenoxyacetic acid
IBA = indole-3-butyric acid (Potassium salt)
Kin = kinetin
NAA = α -naphthaleneacetic acid
2iP = 2-isopentenyl adenine
WPM = Woody Plant Medium.

KEY WORDS:

Oak
Quercus robur
Somatic embryogenesis
Organogenesis

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CHALUPA V., 1984. «In vitro» propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia Plantarum* (Praha), 26 (5), 374-377.
- CIVINOVA B., SLADKY Z., 1987. A study of the regeneration capacity of oak (*Quercus Robur* L.). *Scripta Fac. Sci. Nat. Univ. Purk. Brun*, 17 (3-4), 103-110.
- EVANS J., 1984. Silviculture of broadleaved woodland. *Forestry Commission Bulletin* 62, 232.
- EVERS P. W., DONKERS J., PRAT A., VERMEER E., 1988. Micropropagation of forest trees through tissue culture. 88 pp. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- GINGAS V. M., LINEBERGER R. D., 1989. Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 17, 191-203.
- GMITTER F. G., MOORE G. A., 1986. Plant regeneration from undeveloped ovules and embryogenic calli of *Citrus*: embryo production, germination, and plant survival. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 6, 139-147.
- KLEINSCHMIT J., WITTE R., SAUER A., 1975. Möglichkeiten der züchterischen verbesserung von stiel- und traubeneichen (*Quercus robur* und *Quercus petraea*). II. Versuche zur stecklingsvermehrung von eiche. *Allgemeine Forst- und Jagdzeitung*, 146, 179-186.
- LLOYD G., MCCOWN B., 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, 30, 421-427.
- MAATAOUI 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*, t. 304, 83-88.
- SRIVASTAVA P. S., STEINHAUER A., 1982. «In vitro» culture of embryo segments of *Quercus lebanii*; organogenesis and callus differential response to experimental conditions. *Z. Pflanzenphysiol.* Bd. 106.5, 93-96.
- VIEITEZ A. M., SAN-JOSE M. C., VIEITEZ E., 1985. «In vitro» plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. *Journal of Horticultural Science*, 60 (1), 99-106.