

Clonación y conservación de árboles singulares de Galicia mediante cultivo *in vitro*

Cloning and conservation of singular trees of Galicia by *in vitro* culture

Viéitez F.J., Corredoira, E., Martínez M.T., Cernadas M.J.,
Montenegro, R., San José, M.C.*

*Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal, Departamento de Fisiología Vegetal,
Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), CSIC.
Avenida de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, A Coruña*

*Autor para correspondencia: sanjose@iiag.csic.es

Resumen

La propagación vegetativa mediante cultivo *in vitro* permite capturar genotipos arbóreos valiosos como los de robles y castaños centenarios y producir cientos de plantas iguales a ellos. Mediante esta vía de regeneración clonal, los árboles centenarios “vuelven a nacer”. Además de la propagación, el cultivo *in vitro* en combinación con el crecimiento reducido de los cultivos y la crioconservación, permite, respectivamente, la conservación a medio y largo plazo. El grupo de Biotecnología y Mejora Forestal del IIAG-CSIC durante estos años ha desarrollado protocolos para propagación vegetativa de especies forestales usando técnicas de cultivo *in vitro* y mantiene un banco de germoplasma de castaño y roble en el que se conservan varios árboles centenarios incluidos en el Catálogo de Árboles Singulares de la Xunta de Galicia.

Summary

Vegetative propagation through *in vitro* culture allows to capture valuable arboreal genotypes such as those of centenary oaks and chestnuts and produce hundreds of plants equal to them. Through this path of clonal regeneration, the centenary trees "are reborn". In addition to the propagation, the *in vitro* culture in combination with the reduced growth of the cultures and the cryopreservation, allows, respectively, the conservation in the medium and long term. The Biotechnology and Forest Improvement group of the IIAG-CSIC during these years has developed protocols for vegetative propagation of forest species using *in vitro* culture techniques and maintains a bank of chestnut and oak germplasm in which several centuries-old trees included in the “Catálogo de Árboles Singulares de la Xunta de Galicia”.

Palabras clave: almacenamiento a medio plazo, árboles singulares, crioconservación, micropropagación

Keywords: medium-term storage, singular trees, cryopreservation, micropropagation

Existen árboles y arboledas muy especiales a las que generación tras generación, hemos ido individualizando en su excepcionalidad, ya sea por su antigüedad, tamaño, forma, localización o historia. Son árboles singulares, con nombre propio, monumentos vivos de la naturaleza, supervivientes de guerras, situaciones ambientales cambiantes, invasiones, incendios, sequías, talas, enfermedades, vendavales, carreteras y urbanizaciones. Por todo esto, se considera que algunos de ellos podrían ser genotipos especialmente resistentes a variaciones climáticas y a plagas y enfermedades. Cabe señalar la importancia de tan excepcionales seres como reductos de biodiversidad, generadores de paisaje y herramientas de educación ambiental. También poner en valor su interés turístico, pues los árboles singulares bien gestionados pueden convertirse en motor de desarrollo sostenible en zonas rurales y espacios naturales protegidos.

En la conservación de especies silvestres, el enfoque tradicional es la conservación *in situ*, es decir la conservación de la especie en su propio hábitat. Sin embargo, cada vez se acepta de mayor grado que las técnicas de conservación *ex situ* pueden ser utilizadas eficientemente para complementar los métodos *in situ* y, que incluso, pueden representar la única opción para la conservación de especies raras, amenazadas o en peligro de extinción. En este sentido, las herramientas de la biotecnología moderna están siendo cada vez más aplicadas para la caracterización de la diversidad vegetal e indudablemente tienen un papel principal asistiendo a los programas de conservación de plantas. Entre estas herramientas biotecnológicas destaca el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Esta técnica tiene cada vez más impacto en las estrategias de conservación *ex situ* de los recursos genéticos vegetales, es el caso de las especies/variedades que deben ser propagadas vegetativamente o que tienen semillas heterodoxas o recalcitrantes, como es el caso de muchas especies leñosas, cuya expectativa de supervivencia en bancos de semillas convencionales es muy corta debido a su estricta necesidad de humedad. Además, la conservación *in situ* por sí sola no es suficiente para salvar las especies en peligro de extinción ya que aunque aporta importantes opciones de conservación, el germoplasma mantenido de esta manera corre el riesgo de sufrir ataques de patógenos, inundaciones, tornados, incendios, que ponen en riesgo su supervivencia. Disponer de copias del germoplasma natural a resguardo de peligros reales es una alternativa práctica y aceptada hoy en día de forma general. Pero para ello es necesario aplicar las nuevas tecnologías disponibles, de las cuales la regeneración de la especie vegetal en cuestión mediante el cultivo *in vitro* es una herramienta fundamental. En cualquier momento los propágulos mantenidos *in vitro* pueden rescatarse de su almacenamiento, regenerar plantas completas y reponer o aumentar la población natural de las especies en estudio.

El actual grupo de Biotecnología y Mejora Forestal tiene sus orígenes en los años 70 cuando en el Departamento de Fisiología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG) se empezaron a emplear las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales como alternativa a la problemática que planteaba la clonación de castaños resistentes a la tinta mediante métodos convencionales de propagación vegetativa. De hecho la falta de un método eficiente de propa-

gación en masa de castaños provocó que la micropropagación fuese el objetivo primario de estas técnicas. Viéitez y Viéitez (1980) publicaron por primera vez la regeneración de castaño *in vitro* basándose en el sistema organogénico vía multiplicación de brotes axilares. Este protocolo se fue adaptando paulatinamente y optimizado para nuevos genotipos de castaño europeo, *Castanea sativa*, como híbridos *Castanea crenata* x *C. sativa* y posteriormente se extendió a otras especies arbóreas, tanto forestales como ornamentales y frutales, de forma que el IIAG dispone hoy en día de un amplio banco de germoplasma (Tabla 1).

Tabla 1. Relación de especies almacenadas en el banco de germoplasma del IIAG utilizando para su conservación la micropropagación mediante la proliferación de yemas axilares y el almacenamiento en frío.

Especie	Nº DE GENOTIPOS	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO 4º C
<i>Alnus glutinosa</i>	3	18 MESES
<i>Betula pendula</i>	3	18 MESES
<i>Camellia japonica</i>	4	18 MESES
<i>Camellia reticulata</i>	5	18 MESES
<i>Castanea sativa</i>	44	18 MESES
<i>Castanea sativa</i> x <i>C. crenata</i>	14	18 MESES
<i>Fagus sylvatica</i>	3	18 MESES
<i>Fagus orientalis</i>	34	18 MESES
<i>Paulownia tomentosa</i>	3	--
<i>Malus sp</i>	1	12 MESES
<i>Populus tremula</i> x <i>P. tremuloides</i>	1	18 MESES
<i>Populus alba</i>	3	18 MESES
<i>Prunus avium</i>	2	12 MESES
<i>Prunus serrulata</i>	1	12 MESES
<i>Quercus alba</i>	3	12 MESES
<i>Quercus bicolor</i>	3	12 MESES
<i>Quercus ilex</i>	8	--
<i>Quercus petraea</i>	7	12 MESES
<i>Quercus robur</i>	11	12 MESES
<i>Quercus rubra</i>	3	6 MESES
<i>Quercus suber</i>	3	12 MESES
<i>Ulmus minor</i>	3	12 MESES

-- No se almacena en frío

Los bancos de germoplasma vegetal se definen como centros de recursos de material vegetal vivo. En ellos se trata de conservar en volúmenes o superficies muy reducidas, las partes reproductoras de las plantas, ya sean semillas, esporas, polen, bulbos, estaquillas, u otros propágulos vegetales, de forma que estén claramente identificados y fácilmente accesibles. Dentro de estas alternativas, la técnica más extendida es la de bancos de semillas, por su facilidad de almacenamiento y manipulación, pues en poco espacio pueden conservarse cantidades enormes de individuos vivos durante decenas de años o incluso siglos cuando se conservan con un bajo contenido de humedad y a baja temperatura. Sin embargo, como ya se ha men-

cionado, numerosas Angiospermas forestales (ej. castaño, roble y muchas especies tropicales) poseen semillas recalcitrantes que pierden rápidamente la viabilidad o su capacidad de germinación se reduce considerablemente durante su almacenamiento. La biotecnología y concretamente las técnicas de cultivo *in vitro* han contribuido de forma muy importante no sólo a su propagación sino también a la conservación de su germoplasma (Wang *et al.*, 1993; Haines, 1994), siendo actualmente, utilizadas de forma sistemática en la conservación e intercambio de recursos fitogenéticos.

Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* (término que literalmente significa en vidrio) se refiere al conjunto de técnicas que permiten el cultivo de células y tejidos vegetales en condiciones estériles o axénicas. Dentro de esas técnicas, destaca las de micropropagación que permiten la regeneración de plantas completas a partir de células o tejidos de las mismas usadas como explantos. La micropropagación se puede lograr mediante la proliferación de yemas axilares, la caulogénesis o inducción de yemas adventicias y la embriogénesis somática. De las tres, la más sencilla y de uso ampliamente extendido es la proliferación de yemas axilares. Consiste en aprovechar el crecimiento continuado del meristemo apical junto con la formación de yemas laterales. Generalmente se desarrolla en cuatro fases: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Para el establecimiento de los cultivos se recogen ramas de los árboles antes de la brotación, normalmente durante el invierno-primavera. Las ramas se cortan en estaquillas de 20-25 cm y se ponen a brotar en una cámara de ambiente controlado con alta humedad. A las 3-4 semanas se desarrollan los brotes que serán utilizados como explanto para iniciar los cultivos *in vitro* (Figura 1A). Los brotes se desinfectan con soluciones de hipoclorito para que desarrollen libres de contaminación (bacteriana o fúngica) en un medio mineral gelificado y que contiene un azúcar (sacarosa o glucosa) y reguladores del crecimiento, generalmente citoquininas. La segunda fase se destina a lograr la multiplicación del material vegetal induciendo la formación de nuevos brotes con la aplicación de reguladores del crecimiento vegetal (citoquininas y auxinas) (Figura 1B). En la tercera fase o de enraizamiento tiene como objeto la formación de raíces adventicias en los brotes lo que permite la obtención de una planta completa (Figura 1C). Por último, las nuevas plantitas se someten a un proceso de aclimatación imprescindible para que sobrevivan en las condiciones ambientales propias del invernadero o del vivero (Figura 1D).

En nuestro grupo se han definido protocolos para la propagación mediante la vía de la proliferación de yemas axilares de muchas especies leñosas (Tabla 1). Entre éstas destacan los desarrollados para castaños y diferentes especies de robles europeos y americanos (Viéitez *et al.* 2012), entre los que se encuentran varios árboles singulares como el de la Sainza da Rocha (Figura 2) y los castaños de la Fraga de Catasós (Figura 3), incluidos en el Catálogo Gallego de Árboles Singulares (regulado por el Decreto 10/2015, del 22 de enero).

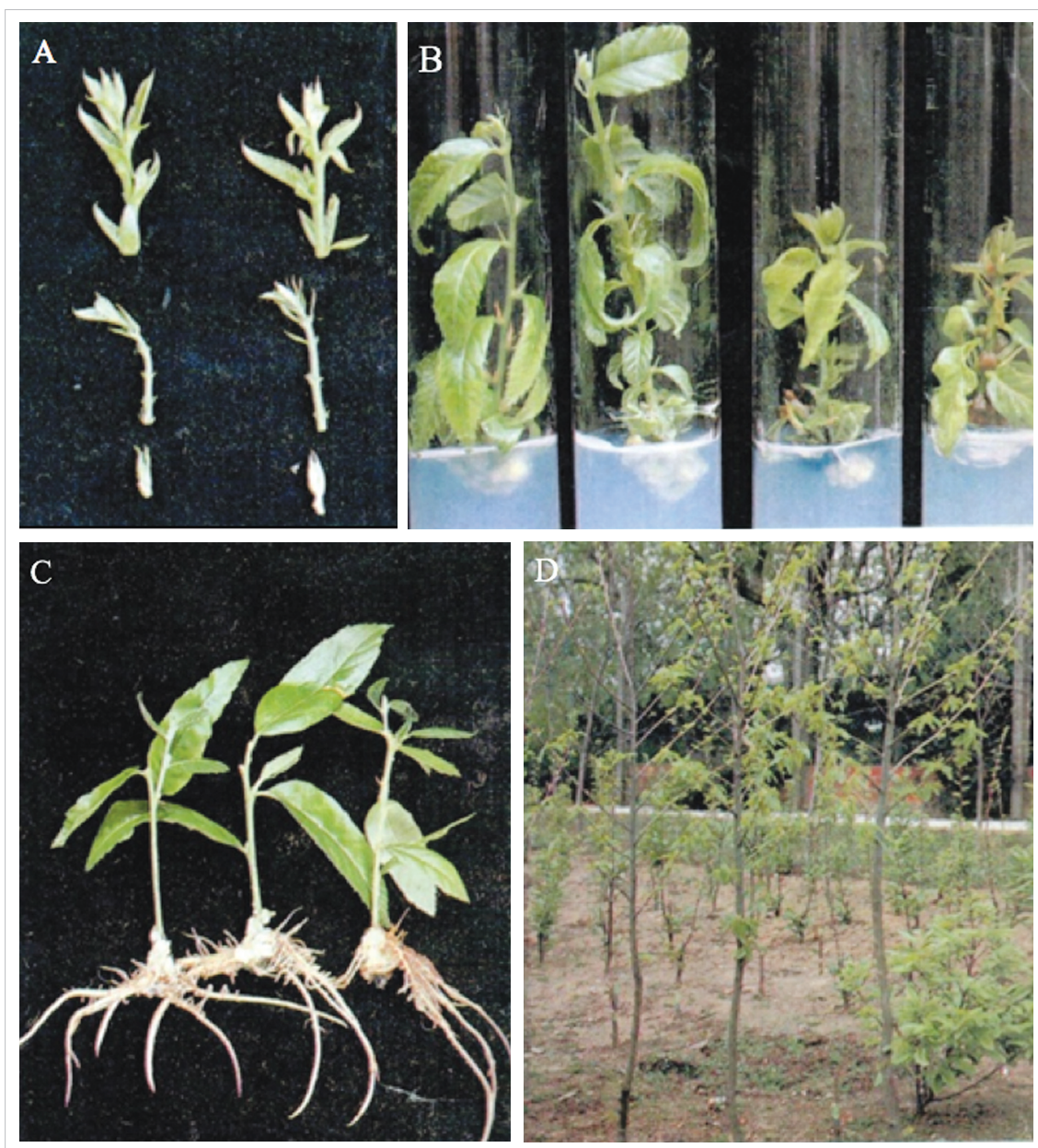


Figura 1. Micropropagación de castaño (*Castanea sativa*) mediante la proliferación de yemas axilares. A. Establecimiento, B. Multiplicación de los brotes, C. Enraizamiento, D. Aclimatación.

Estos protocolos no sólo permiten obtener miles de copias de esos árboles sino también que garantizan su conservación. No obstante este sistema tiene un alto coste en mano de obra, medios de cultivo, o espacio, además del riesgo de pérdida del material por contaminación y de variación somaclonal. Para evitar esto, el cultivo in vitro se puede combinar con el crecimiento reducido que permite espaciar enormemente los subcultivos sin afectar a su viabilidad una vez son transferidos a condiciones normales (Lambardi y De Carlo, 2003), por lo cual la carga de trabajo se reduce considerablemente. Presenta otras ventajas como que los cul-



Figura 2. Carballa da Rocha (81 A), en el lugar de a Sainza, parroquia de Touza, en el municipio de Rairiz de Veiga (Ourense). Este roble (*Quercus robur*) con una edad aproximada de quinientos años está catalogado como monumento natural de acuerdo a lo establecido en la Ley 9/2001 del 21 de agosto, de conservación de la naturaleza. Mide más de 30 m de altura y tiene una circunferencia de casi ocho metros. Se estableció in vitro en 1989, y desde entonces se mantienen en cultivo siguiendo dos vías de micropropagación, proliferación de brotes axilares e inducción de embriogénesis somática.



Figura 3. Castaños (*Castanea sativa*) de la Fraga de Catasos (5F) en el municipio de Lalín (Pontevedra). Son los famosos castaños de Quintela considerados monumentos naturales.

tivos se mantienen libres de enfermedades durante más tiempo, se reducen los riesgos de modificaciones genéticas y se requiere menos espacio y personal. Es, por tanto, una opción más económica que la micropropagación propiamente dicha y no requiere grandes gastos en equipos especiales como ocurre en el caso de la criopreservación.

La reducción del crecimiento se puede conseguir disminuyendo la temperatura, la intensidad luminosa, con retardantes de crecimiento, suprimiendo/reduciendo la fuente de carbón o elevando la osmolaridad del medio (Engelmann, 1997). La opción que presenta un menor riesgo es la disminución de la temperatura que suele ir acompañada de una reducción de la intensidad luminosa o de oscuridad. Mediante esta técnica nuestro grupo ha conseguido establecer un banco de germoplasma que en la actualidad cuenta con más de 200 genotipos de diferentes especies leñosas (Tabla 1). La mayor parte de los árboles que han proporcionado el material de partida han sido seleccionados por la calidad de su madera, resistencia a enfermedades, su edad o calidad de la floración como en el caso de las especies ornamentales (ej: camelias). En muchos de estos genotipos se mantienen cultivos

con diferente origen ontogenético, es decir establecidos a partir de material procedente de la copa del árbol, de brotes epicórmicos o de renuevos basales. El tiempo de permanencia en estas condiciones (3-4°C) oscila entre los 6-18 meses según las especies (*Figura 4; Tabla 1*).



Figura 4. Brotes del genotipo Sainza (*Quercus robur*) proliferando in vitro después de haber sido almacenados en frío por espacio de un año.

Crioconservación

La crioconservación consiste en el almacenamiento en nitrógeno líquido de material biológico lo que permite su almacenamiento de forma indefinida. Esta técnica se basa en la paralización total de las divisiones celulares y de los procesos metabólicos como resultado del almacenamiento del material en nitrógeno líquido a -196°C (Niino y Sakai, 1992). Dentro de la crioconservación, la vitrificación es uno de los métodos que más frecuentemente se han utilizado en los últimos años. En esta técnica, desarrollada por Sakai *et al.* (1990), los tejidos son deshidratados con soluciones muy concentradas que evitan la formación de cristales de hielo en las células durante la crioconservación y la posterior descongelación. Es un método sencillo que no necesita de aparatos excesivamente caros, y se ha desarrollado con éxito para la conservación de ápices, suspensiones celulares y embriones somáticos de numerosas especies (Sakai *et al.*, 2008). En nuestro grupo la crioconservación se ha aplicado con éxito a la conservación de embriones zigóticos de castaño, y de embriones somáticos de castaño, alcornoque, encina, aliso y diferentes especies de robles europeos y americanos.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es un proceso por el que células somáticas producen estructuras semejantes a embriones zigóticos, a través de los estados embriológicos característicos, sin que haya fusión de gametos. Sus etapas son la iniciación en la que se induce el embrión somático por ejemplo a partir de una hoja o un ápice obtenido de un árbol. Una vez obtenido el embrión somático éste se multiplica exponencialmente mediante embriogénesis secundaria lo que nos permite obtener miles de copias del árbol de partida. Si queremos obtener plantas los embriones somáticos se someten a tratamientos de maduración y finalmente de germinación donde se produce la emisión de la raíz y del brote propiamente dichos.

Los embriones somáticos constituyen un material idóneo para crioconservación. Nuestro grupo mediante esta técnica mantiene almacenados más de 50 genotipos distintos (*Tabla 2*). Dentro de éstos se mantienen crioconservados varios árboles de la Carballeira de Caldas de Reyes incluida dentro de las formaciones singulares de la Xunta de Galicia.

Tabla 2. Relación de especies en las que se ha inducido y se mantienen vía embriogénesis somática.

Especie	Nº DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS
<i>Alnus glutinosa</i>	3
<i>Camellia japonica</i>	10
<i>Castanea sativa</i>	8
<i>Castanea crenata x C. sativa</i>	5
<i>Fagus sylvatica</i>	4
<i>Quercus alba</i>	3
<i>Quercus bicolor</i>	3
<i>Quercus ilex</i>	5
<i>Quercus rubra</i>	3
<i>Quercus suber</i>	3
<i>Ulmus glabra</i>	2
<i>Ulmus minor</i>	3

En resumen, se puede afirmar que la utilización de las técnicas de propagación *in vitro* y almacenamiento en frío de germoplasma de estos ejemplares sirve para acometer un plan de conservación de árboles singulares. La clonación permite obtener duplicados de combinaciones genéticas de especial interés y conservarlas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a todas las personas que durante estos años han trabajado en el Departamento de Fisiología Vegetal del IIAG contribuyendo a la creación de este banco de germoplasma.

Bibliografía

- Engelmann, F., 1997. *In vitro* conservation methods. En: Fort-Lloyd, B.V., Newburry, J.A. (eds.), *Biotechnology of Plant Genetics Resources: Conservation and Use*. CABI, Wellington, pp. 119-162.
- Haines, R., 1994. Biotechnology in forest tree improvement. *FAO Forestry Paper* 118. Roma.
- Lambardi, M., De Carlo, A., 2003. Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. En: Jain, S.M., Ishii, K. (eds.), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 815-840. https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_28
- Niino, T., Sakai, A., 1992. Cryopreservation of alginate-coated *in vitro*-grown shoot tips of apple, pear and mulberry. *Plant. Sci.* 87, 199-206. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90151-B](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90151-B)
- Sakai, A., Hirai, D., Niino, T., 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. En: Reed, B.M. (ed.), *Plant Cryopreservation: a Practical Guide*. Springer Science+Business Media, New York, pp. 33-57. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72276-4_3
- Sakai, A., Kobayashi, S., Piyama, I., 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9, 30-33. <https://doi.org/10.1007/BF00232130>
- Viéitez, A.M., Corredoira, E., Martínez, M.T., San José, M.C., Sánchez, C., Valladares, S., Vidal, N., Ballester, A. 2012. Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur. J. Forest. Res.* 131, 519-539. <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0526-0>
- Viéitez, A.M., Viéitez, M.L., 1980. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *Hortic. Sci.* 55, 83-84 <https://doi.org/10.1080/00221589.1980.11514906>
- Wang, B.S.M., Charest, P.J., Downie, B., 1993. *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody species. *FAO Forestry Paper* 113. Roma.