

INJERTO EN SERIE ‘ACELERADO’ DE *QUERCUS ROBUR* ADULTO

Santiago Crecente Campo y Juan Luis Fernández Lorenzo

Dpto. de Producción Vexetal. E.P.S. de Lugo. Universidade de Santiago de Compostela. 27002-LUGO (España). Correo electrónico: juanluf@usc.es

Resumen

En este trabajo se presenta un sistema de injerto en serie sobre patrón juvenil para obtener explantos para micropropagación de un clon adulto seleccionado de *Quercus robur* ‘Fastigiata’, analizándose su posible efecto de rejuvenecimiento y evaluándose su utilidad como método de producción masiva de planta injertada. Se realizaron 10 ciclos de injerto sobre patrones de *Quercus robur* de 2-3 semanas. Tras cada injerto prendido y desarrollado, parte de los brotes obtenidos se establecieron *in vitro* y otra parte se reinjertaron. El material procedente de injerto presentó una mayor reactividad *in vitro* que el control (procedente directamente de brotes obtenidos por forzado de segmentos de rama) pero, a excepción del primer subcultivo, no se detectaron diferencias en las tasas de multiplicación ni en los porcentajes de enraizamiento, independientemente del número de injertos previos a la introducción *in vitro*. Con respecto a la técnica de injerto, el porcentaje de prendimiento fue ~80% y la producción de explantos-púas fue de 4,22 en ciclos de 40 días, estimándose una producción anual de 170.000 plantas injertadas a partir de 10 injertos iniciales. Aparte del posible efecto de rejuvenecimiento, no observado en esta experiencia, esta técnica es útil para ampliar la cantidad de explantos disponibles para establecer *in vitro* y como sistema de producción rápida y masiva *in vivo* de planta injertada seleccionada.

Palabras clave: *Rejuvenecimiento, Fuente de explantos, Producción masiva, Roble*

INTRODUCCIÓN

Quercus robur, con *Q. petraea*, constituye el recurso forestal más importante entre las frondosas europeas. Su propagación vegetativa puede permitir el mantenimiento de genotipos de alto valor, siendo útil para la mejora y la conservación de recursos genéticos en la especie. Sin embargo, *Quercus robur* es difícil de propagar vegetativamente, especialmente en estado adulto. De hecho, el injerto es el único sistema de producción en variedades ornamentales (OBDRŽÁLEK & JÍLKOVÁ, 2006). La micropropagación representa, al menos en parte, una alter-

nativa para la producción de material clonal de *Quercus robur*. El roble se ha micropropagado a partir de nudos y ápices (SAN JOSÉ et al., 1985) y recientemente se ha conseguido embriogénesis somática a partir de ejemplares adultos (TORIBIO et al., 2004). La respuesta *in vitro* del material adulto mejora seleccionando explantos a partir de tejidos ontogenéticamente más juveniles (como renuevos basales o brotes epicórmicos) y/o aplicando técnicas de rejuvenecimiento, como la poda severa (EVERS et al., 1996), el forzado de segmentos de rama (VIÉITEZ et al., 1994) o el injerto en serie sobre patrón juvenil. Este último ha permitido en algunos casos la

recuperación de capacidades morfogénicas, tanto *in vivo*, provocando, por ejemplo, una mejora en el enraizamiento de las estaquillas (p.ej. en *Eucalyptus x trabutii*, SINISCALCO & PAVOLETONI, 1988; o *Quercus rubra*, ZACZEK *et al.*, 2003), como *in vitro* (p.e. en *Sequoia sempervirens*, HUANG *et al.*, 1992; o *Castanea sativa*, FERNÁNDEZ-LORENZO & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2005). EWALD & NAUJOKS (1997), realizando un único ciclo de injerto *in vitro*, han obtenido una mejora en la multiplicación de *Quercus robur* adulto durante los primeros subcultivos.

La duración de los ciclos de injerto es variable, 6-12 meses en injertos *in vivo* en invernadero, y 5-8 semanas en injertos *in vitro*. El injerto seriado *in vivo* es relativamente sencillo, pero los ciclos son muy largos y los explantos obtenidos presentan una alta contaminación al establecerlos *in vitro*. Por otra parte, en el (micro)injerto *in vitro* los ciclos son mucho más cortos, pero la técnica es más compleja, y es obligado trabajar en condiciones de asepsia.

En el presente estudio se realiza injerto seriado en cámara de cultivo, combinando las ventajas del injerto *in vivo* (sencillez) con las del injerto *in vitro* (obtención rápida de patrones, ciclos cortos, baja tasa de contaminación *in vitro*). Se determina el posible efecto de rejuvenecimiento analizando la capacidad de propagación *in vitro* y se evalúa su potencialidad para aportar explantos y para la producción masiva de planta injertada.

Nuestra denominación de injerto en serie 'acelerado' deriva del hecho de que se realiza injerto *in vivo* en ciclos mucho más cortos que los tradicionales (40 días frente a 6-12 meses).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

El material adulto procede de un árbol centenario de *Quercus robur* 'Fastigiata', del que se tomaron, en reposo vegetativo, 1) segmentos de rama de partes bajas de la copa (long.: ~20 cm; Ø: ~1 cm) sometidos directamente a forzado en cámara de cultivo, y 2) brotes leñosos terminales (long.: ~3 cm; Ø: ~2 mm) que se conservaron a 4°C hasta su uso. El material juvenil estaba constituido por plántulas procedentes de semi-

llas de *Q. robur* estratificadas en arena húmeda a 4°C hasta su uso.

Cámara de cultivo

En la cámara de cultivo se obtuvieron los patrones, se realizaron y mantuvieron los injertos y se realizaron los ensayos *in vitro*, en las siguientes condiciones: densidad de flujo radiante: 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (tubos fluorescentes OSRAM® L. 40W, luz blanca fría); foto-termoperíodo: 16 h luz/25°C - 8 h oscuridad/20°C; humedad relativa: > 70%.

Injertos

Para obtener los patrones, las semillas se sembraron en bandejas con alveolos de 300 cm³, en sustrato de turba:perlita (2:1). La germinación tuvo lugar en cámara de cultivo. A las 2-3 semanas de la germinación la plántula puede usarse como patrón.

Las púas del primer ciclo de injerto fueron: 1) brotes leñosos terminales; 2) brotes herbáceos (long.: 2-3 cm) obtenidos de forzado de segmentos de rama en cámara de cultivo. Las púas del 2º al 10º ciclo de injerto proceden de brotes nodales (long.: ~2 cm) obtenidos de las púas elongadas en el ciclo previo (Figura 1).

Se practicó injerto de hendidura, cortando el patrón a 2 cm de altura. La unión se sujetó con Parafilm® y la planta se protegió bajo una campana plástica durante unos días. El prendimiento y desarrollo de la púa tuvo lugar en unos 40 días. Se realizaron 10 ciclos de injerto tomándose datos del prendimiento según tipo de púa y ciclo de injerto y del número obtenido de púas-explantos/ciclo. En general, cada tratamiento constó de 3 repeticiones de 8 injertos.

Cultivo in vitro

Establecimiento: Los brotes procedentes directamente de forzado (control) y de injerto se desinfectaron superficialmente para su introducción *in vitro*, practicándose los siguientes tratamientos: a) 30 s etanol 70° + 15 min 0,8% NaClO (1ª introducción de material control-I1); b) 10 s etanol 50° + 10 min 0,8% NaClO (2ª-3ª introducción de material control-I2, I3); c) 60 s etanol 70° + 15 min 0,8% NaClO (introducciones a partir de injertos). Los explantos apicales y nodales desinfectados se introdujeron en tubos

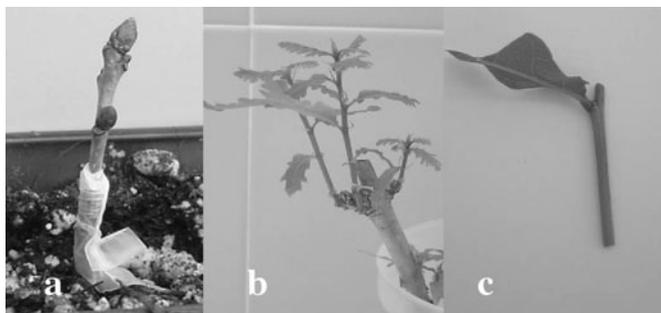


Figura 1. Púas adultas empleadas en el estudio: a) brotes leñosos terminales; b) brotes herbáceos obtenidos por forzado; c) brotes nodales obtenidos de púas elongadas

de ensayo con medio GD (GRESSHOFF & DOY, 1972) + 1 mg.L⁻¹ de benciladenina (BA). A los 20 días se analizó la contaminación y la reactividad en función del tipo de material y del tratamiento de desinfección.

Multiplificación: En la 1ª introducción de explantos control se ensayaron los medios GD y WPM (LLOYD & McCOWN, 1981), observándose que las tasas de multiplicación a lo largo de 11 subcultivos son siempre mayores en WPM (datos no mostrados). Por este motivo, se utilizó este medio en el resto de ensayos de multiplicación. Los brotes reactivos procedentes del material control (2ª-3ª introducción) y de injerto se transfirieron a medio WPM+0,2 mg.L⁻¹ BA, subcultivándose sobre el mismo medio y analizándose las tasas de multiplicación durante un máximo de 11 subcultivos. Los subcultivos se realizaron cada 35 días y cada tratamiento consistió de 3 repeticiones de 12 brotes.

Enraizamiento: Se han realizado pruebas de enraizamiento según la disponibilidad de explantos. Se analizó el porcentaje de enraizamiento de: material control en el 13er subcultivo (SC13), injertado una vez (SC10), 4 veces (SC7), 5 veces (SC5-6), 6 veces (SC4-5) y 7 veces (SC3), para grupos de 12 brotes, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días de la inducción (inmersión basal 2 min en 1 mg.mL⁻¹ de ácido 3-indolbutírico y transferencia a medio 1/3GD (concentración de macroelementos reducida a 1/3).

Los datos en porcentajes sometidos a análisis estadístico se modificaron previamente mediante la transformación del arco seno. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido

de la prueba LSD de comparación de medias, mediante el programa SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Injertos: prendimiento, duración de los ciclos y producción de púas-explantos

Los datos de prendimiento se reflejan en la figura 2. Éste es mayor en el primer injerto en púas de brotes de forzado (63%) que en las de brotes leñosos (27%). Entre el segundo y el décimo ciclo el prendimiento es elevado (69-95%), sin variación en función del número de ciclos. En otros trabajos, el prendimiento aumenta con cada reinjerto (SINISCALCO & PAVOLETONI, 1988). Los brotes leñosos dan peores resultados debido sin duda al desfase fisiológico con el patrón. Se propone su uso eventual, sin embargo, cuando no se pueda disponer de otro tipo de material. A partir del segundo injerto, las púas reinjertadas presentan una alta sincronización fisiológica con los patrones, que se traduce en altos porcentajes de prendimiento. En general, los reinjertos se realizaron cada 40 días. Al final de cada ciclo, la púa prendida y desarrollada aportó $4,22 \pm 1,25$ brotes apicales y nodales, utilizados como púas para reinjertar o como explantos, en función de los objetivos.

Cultivo in vitro

Establecimiento: La figura 2 muestra los porcentajes de contaminación y de reactividad del material establecido *in vitro*. Los explantos control muestran una reactividad variable en

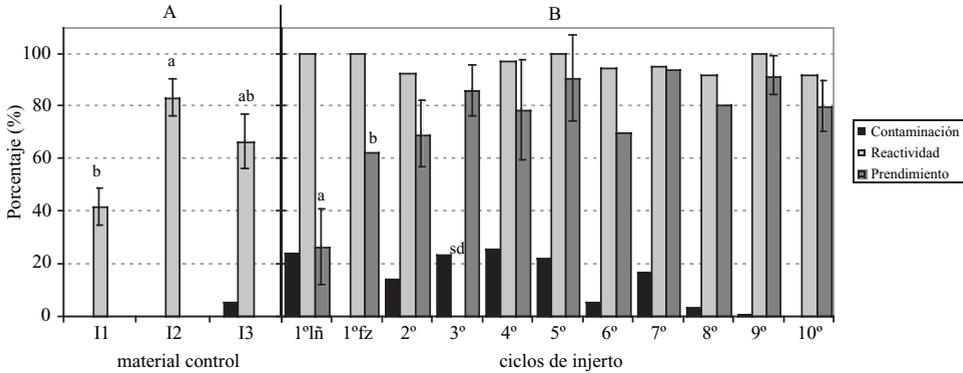


Figura 2. Porcentajes de reactividad y contaminación tras el establecimiento *in vitro*, y prendimiento de los injertos en función del ciclo. Cuadro A: material control (11, 12 e 13 corresponden a tres introducciones distintas); Cuadro B: material injertado. ln: púas de brotes leñosos; fz: púas de brotes de forzado. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba LSD ($p < 0,01$). (sd: sin datos)

función de la introducción. Los porcentajes de contaminación son muy bajos (0-6%) en todos los casos. El tratamiento más suave (b), que corresponde a la 2ª y 3ª introducciones, sería el más aconsejable. En el material de injerto se mantienen bajos porcentajes de contaminación (0-26%) y la reactividad supera el 90%, revelando un estado fisiológico óptimo para el establecimiento *in vitro*. Aunque no se muestra en la figura 2, la reactividad media del material procedente de injerto difiere significativamente de la

del material control ($p < 0,01$) y el prendimiento medio de los ciclos 2 al 10 difiere significativamente del obtenido en el primer injerto de brotes de forzado ($p < 0,05$).

Multiplicación *in vitro*: Los resultados comparativos de material control e injertado se muestran en la figura 3. Aunque en algunos estudios la tasa de multiplicación mejora por efecto del injerto (FERNÁNDEZ-LORENZO Y FERNÁNDEZ-LÓPEZ, 2005), nuestros resultados no permiten de momento confirmar este hecho. La tasa de mul-

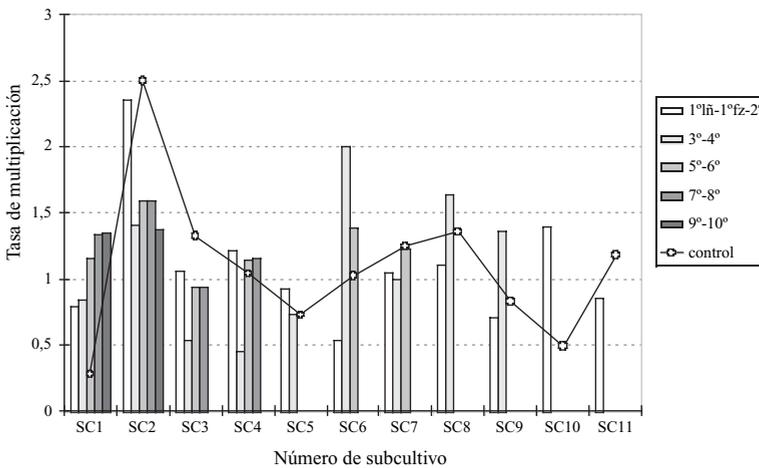


Figura 3. Tasa de multiplicación media, para un máximo de 11 subcultivos, del material control (línea) e injertado (barras), agrupando los ciclos de dos en dos para facilitar la interpretación. La ausencia de datos a partir de un determinado subcultivo indica que el material aún no ha alcanzado dicho subcultivo

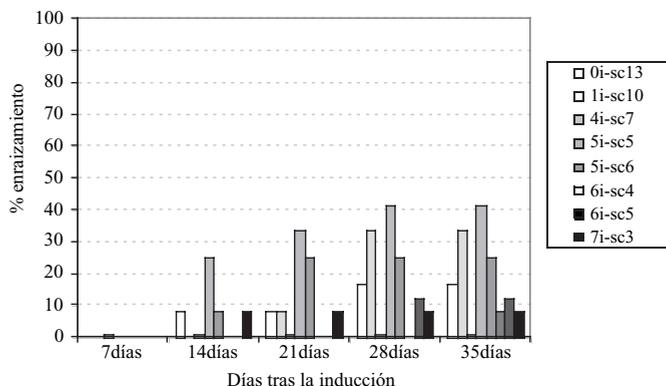


Figura 4. Porcentaje de enraizamiento *in vitro* de material control (0i) y de material injertado una (1i), cuatro (4i), cinco (5i), seis (6i) y siete (7i) veces, a los 7, 14, 21, 28 y 35 días tras la inducción. Se indica así mismo cuantas veces se subcultivó(sc) el material antes del ensayo

tipificación fluctúa de un subcultivo a otro, lo que es frecuente en el período de estabilización *in vitro* (McCOWN & McCOWN, 1987), sin que se aprecien diferencias entre el control y el material de injerto, a excepción del primer subcultivo, en el que la tasa de multiplicación del material de injerto es mayor que la del control, tendiendo a aumentar con el número de ciclos de injerto al que se sometió el material. Estas diferencias en el primer subcultivo permiten un rendimiento mayor a medio plazo, manejándose un mayor número de brotes durante la estabilización.

Enraizamiento *in vitro*: El porcentaje de enraizamiento del material control e injertado (Figura 4) es en general bajo (0-43%), frecuente en *Quercus robur* adulto (SÁNCHEZ *et al.*, 1996). Se detectan raíces desde los 14 días, alcanzándose el máximo enraizamiento sobre los 28 días. No se percibe un efecto positivo del injerto sobre el enraizamiento, ahora bien, el efecto del subcultivo continuo podría enmascarar el del injerto, pues el subcultivo continuo mejora en algunos casos el enraizamiento (FAVRE & JUNCKER, 1987). Para discernir el efecto del injerto, las pruebas comparativas deben realizarse entre materiales subcultivados el mismo número de veces.

Otras utilidades del injerto en serie ‘acelerado’

Esta técnica permite aumentar considerablemente el número de explantos iniciales con respecto al forzado de segmentos de rama. La disponibilidad de explantos (e) en función de los

ciclos practicados (n) y del número de injertos iniciales (P) vendría expresada, con nuestros datos (prendimiento: 80%; ciclos de 40 días; 4,22 explantos/ciclo), como: $e = P(3,38)^n$. Por ejemplo, partiendo de 10 injertos, en un año (n = 9) se podría disponer de más de 575.000 explantos. El método también permite la producción masiva de planta injertada. En un año se podrían obtener más de 136.000 plantas injertadas, sobre patrones de 1,5 meses. Esta producción es extraordinaria si se compara con el injerto en invernadero sobre patrones de 1-2 años.

CONCLUSIONES

En el material ensayado no se observa un efecto positivo del injerto en serie sobre la propagación *in vitro*. En todo caso, el injerto en serie ‘acelerado’ es una herramienta valiosa para obtener un alto número de explantos para establecer *in vitro* y para producir masivamente planta injertada en períodos muy cortos, mejorando ostensiblemente los rendimientos obtenidos empleando técnicas tradicionales.

BIBLIOGRAFÍA

EVERS P.; HAANSTRA, L.; VERMEER, E. & VAN EEDEN S.; 1996. Influence of reversed phase change on micropropagation of *Quercus*

- robur*. *Plant Tissue Cult. Biotech.* 2(3): 148-153.
- EWALD, D. & NAUJOKS, G.; 1997. Sustainability of rejuvenation in larch and oak clones. In: *Annual Report of the COST Working Group "Rejuvenation and Phase Change"*. Ed. European Commission. Bruxelles.
- FAVRE, J.M. & JUNCKER, B.; 1987. In vitro growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. *Plant Cell Tissue & Organ Cult.* 8: 49-60.
- FERNÁNDEZ-LORENZO, J.L. & FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.J.; 2005. Reinvigoration of mature *Castanea sativa* by micrografting onto a juvenile clone. *Acta Hort.* 693: 293-298.
- GRESSHOFF, P.M. & DOY, C.H.; 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Plant* 197: 161-170.
- HUANG, L.C.; LIUS, S.; HUANG, B.L.; MURASHIGE, T.; MAHDI, E.F.M. & VAN GUNDY, R.; 1992. Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro. *Plant Physiol.* 98: 166-173.
- LLOYD, G. & McCOWN, B.; 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 30: 421-427.
- McCOWN, D.D. & McCOWN, B.H.; 1987. North American hardwoods. In: J.M. Bonga & D.J. Durzan (eds.), *Cell and Tissue Culture in Forestry. Case Histories: Gymnosperms, Angiosperms and Palms* 3: 247-260. Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht.
- OBDRŽÁLEK, J. & JÍLKOVÁ, J.; 2006. Winter grafting of oaks *Quercus* L. *Hort. Sci.* 33(2): 61-69.
- SAN JOSÉ, M.C.; VIÉITEZ, A.M. Y VIÉITEZ, E.; 1985. Establecimiento y multiplicación in vitro de brotes del género *Quercus*. *Phyton* 45: 31-40.
- SÁNCHEZ, M.C.; SAN JOSÉ, M.C.; BALLESTER, A. & VIÉITEZ, A.M.; 1996. Requirements for in vitro rooting of *Quercus robur* and *Quercus rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol.* 16: 673-680.
- SINISCALCO, C. & PAVOLETTONI, L.; 1988. Rejuvenation of *Eucalyptus x trabatii* by successive grafting. *Acta Hort.* 227: 98-100.
- TORIBIO, M.; FERNÁNDEZ, C.; CELESTINO, C.; MARTÍNEZ, M.T.; SAN JOSÉ, M.C. & VIÉITEZ, A.M.; 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell, Tissue & Organ Cult.* 76: 283-287.
- VIÉITEZ, A.M.; SÁNCHEZ, C.; AMO-MARCO, J.B. & 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.
- ZACZEK, J.J.; STEINER, K.C.; HEUSER, C.W. & TZILKOWSKI, W.M.; 2006. Effects of serial grafting, ontogeny, and genotype on rooting of *Quercus rubra* cuttings. *Can. J. For. Res.* 36: 123-131.