



7º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

**Gestión del monte: servicios
ambientales y bioeconomía**

26 - 30 junio 2017 | Plasencia
Cáceres, Extremadura

7CFE01-060

Edita: Sociedad Española de Ciencias Forestales
Plasencia. Cáceres, Extremadura. 26-30 junio 2017
ISBN 978-84-941695-2-6

© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Cultivo in vitro de *Populus tremula* L.: Influencia del medio de cultivo en la conservación del material vegetal

CALDERÓN MEDIAVILLA, R.¹, OTAÑO LLORENTE, A.¹, SAN MARTÍN FERNÁNDEZ, R.^{1,2}, SIERRA DE GRADO, R.^{1,2}.

¹ E.T.S. de Ingenierías Agrarias Universidad de Valladolid (Campus de Palencia).

² Instituto Universitario de Investigación en Gestión Forestal Sostenible (iuFOR).

Resumen

Las poblaciones de *Populus tremula* L. en España constituyen el límite suroeste de su distribución mundial y se ven amenazadas por cambios de uso del terreno y el cambio climático. En la ETSIIAA-iuFOR se mantiene una colección in vitro de recursos genéticos de *Populus tremula* de Castilla y León. En este trabajo se busca encontrar un medio de cultivo que permita alargar el tiempo en que los explantos permanecen en buen estado sin necesidad de renovar el medio. Se comparó el desarrollo de tres clones en el medio estándar de cultivo in vitro (ACM) con variantes de este en las que se modificaba la cantidad de macro y micronutrientes, la adenina y la sacarosa, a dos temperaturas distintas (15°C y 24°C). Se realizó también una prueba a 4°C. El seguimiento se realizó durante 6 meses. El medio que combinaba las menores concentraciones de nutrientes, adenina y sacarosa, a 15°C, redujo el crecimiento de los explantos y la aparición de callo, obteniendo elevada supervivencia a los 6 meses. Se analiza la interacción entre factores. Las plantas que permanecieron durante 4 meses a 4°C no experimentaron desarrollo alguno, sin embargo, tras este período de tiempo se situaron a 15°C, multiplicándose rápidamente.

Palabras clave

Nutrientes, adenina, sacarosa, temperaturas.

1. Introducción.

El *Populus tremula* L., es la especie de álamo más extendida del planeta, si embargo, su distribución en la Península Ibérica está limitada a la zona septentrional, fundamentalmente a los Pirineos, si bien, también se localiza en la Cordillera Cantábrica, Sistema Central y Sistema Ibérico. El álamo temblón se encuentra con una serie de problemas para su conservación en España, como son, una reproducción sexual limitada por la rápida pérdida de viabilidad de sus semillas unida a sus estrictas exigencias para la germinación, los cambios de uso del terreno o el cambio climático. En la ETSIIAAiuFOR de Palencia se ha establecido una colección de recursos genéticos de *Populus tremula* de Castilla y León: el llevar a cabo un proyecto de conservación como éste, implica la necesidad de preservar a largo plazo gran cantidad de material vegetal, lo que trae consigo un trabajo de repicado de las plantas y la elaboración constante de medios de cultivo.

El trabajo y el coste implícitos en un proyecto de conservación de material vegetal, pueden verse reducidos si se encuentran las condiciones para mantener la colección en óptimas condiciones, minimizando el número de manipulaciones. Éste es, en esencia, el principal propósito de este experimento, de manera que, se ha partido del medio ACM proliferación propuesto por Ahuja (1983), que es el medio estándar de cultivo para esta especie, y se han variado los factores temperatura, cantidad de macro y micronutrientes, adenina y sacarosa. Las razones por las que se han considerado como relevantes estos factores en un trabajo de conservación son las siguientes:

- ✓ Temperatura. Reduciendo la temperatura ambiente se puede ralentizar el crecimiento de la planta, y lograr que el medio de cultivo tarde más tiempo en agotarse.

- ✓ Sacarosa. Las plantas in vitro presentan una baja capacidad fotosintética, de modo que, la fuente de carbono debe existir en el medio de cultivo de forma orgánica.
- ✓ Macro y micronutrientes. Son la base de la nutrición de las plantas, aseguran el metabolismo, el crecimiento, las funciones fisiológicas, etc.
- ✓ Adenina sulfato. La adenina sulfato fue utilizada por SKOOG & TSUI (1948) para el crecimiento de explantos de tallos de tabaco, donde estimuló la formación de vástagos adventicios. Posteriormente, NITSCH et al. (1967) utilizaron la adenina para estimular la formación de brotes de *Plumbago indica*. NAAZ et al. (2007) también encontraron que la adenina sulfato mejoró la inducción de tallos en el desarrollo in vitro de *Syzygium cumini* L. Podemos concluir que, por lo general, la adenina sulfato en el cultivo in vitro, induce a la formación de yemas axilares que darán lugar a nuevos brotes.

2. Objetivos.

El objetivo general que se busca con el presente trabajo es, partiendo del medio de cultivo ACM de proliferación (Ahuja, 1983) empleado en la micropropagación de *Populus tremula* L., encontrar un medio de cultivo in vitro en el que el material vegetal, además de desarrollarse adecuadamente, se mantenga en buen estado de conservación durante el mayor período de tiempo posible.

En particular se analizará la influencia de la temperatura, la concentración de nutrientes, de sacarosa y de adenina sulfato, sobre la conservación de tres clones de *Populus tremula* durante un período de seis meses.

3. Metodología.

3.1. Material vegetal.

Se emplearon tres clones en el experimento, cuyas características se reflejan en la Tabla 1.

Tabla 1. Procedencia del material utilizado.

Número de clon	Código	Provincia	Rodal
1	PAJ	Segovia	Pajares de Fresno
10	RIA	Segovia	Riaza
19	GOM	Segovia	Gomeznarro

3.2. Medios de cultivo.

Se evaluó el comportamiento del material vegetal en ocho medios de cultivo, generados a partir del medio control ACM desarrollado por Ahuja (Ahuja, 1983). El medio 1 es el medio control, y el resto de medios se han elaborado a partir del mismo, cambiando la cantidad de algunos de sus componentes.

Los factores considerados como relevantes han sido modificados como sigue:

- ✓ Temperatura. Se ensayaron tres temperaturas en diferentes cámaras: en la cámara de cultivo visitable (24°C), en la cámara tipo armario (15°C) y en la refrigeradora (4°C).
- ✓ Sacarosa. Se ha empleado la cantidad de sacarosa del medio estándar, 20 g/L, y ésta reducida a 7 g/L, buscando de este modo una proliferación de tallos más lenta.
- ✓ Macro y micronutrientes. Se ensayó con la cantidad estándar (100 mL de macronutrientes y 10 mL de micronutrientes) y ésta reducida a la mitad.
- ✓ Adenina sulfato. Se ensayó con la cantidad del medio estándar, 20 mg/L, y ésta incrementada al doble, buscando obtener una buena roseta de cada planta, lo más consistente posible pero, a la vez, con el menor crecimiento.

Tabla 2. Composición de cada medio de cultivo elaborado

Medio	1	2	3	4	5	6	7	8
Macronutrientes A	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Macronutrientes B	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL
Micronutrientes	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Hierro	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,08 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Vitaminas	Th+Ac.Nic+Pir	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
	Lisina	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
	Mio-inositol	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Reguladores	BA	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
	ANA	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
	Adenina	4 mL	4 mL	8 mL	8 mL	4 mL	4 mL	8 mL
Sacarosa	20 g	7 g	20 g	7 g	20 g	7 g	20 g	7 g
Agar	8 g							
pH	5,6-5,8							

Tabla 3. Resumen de las distintas mezclas de los componentes de los medios de cultivo relevantes para el ensayo.

Componentes	Cantidad o porcentaje							
	100%				50%			
Nutrientes								
Adenina	20 mg/L		40 mg/L		20 mg/L		40 mg/L	
Sacarosa	20 g/L	7g/L	20 g/L	7g/L	20 g/L	7g/L	20 g/L	7g/L
Medio	1	2	3	4	5	6	7	8

3.3. Diseño experimental.

Los medios de cultivo se repartieron en 162 botes y cada bote contenía 3 explantos de un mismo clon; de ellos, 72 botes fueron a la cámara a 24°C, otros 72 botes a la cámara a 15°C y 18 botes a la cámara a 4°C.

En cada cámara se utilizó un diseño experimental en tres bloques aleatorios completos: en la cámara a 24°C y en la cámara a 15°C cada bloque contaba con todos los clones en todos los medios, y en la cámara a 4°C se evaluó únicamente el medio control.

3.4. Variables estudiadas.

- Variables categóricas: se midió el tamaño de las raíces, el número de tallos y el número de hojas por explanto.
- Variables cuantitativas: se midió el crecimiento en altura de cada explanto en cm.
- Variables presencia/ausencia: se midió el número de explantos con callo, la supervivencia y la presencia o ausencia de contaminación en cada bote.
- ✓ El cultivo de los explantos se realizó los días 20, 21 y 22 de julio de 2015. La medición y toma de datos comenzó el día 4 de septiembre de 2015 y se repitió posteriormente una vez al mes, hasta finalizar en el mes de enero de 2016.

3.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico SAS 9.4 for Windows.

Para analizar la supervivencia, en cada fecha de medición, para cada cámara y para cada medio de cultivo se obtuvo el porcentaje (P) de explantos que sobrevivieron en cada bloque (9 explantos por combinación de fecha (mes), cámara, medio y bloque). Es decir, el porcentaje de supervivencia se obtuvo sobre un total de 9 explantos.

Para analizar el porcentaje de explantos vivos y ver el efecto de los distintos factores (mes, cámara, medio de cultivo) se ajustó el modelo lineal mixto de medidas repetidas. Posteriormente, para observar el efecto de la supervivencia de los componentes del medio de cultivo, se planteó el mismo modelo para cada cámara.

Del mismo modo se actuó en el análisis de la presencia de callo y de las variables categóricas.

Para estudiar el crecimiento y analizar el efecto de los distintos factores (mes, cámara, medio de cultivo) en la altura de los explantos, se ajustó el modelo lineal mixto de medias repetidas. Posteriormente, para observar el efecto en el crecimiento de los componentes del medio de cultivo, se planteó, para cada cámara de cultivo, el modelo lineal mixto de medias repetidas.

4. Resultados

4.1. Supervivencia.

En la Figura 1 se representa la supervivencia de las plantas al final del experimento, en función de que estén a 15°C o 24°C.

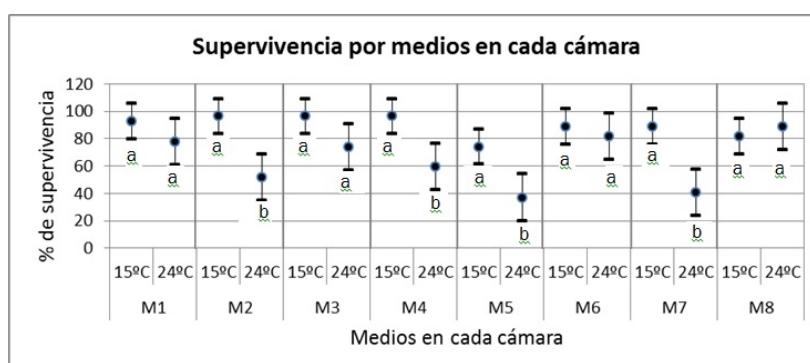


Figura 1. Supervivencia en enero en cada medio de cultivo. Se compara cada medio en las dos temperaturas.

Los medios 1, 3, 6 y 8 presentan una buena tasa de supervivencia a ambas temperaturas. En los medios 2, 4, 5 y 7 la supervivencia es significativamente inferior a 24°C. Si se promedian ambas temperaturas, se concluye que los medios en los que la supervivencia es significativamente inferior son los medios 5 y 7.

4.2. Crecimiento.

En las Figuras 2a y 2b se refleja la diferencia de desarrollo del material vegetal en función de la temperatura y el medio en el que se encuentren.

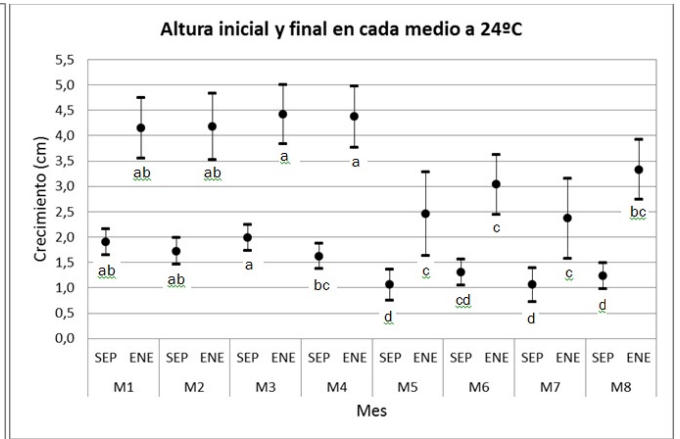
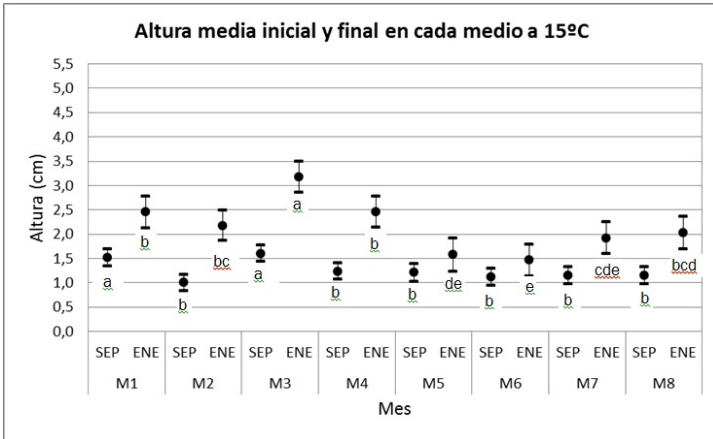


Figura 2a. Altura media en la primera y última medición en cada medio de cultivo a 15°C.

Figura 2b. Altura media en la primera y última medición en cada medio de cultivo a 24°C.

A 15°C, la altura media en el medio 3 en enero es significativamente superior al resto. Por otro lado, en los medios 5, 6 y 7 es donde la altura media de los explantos es menor al final del experimento.

A 24°C, en enero, los explantos alcanzan una altura media significativamente superior en los medios 1, 2, 3 y 4 que en los medios 5, 6 y 7, siendo el 8 un medio intermedio entre estos dos grupos.

- Crecimiento de las plantas en la cámara a 4°C.

Estas plantas se mantuvieron durante 4 meses a 4°C, tiempo durante el cual no se observó desarrollo alguno en las mismas. Tras este tiempo, las plantas se cambiaron a 15°C, donde lograron desarrollarse con éxito.

4.3. Variables categóricas.

Número de tallos. Existen diferencias significativas entre las dos temperaturas: a 15°C, hasta octubre no comienzan a aparecer plantas con más de 5 tallos, y sólo un 20% de las plantas superan los 5 tallos al final del experimento. A 24°C, en septiembre ya hay plantas con más de 5 y de 10 tallos, y el máximo se alcanza en diciembre, con un 55% de plantas con más de 5 tallos.

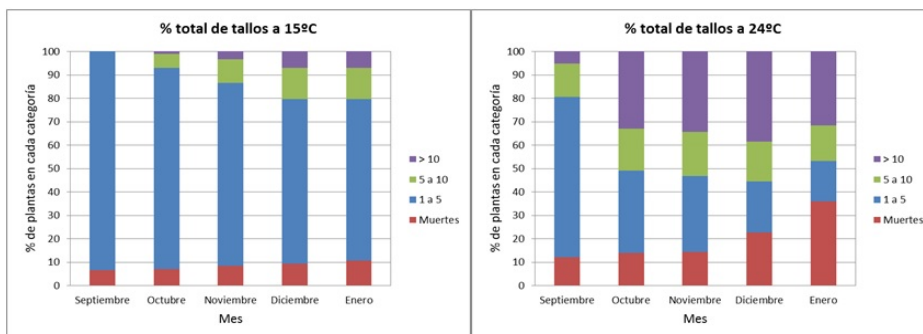


Figura 3. Proliferación media de tallos en cada cámara a lo largo del ensayo.

. A 15°C, los medios que presentan una mayor proliferación son el 1 y el 3, y los que menos, el 5, 6 y 7.

A 24°C, los medios en los que la proliferación de tallos es menor son el 1, 5, 6 y 7, sin embargo la mortalidad en los medios 5 y 7 es elevada (desde el 40% al inicio del experimento hasta el 60% al final).

Número de hojas. En este caso la diferencia entre las dos temperaturas es menor, si bien, por lo general las hojas alcanzaron un tamaño mayor más rápidamente a 24°C.

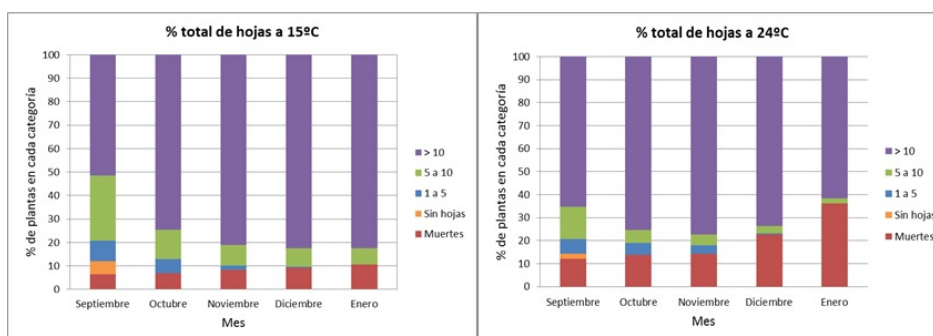


Figura 4. Proliferación media de hojas en cada cámara a lo largo del ensayo.

A 15°C, los medios 2, 4, 6 y 8 son los que menor proliferación de hojas presentan, el 1 y el 3 son los que tienen mayor proliferación, donde, en octubre, todas las plantas tienen ya más de 10 hojas.

A 24°C, la diferencia están entre los medios 1, 2 y 6, donde, a partir de octubre, todas las plantas tienen más de 10 hojas, y los medios 3, 4 y 8, en los que las plantas tienen más de 10 hojas ya desde septiembre.

Tamaño de las raíces. En este caso, a 15°C comienzan a surgir raíces en diciembre, mientras que a 24°C lo hacen ya desde octubre.

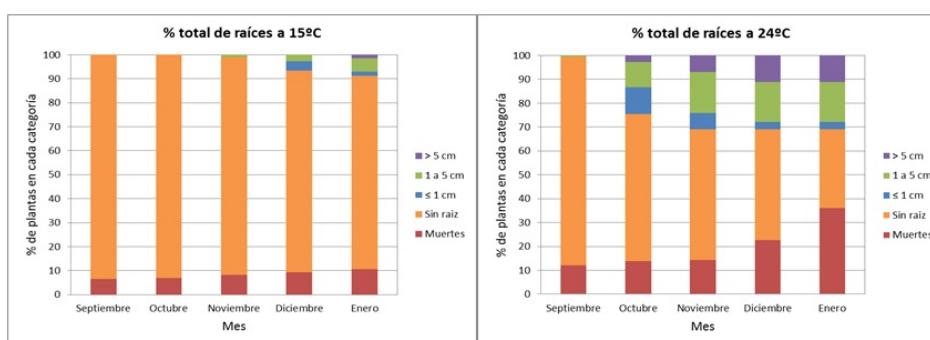


Figura 5. Proliferación media de raíces en cada cámara a lo largo del ensayo.

A 15°C, el medio que presenta mayor número de plantas con raíz es el medio 3, y el único medio donde no surgen raíces en todo el experimento es el medio 6.

A 24°C, el medio donde prolifera un menor número de raíces manteniendo, a la vez, el mayor porcentaje de plantas vivas al final del ensayo es el medio 6.

5. Discusión.

- Supervivencia.

El efecto de la temperatura en los trabajos revisados, es que temperaturas más bajas prolongan la supervivencia del material vegetal, que es lo mismo que sucede en el presente estudio. En nuestro caso, las combinaciones nutrientes-sacarosa que conservan peor el material vegetal son, en este orden: nutrientes al 50% + 20 g/L de sacarosa y nutrientes al 100% + 7 g/L de sacarosa; al contrario sucede con las especies del género *Lilium* L., donde la mayor supervivencia a 25°C se dio en los medios que combinaban la menor concentración de nutrientes con la mayor concentración de sacarosa (BONNIER et al, 1997). En el caso de las especies *Zizyphus jujuba* (SOTA et al, 2014) y *Prunus mahaleb* (SOTA et al, 2014) la adición de sacarosa redujo la supervivencia, y lo contrario sucedió con los genotipos de *Coffea spp.* (BERTRAND-DESBRUNAIS et al, 1992) y *Pyrus spp.* (AHMED et al, 2010), donde los medios con mayor concentración de sacarosa o manitol conservaron mejor las plantas.

- Presencia de callo.

Respecto a la presencia de callo en las plantas, los únicos factores que provocan diferencias significativas son la concentración de nutrientes y de adenina sulfato a 15°C.

- Crecimiento.

Por norma general, tanto en el presente estudio como en los trabajos revisados (salvo MARTIN et al, 2007) los resultados muestran una ralentización del crecimiento a temperaturas más bajas y con concentraciones menores de nutrientes y sacarosa. Otra similitud es que en este trabajo se observa un comportamiento similar al de las plantas de *Lilium* L. (BONNIER et al, 1997): a 24°C, el menor crecimiento se da empleando la menor concentración de nutrientes junto con la mayor de sacarosa.

- Variables categóricas.

Los resultados de estas tres últimas variables (número de tallos, hojas y raíces) presentan cierta correlación. La reducción de la temperatura provoca una proliferación de tallos, hojas y raíces más tardía. La concentración de nutrientes al 100% trae consigo una mayor proliferación, que en general se incrementa al combinarlos con 20 g/L de sacarosa. La combinación de las menores concentraciones de nutrientes, sacarosa y adenina es la que otorga una menor proliferación de las tres variables.

6. Conclusiones.

Existen diferencias significativas entre el efecto de las dos temperaturas, 15°C y 24°C, para todas las variables respuesta analizadas. El material vegetal se conserva mejor a 15°C.

Los medios 5 y 7 quedarían descartados como medios de conservación debido a la gran mortalidad que se observa en ellos a 24°C, y por el escaso vigor que mostraban a 15°C.

Los medios 2 y 4 también quedarían descartados a 24°C debido al significativo descenso de la supervivencia en enero.

El crecimiento tanto a 15°C como a 24°C es significativamente inferior en los medios 5, 6 y 7.

El medio 3 no sería una buena opción para conservación debido a que es el medio que maximiza el crecimiento y la proliferación de tallos.

El medio en el que la proliferación de tallos y hojas es más tardía, y en el que además las plantas presentan un menor número de tallos y hojas en enero es el medio 6, que es el compuesto por la menor cantidad de nutrientes, adenina y sacarosa. Sería por tanto, la mejor opción, teniendo en cuenta los objetivos del presente estudio. Tras él, las mejores opciones que se podrían elegir serían, por este orden, el medio 8, el 4 y el 2 a 15°C. El medio 6 es, además, el más económico.

7. Agradecimientos.

Esta comunicación forma parte del Trabajo Fin de Máster de Ingeniería de Montes del primer autor.

8. Bibliografía

AHMED, M.; ANJUM, M.A.; 2010. In vitro storage of some pear genotypes with the minimal growth technique. *Turk J. Agric For* 34; pp. 25-32.

AHMED, M.; ANJUM, M.A.; SHAH, A.H; HAMID, A; 2010. In vitro preservation of *Pyrus* germplasm with minimal growth using different temperature regimes. *Pak. J. Bot.*, 42(3): pp. 1639-1650.

BERTRAND-DESBRUNAIS, A.; NOIROT, M.; CHARRIER, A.; 1992. Slow growth in vitro conservation of coffee (*Coffea spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: pp. 105-110.

BONNIER, F.J.M.; VAN TUYL, J.M.; 1997. Long term in vitro storage of lily: effects of temperature and concentration of nutrients and sucrose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 49: pp. 81-87.

MARTIN, M.T.; PEDRANZANI, H.E.; SIERRA DE GRADO, R.; 2007. Behavior and preservation of an in vitro collection of European aspen in Spain. *Biocell*, 31(1), pp. 41-49.

NITSCH, C.; NITSCH, J.P.; 1967. The induction of flowering in vitro in stem segments of *Plumbago indica* L. *Planta*, pp. 355-370.

SKOOG, F.; TSUI, C.; 1948. Chemical Control of Growth and Bud Formation in Tobacco Stem Segments and Callus Cultured in Vitro. *American Journal of Botany*, pp. 782-787.

SON, S.H; CHUN, Y.W; HALL, R.; 1991. Cold storage of in vitro cultures of hybrid poplar shoots (*Populus alba* L. x *P. grandidentata* Michx.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 27: pp. 161-168.

SOTA, V.; KONGJIKA, E.; 2014. The effect of nutrient media in micropropagation and in vitro conservation of wild population of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 3 (6); pp. 453-456.

SOTA, V.; KONGJIKA, E.; 2014. Slow growth in vitro conservation of *Zizyphus jujuba* Mill. *Agriculture & Forestry*, Vol. 60. Issue 1: pp. 27-37.