

Micropropagación de *Populus tremula* L.

Aranzazu Gómez Garay¹. Beatriz Pintos López¹.
José Manuel Grau Corbi². M^a Ángeles Bueno Pérez²

1. Facultad de CC Biológicas. Dpto. de Biología Vegetal I: Fisiología Vegetal. C/ José Antonio Novais 12. 28040 Madrid. Ciudad Universitaria.

2. CIFOR-INIA. Carretera de La Coruña Km 7.5 28040 Madrid.

magom02@bio.ucm.es

Resumen: la micropropagación de *Populus tremula* L. es una técnica de cultivo *in vitro* que permite multiplicar clonalmente ejemplares adultos de esta especie. Este sistema adquiere especial importancia dado que el álamo temblón se multiplica difícilmente a partir de métodos convencionales que están generalizados para otras especies de chopos. El proceso comienza con la obtención de brotes de raíz que servirán como fuente de explantos para la iniciación del cultivo. Tanto esta fase como las tres primeras de la micropropagación (establecimiento de un cultivo aséptico, multiplicación y enraizamiento) y se realizan alterando las concentraciones relativas de reguladores de crecimiento para obtener las respuestas deseadas en cada una de ellas. La cuarta y última fase es la transferencia a condiciones *ex vitro* en invernaderos y viveros, lográndose un éxito del 96%. Con un sistema de análisis mediante marcadores moleculares se garantiza el mantenimiento la variabilidad genética y el seguimiento de los árboles desde el laboratorio hasta el monte.

Palabras clave: Álamo temblón. Cultivo *in vitro*. Auxinas. Citoquininas. Clon. Marcadores moleculares.

INTRODUCCIÓN

Populus tremula L.: la especie

El álamo o chopo temblón (*Populus tremula* L.) pertenece a la familia de las salicáceas. Es un árbol caducifolio de tamaño medio-alto (hasta 40 m de altura aproximada) y con un tronco que puede alcanzar más de un metro de diámetro. La corteza de los ejemplares jóvenes tiene un color pálido, gris plateado, verdoso, con lenticelas en forma de diamante en color gris oscuro. En los ejemplares adultos la corteza se oscurece y aparecen las fisuras. Las hojas de las plántulas y los brotes de raíz tienen forma de corazón. Las hojas adultas son redondeadas y ligeramente más anchas que largas, con un peciolo plano, de cuatro a ocho centímetros de largo, que les permite temblar con la brisa, de ahí su nombre (Fig. 1).



Figura 1. Imagen de *Populus tremula* L. en reposo vegetativo.

El área de distribución del álamo temblón es muy amplia, desde sus orígenes en las zonas frías del norte de Europa y Asia hasta España y Turquía llegando incluso a Corea del Norte y Japón. En su distribución más al sur ocupa las montañas, creciendo en zonas donde la precipitación excede a la evapotranspiración (von Wühlisch, 2009).

Esta especie es muy importante por su capacidad de regeneración y su baja exigencia en suelos. Presenta, como otros *Populus* autóctonos un gran interés en programas de recuperación de la diversidad en riberas y zonas degradadas. También es una elección para la populicultura de media montaña por no tener problemas de adaptación (Grau, 1991) y tiene un gran valor ornamental en cualquier fase del periodo vegetativo, pero sobre todo en otoño, cuando las hojas adquieren unas coloraciones muy vistosas, que van desde al amarillo al púrpura en todas sus tonalidades, consiguiéndose en jardinería formas llamativas: piramidales, lloronas, abiertas (Bueno *et al.*, 2001).

Propagación convencional

El éxito de la repoblación con chopos radica en gran medida en la utilización de plantas de calidad procedentes de vivero. Estas plantas deben estar bien lignificadas y desarrolladas, exentas de daños, enfermedades, plagas y virosis.

Aunque la propagación convencional de plantas se realiza, normalmente, por semillas, es decir, reproducción sexual, el género *Populus* constituye una excepción ya

que un gran porcentaje de semillas son estériles. Esta característica es la que hace que tradicionalmente se utilice la multiplicación asexual, vegetativa, de forma común en la popicultura mediterránea y que se basa fundamentalmente en los chopos euroamericanos (Grau, 1991). En general, los chopos se multiplican clonalmente mediante el estaquillado. Las estaquillas de calidad se obtienen, durante el periodo de reposo vegetativo (Fig. 2), de los dos tercios inferiores de brotes del año bien lignificados y son fragmentos de 20-30 cm de longitud y no menos de 8-10 mm de diámetro (González-Antoñanzas y Grau, 1999). Pero la propagación vegetativa por estaquillas es muy desigual de unos chopos a otros; así los álamos temblones no tienen ninguna aptitud para el estaquillado y es esta dificultad de *P. tremula* en propagarse por estaquilla lo que ha dificultado la clonación convencional de ejemplares selectos, autóctonos y adaptados a los ecosistemas.



Figura 2. Recolección de estaquillas de *P. tremula*.

Micropropagación

La micropropagación es una técnica de cultivo *in vitro* en la que una parte del vegetal (célula, tejido u órgano) que se denomina explanto se cultiva en condiciones controladas (temperatura, iluminación y humedad) y asépticas (en ausencia de microorganismos) sobre un medio de cultivo nutritivo que contiene macro y micronutrientes (sales minerales en cantidades diferentes), una fuente de carbono (ya que el crecimiento es heterótrofo) y reguladores de crecimiento (hormonas vegetales).

Esta técnica se ha convertido en una alternativa importante dentro de los métodos convencionales de propagación en una amplia gama de especies y se compone de cuatro etapas secuenciales: establecimiento, proliferación o multiplicación, enraizamiento y aclimatación (Boutherin y Bron, 1994).

La respuesta del explanto es muy variada. En algunas ocasiones es ausente, es decir, no se produce ningún tipo de respuesta. En otras ocasiones en el cultivo se producen contaminaciones que derivan en el crecimiento de microorganismos (hongos y bacterias) en detrimento del vegetal. Pero también se pueden obtener los resultados perseguidos, lograr la respuesta esperada y obtener el crecimiento y desarrollo buscados. La variación en los niveles relativos de los reguladores de crecimiento es la responsable de obtener respuestas diferenciadas, de modo que son estos componentes los que adicionados al medio van a permitir a las células desarrollarse en el camino adecuado. En este caso propagar clonalmente árboles adultos de *Populus tremula*.

MATERIAL VEGETAL

Cuando el objetivo es llevar a cabo la utilización de clones con fines de recuperación de ecosistemas es necesario realizar una evaluación preliminar de la variabilidad genética de las poblaciones a recuperar, de forma que se garantice la representatividad de la misma mediante las plantas utilizadas logrando preservar la mayor variabilidad con el menor número de clones.

La variabilidad genética del álamo temblón es elevada, la mayor parte es intrapoblacional y se distribuye en menor medida entre poblaciones (von Wühlisch, 2009). Sin embargo, el crecimiento en rodales hace que se encuentre una gran homogeneidad dentro de ellos. En general, la distribución es la de un árbol adulto del cual han derivado árboles más jóvenes a partir de los brotes de raíz (lo que se denomina "ramet"). Los rodales también pueden comprender un mosaico de clones (Cheliak y cols., 1984) o individuos de reproducción sexual. Por lo tanto, como un ortet es homogéneo genéticamente es necesario hacer una buena selección de los árboles representativos de cada genotipo (Bueno y cols. 1993) dentro del mismo rodal.

El análisis de esta variabilidad se puede realizar utilizando diversidad de marcadores moleculares entre los que al principio se utilizó la técnica de isoenzimas (Castillo y Prado, 1987; Farmer y cols., 1988; Bueno y cols. 1993). Posteriormente se han utilizado marcadores de ADN con la finalidad de identificar cada genotipo (por ejemplo: Castiglione y cols., 1993; Sánchez y cols. 1998). Estos marcadores permiten diferenciar especies pero también caracterizar un único clon de forma que permita diferenciarlo del resto ("fingerprinting").

Obtención de brotes de raíz (fuente de explantos)

Una vez seleccionados los individuos a propagar se procede a tomar las muestras para iniciar el cultivo. Estas muestras son trozos de raíz de 5-10 cm de grosor que se mantienen en el invernadero en macetas con turba y perlita (2:1). En los fragmentos de raíz se realizan incisiones superficiales que se pulverizan con 6-bencilaminopurina (6-BAP) para estimular la producción de brotes (Fig. 3). El 6-BAP es un regulador de crecimiento, una citoquinina sintética, las citoquininas son fundamentales para la formación de brotes. Entre ellas la 6-bencilaminopurina (6-BAP) es, en general, la citoquinina más efectiva y la más empleada en la inducción de yemas axilares. El tiempo aproximado de elongación de los brotes es de siete semanas.



Figura 3. Aparición de brotes de *P. tremula* sobre turba y perlita (2:1) tras la estimulación de las raíces con la citoquinina 6-BAP (6-bencilaminopurina).

FASES DE MICROPROPAGACIÓN DE *Populus tremula* L.

Las primeras tres fases de la micropropagación (Fig. 4): establecimiento de un cultivo aséptico, multiplicación y enraizamiento, se llevan a cabo en cámara de cultivo climática. En esta cámara se controlan las condiciones ambientales: fotoperiodo de 16 horas de luz y un flujo fotónico de $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ dentro del espectro fotosintético activo proporcionado por lámparas fluorescentes de luz fría. La temperatura se regula a 25°C con iluminación y 20°C en oscuridad. La cuarta y última fase que es la transferencia a condiciones *ex vitro* se realiza en invernaderos y viveros.

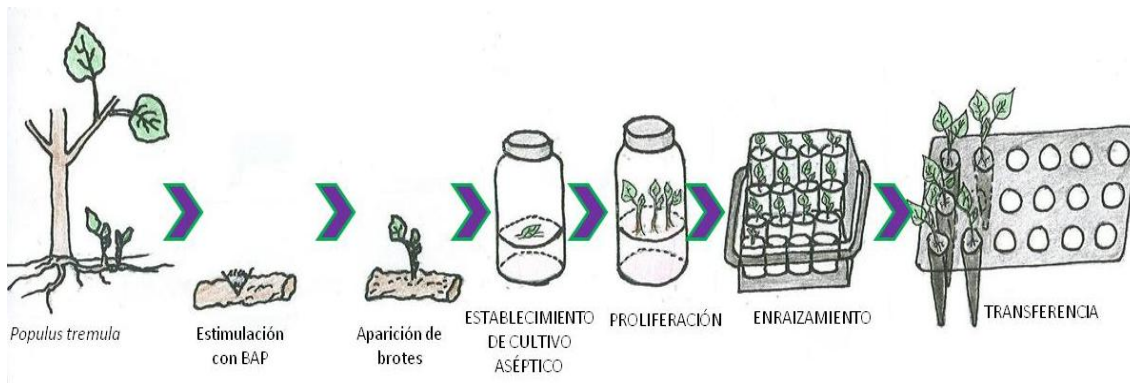


Figura 4. Esquema de inducción de brotes de raíz y fases de la micropropagación de *P. tremula*.

Fase I: Asepsia y establecimiento del cultivo

Los segmentos nodales y las yemas apicales de los brotes de raíz se esterilizan superficialmente para eliminar microorganismos que pudiesen competir en el cultivo (contaminaciones). Se sumergen en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos y después en hipoclorito sódico al 1% con unas gotas de Tween 20 durante 20 minutos para posteriormente realizar tres aclarados con agua destilada estéril en intervalos de cinco minutos.

El medio de cultivo basal (compuesto por macro y microminerales) utilizado es el "Aspen Culture Medium" (ACM; Ahuja, 1983) que es una modificación del "Woody Plant Medium" (WPM; Lloyd y McCown, 1980) sustituyendo el Fe-EDTA por 40 mg/l de Sequestrene 138 Fe G-100.

Como reguladores de crecimiento se añaden 0.5 mg/l de 6-BAP y 0.02 mg/l de ácido naftalenacético (ANA). El ANA es una auxina sintética que produce diversos efectos fisiológicos en las plantas, entre ellos estimular el crecimiento.

Se añaden al medio 30 g/l de sacarosa como fuente de carbono y 8 g/l de agar como agente gelificante. El pH del medio se ajusta a 5.6 y se esteriliza en autoclave a 1.2 atmósferas y 120°C durante 20 minutos. Se inducen así las yemas que progresarán en el cultivo (Fig. 5).



Figura 5. Yemas de *P. tremula* inducidas sobre segmentos nodales con la citoquinina 6-BAP (6-bencilaminopurina) y la auxina ANA (ácido naftalenacético).

Fase II: Proliferación y elongación

Las yemas inducidas en la iniciación del cultivo se cultivan en medio ACM suplementado con 0.5 mg/l de 6-BAP y 0.02 mg/l de ANA.

La elongación de las yemas se realiza en medio ACM con 0.1 mg/l de 6-BAP y 0.02 mg/l de ANA.

La duración de ambos procesos es aproximadamente de dos meses. La tasa de multiplicación de brotes por explanto está próxima a 3 y tiene dependencia del genotipo (Sellmer y cols. 1989), es decir, hay genotipos que no se multiplican (tasa de multiplicación cero) y otros que presentan mejores tasas de multiplicación (Fig. 6).

Fase III: Enraizamiento

Los brotes se cultivan entonces en medio ACM con 0.5 mg/l de ácido indolbutírico (IBA) que es una hormona vegetal, auxina sintética, que se utiliza habitualmente para inducir enraizamiento en estacas leñosas. Este proceso tiene una duración aproximada de dos meses y se realiza en un sistema de soportes individuales para cada planta (Fig. 7). Para tener mejores resultados en el posterior establecimiento *in vivo* de las plantas es necesario este desarrollo radicular *in vitro* (Pierik, 1990).



Figura 6. Multiplicación de brotes de *P. tremula* mediante la acción de la citoquinina 6-BAP (6-bencilaminopurina) y la auxina ANA (ácido naftalenacético).



Figura 7. Proceso de enraizamiento de brotes clonales de *P. tremula* inducido por la auxina IBA (ácido indolbutírico) sobre soportes de filtro.

Fase IV: Aclimatación

El ambiente *in vitro*, con una elevada humedad relativa, bajo o nulo intercambio gaseoso, escasez de CO₂ durante casi todo el período, producción de etileno y baja densidad fotosintética, induce perturbaciones en las plantas. Para poder transferirse con éxito las plantas al ambiente *ex vitro*, se tienen que corregir todas esas anomalías y lograr aclimatación al nuevo ambiente, ya sea en invernadero o campo. Por otra parte, la anatomía de la hoja que crece *ex vitro* está influida por la luz y la humedad, diferenciándose anatómicamente de las originadas *in vitro*. Por todo ello, la aclimatación es un factor importante en la posterior supervivencia de la planta, ya que es una etapa crítica dentro del proceso, siendo esta etapa en la que se producen las mayores pérdidas. En esta etapa de aclimatación se debe comenzar

reduciendo gradualmente la humedad relativa, para permitir con esto además del cierre estomático, una mejor formación de la cutícula y disminuir las pérdidas de agua.

Las plantas regeneradas *in vitro* de *P. tremula* se aclimatan en invernadero con un túnel de niebla, en este túnel de niebla la humedad relativa está próxima al 90%. El sustrato es una mezcla de turba y perlita (1:1) estéril (Fig. 8). Después de dos semanas las plantas se pueden sacar del túnel y trasplantar a un vivero. Lograremos así que la supervivencia en esta fase esté próxima al 96%.



Figura 8. Plantas de *P. tremula* producidas *in vitro* creciendo en invernadero para su aclimatación *ex vitro*.

FIDELIDAD AL TIPO

La identificación de plantas mediante marcadores moleculares permite la comprobación de que la clonación realizada mediante el cultivo *in vitro* es representativa de la variabilidad natural así como la posibilidad de garantizar la fidelidad de las vitroplantas generadas.

El análisis de isoenzimas (por ejemplo: fosfatasa ácida, esterasas y peroxidasas; García de los Ríos y cols. 1992) o de diferentes marcadores de ADN (por ejemplo: Sánchez y cols. 1998; Gómez y cols. 2003) deben mostrar los mismos patrones en los árboles de los que se obtuvo el explanto y en las vitroplantas generadas a partir del mismo. Se puede demostrar así la integridad genómica de las plantas micropropagadas respecto a la planta madre y por consiguiente que las características del genotipo seleccionado se mantienen con la propagación *in vitro*, permitiendo la identificación de los clones en todas las fases del proceso, desde el laboratorio hasta el monte (Fig. 9).



Figura 9. Ejemplares de *P. tremula* producidos mediante micropropagación trasplantados a parcela en campo dentro de su área natural de distribución.

BILIOGRAFÍA

- Boutherin, D. y Bron, G. 1994. *Multiplicación de plantas hortícolas*. Zaragoza, Acribia. 225 pp.
- Bueno, M. A., Grau, J. M. y García de los Ríos, M. D. 1993. *Micropropagación de árboles adultos de Populus tremula e identificación de clones en rodales mediante electroforesis*. Congreso Forestal Español. Lourizan. Pp 177-183.
- Bueno, M. A.; Manzanera, J. A., Grau, J. M., Sánchez, N. y Gómez, A. 2001. Propagación in vitro de *Populus tremula* L. y *Populus alba* L. Populicultura en Castilla y León. I Simposio del Chopo. Ed. Junta de Castilla y León. Pp 27-51.
- Castiglione, S., Wang, G., Damiani, G., Bandi, C., Bisoffi, S. y Sala, F. 1993. RAPD fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 54-59.
- Castillo, T. y Prado, A. 1987. Electrophoretic characterization of the Euroamerican poplar clones "I-214" and "Campeador". *Silva Genetica*, 36: 5-6.
- Cheliak, W. M. y Pitel, J. A. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Can. J. For. Res.*, 14: 740-743.
- Farmer, R. E. Jr., Cheliak, W. M., Perry, D. J., Knowles, P., Barrett, J. y Pitel, J. A. 1988. Isozyme variation in balsam poplar along a latitudinal transect in northwestern Ontario. *Can. J. For. Res.*, 18:1078-1081.

- Gómez, A.; Manzanera, J. A.; Aguiriano, E.; Grau, J. M. y Bueno, M. A. 2003. SSR Markers for Monitoring an *in vitro* Core Collection of *Populus tremula*. *Silvae Genetica*, 52 (5-6): 224-229.
- González-Antoñanzas F. y Grau J. M. 1999. *Cultivo de chopos en vivero*. Ed. INIA. 39 pp.
- Grau, J. M. 1991. *El cultivo del chopo*. Monografías universitarias. Universidad Internacional Alfonso VIII. Soria. 135 pp.
- Pierik, R. L. M. 1990. Rejuvenation and micropropagation. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Proc. VIIth Int. Congress on Plant Tissue and Organ Culture. Eds. H.J.J. Nijkamp, L.H.W. Van Der Plas and J. Van Aartrijk. Kluwer Academic Publisher, Amsterdam, pp 91–101.
- Sánchez, N.; Grau J. M.; Manzanera, J. A. y Bueno, M. A. 1998. RAPD markers for the identification of *Populus* species. *Silvae Genetica*, 47 (2-3): 67-71.
- Sánchez, N.; Grau, J. M. M; Alba, N.; Manzanera, J. A. y Bueno, M. A. 2000. Genetic characterisation of *Populus tremula* regions of origin in Spain using RAPD fingerprints. *Silvae Genetica*, 49(2): 66-71.
- von Wühlisch, G. 2009. *EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of Eurasian aspen (Populus tremula)* Bioversity International, Rome, Italy. 6 pp.
[http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/1371_Eurasian%20aspen%20\(Populus%20tremula\).pdf](http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/1371_Eurasian%20aspen%20(Populus%20tremula).pdf)

BILIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Sierra de Grado, R. (Coordinadora). 2002. *El álamo temblón, Populus tremula L. Bases para su cultivo, gestión y conservación*. Mundi-Prensa. ISBN 9788484760962. Ediciones Paraninfo S.A., Madrid, España. 218 pp.
- Pierik, R. L. M. 1997. *In vitro* culture of higher plants. ISBN 0-7923-4527-4. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, The Netherlands. 348 pp.

Recibido: 26 de octubre 2012.

Aceptado: 18 de febrero 2014.