

Nota Técnica

Recuperación in vitro de clones envejecidos y amenazados de ciruelo

A. Arbeloa *, P. Andreu, P. Lorente, E. García y J.A. Marín

Estación Experimental de Aula Dei-CSIC

Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza, España

*arbeloa@eead.csic.es

Resumen

El cultivo in vitro se ha confirmado hoy en día como una herramienta que permite la multiplicación, la conservación y el almacenamiento de germoplasma para las especies de propagación vegetativa o especies con semillas recalcitrantes. En este trabajo se ha puesto a punto una técnica de establecimiento de cultivos in vitro para ciruelos antiguos amenazados. Los árboles mostraban un notable envejecimiento y se encontraban en áreas marginales, careciendo de crecimiento vegetativo anual. Se forzaron en invernadero estacas de ramas para inducir la brotación de yemas epicórmicas que se utilizaron para el inicio de los cultivos. Se recolectaron 14 clones de ciruelo obteniéndose brotes epicórmicos en 11 de ellos que se instalaron con éxito in vitro. Los explantos desarrollaron nuevos brotes in vitro y una vez multiplicados se enraizaron in vitro y se aclimataron en invernadero. La utilización de las técnicas de cultivo in vitro ha permitido recuperar 11 clones amenazados de ciruelo que se han multiplicado con éxito y se conservan in vitro en condiciones asépticas para su multiplicación o intercambio

Palabras clave: cultivo in vitro, *Prunus domestica*, brotes epicórmicos

Abstract

In vitro recovery of endangered and aged plum clones

Recently, in vitro culture has been found to be a useful tool for the multiplication, conservation and storage of endangered plants when seed based methods do not apply. In this work, a method for the in vitro culture initiation of endangered and aged plum clones has been developed. Plum trees growing in marginal areas did not show vegetative annual growths, though woody segments of branches were forced in the greenhouse under high relative humidity. Emerged epicormic sprouts were used as explants to initiate in vitro cultures. Eleven out of 14 collected clones were successfully established in vitro. Explants developed new shoots that multiplied, rooted and acclimatized readily. In vitro culture techniques have allowed the recovery of 11 endangered plum clones that have been successfully propagated for its use and conservation under aseptic conditions to facilitate exchange

Key words: in vitro culture, *Prunus domestica*, epicormic shoots

Gran parte de las variedades autóctonas de frutales se encuentran en peligro de desaparición no sólo debido a la rápida renovación de la estructura varietal de muchos frutales, basada en la implantación de variedades extranjeras mejoradas, sino por el abandono de huertos tradicionales de cultivo o por cambios de uso de la tierra, como ocurre en la zona del Pirineo Central (España). Se trata en general de variedades muy antiguas, bien adaptadas al medio y con un claro valor potencial en la actualidad, donde la utilización de variedades y patrones

adaptados y resistentes a enfermedades o tolerantes a diferentes estreses es un objetivo prioritario. El ciruelo, entre estas especies, presenta actualmente un gran interés por sus características agronómicas, entre otras la rusticidad y la compatibilidad como patrón con otras especies y forma parte de programas de mejora de patrones adaptados y compatibles mediante su cruzamiento con otras especies (Felipe, 1989; Arbeloa et al., 2006). Las especies del género *Prunus* que engloban a los ciruelos, están ampliamente representadas en Europa y España tanto como especies silvestres o asilvestradas, como cultivadas, y sufren una continua desaparición, por lo que es necesaria la conservación de sus recursos genéticos (Dosba et al., 1994).

La conservación de frutales con interés genético, donde los métodos de conservación de semillas no son aplicables, se realiza mediante su conservación *ex situ* en colecciones en campo que requieren grandes espacios y mano de obra. El cultivo *in vitro* se ha confirmado hoy en día como una herramienta que permite la multiplicación, la conservación y el almacenamiento de especies de propagación vegetativa o con semillas recalcitrantes (Ashmore, 1997; Engelmann, 2011). A pesar de sus mayores costes (Pence, 2011) el cultivo *in vitro* permite, bien reducir las necesidades de espacio, bien el intercambio de material en adecuadas condiciones sanitarias (Engelmann, 2011). Los métodos de cultivo *in vitro* proporcionan herramientas muy útiles para la conservación de la biodiversidad en numerosas partes del mundo (Reed et al., 2011) y han sido asimismo utilizados en España para la conservación de especies amenazadas (Iriondo y Perez, 1996; González-Benito y Martín, 2011).

La iniciación del cultivo *in vitro* de una especie amenazada es una fase crítica en el proceso de conservación *in vitro*. El proceso implica la elección de los explantos, la recogida y su traslado, la desinfección y la introducción *in vitro* de los mismos, lo que en ocasiones puede ser un proceso muy complicado (Sarasan et al., 2006) o, incluso, puede llegar a ser una oportunidad única, según el estado de amenaza de la planta (Whithers, 2002). En el caso de árboles frutales abandonados la ausencia de un crecimiento activo anual impide tanto su multiplicación vegetativa como su multiplicación *in vitro*. La búsqueda de un explanto adecuado para el cultivo *in vitro* implica bien la búsqueda de material más juvenil dentro del árbol, como son los brotes epicórmicos basales, bien su rejuvenecimiento, sin poner en peligro la supervivencia del árbol (Vieitez et al., 1994; Sánchez et al., 1997), ya que la falta de cuidados y sus condiciones de cultivo impiden el crecimiento de brotes vigorosos. Este material más juvenil, que reacciona mejor al cultivo *in vitro*, se puede obtener directamente de los brotes epicórmicos presentes en el árbol o bien mediante la brotación de yemas epicórmicas, ya sea como consecuencia de la poda o del forzado de estacas de madera (Vieitez et al., 1994).

En este trabajo, estacas de ramas de ciruelo se obtuvieron de árboles envejecidos creciendo en ribazos o campos abandonados, sin crecimiento activo anual y se forzaron para inducir la brotación de yemas epicórmicas. El material consistió en clones de ciruelo (*Prunus domestica* L.) que se recogieron durante el mes de Febrero en tres localidades del Pirineo Central (España) en las que se había recogido información de la existencia de material de interés, su uso tradicional y su ubicación: 1) Sarvisé (Huesca), 2) Salvatierra de Esca (Zaragoza) y 3) Santa Cruz de la Serós (Huesca). En total se recogieron 14 clones diferentes: 7 clones de ciruelo en la localidad 1, 5 clones en la localidad 2, y 2 clones en la localidad 3. Se obtuvieron estacas de

madera de unos 5 cm de diámetro y unos 40cm de longitud. La madera se transportó envuelta en plástico tras ser tratada con Beltanol (Quinosol 50%) al 0.1% y a baja temperatura para evitar su desecación. Una vez en el invernadero, se pusieron las ramas horizontalmente en bandejas sobre un lecho de perlita dentro de un túnel de plástico, y se mojaron con una solución de Captan (3 g l^{-1}), manteniendo una alta humedad relativa. Se humedecieron diariamente rociando con agua Captan (3 g l^{-1}). El invernadero se mantuvo a una temperatura mínima no inferior a 15°C y se completó un fotoperiodo de día largo con lámparas de vapor de mercurio.

Durante el forzado se desarrollaron brotes a partir de las yemas y se comenzó el establecimiento in vitro de los cultivos con los nuevos brotes desarrollados a partir de 4 semanas después de su introducción en invernadero. Después de lavar los brotes en agua corriente, secciones con una yema se desinfectaron con una solución de lejía (10 %) durante 20 min y posteriormente se aclararon tres veces con agua destilada estéril. El medio de cultivo empleado para el inicio de los cultivos fue Woody Plant Medium (Lloyd y McCown, 1980) suplementado con $0.5 \mu\text{M}$ IBA, $5 \mu\text{M}$ BA, 30 g l^{-1} sacarosa, y 7 g l^{-1} agar (Andreu y Marín, 2005). El pH se ajustó a 5.6 antes de la esterilización en autoclave. Los explantos se cultivaron a 22°C con un fotoperiodo de 16 h con luz fluorescente ("cool-white") a $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los explantos se examinaron semanalmente y se calculó el porcentaje de establecimiento de cultivos a partir de los que exhibían hojas expandidas y un crecimiento apical. Los brotes desarrollados a partir de los explantos iniciales fueron posteriormente transferidos a frascos de cultivo de 100ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) con 30 ml de medio de multiplicación MS (Murashige y Skoog, 1962). Los brotes se identificaron y fueron subcultivados en medio nuevo cada 4 semanas. Tras 4 meses de cultivo se seleccionó una única línea de cultivo por clon, que una vez multiplicada se enraizó en medio de enraizamiento MS modificado reduciendo las sales minerales a la mitad, sin BAP y suplementado con $5 \mu\text{M}$ de IBA. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo en las mismas condiciones descritas anteriormente y las plantas enraizadas se aclimataron en invernadero en maceta para su trasplante final a campo (Marín, 2003).

De los 14 clones prospectados y recolectados que se sometieron a forzado en invernadero (Figura 1A) se obtuvieron brotes epicórmicos en 11 de ellos (78.6 %). Tres clones no brotaron después del tratamiento de forzado o no dieron brotes suficientemente desarrollados como para ser introducidos in vitro (AS6, LS5 y CS1), sin embargo, todos los clones que brotaron se instalaron in vitro satisfactoriamente (Tabla 1).

Además de las yemas epicórmicas se desarrollaron algunas yemas laterales dando lugar a dos tipos de brotes según su origen (Figura 1B y 1C). Las yemas laterales brotaron en la mitad de tiempo que las yemas epicórmicas (a las 2 semanas en lugar de las 4 semanas). Los dos orígenes de brotes han sido observados igualmente en la introducción in vitro de *Quercus robur* L. (Vieitez et al., 1994; Toribio et al., 2004) constatándose que ambos tipos son susceptibles de crecer in vitro. Sin embargo, no siempre se ha obtenido éxito en el forzado de yemas epicórmicas ya que para su brotación influyen diversos factores como la época, la intensidad de luz, el tratamiento previo con reguladores de crecimiento o el genotipo (Gordon et al., 2006; Mansouri y Preece, 2009). En nuestro caso los tres clones que no produjeron brotes epicórmicos estaban muy envejecidos y proporcionaron estacas de peor calidad, como

el clon AS6 que era el árbol más grande y envejecido. La falta de respuesta de las yemas epicórmicas podía asociarse al estado vegetativo del árbol y no a las condiciones ambientales de la zona donde estaban ubicados, ya que en todas las zonas se encontró un clon que no respondió. La posibilidad de recolectar y forzar secciones de rama en diferentes épocas del año podría también facilitar el éxito en la brotación epicórmica de las mismas (Gordon et al., 2006) por lo que se debería repetir el proceso con los tres clones, recogiendo material en otras épocas de forzado distintas a la efectuada aquí.

Una vez que los brotes alcanzaron en el invernadero una longitud de unos 2-3 cm, lo que tuvo lugar un mes después del inicio del forzado (Figura 1D), se cortaron para iniciar los cultivos in vitro. El inicio se realizó progresivamente, según la disponibilidad de nuevos brotes, durante cuarenta días. Tras 2 meses de cultivo in vitro, los explantos desarrollaron nuevos brotes (Figura 1E), no observándose oscurecimiento del medio de cultivo por liberación y oxidación de fenoles que pueden disminuir el porcentaje de establecimiento (García et al., 2010). Los brotes desarrollados in vitro se subcultivaron en nuevo medio de multiplicación MS. El porcentaje de explantos que mostraron nuevos brotes (% de supervivencia in vitro) fue muy variable (Tabla 1), con valores que oscilaron entre el 7 y 73% de unos clones a otros y dependió tanto de la competencia de las yemas para desarrollar un nuevo brote, como a la menor o mayor presencia de contaminantes en el explanto inicial. A pesar de que algunos clones presentaron bajos porcentajes de supervivencia in vitro, en todos los casos se consiguieron brotes que se desarrollaron in vitro, lo que ha permitido conservar y multiplicar el material.

Una vez iniciados y establecidos in vitro los cultivos, los brotes se multiplicaron con normalidad en el medio MS (Figura 1F) en todos los casos y se enraizaron in vitro y se aclimataron posteriormente en invernadero con los protocolos desarrollados para otros frutales (Marín, 2003; Arbeloa et al., 2009; García et al., 2010, 2011). De esta manera, todos los clones introducidos in vitro han podido ser cultivados en maceta para su posterior trasplante a campo, lo que permitirá su posterior estudio morfológico, fenotípico y su caracterización molecular. Además, cada clon se conserva in vitro de manera que este germoplasma se puede considerar recuperado y puede ser conservado a largo plazo mediante técnicas de cultivo in vitro de crecimiento ralentizado o incluso mediante crioconservación (Engelmann, 2011)

La utilización de herramientas de cultivo in vitro ha permitido recuperar 11 clones amenazados de ciruelo que se han multiplicado con éxito para su posterior uso y que se conservan in vitro en condiciones asépticas para su conservación o intercambio.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos RF2008-00029-C02-01, RTA2010-00053-C03-03 y por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43.

Referencias bibliográficas

Andreu P, Marín JA. 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the *Prunus* rootstock 'Adesoto 101' (*P. insititia* L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Sci Hort* 106: 258-267.

- Arbeloa A, Daorden ME, Garcia E, Wunsch A, Hormaza JI, Marin JA. 2006. Significant effect of accidental pollinations on the progeny of low setting *Prunus* interspecific crosses. *Euphytica* 147: 389-394
- Arbeloa A, Daorden ME, García E, Andreu P, Marín JA. 2009. In Vitro Culture of Myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh.) Embryos. *HortScience* 44: 1672-1674
- Ashmore SE. 1997. Status report on the development and application of in vitro techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 67 pp.
- Dosba F, Bernhard R, Zanetto A. 1994. Importance des ressources génétiques des *Prunus*. *C. R. Acad. Agric. Fr.* 80: 45-57
- Engelmann F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 47: 5–16
- Felipe AJ. 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Técnicas Europeas, Barcelona: 83-107.
- García E, Lorente P, Marín JA, Arbeloa A, Andreu P. 2010. Micropropagación e injerto in vitro de pistacho. *ITEA* 106: 294-302
- García E, Lorente P, Marín JA, Andreu P, Arbeloa A. 2011. Factores que afectan a la necrosis apical de brotes de *Pistacia vera* L. cultivados in vitro. *ITEA* 107: 315-323
- González-Benito ME, Martín C. 2011. In Vitro Preservation of Spanish Biodiversity. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 47:46–54
- Gordon D, Rosati A, Damiano C, Dejong TM. 2006. Seasonal effects of light exposure, temperature, trunk growth and plant carbohydrate status on the initiation and growth of epicormic shoots in *Prunus persica*. *J Hortic Sci & Biotech* 81: 421-428
- Iriondo JM, Perez C. 1996. Micropropagation and in vitro storage of *Centaurium rigualii* Esteve (Gentianaceae) *Isr J Plant Sci* 44: 115-123
- Lloyd G, McCown B. 1980. Use of microculture for production and improvement of *Rhododendron* spp. *HortScience* 15: 416.
- Marín JA. 2003. High survival rates during acclimatization of micropropagated fruit tree rootstocks by increasing exposures to low relative humidity. *Acta Hort* 616: 13-142.
- Mansouri K, Preece JE. 2009. The influence of plant growth regulators on explant performance, bud break, and shoot growth from large stem segments of *Acer saccharinum* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99: 313-318
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.

- Pence VC. 2011. Evaluating costs for the in vitro propagation and preservation of endangered plants. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 47: 176–187
- Reed BM, Sarasan V, Kane M, Bunn E, Pence VC. 2011. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 47: 1–4
- Sánchez C, San-José MC, Ferro E, Ballester A, Vieitez AM. 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *J Hortic Sci* 72: 433-443
- Sarasan V, Cripps R, Ramsay MM, Atherton C, McMichen M, Prendergast G, Rowntree JK. 2006 Conservation In Vitro Of Threatened Plants – Progress In The Past Decade. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 42: 206–214
- Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM. 2004. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 76: 283-287
- Vieitez AM, Sánchez C, Amo-Marco JB, Ballester A. 1994. Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 37: 287-295
- Whithers LA. 2002. *In vitro* collecting—concept and background. In : *In vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Valerie C, Pence JA, Sandoval VM, Villalobos A, and F Engelmann, editors. IPGRI Technical Bulletin N° 7: 16-25

Tabla 1. Establecimiento in vitro de los clones de ciruelo, indicando el número de explantos que fueron sembrados in vitro para cada clon, así como el porcentaje de estos explantos que desarrollaron brotes y sobrevivieron in vitro.

Table 1. In vitro establishment of plum clones showing the number of explants per clone and the percentage of explants that survive

Clon	Nº de explantos sembrados in vitro	% supervivencia
AS1	92	26.1
AS2	40	40.0
AS3	14	14.3
AS5	36	33.3
AS6	0	-
AS7	81	54.3
AS8	73	34.2
LS1	32	9.4
LS2	57	7.0
LS3	0	-
LS4	15	73.3
LS5	10	70.0
CS1	0	-
CS2	47	12.8



Figura 1 Establecimiento in vitro de ciruelo tras el forzado de estacas de ramas. A. Forzado de estacas en invernadero en lecho de perlita y túnel de plástico. B. Brotación de yemas laterales 2 semanas después del forzado. C. Brotación de yemas epicórmicas 4 semanas después del forzado. D. Crecimiento de brotes en las estacas de rama en invernadero. E. Inicio del cultivo in vitro en tubo en medio WP. F. Multiplicación in vitro en medio MS

Figure 1. In vitro establishment of plum sprouts after forcing branch segments.

A. Forced branches in the greenhouse on perlite bed covered by plastic tunnel. B. Lateral buds sprouting 2 weeks after forcing. C. Epicormic buds sprouting 4 weeks after forcing. D. Shoots growing in the greenhouse on branch segments. E. In vitro culture initiation in WP medium. F. In vitro multiplication in MS medium.