

RESISTENCIA DE YEMAS DE ÁLAMO BLANCO A ANTIBIÓTICOS.

N. Sánchez⁽¹⁾, J.A. Manzanera⁽²⁾, M^a A. Bueno⁽¹⁾.

⁽¹⁾ CIFOR-INIA Ctra. de la Coruña km.7.8, 28040 Madrid. España.

⁽²⁾ IMIA Finca "El Encin". Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid). España.

RESUMEN

Se han realizado los experimentos previos necesarios para la transformación genética de *P. alba*. Se ha logrado unos medios con concentraciones de reguladores del crecimiento específicas para una buena propagación y elongación "in vitro". Se obtuvieron medios de inducción de callo y yemas a partir explantos tanto de hoja como de segmentos internodales. El medio óptimo para la inducción de callo a partir de los explantos es el de Murashige-Skoog (MS) con 0.1mg/l de Tidiazuron (TDZ) y 0.02 mg/l de ácido α -naftalénacético (ANA). Y el medio de inducción de yemas a partir de callo es el MS con 0.1 mg/l de 6-bencil aminopurina (BAP) y 0.002mg/l de ANA.

Se ha observado la resistencia a distintas concentraciones de los antibióticos kanamicina e higromocina, frecuentemente utilizados como marcadores de selección de plantas.

PALABRAS CLAVE: Inducción de callos y yemas, *P. alba*, propagación in vitro.

SUMMARY

Preliminary experiments for the genetic transformation of *Populus alba* have been conducted. Culture media with specific concentrations of plant growth regulators for a good proliferation and "in vitro" elongation have been achieved. Induction of both callus and buds from leaf and internodal segments were obtained. The best medium for callus induction was that of Murashige-Skoog (MS) with 0.1 mg/l Thidiazuron (TDZ) and 0.02 mg/l naphthaleneacetic acid (NAA). The medium for bud induction on callus was MS with 0.1 mg/l 6-benzyladenine (BAP) and 0.002 mg/l NAA.

The resistance to different concentrations of frequently used antibiotics as plant selection markers, e.g. kanamycin and hygromycin, was studied.

KEY WORDS: callus, bud induction, *Populus alba*, in vitro propagation

INTRODUCCION

Populus alba es una especie autóctona con amplia representación en nuestro país. Es una especie de interés para la restauración de riberas. Sería productivo el obtener nuevas variedades adaptadas a condiciones edáficas extremas de salinidad.

La aptitud de esta especie para el enraizamiento tiene diversos grados de dificultad dependiendo del genotipo elegido (Bueno et al. 1992). El poner a punto un sistema eficaz de regeneración in vitro amplía las posibilidades de propagación clonal a esta especie.

Aunque se han realizado estudios para la regeneración a partir de explantos de híbridos de *P. alba* (Kim et al. 1981, Park et al. 1988, Sung et al. 1990), existe poca información en esta especie concreta (Kapusta et al. 1985, Park et al. 1989).

En este trabajo se han realizado una serie de experimentos necesarios para la regeneración: Propagación, elongación y enraizamiento (Bueno et al. 1992) *in vitro*, inducción a partir de explantos de hojas y entrenudos de callos y yemas adventicias (brotes); así como otros experimentos: determinación de las concentraciones de kanamicina e higromicina a las que son resistentes estos explantos.

MATERIAL Y METODOS

Material vegetal

Se colectaron de los meses de abril, mayo y junio brotes de raíz de los clones TO de Torremocha; del clon M16 (sólo de estaquilla); de los clones AL-30 (sólo de estaquilla) y MÑ15 de cepas procedentes del río Gallego (colección INIA) en parcelas del Serranillo.

Dicho material fue previamente puesto al vacío durante 10', tratado con parafina en los extremos de la estaquilla, sumergido en alcohol etílico del 70% durante 30" y esterilizado en ClONa al 1.2% con unas gotas de tween 20 durante 15'. Las hojas fueron cortadas de las estaquillas y desechadas, las estaquillas troceadas transversalmente fueron introducidas en el medio de cultivo, en este medio generarán nuevos segmentos internodales y hojas que serán utilizadas para la inducción de callos y yemas y resistencia a antibióticos.

Medio de Crecimiento

El medio de propagación basal fue el de Murashige y Skoog (1962) (MS) ó Woody Plant Medium (WPM; Lloyd, McCown, 1980). Como reguladores del crecimiento se emplearon 6-bencil aminopurina (BAP) y ácido α -naftalenacético (ANA). Se añadió sacarosa (30 g/l) como fuente de carbono y como agente gelificante agar (8 g/l). El medio fue ajustado a pH 5,6 y esterilizado en autoclave a 1 atmósfera (115°C) 20'. A continuación se dispensó en tubos estériles. Al cabo de un mes, crecidas las plántulas se repicaron a medio nuevo.

Medio de inducción de callo y yemas

Para inducir callo de hojas y segmentos internodales de los brotes de raíz de TO, M16 y MÑ15, a ambos se les producía cortes y posteriormente se pusieron en medio MS y WPM con reguladores del crecimiento, tiazuron (TDZ) a distintas concentraciones: 0, 0.1, 0.5, 1 mg/l y ANA 0.02 mg/l. Se pusieron 4 explantos por placa y 4 placas por tratamiento. Posteriormente se repicaron al mes cambiando el TDZ por 0.1mg/l de BAP para la inducción de yemas.

Resistencia a las distintas concentraciones de higromicina y kanamicina

Los experimentos se realizaron con explantos de hojas de los clones TO y MÑ15, haciendo heridas como se ha indicado anteriormente. El medio utilizado es el MS con 0.1 mg/l de TDZ y 0.02 mg/l de ANA, añadiendo las distintas concentraciones de kanamicina (km): 0, 25, 50, 100, 200 y 500 mg/l. Se pusieron 4 explantos por placa y 4 placas por tratamiento. Lo mismo se realizó para la higromicina (hig) pero con otras concentraciones: 0, 2, 5, 7, 10, 15, 25, 50, 75 y 100 mg/l.

RESULTADOS

Propagación *in vitro*

Se realizó una valoración visual del vigor de las plántulas *in vitro* en medio MS y WPM, el resultado se muestra en la tabla 1. Varias generaciones después los clones M16 y AL-30 fueron perdiendo vigor y fueron descartados para posteriores experimentos. Los clones restantes se propagan en MS y se han producido modificaciones optimizadas del medio de propagación según la posterior utilización de las plántulas y mantenimiento del vigor de las mismas:

MSP: MS 0.1BAP 0.002ANA: Para la inducción de yemas a partir de material de campo esterilizado .

MSPP: MS 0.1BAP 0.02ANA: Para propagación *in vitro*.

MSE: MS 0.02BAP 0.02ANA: Para elongación.

MSR WPM 0.2 AIB: Para enraizamiento (Bueno et al. 1992).

Inducción de callos y yemas

Los porcentajes de explantos que han inducido yemas al mes y medio se muestran en la figuras 1.

En cuanto al clón TO en las placas de WPM la producción de callo fue peor y no se observaron yemas. En las placas de MS se apreciaron las primeras yemas al mes y medio (figuras 5 y 6) desde el inicio y fueron mayoritarios cuando provenían de la concentración de TDZ de 0.1mg/l. La concentración de TDZ de 0.1 elegida también fue aplicada a explantos de segmentos internodales (figuras 7 y 8).

En el clon MÑ15 se realizaron los mismos pasos que en el clon TO, pero sólo en el medio WPM, el resultado se muestra en la figura 2. Lo mismo se realizó con el clon M16 y no se obtuvieron yemas. En experimentos posteriores se unificó para los clones TO y MÑ15 la utilización de los medios de inducción de callos y yemas en MS con 0.1mg/l TDZ y 0.02mg/l ANA; y MS con 0.1mg/l BAP y 0.002mg/l ANA respectivamente.

Resistencia a los antibióticos Kanamicina e Higromicina

Se pusieron hojas con herida de TO y MÑ15 en el medio de inducción de callo (MS con 0.1 TDZ y 0.02 ANA), con la adición de distintas concentraciones de antibióticos como se muestra en las figuras 3 y 4. En estas mismas figuras se observan las

concentraciones óptimas de antibióticos que fueron seleccionadas, de 50 mg/l para la kanamicina y de 10 mg/l para la higromicina.

CONCLUSIONES

Se han determinado:

- Medios específicos de propagación; de elongación para la obtención de segmentos internodales y para la elongación de futuros brotes.
- Medios con concentraciones de reguladores del crecimiento específicas para la inducción de callos y yemas-brotes.
- Las concentraciones de antibióticos, umbral de resistencia en *P. alba*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA SC 98-081. Durante el proceso de este estudio, Nieves Sánchez Quintana disfrutó de una becapostdoctoral del INIA. Agradecemos a M^o Dolores Salvador la ayuda técnica prestada en la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

BUENO, M.A., ASTORGA, R. Y MANZANERA, J.A. 1992. Micropropagación de *Populus alba* "Siberiana extremeña" a partir de amentos. Sist. recur. for. **1**(2): 163-171.

KAPUSTA, J AND SKIBINSKA, A. 1985. Induction of morphogenesis and regeneration in the callus of *Populus alba* L. and *Populus nigra* L. Journal of Trees Sciences **4** (2): 34-38.

KIM, J.H., LEE AND S.K., CHUN, Y.W. 1981. Mass propagation of tree species through *in vitro* culture: bud culture of *P. alba* x *P. glandulosa*. Res Rep. Inst. for Genet (Immok Yukchong Yongu Pogo) **17**:57-64.

LLOYD AND MCCOWN. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *kalmia latifolia*, by shoot-tip culture. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. **30**:421-427.

MURASHIGE, T AND SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. **15**: 473-497.

PARK, Y.G. AND SONS, S.H. 1988. Culture and regeneration of *P. alba* x *P. glandulosa* leaf protoplasts isolated from *in vitro* cultured explants J. Korean For. Soc. **77**: 208-215.

PARK, Y.G. AND SONS, S.H. 1989. Regeneration of plantlets from cell suspension derived callus of *P. alba*. *Plant Cel. Rep.* **7**: 567-570.

SUNG, H.S. AND HALL, R.B. 1990. Multiple shoot regeneration from root organ cultures of *Populus alba* x *Populus grandidentata*. *Plant Cell, Tissu and Organ Culture* **20**: 53-57.

	MS	WPM
TO	+	-
MÑ15	+	+
AL-30	+-	-
M16	-	-

Tabla 1: Valoración a los dos meses del vigor de los clones en MS + 0.1BAP + 0.002 ANA ó en WPM + 0.1BAP + 0.002 ANA.

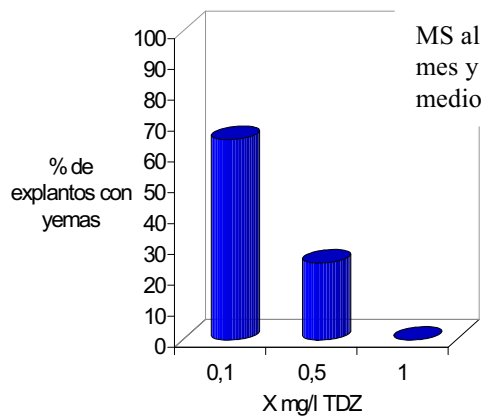


Figura 1: Porcentaje de explantos con yemas, resultantes de las distintas concentraciones de tiazuron introducidas para la inducción de callo en explantos de hojas del clon TO.

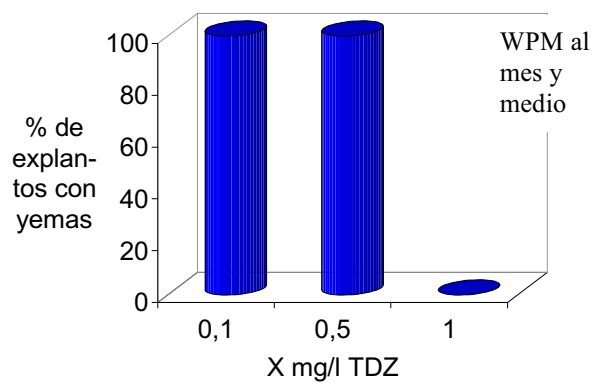


Figura 2: Porcentaje de explantos con yemas resultantes de las distintas concentraciones de tiazuron introducidas para la inducción de callo en explantos de hojas en el clon MÑ15

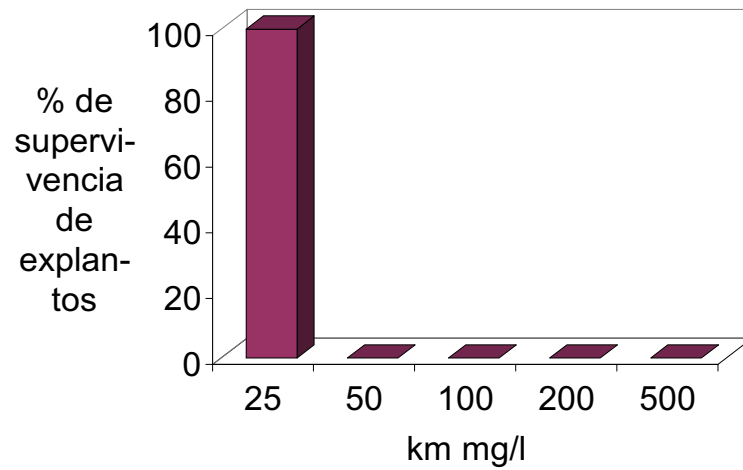


Figura 3: Resistencia de los explantos a las distintas concentraciones señaladas de kanamicina.

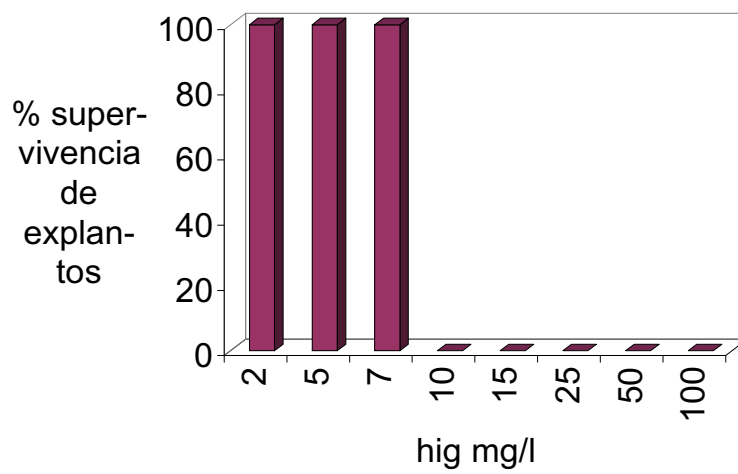


Figura 4: Resistencia de los explantos a las distintas concentraciones señaladas de higromicina



Figura 5: Inducción de callo a partir de explanto de hoja.

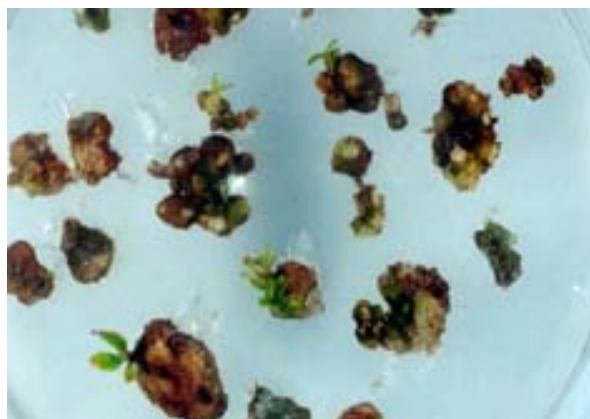


Figura 6 : Inducción a partir de explantos de hoja de yemas sobre callo al mes y medio.

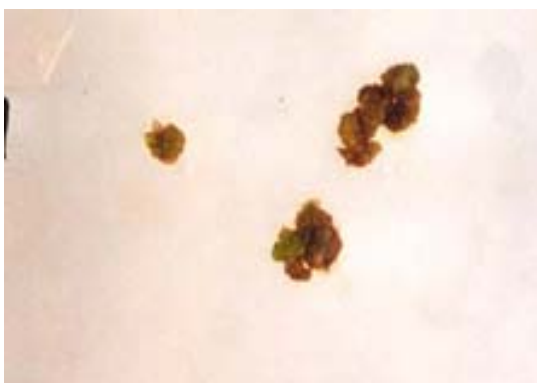


Figura 7: Inducción de callo a partir de segmentos internodales.



Figura 8: Inducción a partir de segmentos internodales de yemas sobre callo al mes y medio.