



**CONAMA10**  
CONGRESO NACIONAL  
DEL MEDIO AMBIENTE

COMUNICACIÓN TÉCNICA

# Clonación de los Tejos y Olmos singulares de la Comunidad de Madrid

Autor: David Medel Cuesta

Institución: IMIDRA

e-mail: [david.medel@madrid.org](mailto:david.medel@madrid.org)

Otros Autores: Mar Ruiz (IMIDRA); Alfredo Cuevas (IMIDRA); Celina Villareal (IMIDRA); Araceli Hernández (IMIDRA); Gabriel García (IMIDRA); Cristina Celestino (IMIDRA); Jesús Alegre (IMIDRA); Lucía Turnes (IMIDRA)

## RESUMEN

Las técnicas de propagación vegetativa se emplean con diversas finalidades, pudiendo ser una de ellas la conservación de la biodiversidad mediante la preservación de genotipos de interés. Dichas técnicas se basan en dos posibles vías de regeneración clonal de plantas: la vía organogénica y la vía embriogénica. En esta comunicación se describe la aplicación de dos protocolos basados en la organogénesis, uno de ellos con la técnica clásica del estaquillado o enraizamiento de esquejes, que se ha aplicado a los tejos incluidos en el catálogo de Árboles Singulares de la Comunidad de Madrid, y otro que usa técnicas de cultivo in vitro de tejidos y se ha aplicado a los olmos singulares. Se ha trabajado con los tejos denominados: Sestil del Maillo y de la Senda (Canencia); del Real Jardín Botánico y Campo del Moro I y II (Madrid); Arroyo del Chivato, Huevo de las Hoces y Arroyo de los Hoyos (Manzanares el Real); El Chaparral I y II (Montejo de la Sierra); Arroyo de Barondillo y de la Roca (Rascafría). Por el momento se han clonado todos ellos excepto el Chaparral II. Con respecto a los olmos, se ha introducido in vitro material de los siguientes árboles: Ayuntamiento (Guadarrama); San Martín de Valdeiglesias I y II (San Martín de Valdeiglesias); Nuevo Baztán (Nuevo Baztán); El Pantalones, Somontes I y II (Madrid); Los Llanillos (San Lorenzo del Escorial); Milagro (Cubas). Se está amplificando dicho material mediante la inducción de brotes adventicios y axilares. Se ha enraizado microtallos y obtenido ya plantas clónicas de los seis primeros árboles enunciados anteriormente.

**Palabras Clave:** Árboles singulares; clonación; propagación vegetativa; cultivo in vitro; organogénesis; tejo; olmo

## Introducción

### Aspectos generales

Los árboles son los seres más evolucionados del reino vegetal. Para la Naturaleza son cúmulo genético de sabiduría e importantes porque evitan la erosión del suelo, aportan materia orgánica o sombra para que otras especies puedan desarrollarse; cobijan a muchos animales y nutren a otros tantos, retienen grandes cantidades de CO<sub>2</sub> y oxigenan el aire. Para el ser humano han sido desde antaño fuente de recursos naturales utilizados como alimento, combustible, en industrias papeleras, químicas, farmacéuticas, madereras y en un sin fin de otras aplicaciones.

En la Comunidad de Madrid se consideran árboles singulares los más longevos, los que son representantes escasos de una especie, los que han adquirido alguna característica especial como un gran tamaño, supervivencia a enfermedades, o también los árboles que por su localización, tradición, e historia constituyen una parte importante del patrimonio arbóreo madrileño. La Comunidad de Madrid aprobó mediante el Decreto 18/1992, de 26 de marzo, el Catálogo Regional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres, creando la categoría de *Árboles Singulares*. Con el fin de divulgar el conocimiento de los árboles singulares se publicó el libro *Árboles Singulares de Madrid* (Cantero Desmartines y López Lillo, 1995) que quiere servir para que el ciudadano adquiera sensibilidad, respeto y amor hacia los árboles, para que estos valores puedan ser extrapolados a la naturaleza en general.

En ausencia de protección los árboles singulares, al igual que los bosques y parajes naturales, tienen un futuro poco halagüeño. Desde el IMIDRA se lleva a cabo un proyecto de clonación de árboles singulares de Madrid (FP09-IA05-CLON) que de momento se centra en los tejos, los olmos y los alcornoques. El proyecto se apoya en nuestro conocimiento de la biotecnología forestal que ofrece herramientas específicas para la conservación de la biodiversidad *ex situ* (Toribio y Celestino, 2000), entre ellas las técnicas avanzadas de clonación que se vienen aplicando para la conservación del germoplasma de árboles especialmente valiosos como el alcornoque de Alfavaret (Hernández et al., 2008) o el olmo del Central Park (Thakur y Karnosky, 2007). La clonación de individuos es una herramienta de conservación de especial utilidad para especies muy amenazadas con escasez de representantes, porque asegura la conservación de los ejemplares existentes y el mantenimiento de la biodiversidad mediante el establecimiento de colecciones. Las acciones encaminadas a la conservación de especies vegetales, persiguen como mínimo el mantenimiento de los recursos existentes, es decir la conservación de las poblaciones naturales que aún perduran. Esta es la finalidad con la que se dictan las normas de protección que suelen ir acompañadas con el inventario y catalogación de las poblaciones, con limitaciones en la explotación forestal y con la ejecución de repoblaciones. Esto es lo que se denomina conservación *in situ*. Por otra parte se contempla también la creación y el mantenimiento, de colecciones de material vegetal que permiten preservar genotipos y complejos genéticos fuera de su lugar de origen. Esto se realiza mediante la creación de reservas de semillas (bancos de germoplasma) o mediante el establecimiento de plantaciones de individuos idénticos a los de las poblaciones de origen, obtenidos mediante técnicas de clonación (colecciones clonales). Los bancos de germoplasma y las colecciones clonales son los instrumentos básicos de la que se denomina conservación *ex situ*.

En esta comunicación se describe la aplicación de dos protocolos de clonación basados en la organogénesis: uno se aplica al tejo y utiliza la técnica clásica del estaquillado o enraizamiento de esquejes, el otro protocolo se aplica al olmo y usa técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos. El fin último es el establecimiento en el IMIDRA de parcelas de conservación de árboles singulares de la Comunidad de Madrid en un Centro de Conservación de Recursos Genéticos Forestales que ya dispone de otras colecciones de material de material clonal valioso de tejo, alcornoque y pino piñonero.

### Tejos (*Taxus baccata* L.)

El tejo es una gimnosperma, taxácea no resinera con sexos en pies separados. Las hembras producen frutos con semillas individuales que están envueltas por un tejido carnoso de color rojo muy llamativo. El aspecto externo de los tejos es muy variable. En muchas ocasiones sólo adquieren porte arbustivo, pero pueden alcanzar entre 15 y 20 metros de altura convirtiéndose en árboles majestuosos. Son muy longevos, crecen lentamente, se mantienen siempre verdes y en el imaginario colectivo se han asociado a la eternidad. Son temibles por la composición altamente venenosa de algunas de sus partes y apreciados por su madera noble. El tejo es una especie vegetal sometida a un proceso de regresión natural que ha sido intensamente acelerado por acción del hombre. La corta y la explotación de su madera ha relegado la especie a pequeños enclaves prácticamente inaccesibles, hasta el punto de que ha sido necesario establecer normas de protección de ámbito europeo, nacional y autonómico. Se trata de una especie vegetal amenazada. En la Comunidad de Madrid, el tejo está protegido por el Decreto 1/3/85, la Ley 14/2/91 y el Decreto 26/3/92. Está prohibido su arranque, corta, recogida o desenraizamiento, así como el corte de sus ramas o cualquier otra actuación que pueda contribuir al deterioro de la especie. La conservación del tejo es importante desde el punto de vista ecológico y de conservación del patrimonio vegetal, pero también lo es desde un punto de vista económico y tecnológico. La desaparición de poblaciones de tejo supone la pérdida de recursos genéticos valiosos porque el tejo es el origen del taxol, un producto estratégico en la lucha contra el cáncer. En el catálogo de Árboles Singulares de la Comunidad de Madrid de 1995 se incluyen 12 tejos de características excepcionales (Tabla 1).

La mayor parte de la información publicada en relación con el estaquillado del tejo se refiere a variedades ornamentales, fundamentalmente de la especie *T. cuspidata* e híbridos de *Taxus x media*. En general se considera que las estaquillas de tejo enraízan con dificultad, y que su enraizamiento mejora mediante la aplicación de AIB en concentraciones elevadas (Lanphear, 1963; Chong et al. 1992). En trabajos realizados con poblaciones naturales de tejo se pone de manifiesto que son necesarios periodos de enraizamiento prolongados, de entre 5 y 11 meses (Schneck, 1996; Iglesias-Díaz et al., 1997) siendo el final del otoño y el comienzo del invierno la mejor época para el estaquillado (Lanphear, 1963; Scheer, 1976; Shugert, 1985, Fernández et al. 2004). Otros factores, que pueden tener una notable influencia sobre la capacidad de enraizamiento del tejo, y que no pueden soslayarse en un programa de conservación de individuos concretos, son la edad de la planta donante (Goo et al., 1990; Schneck, 1996), el genotipo (Schneck, 1996) y posiblemente el sexo (Iglesias Díaz et al., 1997). En trabajos previos, destinados a la conservación de las tejeras de la Comunidad de Madrid, hemos comprobado que la capacidad organogénica varía ampliamente entre los individuos de las poblaciones naturales, pero aun así el estaquillado permite obtener copias clonales prácticamente de todos los genotipos. En genotipos con poca capacidad de

enraizamiento las respuestas mejoran tomando estaquillas procedentes de brotes epicórmicos y durante la estación más favorable (Alegre et al., 2001; Fernández et al., 2004) lo que hace del estaquillado una técnica adecuada para la clonación de los tejos.

### Olmos (*Ulmus minor* y *Ulmus laevis*)

El olmo ha sido un árbol muy característico en la Península Ibérica especialmente en las zonas de ribera, haciéndose un elemento fundamental del paisaje español. Es un árbol frondoso, de hoja caduca, y porte majestuoso que sirvió para adornar plazas, parques y avenidas debido a su belleza y el imponente tamaño de su copa. En nuestro territorio son autóctonas dos especies de olmos: el común (*Ulmus minor* Miller *sensu latissimo*) y el de montaña (*Ulmus glabra* Huds.) y es posible además encontrar otras especies de olmo introducidas, entre ellas el olmo blanco europeo (*Ulmus laevis* Pall.). En dos momentos puntuales del siglo pasado entraron en España los hongos *Ophiostoma ulmi* y *Ophiostoma novo-ulmi*, causantes de una enfermedad muy agresiva, la grafiosis, que bloquea los vasos conductores del árbol impidiendo la circulación de savia y provocando que el árbol termine secándose. Los hongos causantes de la grafiosis son transportados por unos pequeños escarabajos voladores (escolítidos) que se alimentan de las ramas jóvenes de los olmos. Estos insectos transportan esporas en su cuerpo y acaban contagiando la enfermedad. Es un problema que afecta a gran parte de los olmos europeos y que ha ocasionado la desaparición de gran parte de los olmos adultos (Gil et al., 2001). Por ello son muy escasos los olmos adultos que aún permanecen vivos en la Comunidad de Madrid. En el catálogo de Árboles Singulares de 1995 se incluyeron 11 olmos de características excepcionales, de los cuales 10 permanecían vivos cuando se inició este proyecto de conservación (Tabla 2).

Los olmos pueden propagarse vegetativamente mediante estaquillado y suele recomendarse el uso de esquejes tomados de brotes jóvenes (Karnosky, 1988). La propagación vegetativa por medio del estaquillado presenta algunas limitaciones. Como sucede con todas las especies vegetales, el mayor o menor éxito del estaquillado depende entre otros factores de las características genéticas de cada individuo y de la época del año en que se realice la recogida del material. La propagación mediante estaquillado tradicional queda restringida a épocas muy concretas del año y es muy poco eficiente para individuos que tengan un genotipo poco favorable para la formación de raíces adventicias. Para la propagación de los olmos singulares se consideró que el cultivo *in vitro* es una alternativa más rápida y consistente, que facilita la multiplicación acelerada y el intercambio de un material vegetal que puede ser valioso con organismos nacionales e internacionales (International Board for Plant Genetic Resources, 1988; Kahn, 1986).

## **Material y métodos**

### Clonación de tejos singulares

Para el estaquillado de los tejos se siguió, básicamente, la metodología descrita por Alegre et al. (2001). Siempre que fue posible se tomó material de brotes epicórmicos y cuando esté tipo de brotes no estaba presente, o no lo estaba en suficiente cantidad, se

cortaron fragmentos de ramas. El material se recolectó en diferentes fechas entre febrero y junio de 2010 (Tabla 1). Desde el momento de su recogida en campo las ramas y brotes se conservaron refrigerados a temperatura inferior a 10°C, dentro de bolsas de plástico herméticas para evitar su deshidratación. Una parte del material recolectado se procesó inmediatamente después de la llegada al laboratorio, y otra se conservó en las bolsas herméticamente cerradas, en frigorífico a 4°C.

Se cortaron estaquillas de entre 5 y 20 cm de longitud. Cuando las estaquillas procedían de ramas se elaboraron mayoritariamente dejando un pequeño talón en su parte basal. Se eliminaron las hojas del tercio inferior de las estaquillas y se aplicó ácido indolbutírico (AIB) mediante inmersión rápida (5 s) de su parte basal en una disolución hidroalcohólica (50% etanol) de la sal potásica del AIB a concentración 5000 ppm. Por último las estaquillas se clavaron en bandejas con perlita A-13 que se mantuvo ligeramente húmeda durante todo el periodo de enraizamiento. Las bandejas se introdujeron en una cámara con ambiente controlado, con humedad relativa próxima al 90 %, una temperatura entre 20° y 25° C y un fotoperiodo de 16h de luz.

Tabla 1. Localización de los tejos singulares de la Comunidad de Madrid y fechas de recogida del material para el inicio de los estaquillados.

Tejo singular	Localidad	Fecha de recogida
del Chaparral I	Montejo de la Sierra	23/04/2010
del Chaparral II	Montejo de la Sierra	23/04/2010
de la Roca	Rascafría	12/04/2010
del Arroyo del Barondillo	Rascafría	12/04/2010
de la Senda	Canencia de la Sierra	25/04/2010
del Sestil del Maillo	Canencia de la Sierra	25/04/2010
del Hueco de las Hoces	Manzanares el Real	19/03/2010
del Arroyo de los Hoyos	Manzanares el Real	4/06/2010
del Arroyo del Chivato	Manzanares el Real	4/06/2010
del Real Jardín Botánico	Madrid	18/02/2010
del Campo del Moro I	Madrid	18/02/2010
del Campo del Moro II	Madrid	18/02/2010

Se realizó un primer control del enraizamiento a las 11 semanas y dos controles posteriores a la 18 y a las 24 semanas. En cada control las estaquillas enraizadas se extrajeron y se plantaron en un sustrato compuesto en un 40 % por turba (KEKKILÄ 50:50), otro 40 % de fibra de coco (Cocopeat<sup>®</sup>) y un 20 % de perlita A-13, al que se adicionaron 3 g l<sup>-1</sup> de abono de liberación lenta (Osmocote Pro<sup>®</sup> NPK 18:9:10; 2MgO; TE; 12-14 M).

Por otra parte para determinar los efectos de la conservación en frío sobre la capacidad de enraizamiento de las estaquillas de tejo, se diseñó un ensayo en el que se empleó

material de tres genotipos diferentes. Los tejos empleados fueron los del Campo del Moro I, Campo del Moro II y el Tejo del Real Jardín Botánico. Con estos tres individuos se realizó un estaquillado inmediatamente después de su recolección y otro posterior con material conservado en frigorífico durante 4 meses. En ambos estaquillados las tasas de enraizamiento se determinaron a los 90 días.

### Clonación de olmos singulares

La metodología empleada para la clonación de los olmos singulares se basó en los trabajos sobre reproducción de *U. minor* llevados a cabo en el marco del Programa de Mejora Genética Español de los Olmos Frente a la Grafiosis (Diez y Gil, 2004), en los trabajos realizados para la multiplicación de un olmo singular del Central Park (Thakur y Karnosky, 2007) y otros relativos al cultivo *in vitro* de las diferentes especies del género *Ulmus* publicados por Birosciková et al. (2004), Malá et al. (2005) y Conde et al. (2008). El material vegetal empleado en los trabajos que se describen a continuación, procedía de los olmos singulares referenciados en el catálogo de Árboles Singulares la Comunidad de Madrid y también de una olmeda en regresión por la grafiosis, que está situada en las márgenes del Arroyo de los Patos, en la finca El Encín (procedencia ENC). El cultivo se inició a partir de brotes jóvenes obtenidos de ramas recolectadas entre los meses septiembre de 2009 y marzo de 2010 (tabla 2).

Se tomaron ramas con un grosor como máximo de 2,5 cm que desde el momento de la recogida se conservaron en bolsas de plástico para mantener su humedad y se mantuvieron a temperatura inferior a 10°C. A partir de este material, ya en el laboratorio, se obtuvieron estacas terminales y estacas internodales de 30-40 cm de longitud, se limpiaron, se despojaron de pequeñas ramas laterales y se sumergieron en una solución fungicida compuesta de 1 g l<sup>-1</sup> de Captan-R® y 1 g l<sup>-1</sup> de Benoagrex® durante 10 minutos. Luego, a temperatura ambiente, se dejó que drenara el exceso de humedad y se almacenaron a 4°C en bolsas de plástico herméticamente cerradas, hasta el momento de su utilización.

Tabla 2. Localización de los olmos singulares de la Comunidad de Madrid y fechas de recogida del material para el inicio del cultivo *in vitro*.

<b>Olmo singular</b>	<b>Localidad</b>	<b>Fecha de recogida</b>
de los Llanillos ( <i>U. laevis</i> )	San Lorenzo del Escorial	25/03/2010
del Camino de la Estación ( <i>U. minor</i> )	Aranjuez	15/03/2010
del Milagro ( <i>U. minor</i> )	Cubas de la Sagra	23/02/2010
del Ayuntamiento ( <i>U. minor</i> )	Guadarrama	20/09/2009
de Somontes I ( <i>U. minor</i> )	Madrid	8/02/2010
de Somontes II ( <i>U. minor</i> )	Madrid	8/02/2010
Pantalones ( <i>U. minor</i> ) *	Madrid	18/02/2010
de Nuevo Baztán ( <i>U. minor</i> )	Nuevo Baztán	9/03/2010
de Rascafría ( <i>U. minor</i> ) **	Rascafría	-
de San Martín de Valdeiglesias I ( <i>U. minor</i> )	San Martín de Valdeiglesias	2/03/2010
de San Martín de Valdeiglesias II ( <i>U. minor</i> )	San Martín de Valdeiglesias	2/03/2010

\* Pantalones es el nombre que recibe el olmo singular del Real Jardín Botánico.

\*\* La olma de Rascafría, que figura en el catálogo de Árboles Singulares de la Comunidad de Madrid, ya no existe. Desapareció en 2002.

Para forzar la brotación las estacas se colocaron verticalmente en bandejas con perlita expandida (A-13), hundiendo en la perlita su tercio inferior y se introdujeron en una cámara con ambiente controlado a  $23 \pm 3$  °C, con humedad relativa alta ( $90 \pm 10$  %) y un fotoperiodo de 16 horas de luz ( $114 \pm 3$   $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}$ ). Durante el periodo de brotación las estacas recibieron un tratamiento semanal con un producto fungicida, alternándose de forma cíclica Captazel<sup>®</sup>, Antracol<sup>®</sup>, Beltanol-L<sup>®</sup> y Previcur<sup>®</sup>. Dos semanas después de su introducción en cámara se comenzaron a recolectar los brotes cuando tenían entre 2 y 3 cm de longitud.

#### *Fase de iniciación del cultivo in vitro*

El primer ensayo de introducción en cultivo se realizó empleando únicamente material del olmo del ayuntamiento de Guadarrama y se utilizaron dos tipos de explanto: yemas que comenzaban a mover y brotes elongados. Ambos tipos de explanto se esterilizaron superficialmente sumergiéndolos en etanol al 70 %, durante 30 segundos, y posteriormente en una solución de hipoclorito sódico al 10 % (3,5 % de cloro activo), más dos gotas de Tween 20, durante 10 minutos. Posteriormente los explantos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. A continuación se cultivaron individualmente en envases con 40 ml de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con los macronutrientes diluidos a la mitad y suplementado con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa, 6 g l<sup>-1</sup> de agar y una concentración 2,5  $\mu\text{M}$  de bencilaminopurina (BAP), a un pH de 5,75. Los explantos se pincharon verticalmente en el medio, y al cabo de cuatro semanas se determinó el número de explantos dañados por el tratamiento de esterilización, el número de explantos contaminados y el número de explantos establecidos en cultivo libres de contaminación.

Se realizó un segundo ensayo de introducción empleando material de la procedencia ENC. En este ensayo se mantuvieron las condiciones antes descritas pero se probaron dos tiempos de inmersión en legía, 10 y 20 minutos. Además se estudió el posible efecto del tiempo de permanencia de las estacas en la cámara de brotación sobre las tasas de contaminación. Con esta finalidad los brotes recolectados se clasificaron en tres grupos según el tiempo transcurrido desde la introducción de las estacas en la cámara de ambiente controlado y la recolección de los mismos (1ª cosecha, 2ª cosecha y 3ª cosecha).

Para iniciar el cultivo en todos los olmos singulares se empleó el protocolo de esterilización descrito en el primer párrafo de este apartado.

#### *Fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación*

Una vez establecidos los cultivos el repicado a medio fresco se realizó cada 4 semanas. El desarrollo de las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación aun está en curso, solo se han desarrollado parcialmente. Se están realizando ensayos para optimizar el manejo de los explantos y la composición de medio de cultivo durante la fase de proliferación, y se están ensayando medios y combinaciones de auxinas para desarrollar la fase de enraizamiento. En el desarrollo de estos procesos se han ido obteniendo algunos brotes con raíces que se han sometido al proceso de aclimatación. Los brotes enraizados se plantaron en el mismo sustrato utilizado para las estaquillas de tejo y ya descrito en el apartado correspondiente y se llevaron a una cámara de aclimatación con 80% de humedad relativa, 23°C y un fotoperiodo de 16 h de luz. Pasada una semana en la cámara se sacaron al invernadero para finalizar su aclimatación.

## **Resultados y discusión**

### *Clonación de los tejos singulares*

Los plazos naturales de ejecución del proyecto hicieron que la época en la que se realizaron los estaquillados no fuera la más favorable para lograr tasas de enraizamiento elevadas, pese a todo se logró la clonación prácticamente de todos los tejos singulares en este primer intento que se desarrolló entre el final del invierno y el final de la primavera. La Figura 1 muestra el aspecto de estaquillas recién enraizadas, en concreto se trata de estaquillas tomadas del tejo del Campo del Moro II.



Figura 1. Estaquillas del tejo del Campo del Moro II, recién enraizadas

En la mayoría de los tejos se obtuvieron tasas de enraizamiento que superaron el 15 % cuando se consideró un periodo de enraizamiento de 24 semanas (Tabla 3). Los valores individuales oscilaron entre el 0% del tejo del Chaparral II (i) y el 88,6 % del tejo del Campo del Moro II. Esta gran variabilidad es lo habitual ya que en la capacidad morfogénica de los tejos existe un marcado efecto del genotipo que también se ha descrito en trabajos anteriores (Alegre et al., 2001). Curiosamente el tejo del Chaparral II, cuyas estaquillas mostraron muy baja capacidad de enraizamiento, prácticamente nula, está formado por dos pies que surgen del suelo entre las rocas. El hecho de que la tasas de enraizamiento de las estaquillas tomadas de ambos pies (derecho e izquierdo) sea tan baja, que sea tan diferente a la del conjunto de los tejos singulares y que además ambos pies sean hembras, nos hace pensar que esos dos pies podrían ser en realidad de un único genotipo aunque para confirmar esta sospecha sería necesario realizar análisis genéticos.

Las tasas de enraizamiento para los tejos del Arroyo del Chivato y del arroyo de Hoyos son también bajas (Tabla 4) pero se obtuvieron en un periodo de enraizamiento de 11 semanas y falta confirmar los resultados en un periodo de enraizamiento más prolongado. El material de estos dos tejos se recolectó muy tarde, ya en el mes de junio y podría afectar a los resultados obtenidos.

Con el almacenamiento en frío de las estaquillas se puede mantener su capacidad de enraizamiento al menos durante varios meses, lo que facilita la gestión de los trabajos de propagación porque lo hace menos dependiente de las fechas de recolección del material y de la disponibilidad de espacio en las instalaciones en una fecha concreta del año. Tras un periodo de almacenamiento en cámara frigorífica de 4 meses la tasa media de enraizamiento obtenida a los 90 días fue del 15 %, prácticamente la misma que el 16 % que se obtuvo inmediatamente después de la recolección. Además los resultados fueron consistentes y se mantuvieron con independencia del genotipo (Tabla 4).

Tabla 3. Tasas de enraizamiento de las estaquillas tomadas de los tejos singulares en los controles realizados al cabo de las 11, 18 y 24 semanas.

Tejo Singular	Estaquillas puestas a enraizar	% de estaquillas enraizadas tras		
		11 semanas	18 semanas	24 semanas
Real Jardín Botánico	48	10,4	27,1	27,1
Campo del Moro I	50	16,0	36,0	36,0
Campo del Moro II	35	22,9	34,3	88,6
Chaparral I	94	0,0	35,1	35,1
Chaparral II (d) *	60	0,0	1,7	1,7
Chaparral II (i)	75	0,0	0,0	0,0
Roca	128	0,0	7,0	17,2
Arroyo del Barondillo	108	0,0	17,6	17,6
Senda	96	6,3	8,3	14,6
Sestil del Maillo	79	6,3	15,2	16,5
Arroyo del Chivato	96	4,2	-	-
Arroyo de los Hoyos	90	1,1	-	-
Hueco de las hoces	50	46,0	54,0	66,0

\* El tejo del Chaparral II es descrito por Cantero Desmartines y López Lillo (1995) como un árbol formado por dos pies, derecho (d) e izquierdo (i). A la vista de los resultados obtenidos en su enraizamiento sospechamos que ambos troncos podrían corresponder a un solo genotipo.

Tabla 4. Tasas de enraizamiento obtenidas a los 90 días con estaquillas puestas a enraizar inmediatamente después de la recolección y tras un almacenamiento en frío de 4 meses.

Tratamiento	Genotipo	Nº de estaquillas	% de enraizamiento
Inmediatamente después de la recolección (18/02/2010)	Real Jardín Botánico	48	10
	Campo del Moro I	50	16
	Campo del Moro II	35	23
Tras 4 meses de almacenamiento en frío (23/06/2010)	Real Jardín Botánico	52	10
	Campo del Moro I	121	17
	Campo del Moro II	107	17

### Clonación de olmos singulares

#### *Fase de iniciación del cultivo in vitro*

En la primera introducción se lograron establecer cultivos asépticos a partir de los brotes de 2 a 3 cm. Sin embargo las tasas de contaminación fueron muy elevadas (81 %) y además se observó un posible efecto del tiempo que permanecieron las estacas en la

cámara de brotación sobre la aparición de estas contaminaciones. Cuando el explanto utilizado fueron yemas que comenzaban a mover no se obtuvieron resultados positivos.

En la segunda introducción el incremento del tiempo de inmersión en lejía no eliminó el problema de las elevadas tasas de contaminación (Tabla 5). El porcentaje de contaminación no disminuyó cuando se emplearon inmersiones en lejía de 20 m, en lugar de 10 m. Además cuando se incrementó el tiempo en lejía también se incrementó el número de explantos dañados por el tratamiento de esterilización y en definitiva esta modificación hizo que disminuyera la proporción de explantos establecidos en condiciones de asepsia desde el 28 % hasta 12 %. La contaminación que apareció durante la fase de iniciación de los cultivos en su mayor parte parece tener un origen endógeno (Figura 2) de forma que no fue posible eliminarla con la desinfección superficial. No se observó una relación clara entre tiempo de permanencia de las estacas en la cámara de brotación (número de cosecha) y las tasas de contaminación, que oscilaron para las distintas cosechas de brotes entre el 43 % y el 82 % (Tabla 5).

Tabla 5. Efectos del tiempo de inmersión en legía y del tiempo de permanencia en la cámara de brotación sobre el número de explantos dañado y los porcentajes de contaminación y establecimiento

Efecto del factor		Nº de explantos total	Nº de explantos dañado	% Contaminado (1)	% Establecido (2)
Tiempo en lejía	10 m	50	21	52	28
	20 m	52	37	60	12
Tiempo en cámara de brotación	1ª cosecha	54	40	43	15
	2ª cosecha	27	8	47	37
	3ª cosecha	21	10	82	10

La tasa de contaminación se expresó en relación al número de explantos que sobrevivió al tratamiento de esterilización. (2) La proporción de explantos establecidos se expresó en relación al número total de explantos

En la Tabla 6 se muestran los valores de la tasa de contaminación y el porcentaje de explantos establecido en cultivo para cada uno de los olmos singulares. Cabe resaltar que gran parte de los 982 explantos introducidos en el medio de cultivo no sobrevivieron por las elevadas tasas de contaminación. Cuando se consideraron globalmente los explantos de todos los olmos introducidos en cultivo, la tasa de contaminación fue del 72 % y la de establecimiento de solo un 20 %. No fue posible establecer cultivos asépticos del olmo del Camino de la Estación (Aranjuez). Las estacas tomadas del olmo singular de Aranjuez brotaron con escaso vigor, tal vez porque cuando se recolectaron el árbol ya había comenzado a florecer. Además en todos los brotes que se obtuvieron apareció contaminación que parece tener un origen endógeno.

Tabla 6. Número de explantos introducido en cultivo para cada uno de los olmos singulares (Total), explantos dañados por el tratamiento de esterilización (Dañado), explantos que presentaron contaminación (Cont.), explantos establecidos en condiciones de asepsia (Esta.) y porcentaje de contaminación y establecimiento.

Olmo singular	Nº de explantos				% de explantos	
	Total	Dañado	Cont.	Esta.	Cont.(1)	Esta.(2)
de los Llanillos	88	9	59	20	75	23
del Camino de la Estación	88	20	68	0	100	0
del Milagro	94	20	64	10	86	11
del Ayuntamiento de G.	31	5	21	5	81	16
de Somontes I	82	35	22	22	53	27
de Somontes II	159	65	90	5	87	3
Pantalones	79	30	34	15	69	19
de Nuevo Baztán	86	11	22	53	29	62
de S.M. de Valdeiglesias I	89	16	39	34	53	38
de S.M. de Valdeiglesias II	96	32	49	15	77	16
<b>TOTAL</b>	<b>892</b>	<b>243</b>	<b>470</b>	<b>179</b>	<b>72</b>	<b>20</b>

(1) La tasa de contaminación se expresó en relación al número de explantos que sobrevivió al tratamiento de esterilización. (2) La proporción de explantos establecidos se expresó en relación al número total de explantos



Figura 2. Aspecto que mostraron las contaminaciones de probable origen endógeno

En general y con independencia del genotipo, los explantos introducidos en cultivo no formaron brotes axilares. Pese a la presencia de citoquininas en el medio de cultivo las yemas axilares de los explantos solo desarrollaron brotes con una frecuencia muy baja. Cuando se produjeron nuevos brotes, estos surgieron básicamente a partir de un tejido de nueva formación que apareció en la base de los explantos (Figura 3) y que generó tallos adventicios siguiendo un proceso semejante al descrito por Mala et al. (2005) en *Ulmus glabra*. Este proceso se observó en todos los olmos singulares menos en el Olmo de San Lorenzo del Escorial. En este genotipo de *Ulmus leváis* se lograron establecer explantos libres de contaminación pero no se logró frotación. Aunque se ensayaron varios medios de cultivo, el crecimiento de los explantos fue desordenado, dio lugar a un callo voluminoso pero no generó nuevos brotes.



Figura 3. Formación de tallos adventicios a partir de meristemo des generados en la parte basal de explantos de la "Olma de Guadarrama".

En la Tabla 7 se muestran los primeros datos de aclimatación de las plantas obtenidas en cinco de los olmos singulares. Para el conjunto de los brotes enraizados se logró un 68 % de aclimatación ex vitro.

Tabla 7. Primeros datos de aclimatación. Número de plantas puestas en cámara de ambiente controlado (En aclimatación), número de plantas que se sobrevive en umbráculo (En vivero) y % de aclimatación.

	En aclimatación	En vivero	% Aclimatación
Simonies I	4	2	50
Pantalones	15	12	80
Nuevo Batán	14	8	57
San Martín de Valdeiglesias I	20	10	50
San Martín de Valdeiglesias II	16	15	94
<b>Total</b>	<b>69</b>	<b>47</b>	<b>68</b>

## Conclusiones

En el caso de los tejos singulares la primera recogida de material nos ha permitido obtener ya el número de copias necesario para establecer un banco clonal en el que estén representados la mayoría de los individuos (Tabla 8). Para completar la colección se necesario tomar nuevamente material de los tejos del Chaparral II, y posiblemente también de los del Sestil del Maillo, el Arroyo de los Hoyos y el Arroyo del Chivato.

Con los olmos los trabajos de clonación avanzan de forma más lenta, pero en la actualidad ya disponemos de copias suficientes de cinco de los olmos singulares (Tabla 8). Un caso muy particular es lo sucedido con la olma vieja de San Martín de Valdeiglesias I y puede servir para ilustrar la importancia de las técnicas de clonación aplicadas a la conservación de determinados recursos genéticos. Durante la pasada primavera de 2010, este árbol fue derribado por rachas de fuertes vientos pero pudimos recoger material del árbol caído y ahora revive en los invernaderos del IMIDRA en la Finca “El Encín”. En el año 2.002 ocurrió algo semejante con la vieja olma de Rascafría pero en su caso el rescate no se produjo.

Tabla 8. Copias clonales de los tejos y olmos singulares de la Comunidad de Madrid disponibles actualmente en el vivero del IMIDRA.

Tejo singular	copias	Olmo singular	copias
del Chaparral I	51	de los Llanillos	0
del Chaparral II*	1	del Camino de la Estación	0
de la Roca	22	del Milagro	0
del Arroyo del Barondillo	22	del Ayuntamiento	36
de la Senda	14	de Somontes I	2
del Sestil del Maillo	9	de Somontes II	0
del Hueco de las Hoces	20	Pantalones	12
del Arroyo de los Hoyos	1	de Nuevo Baztán	8
del Arroyo del Chivato	4	de San Martín de Valdeiglesias I	10
del Real Jardín Botánico	20	de San Martín de Valdeiglesias II	15
del Campo del Moro I	39		
del Campo del Moro II	65		

\* El tejo del Chaparral II está formado por dos pies, en la actualidad solo disponemos de una copia de su pie derecho.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha podido realizar gracias a la financiación concedida por el IMIDRA al proyecto FP09-IA05-CLON, a la inestimable colaboración de los servicios de guardería forestal de la Comunidad de Madrid y de los técnicos de la Consejería de Medio Ambiente.

## Referencias

- Alegre J, Fernández Alfonso C, Toribio M, López Vela D, Alonso N. (2001) Conservación y caracterización de poblaciones de *Taxus baccata* L. en la Comunidad de Madrid. Primeros resultados sobre su capacidad de enraizamiento. En: Montes Para la Sociedad del Nuevo Milenio. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente. Granada. SE-2499-2001. Volumen 2: 579-584.
- Biroscíková M, Spisakova K, Liptak S, Pichler V, Durkovic J (2004) Micropropagation of mature wych elm (*Ulmus glabra* Huds.) Plant Cell Rep 22:640–644.
- Cantero Desmartines FJ, López Lillo A (1995) Árboles Singulares de Madrid. Agencia de Medio Ambiente. Comunidad de Madrid 2ª Edición. 789 pp. ISBN: 84-451-1094-2.
- Chong C, Allen OB, Barnes HW (1992) Comparative rooting of stem cuttings of selected woody landscape shrub and tree taxa to varying concentrations of IBA in Talc, ethanol and glycol carriers. J. Environ. Hort. 10(4): 245-250.
- Conde P, Sousa A, Costa A, Santos C (2008) A protocol for *Ulmus minor* Mill. Micropropagation and acclimatization. Plant Cell Tiss Organ Cult 92:113–119.
- Diez J, Gil L (2004) Micropropagation of *Ulmus minor* and *U. minor* x *U. pumila* from 4-year-old ramets. Invest Agrar: Sist Recur For 13, 249-254.
- 1.1 [Fernández C, Alegre J, López D, Toribio M, Alonso N. \(2004\). Conservación y caracterización de poblaciones de tejo. Agricultura. 869: 950-957. ISSN 0002-1334.](#)
- Gil L, Solla A, Burón M, López JC, López D, Iglesias S (2001) Mejora y conservación de los olmos ibéricos. III Congreso Congreso Nacional Forestal. Granada.  
<http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/ponencias/1130.pdf>
- Goo GH, Lee KY, Youn KS, Kwon YH (1990) Effect of ortet age and types of cuttings on rooting, cyclophysis and topophysy of rooted cuttings in *Taxus cuspidata* S. et Z. Journal of Korean Forestry Society. 79(4): 359-366.
- Hernández I, Celestino C, López-Vela D, Carneros E, Jiménez J, Alegre J, Gil L, Toribio M (2008) Plant regeneration from an endangered valuable cork oak tree by somatic embryogenesis. In: Vázquez J, Pereira H, González-Pérez A (eds.) Suberwood: New challenges.
- Iglesias Díaz MI, Soto Fernández J, Cabezal Gómez LM (1997) Propagación por estaquillado y análisis del contenido en deacetilbaccatina III en poblaciones naturales y cultivadas de tejo (*Taxus baccata*, L.) en Galicia. Actas del II Congreso Forestal Español. 319-324.
- International Board of Plant Genetic Resources (1988) Conservation and movement of vegetative propagated germplasm: in vitro culture and disease aspects Rpt. on in vitro storage conf. advisory committee. In: Intl. Board for Plant Genetic Resources, Rome, pp 1–11.

Kahn RP (1986) Plant quarantine and international shipment of tissue cultured plants. In: Zimmerman R (ed) Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, pp 147–164.

Karnosky DF (1988) “A/Ross Central Park” Chinese elm. Hortscience 23(5):925–926.

Lanphear FO (1963) The seasonal response in rooting of evergreen cuttings. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 3, 144-148.

Malá J, Gaudinová A, Dobrev P, Eder J, Cvikrova M (2005) Role of phytohormones in organogenic ability of elm multiplied shoots. Biologia Plantarum 50: 8-14.

Scheer C (1976) *Taxus* propagation by cuttings. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 26, 173-179.

Schneck V (1996) Investigations on the dependence of clone in rootability and the quality of the root system with propagation by cuttings of 40 to 350-year-old yew (*Taxus baccata* L.) trees. Silvae Genetica. 45(5-6), 246-249.

Shugert R (1985) *Taxus* production in the U.S.A. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 35, 149-153.

Toribio M, Celestino C (2000) El Uso de la Biotecnología en la Conservación de Recursos Genéticos Forestales. En: Gil, L A y Alía R (eds.) Conservación de Recursos Genéticos Forestales. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Volumen: Fuera de Serie, nº 2, pp. 249-260.

Thakur R C, Karnosky D F (2007) Micropropagation and germplasm conservation of Central Park Splendor Chinese elm (*Ulmus parvifolia* Jacq. ‘A/Ross Central Park’) trees. Plant Cell Rep 26:1171–1177.