



## Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

### TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Caulogénesis adventicia en embriones somáticos de *Pinus pinaster*, una alternativa para superar la baja productividad de algunas líneas embriogénicas**



Paula Palacios Mozo  
21 de Junio de 2013

## Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

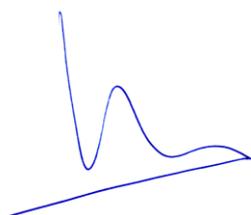
### TRABAJO FIN DE MÁSTER

Caulogénesis adventicia en embriones somáticos de *Pinus pinaster*,  
una alternativa para superar la baja productividad de algunas líneas  
embriogénicas

Paula Palacios Mozo



José Manuel Álvarez Díaz



Ricardo Javier Ordás Fernández



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo, en el cual se llevaron a cabo todos los experimentos de este trabajo, y al Ministerio de Educación Cultura y Deporte por concederme una beca de colaboración.

Al profesor Ricardo Ordás por codirigir este trabajo, enseñarme y ayudarme a trabajar en el laboratorio, a Jose por dirigir el trabajo, y prestarme su ayuda con todos los experimentos, a Natalia por ayudarme en el laboratorio con todas mis dudas y a toda la gente que he conocido durante este período y que ha pasado por el laboratorio.

A mis compañeros del máster por los buenos ratos en clase, y a los profesores por su interés y sus consejos.

A mi familia; mis padres, mi hermano y mis abuelos por apoyarme en todo momento, y a Alfonso por apoyarme y animarme siempre.

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida desde el 'Ministerio de Educación y Ciencia de España' (AGL2009-12139-C02-01) y 'Plan de Ciencia Tecnología e Innovación del Principado de Asturias' (IB08-054 y FC10-COF10-07).

### Resumen

La embriogénesis somática (ES) es una potente herramienta para la propagación clonal de genotipos superiores cuya aplicación comercial se está ampliando a algunas especies de coníferas. Además de su potencial para la propagación masiva, la ES es una excelente fuente de células competentes para la transformación genética. Algunos genotipos producen embriones somáticos de escasa calidad y/o con baja frecuencia de germinación, lo que hace que la producción a gran escala de estos genotipos sea compleja y cara y, por lo tanto, limita su producción. En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de inducir caulogénesis adventicia en embriones somáticos, mediante el precultivo de éstos con citoquininas. Para probar el efecto de benciladenina (BA) en la conversión de embriones y la inducción de yemas axilares, embriones somáticos maduros se precultivaron en medio Quorin-Leproive (QLP) suplementado o no con 5 o 10  $\mu\text{M}$  de BA durante 1, 2 y 3 semanas. Los embriones se transfirieron posteriormente a un medio de crecimiento QLP libre de reguladores y suplementado con 2 g /L de carbón activo hasta que la brotación y desarrollo radicular fueron evidentes. Después de tres meses, se obtuvo un número significativamente mayor de brotes axilares por plántula en embriones inducidos con BA que en los controles. Estos brotes axilares pueden ser aislados y enraizados proporcionando así una estrategia complementaria para aumentar el rendimiento de la ES en *P. pinaster*.

### Abstract

Somatic embryogenesis (SE) is a powerful tool for clonal propagation of superior genotypes and is being scaled up for commercial application in various conifer species. Besides its potential for massive propagation, SE is an excellent source of competent cells for genetic transformation. Some genotypes show a low embryo quality or a low frequency of germination, and large-scale production of these genotypes would be too expensive and therefore would reduce the production. In this study, we have aimed to induce adventitious caulogénesis in somatic embryos by preculturing them with cytokinins. To test the effect of benzyladenine (BA) on embryo conversion and axillary bud induction, mature somatic embryos were pre-cultured on Quorin-Leproive (QLP) medium supplemented or not with 5 or 10  $\mu\text{M}$  BA for 1, 2 and 3 weeks. The embryos were subsequently transferred to a free-plant growth regulators-QLP medium supplemented with 2 g/L activated charcoal until bud breaking and radicle elongation were evident. After three months, a significantly higher number of axillary shoots per plantlet was obtained from BA induced embryos than in controls. These axillary shoots could be isolated and rooted providing a complementary way for increasing the yield of SE in *P. pinaster*.

## ABREVIATURAS

ANA .....	Ácido naftalenacético
BA .....	N <sup>6</sup> –benciladenina
CFY .....	Capacidad de formación de yemas
ERC .....	Embriones con respuesta caulogénica
ES .....	Embriogénesis somática
ESCs .....	Embriones somáticos
MD .....	Medio de desarrollo
MI .....	Medio de inducción
MS .....	Medio de cultivo Murashige y Skoog 1962
PGRs .....	Reguladores de crecimiento
QLP .....	Medio de cultivo Quoirin y Lepoivre
REM .....	Medio de expresión de rizogénesis (Rooting Expresión Medium)
RIM .....	Medio de inducción de rizogénesis (Rooting Induction Medium)
RW .....	Medio de cultivo Risser y White 1964

## Índice

1	Introducción .....	2
1.1	Antecedentes.....	2
1.2	Planteamiento y objetivos .....	3
2	Material y métodos .....	4
2.1	Material Vegetal.....	4
2.2	Inducción de yemas.....	4
2.3	Enraizamiento de yemas .....	6
2.4	Diseño experimental y análisis estadístico.....	6
3	Resultados.....	7
3.1	Inducción de yemas.....	7
3.2	Enraizamiento de yemas .....	12
4	Discusión.....	13
5	Conclusiones .....	16
6	Referencias bibliográficas.....	17

## 1 Introducción

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una conífera ampliamente distribuida en el sur de Europa y norte de África, también se ha establecido ampliamente en áreas no nativas como Australia, América del Sur y Nueva Zelanda. Es una de las especies forestales más importantes en Francia, Portugal y España. En España se extiende por muchas comunidades autónomas, siendo una de las especies más utilizadas en repoblaciones forestales debido a su gran adaptabilidad, frugalidad, y a su rápido crecimiento, permitiendo optimizar su aprovechamiento en turnos más cortos que otras especies forestales. Sus principales usos son la producción de madera (tableros de aglomerado, pasta, chapa y aserrado), producción de resina y protección del suelo en los programas de repoblación forestal. En los últimos años, la utilización de madera y sus derivados se ha incrementado, y parece que su demanda aumentará aún más en el futuro. Para satisfacer esta necesidad creciente, con el menor impacto ambiental posible, es necesario establecer plantaciones con genotipos superiores utilizando herramientas biotecnológicas como la micropropagación y la ingeniería genética. La propagación clonal de individuos sobresalientes dentro de programas de mejora genética y la conservación de sus genotipos puede abordarse a través del cultivo *in vitro*, buscando una tecnología que permita obtener individuos en grandes cantidades y en menor tiempo que el requerido por los métodos convencionales.

### 1.1 Antecedentes

En el caso del pino marítimo, hay dos técnicas de micropropagación *in vitro* para la propagación clonal de individuos sobresalientes y la conservación de sus genotipos: la organogénesis (Álvarez et al. 2009; Calixto y Pais 1997; De Diego et al. 2008) y la embriogénesis somática (ES) (Bercetche y Pâques 1995; Harvengt 2005; Humánez et al. 2012; Lelu-Walter et al. 2006; Miguel et al. 2004), que están muy consideradas por tener mayor potencial que las técnicas tradicionales de enraizamiento de esquejes. La ES es una herramienta con gran potencial para la propagación clonal de genotipos superiores y se está aplicando de manera comercial en algunas especies de coníferas (Klimaszewska et al. 2007; Nehra et al. 2005). Una de las ventajas de la ES es la posibilidad de obtener un gran número de líneas clonales diferentes que pueden ser crioconservadas, esto permite el establecimiento de ensayos de campo para obtener clones con mejor comportamiento que posteriormente serán propagados masivamente

desde el stock crioconservado de tejido embriogénico (Klimaszewska et al. 2007; Park 2002). Además de su potencial para la propagación masiva, la ES es una excelente fuente de células competentes para la transformación genética (Trontin et al. 2007). De hecho, los últimos artículos sobre la transformación genética de *P. pinaster* muestran que esta tecnología es una herramienta útil para estudios tanto aplicados como básicos (Álvarez et al. 2012a; Klimaszewska et al. 2007).

La realidad es que, en la mayoría de los genotipos ensayados, frecuentemente se presenta una baja calidad embrionaria y baja frecuencia de germinación de los embriones somáticos cotiledonares (ESCs), lo que hace que la producción a gran escala de estos genotipos sea compleja y costosa. Este hecho es aún más notorio en el caso de los cultivos embriogénicos transgénicos (Álvarez et al. 2013; 2012a).

Ya se han descrito protocolos sobre cultivo *in vitro* para la formación de yemas adventicias en cotiledones de embriones cigóticos de pino marítimo y para el enraizamiento de microtallos (Calixto y Pais 1997; Dumas y Monteuis 1995). Se sabe que la citoquinina N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) estimula la formación de yemas en los cotiledones que posteriormente pueden ser aisladas y enraizadas.

## 1.2 Planteamiento y objetivos

El objetivo del presente trabajo es la inducción de yemas axilares y adventicias en embriones somáticos de *Pinus pinaster*.

La línea embriogénica P5LV4.1 se ha caracterizado por su alta tasa de crecimiento, su elevada capacidad de maduración y por ser susceptible de transformación genética. ESCs maduros de esta línea serán tratados con distintas concentraciones de BA (5 y 10  $\mu$ M) durante 3 periodos de tiempo (1, 2 y 3 semanas) y posteriormente serán transferidos a medio de desarrollo. Las yemas inducidas y aisladas se enraizarán según Álvarez et al. (2009).

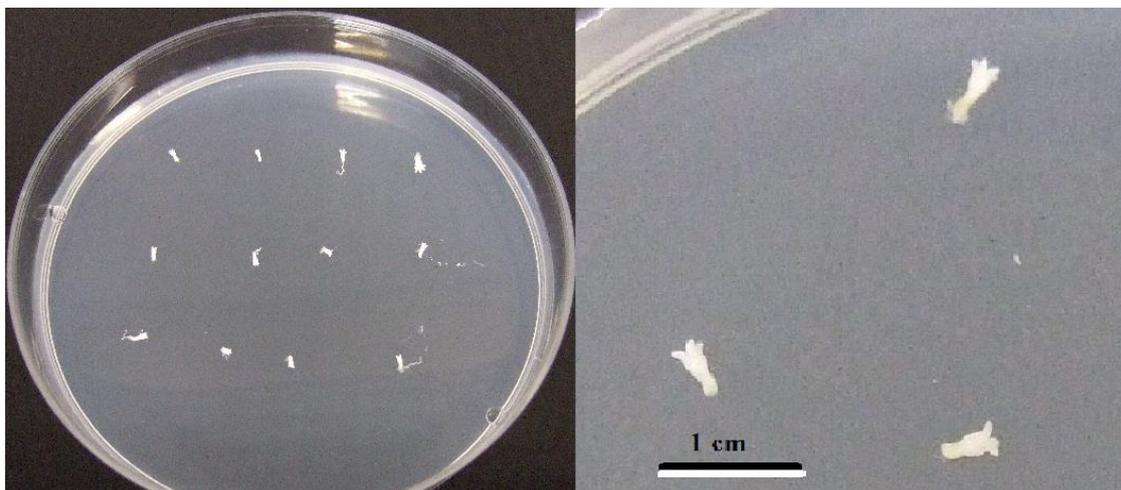
## 2 Material y métodos

### 2.1 Material Vegetal

Como material vegetal se utilizaron ESCs maduros de *Pinus pinaster* Ait. procedentes de la línea embriogénica P5LV4.1, seleccionada por su alta tasa de crecimiento y su capacidad de maduración de acuerdo con Álvarez et al. (2012a). Los ESCs se obtuvieron a partir de un cultivo de células embriogénicas criogenizadas de acuerdo con Álvarez et al. (2012b).

### 2.2 Inducción de yemas

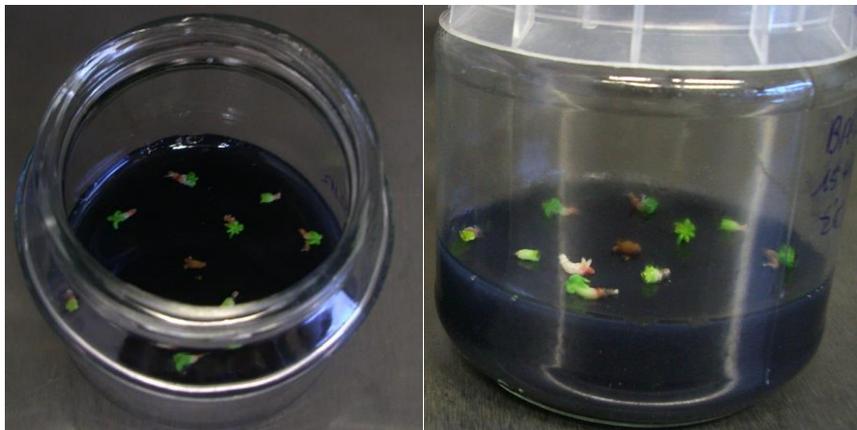
Los ESCs (2-4 mm de largo, Figura 1) se aislaron asépticamente y se colocaron horizontalmente en placas Petri con medio de inducción (MI). Este medio estaba compuesto por las sales minerales y las vitaminas del medio QLP (Quoirin & Lepoivre 1977), 20 g/L de sacarosa y 8 g/L agar, sin reguladores de crecimiento (PGRs) o suplementado con BA (5 ó 10  $\mu$ M). El pH se ajustó a 5,8 antes de autoclavar (a 121°C, 20 min). Los ESCs se cultivaron en MI durante diferentes períodos de tiempo (0, 1, 2 y 3 semanas) en oscuridad a 25° C  $\pm$  1° C.



**Figura 1:** Embriones somáticos aislados asépticamente en MI.

Tras el periodo de inducción los embriones se transfirieron en todos los casos a medio de desarrollo (MD), consistente en medio QLP con 2 g/L de carbón activo, 20 g/L de sacarosa y dispensado en “potitos” de 150 mL (6 cm Ø x 7 cm) con tapa magenta<sup>®</sup> (30 mL de medio por potito, Figura 2). Las condiciones de cultivo fueron 25  $\pm$  1°C con un

fotoperiodo de 16 h, las dos primeras semanas en condiciones de penumbra ( $20 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y las siguientes con un flujo de fotones de  $80 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}$  proporcionado por tubos fluorescentes blanco frío (TLD 58 W/33, Philips).



**Figura 2:** Embriones somáticos transferidos a potitos con MD.

Los embriones se subcultivaron cada 4 semanas en el mismo medio MD y tras 12 semanas, se estimó el porcentaje de supervivencia y de embriones con respuesta caulogénica (ERC), entendiendo como tal el porcentaje de explantos que presentan yemas axilares respecto al número inicial de embriones puestos en cultivo. Las yemas axilares inducidas mayores de 1 cm se separaron de los embriones para permitir la elongación de los brotes y se subcultivaron cada 4 semanas en MD (10-12 yemas por potito). Se tomaron datos relativos a la conversión de embriones para saber si la BA afectaba a la germinación, es decir el número de embriones con yema apical y raíz, y datos referentes al número medio de yemas y de la capacidad de formación de yemas (CFY), entendiendo como tal el número medio de yemas mayores de 1 cm por embrión inicial ( $\text{ERC} \times \text{N}^{\circ} \text{ medio de yemas mayores de 1 cm por embrión con respuesta caulogénica} / 100$ ).

Con anterioridad se realizaron unos experimentos preliminares con las mismas condiciones anteriores, pero con el único objetivo de investigar los efectos de la manipulación, minimizar los daños de los embriones aislados y así poder determinar la posición óptima de los embriones durante el proceso del cultivo, por lo que no se recogieron datos sobre organogénesis. Los embriones se colocaron en tres posiciones diferentes sobre el MI y posteriormente en las mismas posiciones sobre el MD: vertical con los cotiledones insertados en el medio, vertical con el hipocotilo insertado en el medio y horizontal tumbado sobre el medio.

### 2.3 Enraizamiento de yemas

Para el enraizamiento de las yemas se emplearon yemas mayores de 2 cm que se cultivaron de acuerdo con los protocolos de Dumas y Monteuuis (1995) y Álvarez et al. (2009). Las yemas se colocaron en medio de inducción de rizogénesis (RIM) consistente en los macroelementos del medio RW (Risser y White 1964), los microelementos del medio MS (Murashige y Skoog 1962) diluidos a la mitad, 50 mg/L de myo-inositol, 2 mg/L de glicina, 1 mg/L de tiamina, 1 mg/L de piridoxina, 1 mg/L de ácido nicotínico, 10 g/L de sacarosa y como auxina se utilizó ácido naftalenacético (ANA) 2,7  $\mu\text{M}$ , el pH se ajustó a 5,5 antes de añadir 8 g/L de agar y de autoclavar a 121 °C durante 20 minutos. El medio se dispensó en potitos de 150 mL (30 mL de medio por potito). En este medio las yemas permanecieron durante 3 semanas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y con fotoperiodo de 16 h y un flujo de fotones de  $80 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}$ . Posteriormente, las yemas se transfirieron a medio de expresión de rizogénesis (REM) cuya composición es igual a la de RIM pero con 30 g/L de sacarosa y sin hormonas. Después de dos semanas en este medio se estimó el porcentaje de enraizamiento y el número de raíces por yema.

### 2.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron de acuerdo con un diseño completamente aleatorio (Compton 1994), con un mínimo de 40 explantos por tratamiento, presentándose los datos como la media  $\pm$  el error estándar (EE). El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el software<sup>®</sup> “SPSS Statistics 21”. Se utilizó un nivel de significación  $\alpha = 0,05$  para todas las variables. Las variables cualitativas (discretas) como los porcentajes de supervivencia, ERC, y de germinación se analizaron con el estadístico  $\chi^2$ . Las variables cuantitativas (continuas) como el número medio de yemas mayores de 1 cm y CFY, se analizaron con un ANOVA y con un test de Holm-Sidak a posteriori.

### 3 Resultados

#### 3.1 Inducción de yemas

Los experimentos preliminares para investigar los efectos de la manipulación, minimizar los daños de los embriones aislados y así poder determinar la posición óptima de los embriones durante el proceso del cultivo dieron como resultado, transcurridos 20 días en el MD, que los embriones que se dispusieron horizontalmente (tumbados) presentaban mayor índice de supervivencia (77,8 %) que los colocados de forma vertical (33,0 %), y los efectos lesivos de la manipulación eran menores, por lo que en los siguientes experimentos los embriones se posicionaron horizontalmente sobre los medios de cultivo.

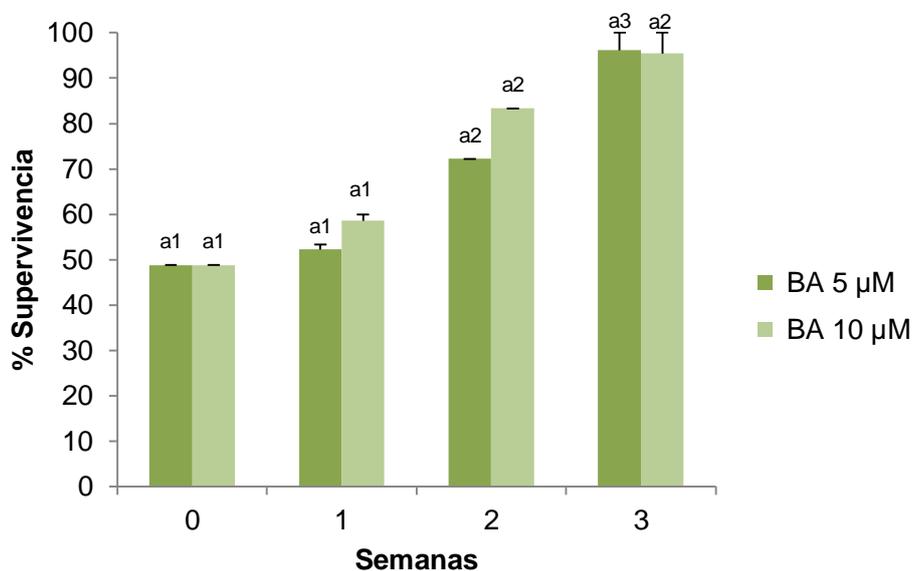
Tras 3 meses desde el inicio del cultivo, se tomaron datos de los porcentajes de supervivencia de los ESCs, porcentajes de ERC y germinación, y número medio de yemas inducidas mayores de 1 cm por embrión con respuesta caulogénica (Figura 3), y se calculó la capacidad de formación de yemas de cada condición estudiada.



**Figura 3:** **A.** ESC germinado tras 12 semanas de cultivo, observándose yema apical y raíz. **B.** ESC con yemas inducidas tras 12 semanas de cultivo. **C.** yema inducida mayor de 1 cm aislada.

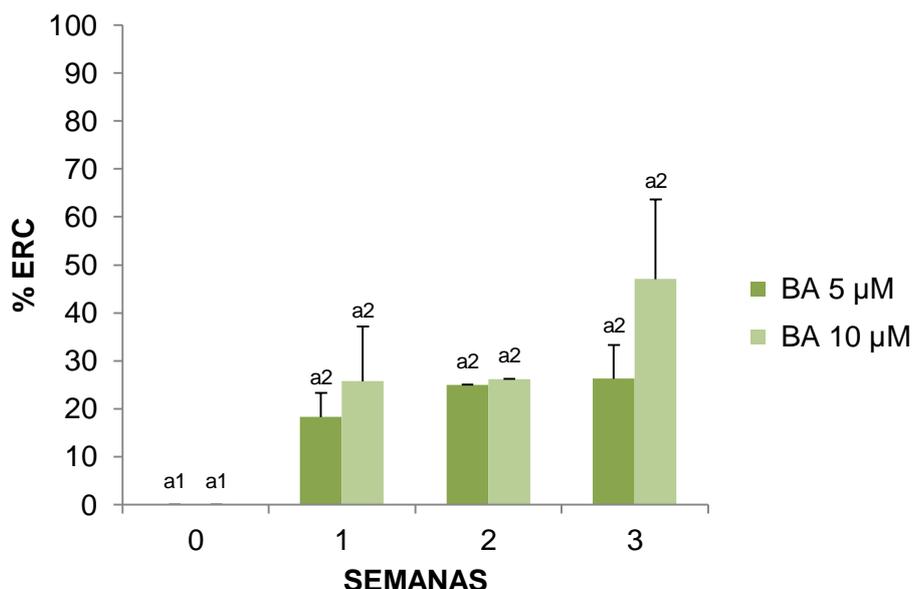
La influencia de la concentración de BA (5 ó 10  $\mu\text{M}$ ) aplicada durante 0, 1, 2 ó 3 semanas sobre la formación de yemas en ESCs maduros se muestra en las figuras 4 y 5. El periodo de exposición a la citoquinina afectó significativamente a la capacidad de supervivencia de los ESCs; pero no se observaron diferencias significativas entre 5 y 10  $\mu\text{M}$  de BA. Los explantos no sometidos a inducción (0 semanas) y subcultivados cada 4 semanas en MD (control) durante 3 meses, presentaron un porcentaje de supervivencia inferior a los embriones tratados con BA durante 1, 2 ó 3 semanas (48,84%), éstos últimos mostraron porcentajes de supervivencia crecientes con el período de inducción, para 1 semana la supervivencia fue en torno al 55%, para 2 semanas aproximadamente el 77%, y para 3 semanas cerca del 95%; también se observó que en general la supervivencia era algo mayor para aquellos ESCs inducidos

con BA 10  $\mu\text{M}$  que para los inducidos con 5  $\mu\text{M}$  de BA pero no de manera significativa (Figura 4).



**Figura 4:** Efecto de la concentración de BA y del período de inducción en la supervivencia de ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10 $\mu\text{M}$ ), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Los datos se tomaron tras 12 semanas de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de BA dentro de cada grupo de barras. Números distintos indican diferencias significativas entre tiempos de inducción dentro de cada concentración de BA ( $p \leq 0,05$  Prueba de  $\chi^2$ ).

Por otra parte, respecto al porcentaje de ERC las diferencias fueron significativas entre el control (tiempo 0) y el resto de tratamientos; pero no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de BA estudiadas, ni entre los períodos de inducción de 1, 2 y 3 semanas (Figura 5). La concentración 10  $\mu\text{M}$  de BA indujo mayores porcentajes de ERC que 5  $\mu\text{M}$ , pero no de manera significativa. También se observó que una inducción de 3 semanas con 10  $\mu\text{M}$  de BA inducía un mayor porcentaje de ERC que el resto de condiciones.



**Figura 5:** Efecto de la concentración de BA y del período de inducción en el porcentaje de embriones con respuesta caulogénica (ERC) de ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10µM), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Los datos se tomaron tras 12 semanas de cultivo. Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de BA dentro de cada grupo de barras. Números distintos indican diferencias significativas entre tiempos de inducción dentro de cada concentración de BA ( $p \leq 0,05$  Prueba de  $\chi^2$ ).

En la Tabla 1 se muestra que el número medio de yemas mayores de 1 cm por ERC es significativamente mayor en los ESCs cultivados en presencia de 5 µM de BA durante un período de 2 semanas (3,11 yemas/embrión), que en el resto de los tratamientos. Para el resto de condiciones ensayadas el número medio de yemas por ERC es de 1 y 2 yemas por embrión. También hay que destacar que en aquellos ESCs que no han sido cultivados en presencia de BA (control), no se observa inducción de yemas (Tabla 1).

**Tabla 1:** Efecto de la concentración de BA y del período de inducción en la formación de yemas axilares en ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10µM), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Los datos se tomaron tras 12 semanas de cultivo, y muestran la media de yemas >1cm por embrión con respuesta caulogénica. No hay diferencias significativas entre concentraciones de BA, letras distintas indican diferencias significativas entre periodos de inducción ( $p \leq 0,05$  ANOVA, test a posteriori de Holm-Sidak).

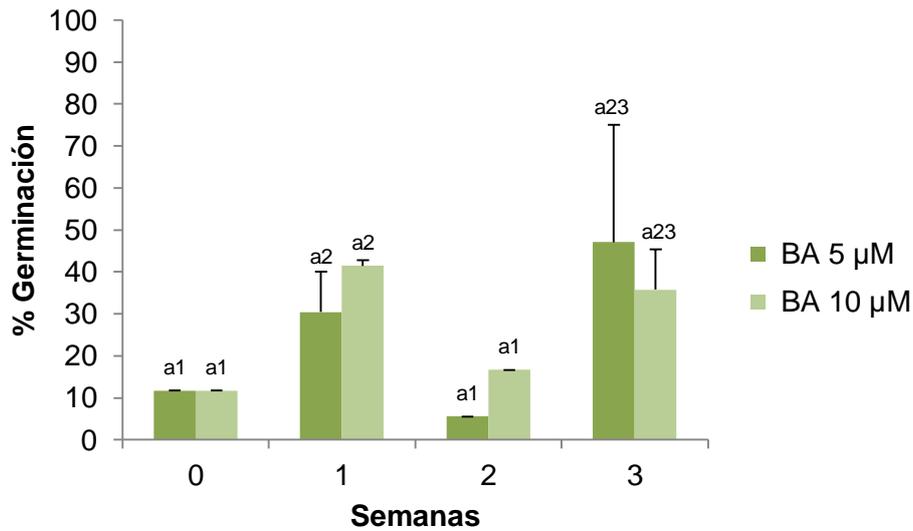
Nº Yemas / embrión ± E				
BA / Tiempo	0 a	1 abc	2 bc	3 c
5	0,00	1,57 ± 0,17	3,11 ± 0,48	2,00 ± 0,47
10	0,00	1,87 ± 0,30	2,00 ± 0,36	2,07 ± 0,16

A partir de los datos del porcentaje de ERC y del número medio de yemas por embrión con respuesta, se ha calculado la CFY, que no muestra diferencias significativas para las diferentes condiciones experimentales ensayadas (Tabla 2). La mayor CFY (0,92) se alcanza para 3 semanas de inducción en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de BA, seguido de un valor de 0,77 para un período de inducción de 2 semanas con 5  $\mu\text{M}$  de BA. La menor CFY (0,29) se obtiene en los ESCs cultivados durante una semana en presencia de 5  $\mu\text{M}$  de BA, siendo el valor de la CFY para el resto de condiciones en torno a 0,5.

**Tabla 2:** Efecto de la concentración de BA y del período de inducción en la capacidad de formación de yemas (CFY) de ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10 $\mu\text{M}$ ), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Los datos se tomaron tras 12 semanas de cultivo. CFY = (ERC x nº medio yemas >1cm por embrión con respuesta caulogénica)/100. No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos ( $p \leq 0,05$  ANOVA).

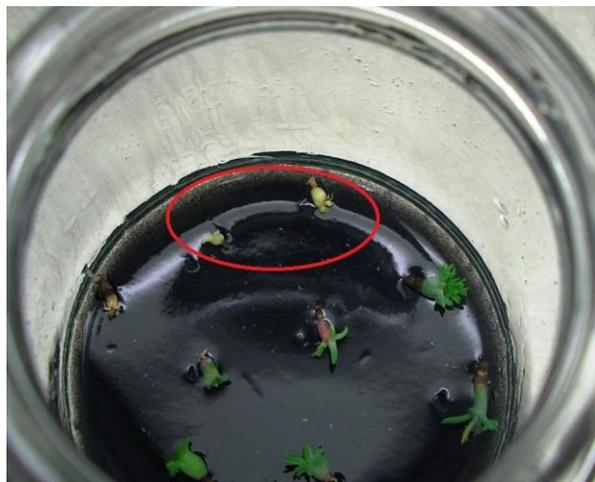
BA / Tiempo	CFY			
	0	1	2	3
5	0,00	0,29 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,00	0,53 $\pm$ 0,14
10	0,00	0,49 $\pm$ 0,20	0,52 $\pm$ 0,00	0,92 $\pm$ 0,18

Otra variable estudiada fue el porcentaje de germinación de los ESCs (aquellos que presentan yema apical y raíz) después de 12 semanas de cultivo. Los ESCs no tratados con BA (controles) en su mayoría presentaron raíz, pero no yema apical al principio, ya que se observó que tardaba más en brotar que en los ESCs tratados con BA. Respecto al resto, se observó que los ESCs que mostraban menor porcentaje de germinación fueron aquellos inducidos durante 2 semanas con 5  $\mu\text{M}$  de BA (5,6%), mientras que los ESCs que exhibían un mayor porcentaje de germinación fueron los cultivados con 5  $\mu\text{M}$  de BA durante 3 semanas (47,12%) (Figura 6).

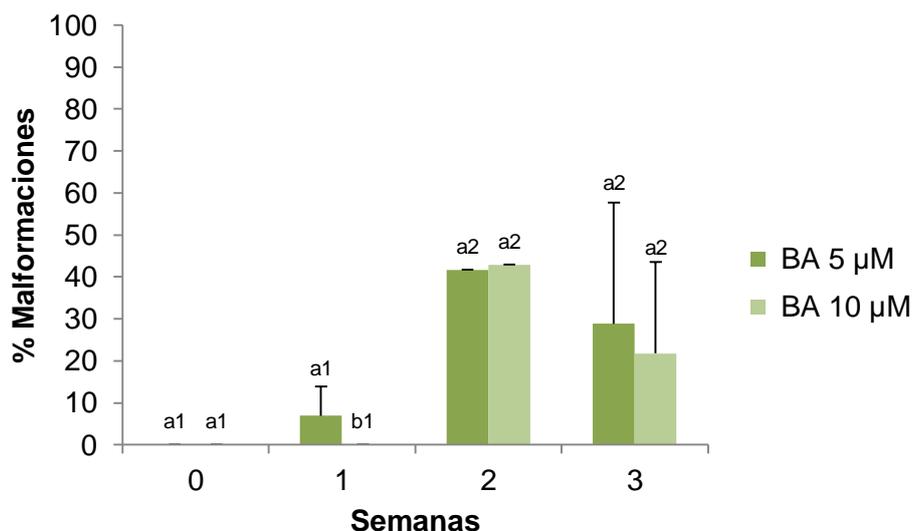


**Figura 6:** Efecto de la concentración de BA, y del período de inducción en el porcentaje de germinación de ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10μM), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de BA dentro de cada grupo de barras. Números distintos indican diferencias significativas entre tiempos de inducción dentro de cada concentración de BA ( $p \leq 0,05$  Prueba de  $\chi^2$ ).

En algunos ESCs se observó que, a medida que estos se desarrollaban en el MD, presentaban malformaciones en los cotiledones e hipocotilo (figura 7); es decir, no se desarrollaban de manera normal y no había formación de yemas axilares ni se producía la germinación de los mismos. La frecuencia de ESCs con malformaciones aumentaba significativamente con el periodo de precultivo en presencia de BA. (Figura 8). Con el tiempo estos embriones se necrosaban y finalmente morían.



**Figura 7:** Marcados en rojo dos ESCs con malformaciones, se observa que los embriones no se desarrollan y no hay formación de yemas axilares, ni tampoco se produce la germinación.



**Figura 8:** Efecto de la concentración de BA, y del período de inducción en el porcentaje de malformaciones de ESCs maduros de *Pinus pinaster*. Los ESCs se cultivaron en MI en presencia de BA (5 ó 10µM), durante 1, 2 ó 3 semanas, y posteriormente se transfirieron al MD sin reguladores (en el caso de los controles los ESCs se transfirieron directamente al MD sin periodo de inducción con PGRs). Letras distintas indican diferencias significativas entre concentraciones de BA dentro de cada grupo de barras. Números distintos indican diferencias significativas entre tiempos de inducción dentro de cada concentración de BA ( $p \leq 0,05$  Prueba de  $\chi^2$ ).

### 3.2 Enraizamiento de yemas

El enraizamiento tuvo lugar en dos etapas, inducción y expresión según Álvarez et al. (2009). Tras 3 semanas en RIM (inducción) en presencia de ANA (2,7 µM) y 2 semanas en REM (expresión), se tomaron datos referentes al porcentaje de enraizamiento, y al número medio de raíces por yema, obteniéndose una tasa de enraizamiento de  $84,3 \pm 6,8$  con cinco-seis raíces por yema. No se observó crecimiento plagiotrópico y las plantas mostraron un sistema radicular bien desarrollado (Figura 9).



**Figura 9:** Yema enraizada

## 4 Discusión

Se sabe que la iniciación y la maduración de embriones somáticos en coníferas está bajo fuerte control genético (Klimaszewska et al. 2001; Lelu-Walter et al. 1999; Miguel et al. 2004; Niskanen et al. 2004; Park et al. 1993). Álvarez et al. (comunicación personal) han observado que sólo tres árboles madre (de 8 testados) producen líneas capaces de madurar. Miguel et al. (2004) describe que sólo el 11% de las líneas ensayadas producen embriones somáticos con cotiledones en genotipos portugueses. La realidad actual es que algunas líneas embriogénicas de genotipos interesantes forman embriones de baja calidad o reducida capacidad de germinación, y hace que la producción a gran escala de ciertos genotipos sea difícil y cara y, por lo tanto, elimina a estos genotipos de la producción. En este estudio, hemos tratado de mejorar el rendimiento de un protocolo de embriogénesis somática publicado previamente en *P. pinaster* (Álvarez et al. 2012a), centrándose en un paso fundamental como es la conversión. El enfoque que aquí se presenta consiste en el desarrollo de un protocolo combinado entre ES y organogénesis. Este procedimiento ha sido ya descrito en *P. radiata* (Montalban et al. 2011) y podría ser útil para amplificar y propagar líneas embriogénicas con reducida capacidad de maduración y que puedan ser interesantes por otras razones, o en el caso de la transformación genética, donde la capacidad de maduración se reduce drásticamente (Álvarez et al. 2013; Álvarez et al. 2012a; Malabadi et al. 2008; Tereso et al. 2006).

En el desarrollo del presente protocolo nos basamos en estudios previos sobre el efecto de la BA y el posicionamiento de los ESCs en el medio de cultivo (datos no mostrados). Los efectos lesivos de la manipulación, son menores en aquellos ESCs que se disponen horizontalmente tumbados en el medio de cultivo y, por tanto, presentan mayor índice de supervivencia que aquellos que se disponen de forma vertical con el hipocotilo o los cotiledones insertados en el medio de cultivo (Álvarez comunicación personal).

Por otro lado, se puede afirmar que el período de inducción afecta de manera significativa a la supervivencia de los ESCs, ya que se observa un aumento de la supervivencia a mayor tiempo de inducción con BA. Los resultados también sugieren que el porcentaje de ERC es influenciado por el período de inducción con BA, la combinación de mayor concentración de BA y mayor tiempo de inducción aumentan el porcentaje de ERC respecto al resto de combinaciones ensayadas, pero no de manera significativa. También hay diferencias significativas en cuanto a la formación de yemas

para los diferentes períodos de inducción; sin embargo estas diferencias no son significativas para las dos concentraciones de BA estudiadas. Estos datos sugieren que concentraciones de BA mayores de 5  $\mu\text{M}$  no estimularían un incremento del número de yemas inducidas por embrión, pero si aumentarían éstas en función del tiempo de inducción. Los resultados muestran que el óptimo para la inducción de múltiples tallos en ESCs sería su cultivo en presencia de BA 5  $\mu\text{M}$  durante un período de 2 semanas.

En cuanto a la CFY, que depende del porcentaje de ERC y del número medio de yemas por embrión con respuesta y es considerada como la más informativa desde un punto de vista productivo (Capuana y Raffaello 1995; Zambryski et al. 1983), es mayor para la combinación de 3 semanas de inducción y 10  $\mu\text{M}$  de BA, al igual que el porcentaje de ERC de la que depende. Los análisis estadísticos muestran que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos; pero los ensayos realizados también sugieren que el tiempo de exposición a BA puede influir en la malformación de algunos ESCs durante su cultivo.

Por otra parte, los datos obtenidos sugieren que la BA influye en el proceso de germinación y en la brotación de la yema apical. No se observan diferencias significativas en el porcentaje de germinación (aquellos que presentan yema apical, y raíz) de los ESCs cultivados en presencia de diferentes concentraciones de BA; sin embargo se puede decir que ésta influye en la germinación de los ESCs, puesto que los controles mostraron brotación de yema apical mucho más tardía que el resto de tratamientos aunque si presentaron formación de raíz. La germinación si estuvo afectada significativamente por el período de inducción en presencia de BA; sin embargo la evolución de la respuesta estimada para un tiempo de exposición de 2 semanas a BA se desvía de lo esperado en relación con los otros periodos 0, 1 y 3 semanas, tanto para esta variable como para la CFY; por lo que sería oportuno repetir este ensayo para un periodo de dos semanas y confirmar o no los datos obtenidos, ensayo que en la actualidad se está realizando.

Calixto y Pais (1997) describieron hasta un 50 % de enraizamiento espontáneo de las yemas si se dejan sin subcultivar más de 5 meses, reduciendo el periodo a 2 ó 3 meses con tratamiento hormonal alcanzando el 60 % de enraizamiento. Álvarez et al. (2009) obtuvieron hasta un 86% de enraizamiento con cinco o seis raíces por yema después de 3 semanas en medio de inducción con 5,4  $\mu\text{M}$  de ANA y 2 semanas en medio de expresión. El porcentaje de enraizamiento alcanzado siguiendo el mismo

protocolo, se acerca mucho a los resultados publicados previamente por Álvarez et al. (2009).

En la actualidad, en nuestro laboratorio el protocolo presentado en este estudio se aplica con éxito para mejorar la producción de plantas transgénicas y para estudiar la regulación genética en coníferas. En conclusión, esta metodología ofrece una alternativa para superar algunos de los problemas asociados con la baja producción de embriones somáticos ya que el rendimiento de plántulas se podría aumentar.

## 5 Conclusiones

1. El porcentaje de supervivencia de los ESCs aumenta a mayor período de inducción con BA.
2. De los tratamientos ensayados una concentración de BA 5  $\mu\text{M}$  durante un período de inducción de 2 semanas es óptimo para la formación de yemas axilares, y mayores concentraciones de BA no implican diferencias en cuanto a mayor número de yemas por embrión con respuesta caulogénica.
3. La BA influye en el proceso de germinación y en la brotación de la yema apical de los ESCs.
4. La BA puede influir en la malformación de los ESCs durante su conversión.
5. El porcentaje de enraizamiento de las yemas utilizando ANA 2,7  $\mu\text{M}$  alcanza el 84%.

## 6 Referencias bibliográficas

Álvarez JM, Cortizo M, Bueno N, Rodríguez A, Ordás RJ (2013) CLAVATA1-LIKE, a leucine-rich-repeat protein receptor kinase gene differentially expressed during adventitious caulogenesis in *Pinus pinaster* and *Pinus pinea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 112: 331–342

Álvarez JM, Cortizo M, Ordás R (2012b) Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. *Cryo letters journal* 33: 476-484.

Álvarez JM, Cortizo M, Ordás RJ (2012a) Characterization of a type-A response regulator differentially expressed during adventitious caulogenesis in *Pinus pinaster*. *Journal of Plant Physiology* 169: 1807-1814

Álvarez JM, Majada J, Ordás RJ (2009) An improved micropropagation protocol for maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) isolated cotyledons. *Forestry*: 10

Bercetche J, Pâques M (1995) Somatic Embryogenesis in Maritime Pine (*Pinus Pinaster*). *Forestry* 44-46: 221-224

Calixto F, Pais MS (1997) Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol ex Aiton. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 119-124

Capuana M, Raffaello G (1995) In vitro plantlet regeneration from embryonic explants of *Pinus pinea* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 31: 202-206

Compton M (1994) Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 217-242

De Diego N, Montalban N IA, Fernandez de Larrinoa E, Moncalean P (2008) In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Canadian Journal of Forest Research* 38: 2607-2615

Dumas E, Monteuis O (1995) In vitro rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 40: 231-235

Harvengt L (2005) Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). In: Jain, S. M. & Gupta, P. K. (eds). *Protocol of somatic embryogenesis in woody plants*. Springer Verlag: 170-120

Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012) Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *plant cell Tissue Organ Cult* 111: 373-383

Klimaszewska K, Park YS, Overton C, Maceacheron I, Bonga JM (2001) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. . *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 392-399

Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar M, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter MA (2007) Recent progress on somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. *Tree and Forestry Science and Biotechnology* 1: 11-25

Lelu-Walter M-A, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant cell reports* 25: 767-776

Lelu-Walter MA, Bastien C, Drugeault A, Gouez ML, Klimaszewska K (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiologia Plantarum* 105: 719 - 728

Malabadi RB, T. dSJA, Nataraja K (2008) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Pinus kesiya* Royle ex Gord (Khasi Pine). *Plant Sci Biotech* 2: 7-14

Miguel C, Gonçalves S, Tereso S, Marum L, Maroco J, Oliveira M (2004) Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of portuguese plus trees of maritime pine. *Plant cell Tissue Organ Cult* 76: 121-130

Montalban IA, De Diego N, Igartua E, A., Setién A, Moncalean P (2011) A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnology Reports*: 177–186

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15: 473-497

Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Dayton Wilde H, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005) Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 701-717

Niskanen AM, lu J, Seitz S, Keinonen K, Von Weissenberg K, Pappinen A (2004) Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiology* 24: 1259 - 1265

Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Annals of Forest Science* 59: 651-656

Park YS, Pond SE, Bonga JM (1993) Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 427-436

Risser PG, White PR (1964) Nutritional Requirements of Spruce Tumor Cells in vitro  
*Physiologia Plantarum* 17: 620-635

Tereso S, Goncalves S, Marum L, Oliveira M, Maroco J, Miguel C (2006) Improved axillary and adventitious bud regeneration from Portuguese genotypes of *Pinus pinaster* Ait. *Propag. Orn. Plants* 6: 24-33

Trontin JF, Walter C, Klimaszewska K, Park YS, Lelu-Walter MA (2007) Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. *Transgenic Plant Journal* 1: 314-329

Zambryski P, Joos H, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO Journal* 2: 2143