

# CARACTERIZACIÓN POR ISOENZIMAS Y CULTIVO IN VITRO DE *PINUS PINASTER*

T. MARTÍN, R. SIERRA, P. MARTINEZ

Dpto. Producción Vegetal y Silvopascicultura, Escuela Técnica Superior Ingenierías Agrarias, Avda. Madrid, 57 Palencia E-34071

## RESUMEN

Con plántulas recién germinadas de tres procedencias (Sierra de Gredos, Sierra de Oña y Bajo Tiétar), y de árboles seleccionados por ser grandes productores de resina (CIFOR-INIA) se realizó la adaptación de protocolos para el cultivo *in vitro* (Ransillac, 1979). Se ensayaron cuatro medios de cultivo diferentes, con distintas combinaciones de fitohormonas y vitaminas. La germinación media fue del 55% y el porcentaje medio de formación de yemas *in vitro* fue del 20%. Se observó una falta de correlación entre la capacidad de germinación de las semillas y la capacidad de formar yemas. En las condiciones utilizadas se consiguieron más de 10 copias de 12 clones en 5 meses.

La caracterización molecular de los individuos propagados *in vitro* se realizó por electroforesis de isoenzimas, utilizando diez sistemas enzimáticos.

**P.C.:** electroforesis, marcadores moleculares, micropropagación, conservación.

## SUMMARY

Seedlings from 3 provenances (Sierra de Gredos, Sierra de Oña and Bajo Tiétar) and seedlings from selected trees which produce high amount of resin (CIFOR-INIA) were micropropagated *in vitro* (Ransillac, 1979). Four different culture media were tried, with different combinations of growth regulators and vitamins. An average of 55% of seeds germinated and about the 20% of them produced buds. There was a low correlation between seeds germination and buds induction. In our conditions more than 10 copies of 12 clons were propagated in 5 months.

The molecular characterization of the *in vitro* propagated trees was performed using 10 different isozymes markers.

**K.W.:** electrophoresis, molecular markers, micropropagation, conservation.

## INTRODUCCIÓN

*Pinus pinaster* tiene una área de distribución en España que se extiende por muchas de sus Comunidades Autónomas, y es una de las especies más utilizadas en la repoblación forestal dada su gran adaptabilidad y frugalidad, junto a que su crecimiento permite aprovecharla a turnos más cortos que otras especies forestales. Además de la madera, otro aprovechamiento tradicional de esta especie ha sido la resina, producto cuyo interés está resurgiendo en los últimos años.

La propagación clonal de individuos sobresalientes en producción de resina, o en otros caracteres relevantes como rectitud de fuste, y la conservación de sus genotipos puede abordarse a través del establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*. En este trabajo se describe el protocolo de cultivo *in vitro* utilizado, así como la caracterización de las plantas propagadas mediante electroforesis de isoenzimas, buscando los sistemas isoenzimáticos con un mayor número de loci polimórficos (Konnert y Maurer 1995).

## MATERIAL Y MÉTODOS:

Las plántulas recién germinadas han sido el material inicial utilizado para la micropropagación *in vitro*. Se han utilizado semillas de árboles de las regiones de procedencia Sierra de Gredos (T2-21,

E1-19, H2-39, KC-59, KC-61, RC-48, RC-86 y UC-95), Sierra de Oña (O1, O2, O3, O4 y O5) y Bajo Tiétar (T1, T2, T3, T4 y T5). También se utilizaron semillas de pinos seleccionados como Grandes Productores de resina en Segovia (GP43, GP83, GP89, GP91, GP115 y GP126), que fueron proporcionadas por el Dpto. de Mejora Genética y Biotecnología del CIFOR- INIA, así como las de la Sierra de Gredos.

Antes de iniciar el cultivo *in vitro*, las semillas se sometieron a un proceso de esterilización superficial, sumergiéndolas sucesivamente en etanol al 70% (2 min), agua estéril (5-10 min), hipoclorito cálcico al 3% (15-20 min), y 3 veces en agua estéril (10-15 min). Posteriormente se colocaron en la cámara de cultivo, ensayando tres medios de germinación: papel de filtro húmedo, agar preparado en agua y vermiculita húmeda.

Cuando la plántula se encontraba con el pericarpo desprendido, la raíz principal desarrollándose y los cotiledones abiertos, se procedía de nuevo a su descontaminación y comenzaba la fase de inducción de yemas. Se cortaba el hipocotilo a unos 0,5 mm del nacimiento de los cotiledones y se introducía en el medio de cultivo *in vitro*.

Para la selección del medio de inducción se probaron 4 medios diferentes de cultivo combinados con diversas concentraciones de fitohormonas y 3 mezclas de vitaminas. Los medios de cultivo *in vitro* probados fueron los de Murashige and Skoog (MS), Gupta-Durzan (DCR), Litway (LM) y Cambell-Durzan (CD) combinados con diversas concentraciones de fitohormonas: citoquininas (BAP entre 0,5-50 $\mu$ M) y auxinas (ANA, IAA entre 5-20nM). También se probaron estos medios con 3 mezclas de vitaminas: a) mioinositol y tiamina b) mioinositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y glicina c) mioinositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina y glutamina (George, 1993).

La proliferación de las yemas también se produjo en el medio CD. En el momento en que empezaban a desarrollarse las yemas y se distinguían las primeras acículas unidas a un incipiente tallo, se dividían y pasaban a un nuevo medio CD donde crecían un poco más. Cuando los tallos empezaban a tener entre 0,5 y 1 cm se individualizaban separando cada tallo y poniendo cada uno en medio CD sin fitohormonas.

La caracterización de los clones de *P. pinaster* se realizó con los sistemas enzimáticos siguientes: GOT=AAT= EC2.6.1.1, 6PGDH= EC1.1.1.44, SKDH= EC1.1.1.25, ADH= EC1.1.1.1, PGH= EC 2.7.5.1, PGI= 5.3.1.9, ACPH= EC3.1.3.2, MDH= EC1.1.1.37, IDH= EC1.1.1.42, LAP= EC3.4.11.1. utilizado los métodos descritos por Salvador, L. *et al.* (2000). El material vegetal utilizado fueron las yemas desarrolladas *in vitro*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los progresos hechos sobre el cultivo *in vitro* de coníferas permite acortar los tiempos necesarios para la propagación de los individuos de interés (Dumas y Monteuis, 1995; Ransillac, 1979).

De los tres medios de germinación ensayados, la vermiculita permite un mejor desarrollo de las semillas para nuestros fines. La variabilidad individual en la germinación es acusada. De forma general las semillas procedentes del Bajo Tiétar empiezan a germinar a los 20 días, las de Gredos a los 25 y los de Oña a los 30. En las condiciones utilizadas estas semillas germinan de manera poco sincronizada. Los porcentajes de germinación son muy variables dentro de una población y entre poblaciones (Tabla 1). En los árboles de Gredos el porcentaje medio es del 56%, las semillas procedentes de Oña son las que menos germinan (28%) hasta el extremo de que las del pino O2 no germinó ninguna. El porcentaje medio de germinación obtenido con las semillas del Bajo Tiétar es de 65% y del 70% las de los grandes productores de resina.

Las condiciones de cultivo que mejor resultados dan son el uso del medio CD con 10µM BAP y la mezcla c) de vitaminas. En este medio a las 6 semanas o más se empiezan a desarrollar yemas entre los cotiledones.

Las primeras observaciones muestran que no hay mucha correlación entre la capacidad de germinación y la capacidad de formar yemas de las plántulas (Tabla 1). El caso extremo lo presenta el árbol KC-59 donde germina el 52% de las semillas y ninguna plántula ha formado yemas viables. Resultados semejantes se observan en los pinos T2-21, H2-39, KC-61, RC86 y O5. A la inversa, el 22% de las semillas del árbol O4 germinan y el 33% de las plántulas producen yemas, así como el pino GP83 con un 26% de semillas germinadas de las cuales un 46% desarrollan yemas. No obstante lo más habitual es el caso de las semillas del árbol T2 con un 75% de germinación y un 33% de producción de yemas. Como media se consigue que se induzcan yemas en un 20% de las plántulas.

De momento disponemos de 12 clones en fase de múltiples copias, habiéndose conseguido una media de 10 copias por clon en 5 meses. Se dispone de otros 5 clones en 2-4 copias cada uno. También hay varias yemas de otros árboles cuya apariencia permite suponer que llegarán a la fase de división y por lo tanto a ser nuevos clones de la colección que se está estableciendo.

En esta colección de *P. pinaster* con diversas características de interés que se desean estudiar más a fondo, uno de los objetivos es tener caracterizadas las plantas con marcadores moleculares, entre ellos estamos utilizando las isoenzimas.

El material comúnmente utilizado en *P. pinaster* para el análisis de isoenzimas son las semillas (el embrión y el megagametofito) (Konnert M., Maurer W., 1995; Salvador *et al.*, 2000), no obteniéndose buenos resultados con acículas. En nuestro caso la utilización de embriones y megagametofitos no era posible, ya que lo que se pretende es caracterizar los pinos micropropagados *in vitro*. Las yemas proliferadas *in vitro* han dado buenos resultados con los 10 sistemas isoenzimáticos mencionados en material y métodos. Se han obtenido zimogramas de los 12 clones, pero siendo aún un número muy escaso de individuos nos limitamos a describir los resultados preliminares obtenidos. Las isoenzimas ADH, SKDH, ACPH y MDH son las que muestran una mayor variabilidad de bandas en los pinos hasta ahora analizados.

## CONCLUSIONES

El medio de cultivo más adecuado de los ensayados ha resultado ser el CD con 10 µM BAP y la mezcla de vitaminas mioinositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina y glutamina. Se ha establecido una incipiente colección *in vitro* con 12 genotipos que será previsiblemente ampliada en los próximos meses. La utilización de yemas de *P. pinaster* micropropagados *in vitro* para la caracterización de la diversidad genética mediante marcadores bioquímicos ha dado buen resultado con 10 sistemas enzimáticos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a R. Alía, (CIFOR- INIA Madrid) la gentileza con la que nos ha proporcionados parte de las semillas utilizadas en este estudio. A ITAGRA su constante colaboración y apoyo económico. Este trabajo es parte de los desarrollados en el proyecto AGF97/0809 financiado por la CICYT.

## BIBLIOGRAFÍA

- DUMAS, E; MONTEUUIS, O. (1995). *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. Plant cell tissue and organ culture. 40: 231-235
- GEORGE E.F. (1993) *Plant propagation by Tissue Culture* 2<sup>nd</sup> Ed. Exegetics Limited.
- GONZALEZ MARTINEZ, S.C.; *et al.* *Geographical variation of gene diversity of Pinus pinaster* Ait.

*in the Iberian Peninsula. En prensa.*

KONNERT M., MAURER W., (1995). *Isozymic investigations on Norway Spruce (Picea abies L. Karst.) and european Silver Fir (Abies alba Mill.).* German Federal-State Working Group, Conservation of Forest Gene Resource .pp 1-79

RANCILLAC, M.; (1979). *Mise au point d'une methode de multiplication in vitro du Pin maritime pour la constitution de clones à partir de semences.* AFOCEL Etude et Recherches. 12: 41-56

SALVADOR, L.; et al. (2000). *Genetic variation and migration pathways of maritime pine in the Iberian peninsula.* Theor. Appl. Genet. 100: 89-95.

Tabla 1.- Número de semillas ensayadas, porcentaje de germinación y porcentaje de plantas en las que se han inducido yemas en los distintos lotes de plantas.

Procedencia	individuo	nº semillas	% germinación	% yemas
Gredos	T2-21	54	86	4
	E1-19	45	32	29
	H2-39	40	47	5
	KC59	40	52	0
	KC-61	40	52	5
	RC-48	20	45	33
	RC-86	94	80	6
	UC-95	40	52	19
Oña	O1	20	25	20
	O2	65	0	
	O3	45	54	30
	O4	40	22	33
	O5	51	40	5
Bajo Tiétar	T1	95	94	12
	T2	20	75	33
	T3	26	61	nd
	T4	40	50	40
	T5	51	44	11
Grandes Productores de resina	GP43	120	87	31
	GP83	120	26	46
	GP89	120	61	11
	GP91	120	84	29
	GP115	120	69	12
	GP126	120	21	22