

MESA TEMÁTICA N° 2: Mejora genética forestal, viveros y repoblaciones.

INDUCCIÓN DE MASAS PREEMBRIOGÉNICAS EN EMBRIONES CIGÓTICOS DE PINO PIÑONERO

Elena Carneros¹, Amely Zavattieri², Inmaculada Hernández¹, Dolores López-Vela¹, Mariano Toribio¹, Cristina Celestino¹

¹ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares (Madrid). ² Laboratório de Melhoramento e Biotecnologia Vegetal, Universidade de Évora Apartado 94, 7002-554 Évora (Portugal).
e-mail: elena.carneros@madrid.org

Resumen

Se determinó la capacidad para obtener embriogénesis somática en embriones cigóticos pertenecientes a familias de mediohermanos obtenidas de genotipos selectos. La mejor época de recolección resultó ser entre primeros de Agosto y primeros de Septiembre, a partir del momento en que los embriones alcanzaron el estado de desarrollo cotiledonar temprano. La mayor frecuencia de inducción de proliferaciones con características preembriogénicas (PEMs) se obtuvo en medios que contenían NAA y 2.4D como reguladores del crecimiento. Se obtuvieron PEMs en todas las familias analizadas, no encontrándose diferencias familiares significativas en la frecuencia de iniciación. Se han observado diferentes tipos de proliferaciones, algunas de ellas mostrando la presencia de distintas fases del desarrollo de las PEMs, con embriones somáticos en la etapa inicial de su desarrollo acompañados de células de suspensores. La optimización de las condiciones de cultivo, para lograr la proliferación y diferenciación de los embriones somáticos obtenidos en pino piñonero, nos permitirá utilizar esta vía de regeneración de plantas en los programas de mejora y conservación de recursos genéticos de esta especie en nuestro país.

PALABRAS CLAVE: Biotecnología; Micropropagación; Embriogénesis Somática; *Pinus pinea* L.

INTRODUCCIÓN

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie arbórea típicamente mediterránea. Su importancia ecológica, social y económica ha propiciado en nuestro país estudios en campos muy variados, necesarios para poder acometer planes de conservación y mejora genética que garanticen un uso adecuado de los recursos genéticos disponibles y un aumento de las productividades. Sin embargo el área de la Biotecnología relativa a la regeneración de plantas mediante técnicas de cultivo *in vitro* está poco representada. Sirva como ejemplo, en el Primer Simposio del Pino Piñonero, organizado por la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León, el INIA y la Confederación de Organizaciones de Selvicultores de España (COSE) en el año 2000, sólo se presentó un trabajo sobre micropropagación vía organogénesis (POTES *et al.* 2000). Ya que los planes de mejora genética de esta especie van orientados fundamentalmente hacia su utilización agronómica, se requiere la identificación de individuos buenos productores de piña y piñón, así como su propagación clonal. La capacidad de regeneración de plantas mediante organogénesis es baja y laboriosa. Solo unas pocas publicaciones muestran la regeneración de plantas a partir de la inducción de yemas adventicias en tejidos embrionarios (CAPUANA & GIANNINI 1995; GONZÁLEZ *et al.* 1998; OLIVEIRA *et al.* 2003). La aplicación de la embriogénesis somática como sistema de propagación clonal, resultaría muy apropiada en los programas de mejora genética y conservación de recursos genéticos ya iniciados en esta especie (como el Programa de Mejora Genética para la producción de fruto de *Pinus pinea* L en Castilla y León, dirigido por el Prof. L. Gil), al aportar mayores posibilidades en la amplificación de progenies, y una mayor uniformidad y calidad de las plantas obtenidas.

Se han descrito diferentes protocolos para la inducción de embriogénesis somática en varias especies del género *Pinus* (TAUTORUS *et al.*, 1991; GUPTA & GROB, 1995; KLIMASZEWSKA & CYR, 2002), pero todavía no se ha documentado la obtención de embriogénesis somática en el pino piñonero. Uno de los aspectos fundamentales en la consecución de respuestas morfogénicas es la

influencia del componente genético sobre las mismas, habiéndose descrito la influencia del componente aditivo de la varianza genética en la inducción de embriogénesis somática (PARK *et al.* 1994); lo cual permitiría efectuar una mejora genética sobre este carácter. Nuestra experiencia previa sobre el comportamiento *in vitro* del pino piñonero indica una fuerte influencia genética sobre las respuestas organogénicas (CARNEROS *et al.*, 2001). El presente trabajo está dirigido a la consecución de un protocolo de iniciación y proliferación de cultivos embriogénicos en pino piñonero a partir de diferentes familias de semillas. Se ha evaluado la influencia del estado de desarrollo del embrión cigótico, de las condiciones de cultivo, y de la familia en la inducción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron las piñas de 12 árboles situados en el banco clonal de pino piñonero “Cataluña Litoral” del Centro Nacional de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro (Madrid), semanalmente desde primeros de Junio del 2004 hasta mediados de Septiembre, para poder determinar el desarrollo del embrión cigótico desde el momento de la fertilización hasta la maduración del mismo. De cada una de las piñas se tomaron entre 5 y 9 semillas por fecha de recogida y medio de cultivo, de las cuales se extrajeron los megagametofitos. Los megagametofitos se esterilizaron y posteriormente se aisló el embrión para su observación y puesta en cultivo. Los medios de cultivo ensayados (400, 402, 506, 507, 508, 509 y 100) se basaron en los medios LP (LEPOIVRE mod. por AITKEN-CHRISTIE, 1985), 505 (PULLMAN & JOHNSON, 2002) y LM (LITVAY, 1985) modificados en cuanto a su contenido en aminoácidos (glutamina e hidrolizado de caseína), antioxidantes (ácido ascórbico), fuentes de carbono (sacarosa o maltosa) y reguladores de crecimiento exógenos (NAA, TDZ, BAP). Los medios se solidificaron con Gelrite® y se ajustaron a pH 5.8 antes de su autoclavado. Los explantos (embriones cigóticos en distintos estados de desarrollo) se cultivaron en placas Petri (60x15 mm) con 10 ml de medio, en condiciones de oscuridad a 25°C. Se subcultivaron cada 20 días en los medios de inducción, transfiriéndose al 5º subcultivo a un medio de mantenimiento donde la concentración de los reguladores del crecimiento se redujo a la décima parte. Se realizaron transferencias mensuales a este mismo medio.

La presencia de estructuras preembriogénicas se determinó mediante observación a la lupa binocular y microscopio de contraste de fases, y su comparación con otros cultivos embriogénicos descritos en otras especies de pinos. Los datos de frecuencia de iniciación se transformaron usando el arcoseno de la raíz cuadrada de los porcentajes y se analizaron mediante ANOVA (software Statistica para Windows 5.1; StatSoft, Tulsa, Okla.)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se han determinado morfológicamente los distintos estados de desarrollo del embrión cigótico de pino piñonero, desde la fertilización hasta la total formación del piñón, así como el estado de desarrollo idóneo para la inducción de proliferaciones preembriogénicas.

La inducción de proliferaciones celulares en embriones cigóticos ha sido posible a partir del estado precotiledonar del embrión (Figura 2a). Estas proliferaciones crecen inicialmente en la zona de transición entre la base del embrión y el suspensor, extendiéndose a lo largo del cuerpo del embrión a medida que avanza hacia su desarrollo cotiledonar (Figura 2b-d). En función de los medios de cultivo ensayados se encontraron diferencias en la consistencia y el aspecto de las proliferaciones celulares, mostrando algunas de ellas la típica morfología embriogénica descrita para coníferas (LELU *et al.* 1999, VON ARNOLD *et al.* 2002, MIGUEL *et al.* 2004). Los medios que contenían TDZ indujeron callo compacto en la base del embrión, mientras que los que contenían 2,4-D ó NAA mostraron unos callos más gelatinosos en la parte media y cotiledonar (Figura 3). También se pudo observar que la morfología de las células que componían los agregados inducidos en los distintos medios, mostraban diferencias (Figura 4). Las obtenidas en los medios con TDZ eran más largas que las obtenidas en los medios con NAA ó 2,4-D. Con éste último regulador del crecimiento se obtuvieron además formas celulares más redondeadas.

La observación de los cultivos a lo largo de las sucesivas transferencias nos permitió identificar la aparición de las tres fases del desarrollo de masas preembriogénicas (PEMs) descritas por FILONOVA *et al.* (2000). Después de dos subcultivos mensuales en el medio de mantenimiento,

se pudieron observar estructuras de embriones somáticos en los primeros estadios del desarrollo (agrupaciones filamentosas de células de suspensores y células densas).

La ventana de competencia de los embriones cigóticos para formar masas preembriónicas fue amplia, extendiéndose desde que el embrión se encuentra en fases tardías de diferenciación hasta un estado de desarrollo cotiledonar avanzado (Tabla 1). Los embriones poco diferenciados no se mostraron competentes para la inducción. Se ha descrito que, para la mayoría de las coníferas, el pico de actividad embriónica ocurre poco después de la fertilización, coincidiendo con el período de poliembriónía por partición, lo que también se ha observado para el género *Pinus* en *P. sylvestris* (LELU *et al.*, 1999). Probablemente debido a las condiciones de cultivo, en otras especies de *Pinus* ocurre cuando el embrión dominante se ha desarrollado. Tal es el caso de *P. pinaster* (LELU *et al.*, 1999), *P. strobus* (GARIN *et al.* 1998) y *P. nigra* (RADOJEVIC *et al.* 1999), siendo el estado cotiledonar el más competente. Nuestros resultados con *P. pinea* estarían próximos a este último caso.

La formulación de los medios de cultivo mostró una influencia muy significativa sobre la capacidad de generar PEMs, siendo las formulaciones basadas en NAA o 2,4-D las que presentaron la mayor frecuencia de inducción (Fig. 1). Los porcentajes de inducción de proliferaciones con características preembriónicas se movieron en un rango entre el 67 y el 100 % de los embriones, en los medios basados en NAA y dependiendo de la familia. No se ha encontrado un efecto familiar significativo, posiblemente debido al bajo número de explantos utilizados. Cabe destacar que en dichos medios se ha podido generar líneas presumiblemente embriónicas en todas las familias analizadas al igual que en otros trabajos (MIGUEL *et al.*, 2004) lo cual evita el posible riesgo de erosión genética debido a la vía de multiplicación utilizada.

La optimización de las condiciones de cultivo para la inducción, proliferación y maduración de embriones somáticos nos puede conducir en el futuro a la diferenciación de embriones somáticos con capacidad germinativa a partir de las masas preembriónicas obtenidas en el pino piñonero.

BIBLIOGRAFÍA

- AITKEN-CHRISTIE, J.; SINGH, A.P. & DAVIES, H.; 1988. Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiate pine. In: J.W. Hanover & D.E. Keathley (eds.) *Genetic manipulation of woody plants*: 413-432. Plenum Press. New York.
- CAPUANA, M. & GIANNINI, R.; 1995. *In vitro* plantlet regeneration from embryonic explants of *Pinus pinea* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 31: 202-206.
- CARNEROS, E., HERNÁNDEZ, I., TORIBIO, M., GIL, L. y CELESTINO, C.; 2001. Factores que influyen en la respuesta organogénica en *Pinus pinea* L. En: *Actas de la IV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales, Santiago de Compostela-2001*: 23
- FILONOVA, L.H.; BOZHKOVA, P.V.; BRUKHIN, V.B.; DANIEL, G.; ZHIVOTOVSKY, B. & VON ARNOLD, S.; 2000. Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J Plant. Sci.* 113: 4399-4411.
- GARIN, E.; ISABEL, N. & PLOURDE, A.; 1998. Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 18: 37-43.
- GONZÁLEZ, M.V.; REY, M.; TAVAZZA, R.; LA MALVA, S.; CUOZZO, L. & ANCORA, G.; 1998. *In vitro* adventitious shoot formation on cotyledons of *Pinus pinea*. *HortScience* 33: 749-750.
- GUPTA, P.K. & GROB, J.A.; 1995. Somatic embryogenesis in conifers. In: S. Jain, P.K. Gupta & R.J. Newton (eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants*. vol 1: 81-98. Kluwer. Dordrecht.
- KLIMASZEWSKA, K. & CYR, D.R.; 2002. Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology* 48: 31-39.
- OLIVEIRA, P.; BARRIGA, J.; CAVALEIRO, C.; PEIXE, A. & ZAVATTIERI, A.; 2003. Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry* 76: 579-587.
- LELU, M.A.; BASTIEN, C.; DRUGEAULT, A., GOUEZ, M.L. & KLIMASZEWSKA, K.; 1999. Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plant.* 105: 719-728.

- LITVAY, J.D.; VERMA, D.C. & JOHNSON, M.A.; 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell. Rep.* 4: 325-328.
- MIGUEL, C.; GONÇALVES, S.; TERESO, S.; MARUM, L., MAROCO, J. & OLIVEIRA, M.M.; 2004. Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 76: 121-130.
- PARK, J.S.; POND, S.E. & BONGA, J.M.; 1993. Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor. Appl. Genet.* 86: 427-436.
- PULLMAN, G.S. & JOHNSON, S.; 2002. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Ann. For. Sci.* 59: 663-668.
- RADOJEVIC, L.; ÁLVAREZ, C.; FRAGA, M.F. & RODRIGUEZ, R.; 1999. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* ARN.ssp. *Salzmannii* embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 35: 206-209.
- POTES, A., VIEIRA PEIXE, A., OLIVEIRA, P.; CAVALEIRO, C. & BARRIGA J.; 2000. Libro de Actas del Primer Simposio del pino piñonero (*Pinus pinea* L.), vol 2: 121-127. Junta de Castilla y León (ed.). 22-24 de Febrero de 2000.
- VON ARNOLD, S.; SABALA, I.; BOZHOKOV, P., DYACHOK, J. & FILONOVA, L.; 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69: 233-249.
- TAUTORUS, T.E.; FOWKE, L. & DUNSTANT, D.I.; 1991. Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69: 1873-1899.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Sara Espinosa, Nuria Cleto y Noelia Ramírez la asistencia técnica prestada en el laboratorio. Al Centro Nacional de Mejora Genética Forestal Puerta de Hierro (Madrid) y a Sven Mutke por la autorización y facilidades para la obtención de material seleccionado. Fondos del proyecto AGL2002-00867 y beca predoctoral IMIA a Elena Carneros.

Tabla 1. Medios de cultivo ensayados para la inducción de masas preembriogénicas a partir de embrión cigótico de *Pinus pinea* L. en distintas fechas de recogida.

Tabla 2. Frecuencia de inducción de masas preembriogénicas en distintas familias de mediohermanos, en embriones cigóticos recogidos en distintos estados de desarrollo. Los valores son medias \pm ES de 5 ó 6 repeticiones (agrupando valores de medios de cultivo) de entre 5 y 9 embriones cigóticos. La ausencia de datos indica la no disponibilidad de piña.

Figura 1. Frecuencia de inducción de masas preembriogénicas en función del medio de cultivo empleado. Los valores son medias \pm ES de 12 o 19 repeticiones (agrupando valores de familias y fechas de recogida) entre 5 y 9 embriones cigóticos.

Figura 2. Inicio de proliferaciones celulares en el medio de inducción 508, en embriones cigóticos pertenecientes a la F11. La secuencia muestra embriones recogidos el 28-7 (a), 11-8 (b), 27-8 (c) y 6-9 (d) del 2004.

Figura 3. Proliferaciones celulares en los distintos medios de inducción de embriogénesis somática, en embriones cigóticos en estado cotiledonar (recogida el 27-8-04) pertenecientes a la F87.

Figura 4. Morfología celular de las proliferaciones preembriogénicas inducidas en los medios que contienen 2.4D (100), NAA (400, 508) y TDZ (402, 507, 509).

Figura 1

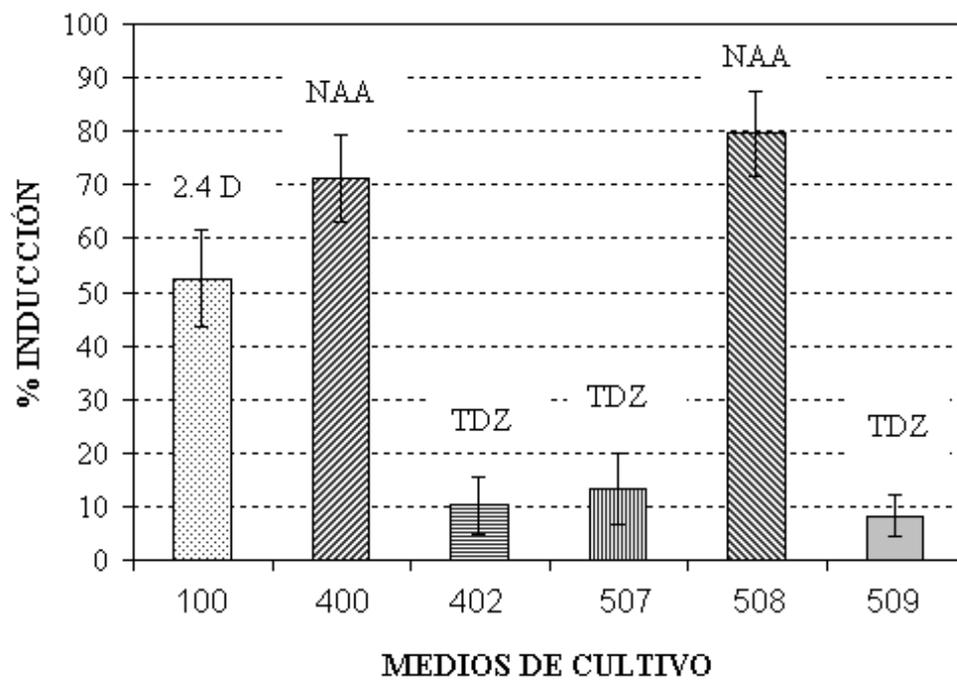


Figura 2

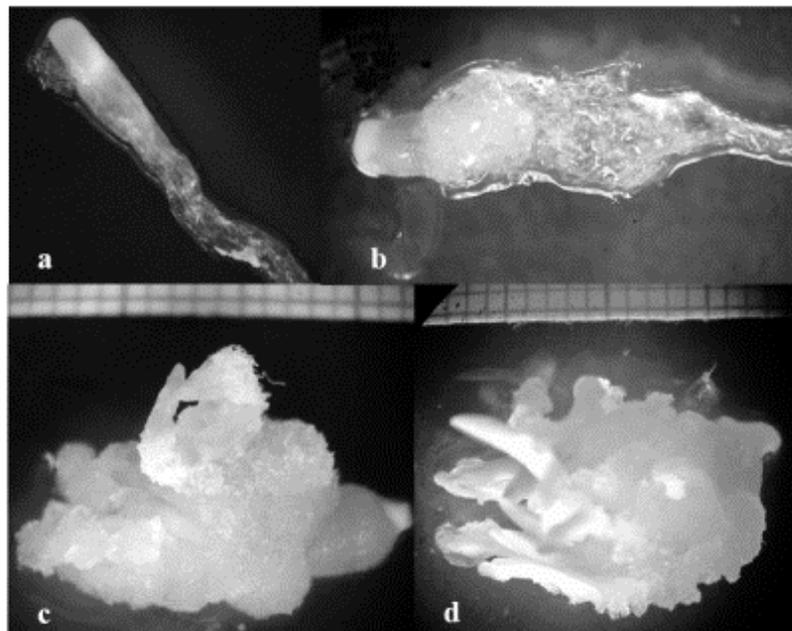


Figura 3

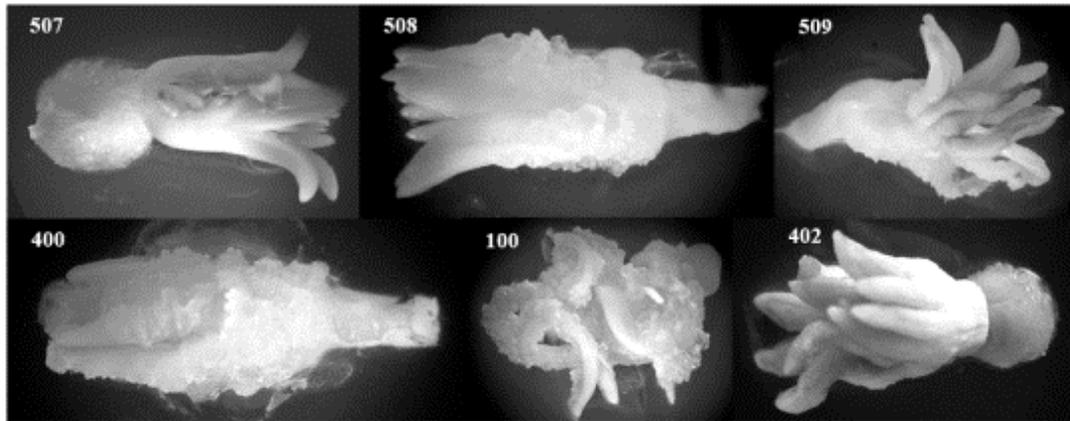


Figura 4

