



Universidad
de Alcalá

Departamento de Biología Celular y Genética

Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.)

TESIS DOCTORAL

Elena Carneros García

Alcalá de Henares, 2009



**CRISTINA CELESTINO MUR, INVESTIGADORA DEL IMIDRA
(INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO
RURAL, AGRARIO Y ALIMENTARIO),**

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral titulada: “**Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.)**”, realizada bajo su dirección por Dña. Elena Carneros García en el IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario), se considera ya finalizada y puede ser presentada para su exposición y defensa

Y para que conste, firma en Alcalá de Henares, a diecisiete de Febrero de dos mil nueve.

Cristina Celestino Mur

**GUILLERMO BODEGA MAGRO, PROFESOR TITULAR DE BIOLOGÍA
CELULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ,**

CERTIFICA:

Que **Dña. Elena Carneros García**, Licenciada en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado la Tesis Doctoral titulada: “**Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.)**” en el IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario), y reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste, firma en Alcalá de Henares, a diecisiete de febrero de dos mil nueve.




Guillermo Bodega Magro

AGRADECIMIENTOS

Han sido muchas las experiencias y las emociones vividas a lo largo de estos años. Y ahora, en este momento, mientras escribo estas líneas, muchos recuerdos vienen a mi memoria. Cada uno de ellos viene acompañado de la imagen de una o varias personas. A todos gracias, y especialmente:

A Cristina Celestino y Mariano Toribio, porque sin vuestra experiencia, esfuerzo y dedicación este trabajo no hubiera sido posible. Cristina, quisiera agradecerle todo lo que he aprendido a tu lado, día a día, así como tu enorme entrega y paciencia a lo largo de estos años, especialmente durante la elaboración de esta Memoria de tesis. Mariano, tu me diste la oportunidad de hacer ciencia y me contagiaste tu constante optimismo y tu entusiasmo por la embriogénesis somática. A ambos, muchas gracias por ser unos maestros inigualables.

A Ángeles Bernardo por sus enseñanzas, guía y consejos, y sobre todo por estar siempre disponible para atender mis demandas.

Al IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) por concederme tanto la beca predoctoral que ha permitido que se llevaran a cabo gran parte de los trabajos realizados, como la financiación de mi estancia en el extranjero.

Al INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) por la concesión de una beca de tipo tecnólogo, que ha permitido la finalización de este trabajo.

Al Centro Nacional de Mejora Genética Forestal "Puerta de Hierro" (Dirección de Medio Natural y Política Forestal - Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino), especialmente a Salustiano Iglesias Sauce, Jefe de Servicio de Material Genético, por proporcionarnos el material utilizado para la realización de los experimentos de este trabajo. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Sven Mutke por su disponibilidad y su eficiencia.

A todas las personas que forman o han formado parte del equipo de cultivo in vitro: a Inma, gracias por su generosidad, su empuje y su maravillosa forma de ver las cosas, y sobre todo por ser una gran compañera y una gran amiga; a Jesús, también gran compañero y amigo, mucho ánimo ya que el próximo eres tú; a Noe, por transmitir tanta energía, por estar ahí para levantarme el ánimo y por querernos tanto, aunque sólo lo admita en contadas ocasiones; a Loli y a Nieves, por ser tan estupendas y tan luchadoras, gracias por los buenos consejos que dais constantemente; a Sara, Yolanda, Nuria y Blanca, las grandes protagonistas de este trabajo, gracias por las innumerables horas de cabina, por la preparación de infinidad de litros de medio de cultivo y por la gran profesionalidad que han demostrado día a día; a Alfredo, Gabi y Araceli, por la importante labor que desarrollan en el equipo; a Celina y a Mar, las últimas incorporaciones, gracias por vuestro apoyo incondicional; a Noelia, Alberto y Cristina, por haberme permitido conocerlos. A todos vosotros, es un placer trabajar a vuestro lado.

A Amely, por los buenos momentos y por haberme recibido tan amablemente durante mi estancia en Évora.

A Yill-Sung Park, Jan Bonga, Ian MacEacheron y Krystyna Klimaszewska por su cálido recibimiento durante mi estancia en Canadá. He de manifestar mi gratitud por el gran interés mostrado, sobre todo por sus enseñanzas de embriogénesis somática en coníferas y sus tan acertadas recomendaciones.

A todos los compañeros de El Encín por la ayuda y apoyo que me habéis dado. Concretamente quiero dedicar un agradecimiento muy especial a todos los becarios con los que he tenido la suerte de compartir tantas experiencias, gracias por ese espíritu de lucha continuo, por el tesón y por hacer que la ilusión persista pese a la precariedad, gracias por ser tan excelentes.

A mis amigos por el gran interés que han mostrado a lo largo de la realización de este trabajo, por el ánimo y cariño que siempre recibo de ellos, por acompañarme incluso en el extranjero, por escuchar.

Por último, quisiera agradecer de forma muy especial a mi familia todo el apoyo, ánimo y cariño mostrados. Jesús, David y Bea, por vuestro continuo interés y por ser como sois. Pedro y M^a Jesús, gracias por vuestro optimismo y sobre todo muchas gracias por facilitarme la elaboración de esta Memoria, siempre recordaré con anhelo el día que me regalásteis el portátil desde el que estoy escribiendo estas líneas. Celia, gracias por ser tan buena hermana y poder contar contigo siempre que lo necesito. Adrián, Ana y Nahia, gracias por hacerme sonreír con vuestras pequeñas e inocentes locuras. Santiago y Carmen, gracias por ser unos padres tan maravillosos y sobre todo gracias por haber depositado siempre tanta confianza en mí, este trabajo también es vuestro. Javier, muchas gracias por todo tu cariño, comprensión y eterna paciencia.

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos:

“Embriogénesis somática en *Pinus pinea* L”. FP02-IA1. Financiación IMIA. Duración: 2002-2003

“Clonación *in vitro* de *Pinus pinea* L. como aplicación biotecnológica para sus programas de mejora genética”. AGL2002-00867 AGR-FOR. Plan Nacional I+D+i. Duración: 2003-2005

“Desarrollo de protocolos de regeneración por embriogénesis somática en *Pinus pinea* L.”. AGL2005-07585-C03-01/FOR. Plan Nacional I+D+i. Duración: 2006-2007

“Desarrollo de la embriogénesis somática para la mejora y conservación de *Pinus pinea* L., *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L.”. AGL2007-66345-C02-01. Plan Nacional I+D+i. Duración: 2008-2010

*A Santiago, Carmen y Javier,
mi fuerza, mi ilusión.*

“La forja de la nueva verdad exige casi siempre severas abstenciones y renunciaciones. Convendrá durante la susodicha incubación intelectual que el investigador, a modo de sonámbulo, atento sólo a la voz del hipnotizador, no vea ni considere otra cosa que lo relacionado con el objeto de estudio: en la cátedra, en el paseo, en el teatro, en la conversación, hasta en la lectura meramente artística, buscará ocasión de intuiciones, de comparaciones y de hipótesis, que le permitan llevar alguna claridad a la cuestión que le obsesiona. En este proceso adaptativo nada es inútil: los primeros groseros errores, así como las falsas rutas por donde la imaginación se aventura, son necesarios, pues acaban por conducirnos al verdadero camino, y entran, por tanto en el éxito final, como entran en el acabado cuadro del artista los primeros informes bocetos”.

Santiago Ramón y Cajal

Reglas y consejos sobre investigación científica. Los tónicos de la voluntad. Ed. Espasa-Calpe. 20ª Edición

	Pg.
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xvi
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Descripción y distribución de la especie	3
1.2. Reproducción	6
1.3. Aprovechamiento	12
1.4. Mejora genética de la especie	13
1.5. Embriogénesis somática	19
1.5.1. Origen y descripción del material embriogénico de coníferas	21
1.5.2. Fases de la embriogénesis somática	23
1.6. Crioconservación	39
1.7. Fidelidad clonal	44
2. OBJETIVOS	49
3. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	53
3.1. Caracterización del estado de desarrollo del embrión cigótico	54
3.2. Inducción de embriogénesis somática a partir de material embrionario	58
3.2.1. Embriones cigóticos maduros. Conservación en frío	58
3.2.2. Embriones cigóticos inmaduros	67
3.3. Iniciación de cultivos embriogénicos a partir de material no embrionario	82
3.3.1. Inflorescencias femeninas y masculinas (mayo 2004)	82
3.3.2. Forzado de estacas para la expansión de acículas y emisión de braquiblastos (enero 2005)	89
3.3.3. Forzado de estacas para el desarrollo de yemas y emisión de braquiblastos (febrero 2006)	95
3.3.4. Forzado de estacas para el desarrollo de yemas y emisión de braquiblastos (marzo 2008)	100
3.3.5. Discusión general del material no embrionario	106
4. PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO	113

4.1. Material y métodos.....	113
4.2. Resultados	115
4.3. Discusión.....	120
5. MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS.....	125
5.1. Material y métodos.....	125
5.1.1. Efecto del medio nutritivo, azúcar, agente gelificante y ABA.....	126
5.1.2. Efecto de la forma de aplicación de ABA y carbón activo.	127
5.1.3. Efecto de diferentes niveles de ABA.	129
5.1.4. Efecto de la desecación parcial.	130
5.1.5. Efecto de la anti-auxina PCIB.....	131
5.2. Resultados	134
5.2.1.Efecto del medio nutritivo, azúcar, agente gelificante y ABA.....	134
5.2.2. Efecto de la forma de aplicación de ABA y carbón activo.	134
5.2.3. Efecto de diferentes niveles de ABA.	136
5.2.4. Efecto de la desecación parcial.	139
5.2.5. Efecto de la anti-auxina PCIB.....	142
5.3. Discusión.....	148
6. GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN EN PLANTA.....	157
6.1. Material y métodos.....	157
6.1.1. Desarrollo de los embriones germinados en medio líquido.	158
6.1.2. Periodos de almacenamiento en frío y aplicación de PGRs.....	159
6.1.3. Germinación de los embriones con los cotiledones insertados en el medio de cultivo. Efecto de la formulación del medio de cultivo.....	160
6.2. Resultados	161
6.2.1. Desarrollo de los embriones germinados en medio líquido.	161
6.2.2. Periodos de almacenamiento en frío y aplicación de PGRs.....	163
6.2.3. Germinación de los embriones con los cotiledones insertados en el medio de cultivo. Efecto de la formulación del medio de cultivo.....	167
6.3. Discusión.....	169
7. PROTOCOLO DE REGENERACIÓN	175
8. CRIOCONSERVACIÓN	181
8.1. Material y métodos.....	181

8.1.1. Pretratamiento. Efecto de los agentes crioprotectores sorbitol y DMSO.	181
8.1.2. Congelación en nitrógeno líquido.	183
8.1.3. Descongelación. Recuperación del crecimiento.	185
8.1.4. Maduración y conversión.	186
8.2. Resultados.....	188
8.2.1. Pretratamiento. Efecto de los agentes crioprotectores.....	188
8.2.2. Descongelación. Recuperación del crecimiento.....	191
8.2.3. Maduración y conversión.	195
8.3. Discusión	197
8.4. Protocolo de crioconservación.....	202
9. CONCLUSIONES.....	207
10. BIBLIOGRAFÍA	213
11. ANEXOS.....	237

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ANA	Ácido 1-naftalenacético
BAP	6-bencilaminopurina
CA	Carbón activo
CPPU.....	N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea
DMSO	Dimetil-sulfóxido
ECI	Embriones cigóticos inmaduros
ECM	Embriones cigóticos maduros
ES	Embriogénesis somática
es.....	Error estándar
HIA.....	Hojas de inserción aislada
IBA	Ácido indolbutírico
MES.....	Masa embrión-suspensor
NL.....	Nitrógeno líquido
PEMs.....	Masas pre-embriogénicas
PGRs.....	<i>Plant growth regulators</i> , reguladores del crecimiento
TDZ.....	Tidiazurón
2,4-D.....	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Braquiblastos del pino piñonero.....	4
Figura 2: Distribución del pino piñonero.....	5
Figura 3: Regiones de procedencia y procedencias de área restringida delimitadas para el pino piñonero.....	6
Figura 4: Floración en pino piñonero a principios de mayo.....	7
Figura 5: Desarrollo de las piñas a lo largo de la polinización-fecundación.....	8
Figura 6: Piña de tercer año, imagen tomada en el mes de mayo.....	9
Figura 7: Piña de cuarto año mostrando dos piñones por escama ovulífera. Piñones con cubierta externa y cubierta papirácea.....	10
Figura 8: Desarrollo embrionario en el género <i>Pinus</i> . (Adaptación de von Arnold y col., 2002).....	11
Figura 9: Programas de muerte celular durante el desarrollo de la semilla del género <i>Pinus</i> . (Adaptación de Filonova y col., 2002).....	12
Figura 10: Crecimiento ortotrópico y plagiotrópico observado tras el enraizamiento de brotes axilares de pino piñonero.....	16
Figura 11: Estrategia de <i>silvicultura multivarietal</i> mediante embriogénesis somática.....	18
Figura 12: Desarrollo de los embriones somáticos en <i>Picea abies</i> . (Adaptación de Filonova y col., 2000b).....	23
Figura 13: Banco Clonal de pino piñonero “Cataluña Litoral” (CNMGF “Puerta de Hierro”).....	53
Figura 14: Secuencia del desarrollo del embrión cigótico de pino piñonero.....	57
Figura 15: Estado de desarrollo del embrión cigótico de pino piñonero para las fechas de recogida 7.8.03, 25.8.03 y 10.9.03.....	58
Figura 16: Embrión cigótico en estado cotiledonar cultivado en medio con TDZ y proliferación obtenida. Embrión cigótico en medio con combinación auxina-citoquinina y proliferación obtenida.....	61
Figura 17: Estructuras pre-embriogénicas inducidas en medio con TDZ en la familia 47 almacenada. Estados de desarrollo PEM I y PEM II.....	63
Figura 18: Embrión cigótico almacenado de la familia 59, en medio de mantenimiento PJ1. Masa embriogénica, embrión somático y tinciones de las células embrionarias.....	63
Figura 19: Diversos embriones somáticos de la familia 70 almacenada observados en el medio de mantenimiento PJ3.....	64
Figura 20: Diferentes tipos de extrusiones observadas en la región del micropilo del megagametofito, entre las 4 y 12 semanas de cultivo en medios de iniciación.....	71
Figura 21: Nueva extrusión emergiendo del explanto original y masa embriogénica retirada en el subcultivo anterior.....	71

Figura 22: Megagametofito, con embrión cigótico en estado precotiledonar, rasgado a lo largo del eje longitudinal con tejido embriogénico en proliferación en su interior	72
Figura 23: Frecuencia de extrusión y establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros, en los años 2005-2006.	73
Figura 24: Efecto de la fecha de recogida en las frecuencias de extrusión y establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros, en los años 2005-2006.....	75
Figura 25: Efecto de la familia en la frecuencia de establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros, en los años 2005 y 2006.....	76
Figura 26: Efecto de la fecha de recogida en la frecuencia de establecimiento de líneas embriogénicas en 2006, para cada una de las familias estudiadas.	77
Figura 27: Estróbilo femenino antes de la polinización.....	83
Figura 28: Estróbilo masculino y microesporangio.....	84
Figura 29: Inflorescencia masculina con acículas en expansión.	85
Figura 30: Proliferaciones celulares inducidas en el medio de cultivo LP1, en estróbilo femenino del genotipo 48.....	86
Figura 31: Proliferaciones celulares inducidas en el medio LP1 y LP2, en estróbilo masculino del genotipo 47.....	88
Figura 32: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en el medio LP1 en acículas de estróbilo masculino del genotipo 47.....	89
Figura 33: Expansión de acículas y emisión de braquiblastos en estacas tomadas en enero.	92
Figura 34: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en acículas del genotipo 62 en el medio PJ3 y en el medio L-mLV ₂	93
Figura 35: Estructuras con apariencia de embrión en las fases iniciales de su desarrollo.	94
Figura 36: Proliferaciones celulares inducidas en el medio PJ3, en hojas de inserción aislada del genotipo 47 y detalle de células de las proliferaciones con núcleo patente	94
Figura 37: Emisión de braquiblastos en estacas tomadas en febrero.....	96
Figura 38: Yemas en elongación y rodajas introducidas en cultivo	96
Figura 39: Proliferaciones celulares inducidas en el medio H-mLV ₂ , en rodajas de yemas apicales del genotipo 88	99
Figura 40: Crecimiento de las proliferaciones celulares inducidas en el medio H-mLV ₂ , en hojas de inserción aislada del genotipo 88.....	99
Figura 41: Estacas con yema apical engrosada y yema en elongación.....	100
Figura 42: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en rodajas y cultivadas en forma de masa, en distintos medios y genotipos. A las 3, 9,12 y 17 semanas en cultivo	104

Figura 43: Células en división con núcleo patente y células anucleadas de tejido proliferando en medio PJ3.....	105
Figura 44: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en el medio PJ a las 3, 6 y 12 semanas en cultivo, en hojas de inserción aislada del genotipo 62	106
Figura 45: Proliferación del material embriogénico de pino piñonero.	114
Figura 46: Embrión somático de pino piñonero durante el proceso de poliembrionía de partición. Tinción con acetocarmín al 1%.	115
Figura 47: Morfotipos de las masas de embrión suspensor de pino piñonero.	116
Figura 48: Embriones somáticos emergiendo de una masa de embrión suspensor.	117
Figura 49: Efecto del procedimiento de subcultivo y genotipo en el incremento en peso fresco relativo acumulado, de las MES en proliferación, a lo largo de tres subcultivos bisemanales.	119
Figura 50: Embriones somáticos maduros pertenecientes a la línea 5F47. Embrión precotiledonar.	134
Figura 51: Cultivo en medio de maduración en el que aparecen embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo. Embrión somático con cotiledones en elongación.....	135
Figura 52: A: Incremento en peso fresco de las MES (50 mg). con distintos niveles de ABA, y en material subcultivado (S) y no subcultivado (NS). B: Número de embriones somáticos maduros por 250 mg de tejido en dos líneas embriogénicas, en distintos niveles de ABA, y en material S y NS. Los datos de peso y nº de embriones fueron tomados a las 12 semanas en cultivo.....	138
Figura 53: Pérdida de humedad (%) en las líneas 1F11 y 9F58 (por gramo de MES) y del soporte (sin MES).....	140
Figura 54: A: Incremento relativo de peso fresco a las 4, 8 y 12 semanas en cultivo de la línea embriogénica 1F11, no desecada y con 2, 4, 6 y 24 horas de desecación. B: Número de embriones normales maduros obtenidos a las 12 semanas en cultivo, en las condiciones indicadas.....	141
Figura 55: Análisis de correlación entre las variables incremento relativo de peso fresco y número de embriones normales maduros obtenidos a las 12 semanas en cultivo; y entre las variables pérdida de humedad y número de embriones normales maduros después de 16 semanas en cultivo.....	142
Figura 56: Incremento relativo de peso fresco en el control y en los tratamientos 1, 3 y 4, en cuatro líneas embriogénicas, a las 4 y 8 semanas en cultivo.	143
Figura 57: A: Incremento relativo de peso fresco, en las líneas 1F11 y 2F47 en las cuatro líneas, en el control y en cada uno de los tratamientos con PCIB, a las 12 semanas en cultivo. B: Nº de embriones normales maduros obtenidos en 250 mg de tejido, a las 12 semanas en cultivo.....	144
Figura 58: Análisis de correlación entre el incremento relativo de peso fresco y número de embriones maduros normales, a las 12 semanas en cultivo.....	144
Figura 59: Nº de embriones maduros normales en 250 mg de tejido, en las líneas 1F11 y 2F47, en el control y en cada uno de los tratamientos ensayados a las 16 semanas.....	145

Figura 60: Diferenciación y maduración de los embriones somáticos con morfología normal.....	146
Figura 61: Embriones somáticos con morfología aberrante.	147
Figura 62: Plántulas creciendo en tubos con puente de papel y en recipientes “De Wit”, en medio AFC líquido.	159
Figura 63: Embrión somático en medio de germinación con los cotiledones insertados en el medio de cultivo.	161
Figura 64: Plántulas de 1,5 y 2 meses en condiciones de aclimatación y plantas 9 y 15 meses en condiciones de invernadero.	163
Figura 65: Porcentaje de germinación en medio AFC de embriones procedentes de las líneas 1F11 y 2F47, por condición (4 u 8 semanas de almacenamiento en frío) durante varias semanas en cultivo.	164
Figura 66: Embriones de pino piñonero germinados en medio AFC.	166
Figura 67: Plántulas de piñonero desarrollándose en recipientes ECO2 con medio SH y plántulas en desarrollo con raíz emitiendo ramificación secundaria.....	167
Figura 68: Porcentaje de embriones germinados en diferentes medios de germinación en cada una de las fechas de observación.	168
Figura 69: Germinación y desarrollo de embrión somático de pino piñonero en medio AFC. A: Raíz emergiendo a la semana. B: Elongación de la raíz a las dos semanas. C: Raíz penetrando en el sustrato a la cuarta semana. D: Desarrollo de la plúmula a las ocho semanas.....	169
Figura 70: Regeneración de <i>Pinus pinea</i> L. por embriogénesis somática.	177
Figura 71: Protocolo de crioconservación	184
Figura 72: Filtración de la suspensión crioconservada y puesta en cultivo.....	185
Figura 73: Incremento relativo en peso fresco de seis líneas embriogénicas después de pretratamientos con 0,4 M sorbitol y tres concentraciones de DMSO, durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha tratado con crioprotectores.....	190
Figura 74: Incremento relativo en peso fresco de seis líneas embriogénicas recuperadas tras la crioconservación, durante cuatro subcultivos bisemanales. Los cultivos se pretrataron con 0,4 M sorbitol y tres concentraciones de DMSO.....	192
Figura 75: Cultivos embriogénicos crioconservados creciendo en medio de mantenimiento a las 2, 4, 6 y 8 semanas en cultivo.....	195
Figura 76: A: Embriones somáticos cotiledonares obtenidos en la línea 7F11 crioconservada, después de 16 semanas en medio AFC con 121 μ M de ABA. B: Germinación de un embrión somático de tejido recuperado tras la crioconservación. C: Plántulas de embrión somático creciendo en tarrinas de cultivo ventiladas con medio SH. D: Planta regenerada de línea embriogénica crioconservada, en contenedor forestal.	196

ÍNDICE DE TABLAS	Pg.
Tabla 1: Fechas de inicio y primeros resultados de inducción de embriogénesis somática obtenidos en diferentes especies de pino.....	21
Tabla 2: Parámetros cualitativos analizados durante la recogida de 2003.....	55
Tabla 3: Resultados de los parámetros analizados.....	55
Tabla 4: Valores medios de los parámetros peso, longitud (L) y diámetro (Ø), para los 5 genotipos y fecha de recogida en 2003.....	56
Tabla 5: Embriones cigóticos 2003. Proliferaciones inducidas (%) a los 30 días en los medios de iniciación, en cinco familias de semihermanos.....	61
Tabla 6: Embriones cigóticos 2004. Proliferaciones inducidas (%) a los 30 días en los medios de iniciación, en siete familias de semihermanos.....	62
Tabla 7: Modificaciones en los micronutrientes, reguladores del crecimiento y contenido en sacarosa en los medios de cultivo empleados para la iniciación y mantenimiento de los tejidos embriogénicos.....	69
Tabla 8: Iniciación de embriogénesis somática en <i>Pinus pinea</i> . Efecto del medio de cultivo en la frecuencia (%) de embriones cigóticos iniciales formando líneas embriogénicas establecidas, dependiendo del año (cinco familias, y seis y ocho fechas de recogida en los años 2005 y 2006 respectivamente).....	73
Tabla 9: Porcentaje de explantos (estróbilos masculinos) con proliferación en cada uno de los genotipos y medio de cultivo ensayado.....	87
Tabla 10: Porcentaje de explantos (acículas y HIA) con proliferación en cada uno de los genotipos, tipo de explanto inicial y medio de cultivo.....	95
Tabla 11: Material emitido por genotipo para su introducción en cultivo, en estacas tratadas y no tratadas con BAP.....	97
Tabla 12: Porcentaje de inducción de proliferaciones en yemas y HIA.....	98
Tabla 13: Fechas de emisión de braquiblastos en los genotipos ensayados.....	102
Tabla 14: Porcentaje de yemas con proliferaciones inducidas, a las 3 semanas en cultivo.....	103
Tabla 15: Porcentaje de HIA con proliferaciones inducidas, a las 3 semanas en cultivo.....	105
Tabla 16: Efecto del procedimiento de subcultivo en el incremento del peso fresco relativo total (IT1, IT2, IT3) del material embriogénico en proliferación, al término de cada subcultivo mensual.....	118
Tabla 17: Efecto del CA durante el precondicionamiento del tejido embriogénico, forma de aplicación y concentraciones de ABA, en el número de embriones somáticos maduros en 250 mg de tejido y por línea embriogénica, a las 16 semanas en cultivo.....	135
Tabla 18: Análisis de la varianza del crecimiento proliferativo de los cultivos y del número de embriones maduros normales y aberrantes, a las 12 semanas. Los datos referentes al crecimiento corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA y a seis y dos líneas embriogénicas. Los datos referentes al	

número de embriones maduros corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA y dos líneas embriogénicas.	137
Tabla 19: Embriones normales y aberrantes en 250 mg de tejido, a las 16 semanas en cultivo. Los valores corresponden a material subcultivado y no subcultivado, y tratado con distintos niveles de ABA.	139
Tabla 20: Análisis de la varianza del número de embriones maduros normales y aberrantes, a las 16 semanas en cultivo. Los datos corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA y dos líneas embriogénicas.	139
Tabla 21: Análisis de la varianza del incremento relativo de peso fresco de los cultivos, a las 4, 8 y 12 semanas. Los datos corresponden a cuatro líneas embriogénicas, cuatro tratamientos con anti-auxina y un control.	143
Tabla 22: Embriones aberrantes en 250 mg de tejido, a las 16 semanas en cultivo. Los valores corresponden a las líneas 1F11 y 2F47, en el control y en cada uno de los tratamientos con PCIB. Se muestra la relación de embriones normales/aberrantes totales formados.	145
Tabla 23: Porcentajes de germinación en medio AFC de los embriones somáticos obtenidos en el ensayo de maduración 5.1.2.	162
Tabla 24: Porcentajes de germinación en medio AFC de los embriones somáticos obtenidos en el ensayo de maduración 5.1.3, a las 8 semanas en cultivo, en función de los tratamientos previos a las condiciones de germinación.	165
Tabla 25: Porcentaje de embriones germinados que desarrollan raíz y epicótilo en medio SH con y sin PGRs, después de tres meses en cultivo.	166
Tabla 26: Porcentaje de plántulas aclimatadas en condiciones de alta humedad.	167
Tabla 27: Preparación de las soluciones sorbitol/DMSO en función de la concentración final de DMSO utilizada por criovial, en cada uno de los tratamientos.	182
Tabla 28: Incremento relativo en peso fresco de cultivos embriogénicos después de pretratamientos con 0.4 M sorbitol y tres concentraciones de DMSO y congelación en NL, durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha tratado con crioprotectores ni congelado.	193
Tabla 29: Crecimiento en peso fresco de cultivos embriogénicos después de pretratamientos con crioprotectores y congelación en NL, en relación al crecimiento de los cultivos control (=100%), durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha pretratado ni congelado.	193
Tabla 30: Tasa de crecimiento de cultivos embriogénicos en varios subcultivos bisemanales, después de pretratamientos con crioprotectores y congelación en NL. El control es tejido que no se ha pretratado ni congelado. Los datos son el cociente entre el peso alcanzado en cada subcultivo y el peso inicial.	194
Tabla 31: Nivel de significación al 5% de probabilidad según ANOVA de la recuperación del crecimiento de cultivos embriogénicos pretratados y crioconservados, en diferentes subcultivos. Los datos corresponden a seis líneas embriogénicas y cuatro tratamientos (control, 4,5% DMSO, 7,5% DMSO y 15% DMSO).	194
Tabla 32: Número de embriones normales maduros en 250 mg de tejido embriogénico, obtenidos en distintas condiciones de maduración; ne: no ensayado.	196

ÍNDICE DE ANEXOS	Pg.
Anexo 1: Composición de los medios basales DCR (Gupta y Durzan, 1985), LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984; macronutrientes diluidos a la mitad), 505 (Pullman y Johnson, 2002), mLV ₂ (Park y col., 2006), mLV (Klimaszewska y col., 2001), AFC (Bonga, 2004), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y Harvengt (Harvengt, 2005).....	237
Anexo 2: Medios de cultivo empleados en explantos embrionarios: embriones cigóticos maduros (ECM) y embriones cigóticos inmaduros (ECI).....	238
Anexo 3: Medios de cultivo empleados en explantos no embrionarios.....	239
Anexo 4: Incremento relativo de peso fresco de seis líneas embriogénicas controles (no tratadas con agentes crioprotectores), pretratadas con agentes crioprotectores, y pretratadas con agentes crioprotectores y congeladas, durante cuatro subcultivos bisemanales.....	240

RESUMEN

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una de las especies arbóreas más características de la flora mediterránea, con gran importancia ecológica, social y económica. Debido a su rusticidad y porte aparasolado puede considerarse como especie destinada a usos paisajísticos y recreativos, pero su aprovechamiento principal es el fruto (piñones comestibles), siendo España uno de los países con mayor producción. La mejora genética de esta especie va orientada fundamentalmente a una utilización agronómica y requiere la identificación de individuos buenos productores de piña y piñón. El pino piñonero se muestra recalcitrante en su capacidad morfogénica, por lo que es necesario desarrollar técnicas de propagación vegetativa eficaces que permitan la mejora de esta especie.

La embriogénesis somática es un proceso *in vitro* que incluye el desarrollo de masas embriogénicas en embriones bipolares capaces de madurar, germinar y aclimatarse a condiciones *ex vitro*. Hoy se considera como la vía más adecuada para la micropropagación clonal de especies forestales, alcanzándose recientemente grandes progresos en las coníferas. Este trabajo se ha centrado en el estudio de determinados aspectos de la embriogénesis somática, utilizada como vía para la regeneración clonal de árboles selectos de pino piñonero, siendo la primera vez que se ha abordado esta técnica de micropropagación en esta especie. La memoria de tesis se ha dividido en varios capítulos, que se corresponden con las sucesivas fases del proceso: inducción de la respuesta embriogénica, proliferación y mantenimiento del material embriogénico inducido, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones en plantas. Además se ha evaluado el efecto de la crioconservación sobre la recuperación del crecimiento de distintas líneas embriogénicas.

Se ha estudiado la respuesta embriogénica de diferentes tipos de explantos, tanto embrionarios (embriones cigóticos maduros e inmaduros) como no embrionarios (estróbilos femeninos, estróbilos masculinos, acículas en expansión, yemas y hojas de inserción aislada). Para ello se han ensayado distintas condiciones de inducción, donde se ha evaluado la influencia de factores como el genotipo, la composición del medio nutritivo, y tipos y niveles de reguladores del crecimiento. Únicamente se ha conseguido la respuesta embriogénica a partir de explantos embrionarios, aunque con los no embrionarios se han obtenido respuestas prometedoras. Las mayores frecuencias de inducción se han obtenido

con los embriones cigóticos inmaduros. El protocolo de inducción se ha basado en el cultivo de megagametofitos completos, la aplicación de los reguladores del crecimiento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y BAP (6-bencilaminopurina), y un aporte de nitrógeno orgánico. El tejido embriogénico aparece en forma de extrusión en el extremo del micropilo del megagametofito. La proliferación del material embriogénico se ha llevado a cabo en el medio de inducción modificado, manteniéndose ésta capacidad proliferativa con el tiempo, siendo su potencial multiplicativo muy alto. Para el mantenimiento de las líneas embriogénicas se han realizado subcultivos bisemanales a medio de cultivo fresco. La diferenciación de los embriones somáticos ha requerido un precultivo de las masas embriogénicas en medio con los nutrientes reducidos y bajas concentraciones de reguladores; posteriormente, las masas se han disgregado en medio con carbón activo, cultivándose en presencia de ABA (ácido abscísico) y alto contenido osmótico. La desecación parcial de las masas embriogénicas ha favorecido la maduración. Cuando los embriones alcanzan el estado cotiledonar se ha procedido a su germinación, y a la transferencia a condiciones *ex vitro* de las plantas somáticas para su aclimatación.

Las frecuencias de iniciación de tejido embriogénico en el pino piñonero han sido relativamente bajas, pero similares a las obtenidas inicialmente en otras especies del género *Pinus*. Se sugiere la existencia de una ventana en el desarrollo del embrión cigótico más sensible a la inducción, pues las mayores respuestas se han obtenido cuando el embrión se encontraba entre el estado de poliembrión de partición y el estado cotiledonar inicial. El medio de cultivo y los reguladores del crecimiento también han influido en las frecuencias de iniciación, obteniéndose los mejores resultados con el medio Litvay modificado, suplementado con L-glutamina e hidrolizado de caseína y la combinación de 9 μM de 2,4-D y 4,5 μM de BAP. Se ha observado una fuerte influencia del genotipo en las fases de inducción, proliferación y maduración de los embriones somáticos. La maduración de los embriones somáticos se ha visto afectada por la elevada de proliferación de los cultivos, no obstante se han obtenido tasas de maduración similares a las de otras especies de pinos. La germinación de los embriones somáticos se ha mejorado realizando un tratamiento pregerminativo de los cultivos en frío. La germinación de los embriones se ha visto influenciada por su posición en los medios de cultivo, obteniéndose mayores frecuencias cuando se disponen en las placas en posición horizontal y éstas se inclinan 40°. El desarrollo de las plántulas se ha estimulado modificando el medio de cultivo y la

intensidad luminosa. Se ha logrado la regeneración de plantas a partir de los embriones germinados, a través de la optimización de las fases de maduración y germinación.

Se ha desarrollado un protocolo de crioconservación de líneas embriónicas de pino piñonero, lo que evitaría la pérdida de vigor y capacidad morfogénica de las masas embriónicas por el cultivo prolongado. Se ha evaluado la influencia de los agentes crioprotectores (sorbitol y DMSO) en la viabilidad del material embriónico, observándose un cierto grado de toxicidad que revierte con los subcultivos además de la influencia del genotipo en la respuesta. La recuperación del crecimiento de las líneas embriónicas crioconservadas pasa por una fase de latencia, igualándose al crecimiento de las líneas no crioconservadas con los subcultivos. La mezcla de 0,4 M de sorbitol y 15 % de DMSO ha proporcionado la mayor tasa de recuperación. Ha sido posible la maduración y germinación de los embriones somáticos procedentes del material crioconservado, obteniéndose embriones capaces de convertirse en plantas.

SUMMARY

Stone pine (*Pinus pinea* L.) is one of the most characteristic tree species of the Mediterranean basin because of its ecological, social and economical importance. Due to its rusticity and its singular umbrella shape, it can be used for ornamental planting and recreational purposes, but edible seeds (pine nuts) are its main product, being Spain one of the countries with major production. Stone pine breeding program is mainly focused on giving an agronomic value to this species and needs the identification of high productive genotypes. Stone pine is a recalcitrant species for morphogenic ability. Therefore, developing vegetative propagation technologies for the improvement of this species is of paramount importance.

Somatic embryogenesis is an *in vitro* process that includes the development of embryogenic masses into bipolar embryos that are able to differentiate, germinate and acclimatize to *ex vitro* conditions. At present, it is considered as the most suitable way for clonal micropropagation of forest species, having conifers achieved great progresses recently. This study focuses on some aspects of somatic embryogenesis for clonal regeneration of selected Stone pine trees. This thesis has been divided into several chapters, related to the consecutive phases of the process: induction of the embryogenic response, proliferation and maintenance of embryogenic cultures, maturation of somatic embryos, somatic embryo germination and conversion. The effect of cryopreservation on growth recovery of different embryogenic lines has also been studied.

The embryogenic response has been studied in explants of different origins, embryonic (mature and immature zygotic embryos) and non embryonic (male and female strobili, expanding needles, shoot apices and brachiblasts leaves). Different induction conditions have been tested evaluating the influence of factors like genotype, basal medium components, and types and levels of plant growth regulators. Embryogenic response has only been achieved on embryonic explants, although promising responses have been obtained in non embryonic. The highest induction frequencies have been achieved on immature zygotic embryos. For induction, whole megagametophytes have been cultured and the application of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid), BAP (6-benzylaminopurine) and organic nitrogen has been necessary. The embryogenic tissue is produced from the micropylar end of megagametophytes and its proliferation has been carried out in the induction media with slight modifications, without declining the

multiplication ability with time. The embryogenic lines have been subcultured biweekly onto fresh maintenance medium. A preculture of embryogenic masses in a medium with reduced components and low concentrations of growth regulators has been required for somatic embryos differentiation; then, masses have been suspended in liquid medium with activated charcoal and the suspension has been cultivated in the maturation media supplemented with ABA (abscisic acid). Once somatic embryos reach the cotyledonary stage germination is carried out.

Although the induction of somatic embryogenesis in Stone pine is achieved at very low frequency, it has been very similar to those obtained in initial studies of other species of pines. It is suggested the existence of a developmental window that could be more prone to induction, as the highest frequencies of SE induction occurred when zygotic embryos were in the cleavage polyembryony to initial cotyledonary stages. The culture medium composition and plant growth regulators have also influenced on induction frequencies, being a modified Litvay's medium supplemented with L-glutamine, casein hydrolysate, 9 μM 2,4-D and 4.5 μM BAP the most suitable one. A strong influence of genotype has been observed on induction, proliferation and maintenance phases. Vigorous proliferation of embryogenic tissue has hampered differentiation and maturation of somatic embryos, even though similar maturation rates to other pine species have been obtained. The culture of somatic embryos at low temperature has improved their germination. Embryo position in the culture medium also has influenced its germination, having higher frequencies when embryos are placed horizontally on medium and tilting the Petri dishes to a slanted position at an angle of approximately 40°. Regeneration of plants from somatic embryos has been achieved, through the optimization of maturation and germination phases.

A cryopreservation protocol for embryogenic lines of Stone pine has been developed, which would avoid the loss of vigour and morphogenic ability of embryogenic lines due to prolonged cultures. The influence of cryoprotective agents on the viability of embryogenic tissue (sorbitol and DMSO) has been evaluated, noticing a slight degree of toxicity that reverts with subcultures, an influence of genotype in the response has also been observed. The regrowth of cryopreserved embryogenic lines goes through a lag phase. The combination of 0.4 M sorbitol and 15 % de DMSO has proportioned the highest recovery rates. Maturation of somatic embryos from cryopreservation and its germination has been possible.



1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LA ESPECIE

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) pertenece a la familia *Pinaceae*, subgénero *Pinus* y es el único representante de la sección *Pinea*. Únicamente se conocen dos variedades: *correvoniana* Hornib., de forma enana, y *fragilis* Duhamel, o también conocida como variedad de testa blanda por tener una cubierta muy porosa, característica que permite partir los piñones con los dedos (Prada y col., 1997).

Su temperatura media anual debe ser de 9-21° C, aunque soporta puntualmente temperaturas desde -20° hasta +41° C. Esta termofilia establece su límite altitudinal en los 1.000 m; encontrándose el 50% de la masa forestal peninsular entre los 0-400 m, el 40% entre los 400-800 m y el 10% restante corresponde a altitudes superiores a los 800 metros (Montoya, 1989).

El pino piñonero es propio de climas mediterráneos y como tal, resiste bien las condiciones de sequía estival, aunque requiera precipitaciones anuales de 250-300 mm y en ocasiones, se presenta en zonas con 1.500 mm anuales. En zonas de sequía estival, requiere al menos precipitaciones de 50 mm si el nivel freático es accesible; si no lo es, necesita al menos de 75-100 mm. Puede clasificarse como heliófilo, xerófilo y relativamente termófilo. Es muy poco exigente en cuanto a nutrientes, sin embargo, presentan claras exigencias en cuanto al nivel de aireación del suelo. Tiene preferencia por los suelos arenosos, sueltos, profundos y algo frescos con un pH que varía de 4 a 9, lo que da idea de la gran adaptabilidad de esta especie (Ceballos y Ruiz de la Torre, 1971; Montoya, 1989).

El piñonero rechaza los suelos pesados y arcillosos que pueden sufrir encharcamientos, prefiriendo los granitos, gneis y arenas. Su perfecta adaptación a las arenas ha permitido su utilización en trabajos de contención de dunas, en los que se muestra muy superior al pino resinero y a la mayor parte del resto de las especies arbóreas. Esta especie puede competir con éxito, a cambio de disminuir su porte arbóreo, en climas

demasiado secos y continentales, o con presencia de las anteriormente mencionadas arenas o dunas.

La longevidad de sus individuos oscila entre los 200-250 años, llegando al estado adulto a los 15-20 años. Puede alcanzar alturas de 20-25 m en condiciones óptimas de suelo y clima. Presenta un tronco robusto, recto, cilíndrico y corto, con ramificación abundante. En la juventud la copa es esférica y en árboles adultos aislados ésta es aparasolada. La forma aparasolada es consecuencia de su escasa dominancia apical, es decir, la yema terminal del árbol no domina con su crecimiento a las yemas terminales de las ramas, que crecen tanto como ella misma. El diámetro de la copa alcanza normalmente unos 15 metros, llegando de forma excepcional hasta los treinta en pinos que crecen aislados. Sin embargo, en espesura el diámetro de la copa se reduce alcanzando unos 3-5 metros.

Las acículas se disponen en fascículos de dos insertos en braquiblastos, que surgen de yemas axilares de las escamas que cubren la yema terminal en reposo (Fig.1). Las hojas juveniles son de inserción aislada y directa sobre el tallo, de color verde-azulado.



Figura 1: Braquiblastos del pino piñonero.

Tras procesos de poda, es frecuente encontrar ramillos con acículas de inserción aislada en árboles jóvenes y en pies adultos. Los cotiledones se presentan normalmente en número de 10 a 13; son de sección triangular, con borde aserrado y ápice agudo. Las yemas son gruesas, de 6 a 12 mm de largo, aovadas y agudas en su extremo, no resinosas, con

escamas de color pardo, franjeadas de blanco. Los brotes son delgados de color pardo a verde grisáceo (Prada y col., 1997).

El pino piñonero se extiende por la cuenca mediterránea, desde Portugal hasta el Líbano (Fig. 2). Es en España donde esta especie ocupa mayor superficie (316.746 has) seguida de Portugal (78.188 has). Se ha introducido con éxito en el Norte de África, principalmente en Túnez, Argelia y Marruecos.



Figura 2: Distribución del pino piñonero (Fady y col., 2004).

En España aparece en Andalucía, Cataluña, en las dos Mesetas, así como pies sueltos o pequeños rodales en Baleares y el litoral levantino. Según datos extraídos del Anuario de Estadística Forestal (MARM, 2006), la superficie por comunidades autónomas es la siguiente: Andalucía 159.846 has, Castilla León 49.718 has, Castilla La Mancha 53.521 has, Cataluña 39.542 has y Madrid 14.119 has.

Prada y col., (1997) delimitan siete regiones de procedencia para esta especie y cuatro procedencias de área restringida (ambientes alejados de su óptimo ecológico, suponiéndose que mantienen una estructura genética peculiar que debería conservarse) (Fig.3).

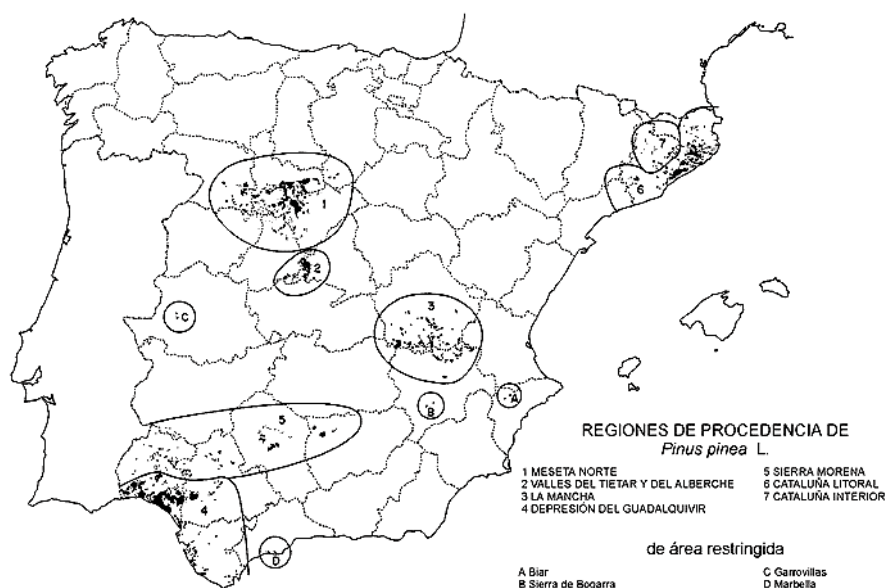


Figura 3: Regiones de procedencia y procedencias de área restringida delimitadas para el pino piñonero.

Montero y Cañellas (2000) consideran que, en base a su condición de árbol *frutal*, el factor humano podría haber influido en su actual distribución geográfica siendo por ello más difícil situar su origen. Algunos autores lo citan como originario de la isla de Chipre, pero la idea de que el centro difusor se encuentra en la Península Ibérica cada vez gana más fuerza debido a que en ella existe más del 60% de las masas consideradas naturales.

1.2. REPRODUCCIÓN

Los órganos reproductores se denominan **estróbilos**, son unisexuales y se presentan de forma independiente en el mismo árbol. Los estróbilos masculinos se sitúan en las ramas del tercio inferior de la copa, generalmente en posición horizontal, y los femeninos aparecen erguidos y dominando a la yema apical, insertándose en ramas vigorosas del tercio superior de la copa. Los **estróbilos masculinos** aparecen de marzo a mayo y son oblongo-cilíndricos, numerosos y pequeños (Fig. 4A). Están constituidos por escamas membranosas que se ordenan helicoidalmente sobre un eje central, en espigas alargadas que albergan los microesporangios, que a su vez contienen cada uno de ellos dos sacos polínicos. Los **estróbilos femeninos** en el momento de la polinización están constituidos

por numerosas brácteas, en las axilas de las cuales aparecen las escamas ovulíferas, cada una de ellas con dos óvulos o megaesporangio en su base. Estas estructuras forman las inflorescencias estrobiliformes o piñas. (Fig. 4B).

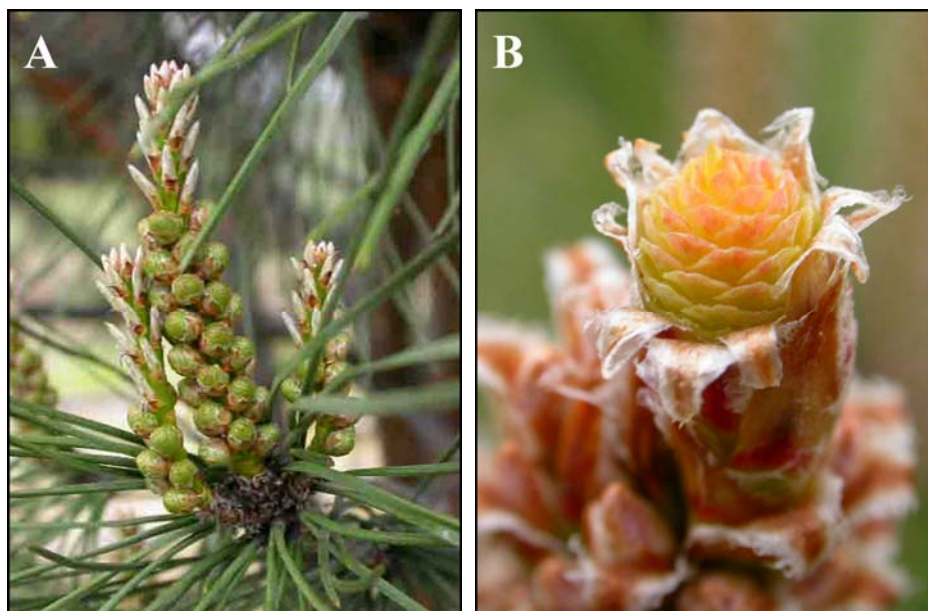


Figura 4: Floración en pino piñonero a principios de mayo. **A:** Estróbilos masculinos **B:** Estróbilo femenino, donde se aprecian las escamas abiertas.

A diferencia de otros pinos el desarrollo completo del ciclo en el piñonero, desde la iniciación de los primordios florales en la yema hasta la maduración de las semillas, comprende tres periodos vegetativos para madurar (Fig. 5). La fecundación de las ovocélulas se produce dos años después de la polinización, por lo que ese año de más se invierte en el desarrollo del gametofito.



Figura 5: Desarrollo de las piñas a lo largo de la polinización-fecundación.

Durante el **primer periodo vegetativo**, los estróbilos femeninos aparecen sobre un pedúnculo erecto en la parte más alta del árbol. En este momento, las escamas ovulíferas que constituyen el estróbilo femenino permanecen abiertas, preparándose de este modo para el proceso de polinización (Fig.4). La **polinización** consiste en el desplazamiento del polen por el viento desde los estróbilos masculinos (situados en la parte más baja de la copa del árbol) hasta el interior de las escamas ovulíferas, de manera que éstas se hinchan y se cierran. Una vez que ha entrado el polen, éste germina formando los tubos polínicos, cuya función será la de conducir los dos núcleos espermáticos hasta los arquegonios donde se producirá la fecundación en el tercer año.

Durante el **segundo periodo vegetativo** los tubos polínicos se alargan y además, se sintetizan sustancias de reserva necesarias para nutrir al futuro embrión, iniciándose el desarrollo del megagametofito aunque la piña aumenta muy poco su tamaño.

En el **tercer periodo vegetativo** los tubos polínicos penetran dentro del óvulo produciéndose la **fecundación**. Según la descripción de Abellanas (1990), al comienzo de la embriogénesis el cigoto sufre dos divisiones mitóticas, de manera que los cuatro núcleos pre-embriónicos emigran a la base de la ovocélula, pero sin haber formado aún paredes divisorias entre ellos. Los núcleos se sitúan aquí formando una sola capa y cada núcleo vuelve a dividirse. Se forman paredes celulares entre los ocho núcleos dando lugar a dos capas de cuatro células cada una. Cada célula se divide de nuevo constituyéndose un pre-embrión de dieciséis células y cuatro capas. La capa proximal permanece abierta hacia el citoplasma de la ovocélula y aparentemente absorbe nutrientes de ésta. La capa adyacente a ésta no tiene función conocida. La siguiente capa constituye el suspensor primario, que se alarga y transporta la capa distal hacia el interior del gametofito, donde se empieza a formar una cavidad de corrosión que permite el paso y el crecimiento del embrión. Las células de la capa apical se dividen nuevamente formando células apicales distales que dan lugar al embrión, y células cuyo alargamiento provoca la emigración del embrión a mayor profundidad del gametofito, constituyendo los suspensores secundarios multicelulares. Durante este tercer año, se completa el crecimiento de los óvulos así como del cono, adoptando una forma globosa de unos 10-14 x 7-9 cm (Fig. 6).

Aunque se ha descrito que es genéticamente muy uniforme, en parte basado en el análisis de diversidad de ADN de cloroplastos de un gran número de orígenes (Fady y col., 2004; Prada y Mutke, 2008), se ha indicado la existencia de una variación clonal en la floración y una heredabilidad en sentido amplio de este carácter, lo que podría permitir su utilización en programas de mejora (Abellanas, 1990).



Figura 6: Piña de tercer año, imagen tomada en el mes de mayo.

La dehiscencia de las piñas y la caída del piñón se produce en la primavera del cuarto año desde la formación de la flor. Las semillas o piñones presentan un tamaño medio de 15-20 x 6-11 mm, con una cubierta externa no estructurada que da lugar a un polvillo marrón oscuro, una cubierta media leñosa de color marrón claro y una cubierta interna, papirácea, castaño lustrosa, que recubre a un megagametofito color crema que encierra en su interior al embrión. Su ala es rudimentaria, articulada y rápidamente caduca por lo que la diseminación de esta especie por el viento no es muy eficaz, alejándose muy poco de su progenitor; esta limitación se ve contrarrestada por el movimiento de las semillas realizada por pequeños animales (Prada y col., 1997).



Figura 7: Piña de cuarto año mostrando dos piñones por escama ovulífera. Piñones con cubierta externa y piñones con cubierta papirácea.

La embriogénesis cigótica en coníferas se caracteriza por la existencia de poliembrionía, que puede ser simple o de partición. La **poliembrionía simple** o arquegonial, consiste en la fecundación de más de un arquegonio por semilla y ocurre tanto en *Picea* como en *Pinus* (Singh, 1978). En la poliembrionía simple, cada pre-embrión es el resultado de la fecundación de los arquegonios por diferentes granos de polen, y por tanto, se producen pre-embriones genéticamente diferentes. Generalmente en la maduración, solo uno de ellos continúa el desarrollo mientras que los otros abortan. En el género *Pinus* también se puede producir la **poliembrionía de partición** o «cleavage» (Bucholz, 1926; Owens y Molder, 1984b) (Fig. 8). Los embriones son el resultado de la división de la capa

apical de células de un pre-embrión en cuatro filas de células, cada una de las cuales puede desarrollarse en un embrión, por lo tanto son genéticamente idénticos. Durante la maduración también uno de estos embriones se desarrolla como dominante, y el resto degeneran. El embrión dominante es empujado por el suspensor hacia la región central de megagametofito, donde rápidamente aumenta de tamaño ocupando el espacio de la cavidad de corrosión (Owens y Molder, 1984a y b). Generalmente, el suspensor se considera como el nexo entre el embrión y el tejido materno, siendo su principal función proporcionar nutrientes y reguladores del crecimiento al embrión durante las primeras fases de la embriogénesis. Una vez que el embrión ha completado su desarrollo el suspensor degenera (Umehara y Kamada, 2005).

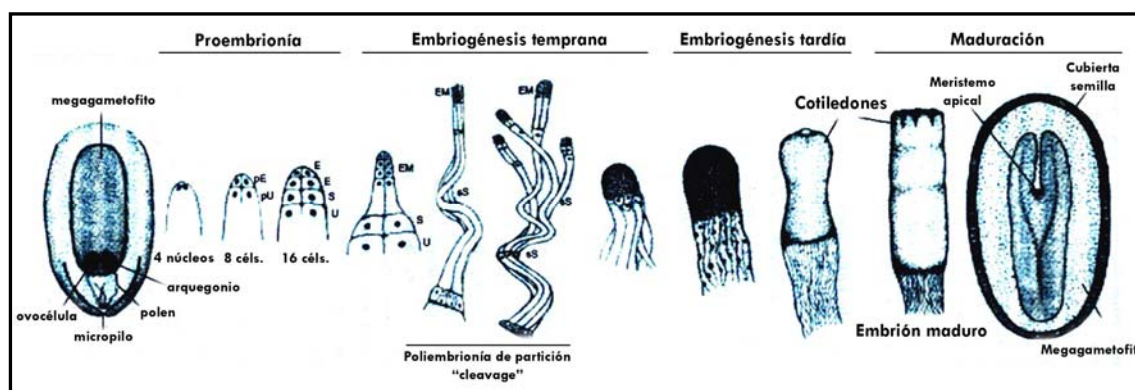


Figura 8: Desarrollo embrionario en el género *Pinus*. (Adaptación de von Arnold y col., 2002)

Filonova y col., (2002) muestran que, en semillas en desarrollo de *Pinus sylvestris*, el mecanismo responsable del desarrollo del embrión y la inhibición del desarrollo de los embriones subordinados procedentes del proceso de poliembrionía es la muerte celular programada de distintas estructuras. Estos autores describen la existencia de dos programas de muerte celular coordinados. Durante las primeras fases del desarrollo, los múltiples embriones comienzan a competir por las reservas, convirtiéndose en un factor limitante, y por el espacio dentro del megagametofito que necesitaría el embrión dominante. Esta competencia desencadena la muerte celular en determinadas regiones del megagametofito, de manera que las células resultantes se convierten en depósitos de nutrientes. El segundo programa de muerte celular elimina los embriones subordinados a través de su autólisis (Fig. 9).

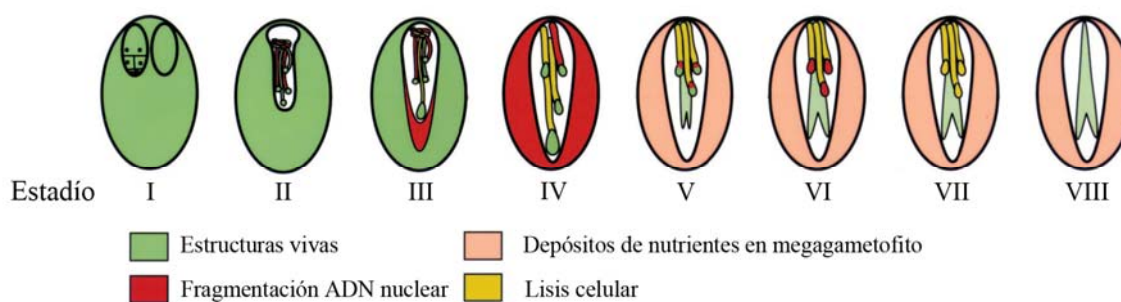


Figura 9: Modelo que muestra los dos programas de muerte celular durante el desarrollo de la semilla del género *Pinus*. El embrión cigótico (I) se divide formando múltiples embriones (II) que compiten por los reguladores y el espacio dentro del megagametofito, disparándose el primer programa de muerte celular en su interior (III). Este programa rápidamente progresa por todo el megagametofito (IV), convirtiéndose las células muertas resultantes en depósitos de nutrientes. A continuación, se dispara el segundo programa de muerte celular con el propósito de eliminar los embriones subordinados (V, VI y VII). (Adaptación de Filonova y col., 2002)

Se ha postulado que la poliembrionía es un carácter primitivo de las gimnospermas que actúa como mecanismo de selección postfecundación de los embriones en función de su vigor (Bucholz, 1926); y también como mecanismo adaptativo para la eliminación de los efectos de los embriones procedentes de autopolinización (Sorensen, 1982).

1.3. APROVECHAMIENTO

Se considera al pino piñonero como una especie frutal siendo la producción de piñones comestibles su principal **aprovechamiento**. Características tales como su alto contenido en ácido linoleico, aroma y sabor les convierten en parte de la dieta del hombre desde la antigüedad.

Los piñones presentan un alto contenido en grasas (43-51%) y un escaso contenido en agua (menos del 50% de su peso). Debido a esto, su aporte energético es elevado: 100 g de piñones aportan aproximadamente 600 Kcal. A pesar del alto contenido en grasa, el perfil nutricional de los piñones es excepcional pues la mayor parte de los compuestos lipídicos son ácidos grasos insaturados, representando el ácido oleico y el linoleico más del 84% de los ácidos grasos totales. Su concentración en proteínas es elevada (33-38%) si se compara con el resto de alimentos de origen vegetal, siendo la arginina el aminoácido que

aparece en mayor medida. También son fuente de hidratos de carbono y micronutrientes como el calcio, magnesio, cobre, manganeso, zinc, potasio, hierro, sodio, vitamina B1 y ácido fólico. El alto contenido en ácidos grasos insaturados potencia la disminución de los niveles de colesterol total y colesterol LDL, mejorando la salud cardiovascular siendo recomendable el uso del piñón en la nutrición humana. (Cañellas y col., 2000; Fundación Nucis, 2004).

Los principales países productores de piñón son España, Portugal, Italia, Túnez y Turquía. El comercio de piñón en España presenta una importancia creciente, así como la demanda de este producto a nivel mundial. Países europeos como Francia o Suiza importan grandes cantidades de producto de nuestro país, así como Oriente Medio y Norteamérica (Barranco y Ortuño, 2004). La competencia directa con el piñón mediterráneo es el piñón chino, procedente de otras especies de pino como *P. korainesis*, *P. bungeana* y *P. armandii*, de menor precio pero de peor calidad debido a su fácil enranciamiento (Prada y col., 1997). La alta producción de piñón se logra mediante la instalación de huertos clonales injertados y técnicas clásicas de producción de frutos secos. Se han establecido numerosos bancos clonales y plantaciones de evaluación de genotipos de interés para la producción de piña, principalmente en Castilla León, Andalucía y la Comunidad Valenciana, asumiendo una función de conservación *ex situ* de individuos de interés para programas de mejora genética y de genotipos con piñones de testa blanda (Prada y Mutke, 2008).

1.4. MEJORA GENÉTICA DE LA ESPECIE

En la actualidad muchos sectores consideran que la producción forestal no es una mera actividad extractiva, siendo útil desarrollar una silvicultura altamente productiva en áreas específicas usando prácticas agrícolas. Las actividades forestales deberían enfocarse en dos áreas: los bosques naturales, considerados como reservas de biodiversidad para usos tales como protección medioambiental, producción sostenible, actividades de ocio, etc.; y plantaciones forestales, donde se utiliza la variabilidad genética para incrementar el rendimiento de productos forestales (madera, corcho, semillas, frutos, etc.), siendo estas una garantía para evitar la presión en las áreas naturales. Las prácticas intensivas de mejora

cultural y genética están plenamente justificadas en la optimización de las producciones por unidad de superficie de las plantaciones, tanto las de interés agronómico como forestal. Los programas de mejora genética en especies forestales se complican, entre otras razones, por sus largos ciclos biológicos (crecimiento lento, floración tardía), la fuerte influencia de los procesos de maduración y las pobres correlaciones de los caracteres entre individuos jóvenes y adultos. Según la revisión de Toribio (2001), el desarrollo de herramientas biotecnológicas esta permitiendo en la actualidad acelerar la mejora genética de las especies forestales; considerando la regeneración de plantas mediante técnicas de cultivo de tejidos, la biotecnología que es capaz de dar una significación práctica a otras herramientas biotecnológicas (por ejemplo la biología molecular). Aunque las especies forestales se las considera recalcitrantes para las técnicas de cultivo *in vitro*, en la actualidad se han podido regenerar plantas a partir del cultivo de tejidos en muchas de ellas; convirtiéndose la regeneración clonal de árboles adultos vía embriogénesis somática, una realidad para algunas especies.

La heterocigosidad de las especies forestales unida al alto componente genético no aditivo que controla diversos caracteres de interés, hace necesaria la propagación vegetativa para la obtención de ganancias genéticas adecuadas (Zobel y Talbert, 1984), aplicándose en la actualidad con fines operativos en especies de los géneros *Cryptomeria*, *Populus*, *Salix* y *Eucalyptus*.

Las especies forestales poseen unas características biológicas que condicionan la mejora genética, como:

- Dificil accesibilidad por su gran porte, lo que dificulta el muestreo y las polinizaciones controladas.
- Crecimiento lento, y maduración y floración tardía, lo que determina largos ciclos de regeneración y por tanto la dificultad de evaluar las progenies.
- Producción irregular de semillas, dificultando el establecimiento de huertos semilleros.
- Falta de buena correlación entre el estado juvenil y adulto, lo que impide la selección precoz.

- Fuerte influencia del cambio de fase (ciclófisis y topófisis), que se traduce en la recalcitrancia a las respuestas morfogénicas *in vivo* e *in vitro*.

Las técnicas de propagación vegetativa a partir de células, tejidos o porciones de la planta donante deben ser fiables, reproducibles, aplicables a distintos genotipos, y altamente productivas. Es necesario que las plantas regeneradas sean fieles al individuo donante, no generándose variabilidad intraclonal, y además, que la técnica sea susceptible de automatización con el fin de reducir los costes de producción del sector forestal.

El pino piñonero es una especie de interés en el marco de programas de desarrollo rural y de forestación de tierras agrícolas abandonadas en la Península Ibérica. Los pinares de piñonero (puros o en mezcla con *Pinus pinaster*) están considerados como hábitat prioritario para su conservación en Europa por la Directiva Hábitats (1992/43/CEE de 21 de mayo de 1992). Actualmente se planta ampliamente en el área mediterránea para protección ambiental: fijación de dunas, conservación de suelos y protección de cultivos agrícolas en zonas costeras. Además, por su gran valor ornamental se planta en parques y jardines de todo el mundo (California, Escocia y sur de Inglaterra), por ejemplo en Italia es un elemento tradicional del paisaje y en el sur de Francia fue un símbolo de libertad durante el Renacimiento (Fady y col., 2004). Sin embargo, su principal interés es el económico basado en la producción de piñón, incluyéndose en la lista de especies de comercialización de materiales forestales de reproducción.

Se han establecido programas de mejora genética en Castilla y León y en Andalucía basados en el establecimiento de bancos clonales y huertos semilleros, para la obtención de mayores rendimientos en la producción de piñón, ya que existe una gran variación entre individuos para este carácter (Abellanas y col., 2000; Gordo y col., 2000). El Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino gestiona el banco clonal establecido en el Centro Nacional de Mejora Genética Forestal (CNMGF) "Puerta de Hierro", perteneciente a la Dirección General de Medio Natural y Política Forestal, del que se han establecido réplicas en el CNMGF "El Serranillo"(Guadalajara), así como en fincas de otras instituciones tales como el IMIDRA en la finca "La Isla" (Arganda del Rey -Madrid), el IRTA en "Torre Marimón" (Caldes de Montbui-Barcelona) y la Junta de Castilla y León en Tordesillas (Sven Mutke, comunicación personal).

El pino piñonero se muestra recalcitrante para su propagación mediante estaquillado, asociándose principalmente con los efectos de ciclófisis y topófisis (Fig. 10). En estos programas se utiliza el injerto tradicional con el fin de reducir el tiempo de entrada en producción y facilitar la recolección en árboles de gran altura. Sin embargo, su desventaja más destacable es la variabilidad en la producción, debida a la interacción púa-patrón portainjerto y sus limitaciones estacionales.



Figura 10: Crecimiento ortotrópico y plagiotrópico observado tras el enraizamiento de brotes axilares de pino piñonero.

La regeneración basada en la tecnología del cultivo *in vitro* se considera el núcleo central de la biotecnología vegetal, a través del control de la capacidad morfogénica de los explantos mediante determinadas condiciones de cultivo, completando el potencial agronómico de otras técnicas biotecnológicas. Se ha descrito un protocolo de microinjerto en pino piñonero donde se evalúa la interacción púa-patrón (Cortizo y col., 2004). Los autores indican que con ésta técnica se salvan las limitaciones estacionales que impone el injerto tradicional, proporcionando mayores rendimientos y reducción en los costes tradicionales.

Entre las vías de regeneración por cultivo *in vitro* se encuentran la organogénesis (axilar y adventicia) y la embriogénesis somática. Se ha promovido la elongación de brotes axilares o preformados en tallos epicótilos en pino piñonero (Carneros y col., 2001). Se ha descrito la organogénesis adventicia, induciéndose la formación de brotes adventicios en

cotiledones de embriones cigóticos, y el enraizamiento posterior de dichos brotes (Diamantoglou y col., 1990; García-Férriz y col., 1994; Capuana y Giannini, 1995; González y col., 1998; Carneros y col., 2001; Valdés y col., 2001; Oliveira y col., 2003; Alonso y col., 2006; Cuesta y col., 2008). Sin embargo, el proceso organogénico tiene como limitaciones unas tasas de propagación bajas, la generación de variabilidad intraclonal, y la pérdida de capacidad morfogénica con la maduración.

En la actualidad, la biotecnología proporciona nuevas herramientas, añadidas a las convencionales, para la mejora genética de especies forestales. Entre estas herramientas se encuentra la embriogénesis somática (ES), la cual requiere un profundo conocimiento de la biología celular, señales bioquímicas, multiplicación, diferenciación y producción de clones; todo ello a partir de una célula simple o de un grupo de células diferenciadas o indiferenciadas vía cultivo *in vitro* (El-Kassaby 2004).

Las ventajas que proporciona la propagación por embriogénesis somática son la producción de un elevado número de plantas y la posibilidad de crioconservar a largo plazo las líneas embriogénicas, mientras que los árboles correspondientes son evaluados en campo (Merkle y Nairn 2005; Nehra y col., 2005). Estas dos técnicas combinadas permiten el desarrollo de programas de *silvicultura multivarietal* (Fig. 11), es decir, el uso en silvicultura de variedades forestales testadas (Park, 2002; Park y col., 2006). Existen muchas ventajas para la práctica de estos programas, incluyendo la producción de los mismos genotipos de forma continua a lo largo del tiempo, la captura de mayores ganancias genéticas, la flexibilidad de utilizar de forma rápida clones apropiados en función de los objetivos de mejora y/o las condiciones ambientales, y la capacidad de gestionar la diversidad y la ganancia genética en las plantaciones forestales (Park, 2002).

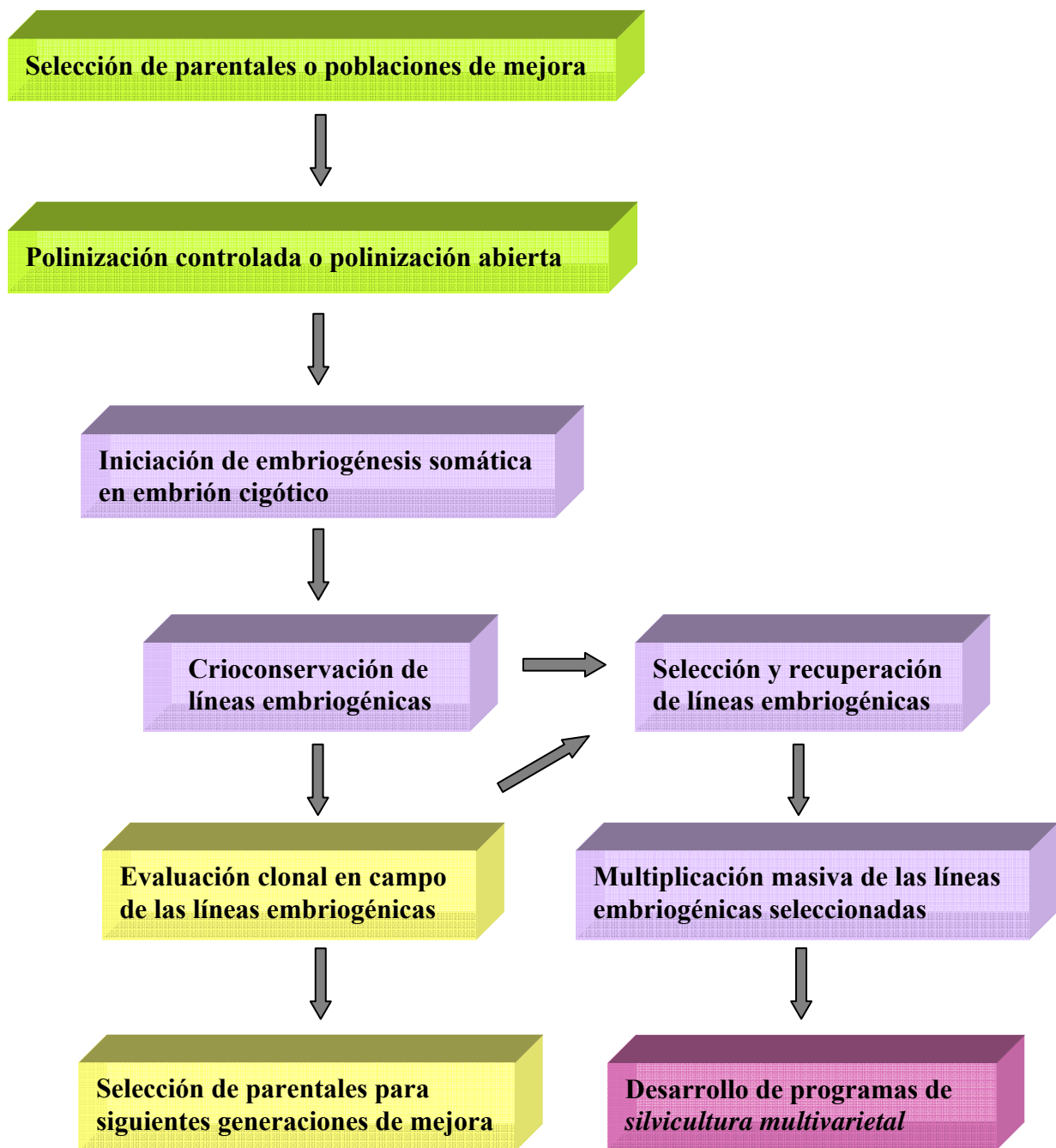


Figura 11: Estrategia de *silvicultura multivarietal* mediante embriogénesis somática.

1.5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Cuando los embriones no proceden de la fusión de gametos sino que se diferencian a partir de células somáticas, se denomina embriogénesis somática. Los embriones somáticos, al igual que los cigóticos, son capaces de germinar y convertirse en plantas. El fenómeno de embriogénesis asexual es posible encontrarlo en la naturaleza, sobre todo en angiospermas, como una forma de apomixis denominada *embriogénesis adventicia*, descrita por primera vez por Strasburger en 1878. A comienzos del siglo XX, Haberlandt (1902) predijo que si todas las células de un organismo tenían la misma información genética que la célula inicial o cigoto, sería posible revertir su expresión génica, de manera que volvieran a expresar el patrón de desarrollo embriogénico hasta formar auténticos embriones de origen somático. Los primeros trabajos en los que se logró esta expresión de la *totipotencia* de las células fueron publicados en zanahoria por Levine (1947), Reinert (1958) y Steward (1958). Desde entonces se han desarrollado protocolos para esta vía de regeneración en numerosas especies.

La embriogénesis somática presenta una serie de **ventajas** para considerarla como la vía más apropiada para la propagación clonal de especies forestales (Merkle y Dean, 2000; Sutton, 2002):

- ❖ La perfecta conexión vascular entre raíz y tallo, implica la ausencia de posible variación intraclonal generada por la conexión diferencial que se da entre distintas estaquillas enraizadas; y por otra parte, garantiza una mayor estabilidad en el desarrollo a largo plazo.
- ❖ La gran capacidad proliferativa garantiza la producción masiva de propágulos a lo largo del tiempo y sin condicionantes estacionales.
- ❖ La crioconservación del material embriogénico permite la evaluación de los clones mientras se conserva el potencial regenerativo, posibilitando el desarrollo de las denominadas estrategias de mejora-clonación («breeding-cloning strategies») y la aplicación práctica de una silvicultura clonal de alto valor («high value clonal forestry») (Park y col., 1998; Park, 2002).
- ❖ Los embriones somáticos pueden ser encapsulados, dando lugar a semillas artificiales que permitan, por ejemplo, forestaciones a gran escala.

- ❖ La posibilidad de desarrollar a nivel industrial el cultivo en biorreactores, en base a su elevado potencial multiplicativo y su posibilidad de automatización.
- ❖ Los cultivos embriogénicos se muestran como un elemento imprescindible en estudios de transformación genética (Tang y Newton, 2003), y de genómica funcional, a fin de validar genes relacionados con procesos determinados (Campbell y col., 2003).

En la familia *Pinaceae*, se ha descrito la obtención de embriogénesis somática en más de cuarenta especies e híbridos, pertenecientes a cinco géneros (*Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga*). No obstante, la mayoría de los estudios sobre el desarrollo del proceso se han realizado en *Picea*, particularmente en *P. abies*, *P. glauca*, *P. glauca* x *P. engelmannii*, y *P. mariana*, debido principalmente a la facilidad en la obtención de respuestas embriogénicas.

En coníferas, la embriogénesis somática se describió por primera vez en *Picea abies* (Chalupa, 1985; Hakman y col., 1985) a partir de embriones cigóticos. En el mismo año, se describió la obtención de ES en *Larix decidua* a partir del megagametofito (Nagmani y Bonga, 1985) y en *Pinus radiata* en embriones cigóticos (Smith y col., 1985). Después del primer trabajo de embriogénesis somática en *P. radiata*, el número de especies del género *Pinus* en los que se ha logrado inducir ES ha ido aumentando (Tabla 1).

Las coníferas son una fuente importante de madera y fibra para las industrias forestales y papeleras, donde la mayor actividad se realiza a nivel de empresas privadas como BioForest y GenFor (Chile), Rayonier, Rubicon, Carter-Holt-Harvey (Nueva Zelanda), Internacional Paper, Westvaco y Weyerhaeuser (USA), AFOCEL (Francia), JD Irving, Arborgen y CellFor (Canadá), que están produciendo miles de brinzales clonales para plantaciones; fundamentalmente con *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea mariana*, *Picea sitchensis*, *Pinus elliottii*, *Pinus pinaster*, *Pinus radiata*, *Pinus strobus*, *Pinus sylvestris*, *Pinus taeda* y *Pseudotsuga menziesii* (Cyr y Klimaszewska, 2002; Celestino y col., 2005; Klimaszewska y col., 2007).

Tabla 1: Fechas de inicio y primeros resultados de inducción de embriogénesis somática obtenidos en diferentes especies de pino.

Espece	Respuesta ^a	Referencia
<i>P. radiata</i> D.Don	ES	Smith y col., 1985
<i>P. lambertiana</i> Lamb.	ES, PL	Gupta y Durzan, 1986
<i>P. taeda</i> L.	ES, PL	Gupta y Durzan, 1987
<i>P. elliotii</i> Engelm.	ES	Jain y col., 1989
<i>P. strobus</i> L.	ES	Finer y col., 1989
<i>P. caribaea</i> Morelet	ES, PL	Lainé y David, 1990
<i>P. nigra</i> Arn.	ES	Salajová y Salaj, 1992
<i>P. palustris</i>	ES	Nagmani y col., 1993
<i>P. patula</i> Schiede et Deppe	ES, PL	Jones y van Staden, 1995
<i>P. pinaster</i> Ait.	ES	Bercetche y Pâques, 1995
<i>P. sylvestris</i> L.	ES	Keinonen-Mettälä y col., 1996
<i>P. koraiensis</i> Sieb et Zucc.	ES	Bozhkov y col., 1997
<i>P. banksiana</i> Lamb.	ES, PL	Park y col., 1999
<i>P. monticola</i> Dougl.	ES, PL	Percy y col., 2000
<i>P. roxburghii</i> Sarg.	ES	Arya y col., 2000
<i>P. kesiya</i>	ES	Deb y Tandon, 2002
<i>P. brutia</i> Ten.	ES	Yildirim y col., 2006
<i>P. armandii</i> Franch.	ES, PL	Maruyama y col., 2007
<i>P. rigida</i> x <i>P. taeda</i>	ES, PL	Kim y Moon, 2007

^a ES: embriones somáticos; PL: plantas

1.5.1. ORIGEN Y DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EMBRIOGÉNICO DE CONÍFERAS

Generalmente, para la iniciación de ES en coníferas se utilizan como explantos las semillas inmaduras, cuando el embrión cigótico dominante está en un estado de desarrollo precotiledonar y aún quedan embriones subordinados, habiendo transcurrido entre 3-6 semanas después de la fecundación (Becwar y col., 1990). El tejido embriogénico aparece en el extremo del micropilo del megagametofito. Si se disecciona el megagametofito, se observa que el tejido extruye de la región del suspensor del embrión, no del megagametofito. Según Becwar y col., (1991), la iniciación del tejido embriogénico puede originarse a partir de uno o más de los embriones subordinados resultantes del proceso de «cleavage».

Gupta y Durzan (1987) describieron similitudes entre los estados tempranos de la embriogénesis somática con la poliembrionía de partición que tiene lugar *in vivo*. Estos autores sugirieron que los embriones somáticos iniciales pueden formarse vía des-

diferenciación de células del embrión cigótico, donde la poliembriogénesis juega un papel importante en la multiplicación de los embriones somáticos, y por tanto en la proliferación de los cultivos. También von Arnold y Hakman (1988) indicaron que los embriones somáticos pueden desarrollarse a partir de células meristemáticas presentes en el suspensor, o a partir de una división asimétrica inicial de una única célula o de pequeños agregados celulares presentes en la región intermedia entre la cabeza embrionaria y el suspensor.

El tejido embriogénico de coníferas tiene una morfología diferente a las masas embriogénicas inducidas en angiospermas, describiéndose como un tejido blanco, translúcido, hidratado y de consistencia mucilaginosa, con un alto grado de organización de células embrión-suspensor (MES) (Gupta y Durzan, 1987). Estas proliferaciones están constituidas por múltiples embriones en un estado de desarrollo muy inicial, que presentan una cabeza embrionaria con células meristemáticas de citoplasma denso, adherida a una región de células alargadas y altamente vacuoladas que corresponden a las células del suspensor. Estas zonas se diferencian en su afinidad para ser teñidas con acetocarmín y azul de Evans: las células embrionarias se tiñen de rojo mientras que las células vacuoladas del suspensor se tiñen de azul.

Filonova y col., (2000a y b) consideran que la mayoría de las células presentes en los cultivos embriogénicos en proliferación de *Picea abies* se agrupan en agregados, referidos como masas pre-embriogénicas (PEMs). Según estos autores, una PEM individual pasa por tres estados de desarrollo característicos (I, II y III) hasta su diferenciación en un embrión somático (Fig. 12). En el estado de desarrollo PEM I, el agregado celular se compone de un grupo compacto de células densamente citoplasmáticas adyacente a una única célula vacuolada. Agregados celulares similares, pero constituidos por más de una célula vacuolada se han clasificado como PEM II. En el estado de PEM III, se observa un agregado de mayor tamaño, y menos compacto, de células densamente citoplasmáticas con la polaridad distorsionada. La retirada de los reguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas) desencadena la formación del embrión desde el estado de PEM III, mientras que el ácido abscísico (ABA) es necesario para promover la maduración de los embriones somáticos.

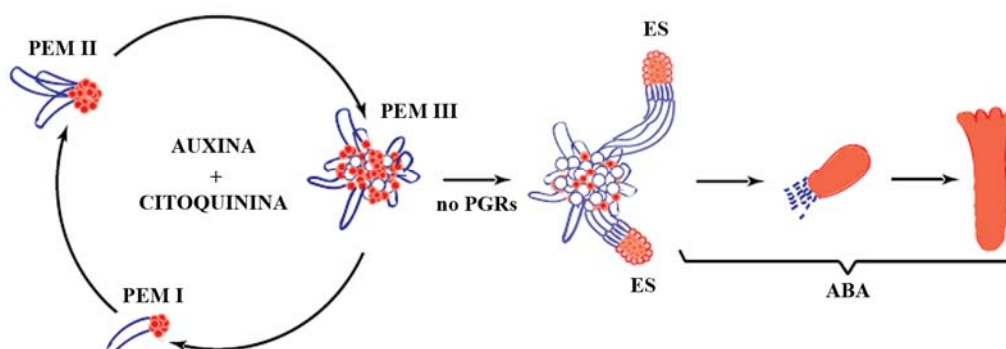


Figura 12: Desarrollo de los embriones somáticos en *Picea abies*. En rojo se representan las células embrionales teñidas con acetocarmín y en azul las células del suspensor teñidas con azul de Evans. PGRs: reguladores del crecimiento. (Adaptación de Filonova y col., 2000b).

1.5.2. FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El proceso de regeneración por embriogénesis somática consta de una serie de etapas: inducción de la respuesta embriogénica, mantenimiento y proliferación de las líneas embriogénicas, maduración de los embriones somáticos, germinación y conversión de los embriones en plantas.

INDUCCIÓN:

Ya que las células somáticas contienen toda la información genética necesaria para crear un organismo completo y funcional, la inducción de embriogénesis somática se basaría en la reprogramación de un patrón de expresión somático hacia un patrón de expresión embriogénico.

Se ha descrito que las condiciones de cultivo, la inclusión de PGRs (reguladores del crecimiento) y el estrés provocado por el cultivo, juegan un papel importante en la reprogramación del patrón de expresión génica (von Arnold y col., 2002; Fehér y col., 2003). El requerimiento de reguladores como las auxinas y las citoquininas en la iniciación de las respuestas embriogénicas, vendría determinado por el tipo de explanto inicial y su grado de desarrollo (von Arnold y col., 2002). Sin embargo, se ha indicado que en algunas

especies forestales es posible desencadenar la respuesta embriogénica en explantos cigóticos muy inmaduros sin la presencia de reguladores; entre estas especies encontramos tanto angiospermas, *Quercus suber* (Fernández-Guijarro, 1997), como gimnospermas, *Pinus sylvestris* y *Pinus pinaster* (Lelu y col., 1999) y *Araucaria angustifolia* (Silveira y col., 2000).

La **selección adecuada de los explantos** es crítica para conseguir con éxito la inducción de ES (Tautorus y col., 1991), asumiéndose que la posibilidad de obtener la respuesta disminuye con la edad ontogénica del explanto (Lelu y col., 1987). Los embriones cigóticos inmaduros son el material idóneo para la inducción de ES en *Pinus*, *Larix* y *Pseudotsuga* (Tautorus y col., 1991; Attree y Fowke, 1993; Bonga y col., 1995; Gupta y col., 1995; Jasik y col., 1999; Park y col., 1999; Klimaszewska y Cyr, 2002), obteniendo frecuencias mucho menores en embriones cigóticos maduros. Sin embargo, en algunas especies de *Picea* y *Abies* se han obtenido mejores resultados con semillas maduras (Zoglauer y col., 2003).

La determinación precisa del estado de desarrollo del embrión cigótico en el género *Pinus* es un factor crítico en la iniciación de la embriogénesis somática (Lelu y col., 1999). Keinonen-Mettälä y col., (1996), describieron en *P. sylvestris*, una *ventana de respuesta* comprendida desde el momento de la fecundación hasta el establecimiento del embrión dominante, aunque las mayores frecuencias de inducción se obtenían en embriones en sus primeras fases del desarrollo, coincidiendo con el proceso de poliembrionía de partición (Lelu y col., 1999). Un patrón similar se ha descrito en *P. strobus* (Klimaszewska y col., 2001). En *P. pinaster*, las mayores frecuencias de iniciación se obtenían en embriones cigóticos en estado precotiledonar (Bercetche y Pâques, 1995; Lelu y col., 1999; Miguel y col., 2004).

Por regla general, cuando se utilizan semillas inmaduras se cultivan los megagametofitos completos, sugiriéndose que el megagametofito suministra nutrientes y/o fitohormonas endógenas al embrión cigótico, cuando las concentraciones en el medio de cultivo resultan subóptimas para la inducción. Becwar y Pullman (1995) describieron en *Pinus taeda* que las frecuencias de inducción eran más bajas cuando se empleaban embriones cigóticos aislados de los megagametofitos frente a completos.

La utilización de embriones cigóticos inmaduros en la inducción presenta una serie de inconvenientes: su disponibilidad se restringe a un periodo anual determinado y corto, y la posible heterogeneidad genética en los cultivos embriogénicos causada por la poliembrionía. Este tipo de poliembrionía se basa en la fecundación de más de un arquegonio por semilla, pudiendo variar el número de arquegonios entre uno y siete en algunas especies de pinos (Klimaszewska y col., 2007). La fecundación de múltiples arquegonios por diferentes granos de polen origina múltiples embriones cigóticos genéticamente diferentes. Conjuntamente, la poliembrionía de partición ocurre en las especies de pino, donde el embrión procedente de cada fecundación produce cuatro embriones genéticamente idénticos. La ES en muchas especies de coníferas está restringida a embriones cigóticos inmaduros, siendo su posible origen los embriones cigóticos subordinados (Becwar y col., 1991; Percy y col., 2000; Pullman y Johnson, 2002), por lo que podrían generarse cultivos con mezcla de genotipos (Park, 2002). La fidelidad genética es un factor muy importante para la aplicación de ES en silvicultura clonal, por lo que sería necesario el empleo de marcadores genéticos para verificar la posible heterogeneidad de genotipos. Sí existiese evidencia de heterogeneidad genética dentro de una línea seleccionada, habría que iniciar líneas isogénicas a partir de embriones somáticos maduros, mediante embriogénesis secundaria, para asegurarnos la fidelidad genética (Park, 2002).

La utilización de semillas maduras evitaría el inconveniente de obtener mezcla de genotipos al proceder de un único embrión. Además, pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo sin cambios apreciables en la respuesta embriogénica, y así permitir una independencia sobre la floración irregular y las restricciones ocasionadas por la *ventana de respuesta* de los embriones inmaduros durante el año (Garin y col., 1998; Klimaszewska y Cyr, 2002; Zoglauer y col., 2003). Se ha descrito la obtención de embriogénesis somática en embriones cigóticos maduros aislados en *Pinus sylvestris* (Hohtola, 1995), *Pinus nigra* (Salajova y col., 1995; Radojevic y col., 1999), *Pinus koraiensis* (Bozhkov y col., 1997), *Pinus strobus* (Garin y col., 1998), *Pinus taeda* (Tang y col., 2001), *Pinus kesiya* (Deb y Tandon, 2002), *Picea glauca* (Tremblay, 1990), *Picea mariana* (Cheliak y Klimaszewska, 1991), *Picea abies* (Ramarosandratana y van Staden, 2003) o *Abies fraseri* (Guevin y Kirby, 1997).

Las frecuencias de inducción suelen ser inferiores a las obtenidas en embriones cigóticos inmaduros, lo que podría estar relacionado con el pequeño número de embriones subordinados que sobreviven a la maduración de las semillas (Gupta y Durzan, 1986; Tang y col., 2001; Bozhkov y col., 1997). Se ha descrito que el tejido embriogénico se origina predominantemente a partir de la región de transición entre el hipocótilo y los cotiledones, así como en restos de suspensor que pudieran permanecer. En *Picea abies*, se estudió la respuesta embriogénica de diferentes secciones transversales del embrión cigótico maduro, observándose que dicha región de transición proporcionaba las mayores frecuencias de inducción en presencia de reguladores, indicándose una gran actividad meristemática en esta región (Ramarosandratana y van Staden, 2003).

Nagmani y Bonga (1985) obtuvieron cultivos embriogénicos haploides en *Larix decidua* a partir de la inducción de ES en tejido del megagametofito.

Existen trabajos referidos a la formación de embriones somáticos a partir de tejido no embrionario. En *Picea glauca* a partir de cotiledones de plántulas de 12 y de 30 días en *Picea mariana* (Attree y col., 1990). En *Pinus caribaea* se obtuvieron respuestas embriogénicas a partir de acículas de plántulas de 3 meses (Berlyn y col., 1991), de 6 meses en *Pinus kesiya* (Deb y Tandon 2002) y de 1 año en *Picea abies* (Ruaud y col., 1992).

Nagmani y col., (1995), señalaron que habría que determinar el potencial embriogénico existente en tejidos meristemáticos en árboles adultos, como por ejemplo el cambium, brotes vegetativos y reproductivos, estróbilos femeninos inmaduros. Bonga (1996) describió el desarrollo de estructuras similares a embriones a partir de yemas apicales de árboles adultos de *Larix decidua* y *L. x eurolepis*. También se ha descrito la obtención de embriones somáticos a partir de nódulos inducidos en yemas de *L. decidua*, siendo estos embriones incapaces de formar raíces funcionales (Bonga, 2004). Las referencias de inducción de embriogénesis somática en material adulto en el género *Pinus* son todavía escasas, como la patente sobre *Pinus pinaster*, citada en Ramarosandratana y col., (1999), y la inducción en ápices vegetativos de árboles adultos en *Pinus radiata* (Smith, 1999), *Pinus kesiya* (Malabadi y col., 2004) y *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005a).

Los **componentes del medio nutritivo** y las **condiciones de cultivo** también influyen en la respuesta embriogénica. En coníferas, los medios de cultivo más utilizados se basan en las siguientes formulaciones: DCR (Gupta y Durzan, 1985); BM3 (Gupta y Durzan, 1985), MSG (Becwar y col., 1990); P6 (Teasdale y col., 1986) modificado por Pullman y Johnson (2002) y denominado 505; WV5 (Coke, 1996); LV (Litvay y col., 1985) modificado por Klimaszewska y col., (2001) y denominado mLv; LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984); y VE (von Arnold y Eriksson, 1981). Estos medios pueden suplementarse con fuentes de nitrógeno orgánico (L-glutamina, hidrolizado de caseína o mezcla de diferentes aminoácidos), PGRs, y otros aditivos como carbón activo (CA), nitrato de plata, biotina, ácido fólico, inhibidores de giberelinas, ácidos orgánicos o vitaminas E y B12 (Klimaszewska y col., 2007; Pullman y Johnson, 2002; Pullman y col., 2003b, 2005a y b, 2006; Toering y Pullman, 2005). La fuente de carbono utilizada habitualmente es la sacarosa, a una concentración entre el 1 y el 3%. En coníferas, generalmente, se utilizan medios de cultivo sólidos para la iniciación de cultivos embriogénicos siendo el agente gelificante más utilizado el «gellan gum», comercializado como Gerlite[®] o Phytigel[™], aunque algunos autores han iniciado respuestas embriogénicas en medios de cultivo líquidos (van Winkle y Pullman, 2005; Pullman y Skryabina, 2007).

Los reguladores del crecimiento empleados normalmente son las auxinas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y NAA (ácido 1-naftalenacético), y la citoquinina BAP (6-bencilaminopurina), aunque existen trabajos en los que se ha empleado otro tipo de reguladores como el CPPU (N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea) (Park y col., 2006), TDZ (Guevin y Kirby, 1997), brasinoesteroides (Pullman y col., 2003c) e incluso ABA (Pullman y col., 2003b).

La extrusión del tejido embriogénico tiene lugar a partir del micropilo del megagametofito completo, entre las 2 y las 16 semanas de cultivo. Durante este tiempo, el material permanece en el mismo medio de iniciación y puede, o no, ser subcultivado a medio fresco. Los cultivos se mantienen en oscuridad a 23-25°C durante todo el proceso.

Se han estudiado en varias especies el **control genético** de la iniciación de ES y sus implicaciones en los programas de mejora (MacKay y col., 2006). Las frecuencias de

iniciación muestran gran variabilidad entre las distintas familias de semillas (Cheliak y Klimaszewska 1991; Park y col., 1993; Percy y col., 2000; Klimaszewska y col., 2001; Miguel y col., 2004; Niskanen y col., 2004; MacKay y col., 2006; Lelu-Walter y col., 2008), en función de los medios de cultivo y procedimientos. Estos estudios proporcionan una evidencia del fuerte efecto genético aditivo en la iniciación de ES (Park y col., 1993, 1994; MacKay y col., 2006), apoyando la hipótesis de que las tasas de iniciación pueden ser mejoradas en los planes de mejora. Hay evidencia del fuerte control materno en la iniciación de las respuestas embriogénicas. La selección del árbol madre más favorable ha sido propuesta para mejorar la respuesta de iniciación de ES (Niskanen y col., 2004; MacKay y col., 2006). La selección de *genotipos de amplio espectro* para la capacidad de iniciación, como árboles madre en cruzamientos controlados, podría ser útil para incrementar el número de genotipos capturados en programas de mejora.

PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO:

La formación continua de estructuras pre-embriogénicas mediante el proceso de poliembrionía de partición permite la multiplicación del material embriogénico.

Algunos investigadores no discriminan entre la extrusión de material embriogénico y la iniciación de la respuesta embriogénica, comunicando altos porcentajes de iniciación. Frecuentemente, las masas embriogénicas iniciadas pierden su capacidad proliferativa con el tiempo en cultivo; por lo tanto, hay que diferenciar entre la extrusión inicial y el crecimiento continuo en el tiempo de las masas extruídas. (Becwar y Pullman, 1995).

Una vez se ha iniciado la respuesta embriogénica, las MES se transfieren a medio de cultivo fresco para su proliferación, con diversas frecuencias según autores. El medio de cultivo de proliferación puede tener la misma composición que el medio de iniciación o variar su composición, reduciéndose a menudo la concentración de auxinas y citoquininas. La frecuencia del subcultivo del material embriogénico se realiza generalmente cada dos semanas, manteniéndose los cultivos en oscuridad a 23-25°C.

Con la aplicación de una técnica de dispersión de las masas embriogénicas mediante la agitación vigorosa en medio de cultivo líquido (aproximadamente 50-300 mg en 4-5 ml

de medio) y posterior filtrado con vacío de la suspensión a través de disco de papel de filtro, se consigue incrementar el peso fresco del cultivo embriogénico en menor tiempo (Klimaszewska y Smith, 1997; Percy y col., 2000; Lelu-Walter y col., 2006). El cultivo del disco de papel con las células adheridas a su superficie rinde del orden de 2 a 4 g de masa embriogénica fresca después de dos semanas de cultivo (Klimaszewska y col., 2007).

Las masas embriogénicas se caracterizan atendiendo a diferentes morfotipos en función del número de agregados celulares presentes en las masas, las estructuras embrionarias que muestran, y el desarrollo y organización de los suspensores (Ramarosandratana y col., 2001a; Breton y col., 2005). Breton y col., (2002) distingue tres morfotipos: el *liso*, como masas con cabezas embrionarias poco desarrolladas; el *granular*, como masas nodulares con embriones con cabezas más desarrolladas y suspensores cortos y gruesos; el *picudo*, como masas con embriones con cabezas desarrolladas y suspensores largos y gruesos; definiéndose también morfotipos intermedios. El desarrollo de estos morfotipos parece depender del genotipo, aunque en ocasiones pueden observarse cambios no controlados de morfotipo en determinados genotipos a lo largo del cultivo.

Se ha observado que el subcultivo prolongado de los tejidos embriogénicos puede ocasionar la pérdida de su capacidad embriogénica (Breton y col., 2006), generar variaciones somaclonales (cambios genéticos o epigenéticos) (Berlyn y col., 1986, Fourré y col., 1997; Tremblay y col., 1999), afectar la integridad del embrión durante el desarrollo, además del riesgo de perder los cultivos por contaminación. Una solución a estos problemas se consigue con la crioconservación del material nada más iniciarse la respuesta embriogénica (Cyr, 2000; Hågman y col., 2000).

También se han descrito trabajos en los que el establecimiento y crecimiento de cultivos embriogénicos se realizan en suspensión en medio líquido: *Picea abies* (Boulay y col., 1988; Find y col., 1998a), *Picea glauca* (Hakman y von Arnold, 1988; Dong y Dunstan, 1994), *Picea sitchensis* (Krogstrup, 1990), *Picea glauca-engelmannii* y *Picea mariana* (Lulsdorf y col., 1992; Klimaszewska, 1995), *Pinus nigra* (Salaj y col., 2007a), *Pinus pinaster* (Miguel y col., 2001), *Pinus strobus* (Finer y col., 1989), *Pinus taeda* (Silveira y col., 2004; Pullman y Skryabina, 2007), *Pseudotsuga menziesii* (Gupta y Timmis, 2005) y *Abies nordmanniana* (Nørgaard y col., 1992).

MADURACIÓN:

Una vez definida la polaridad del embrión somático, se inicia su desarrollo hasta el estado cotiledonar. Durante la maduración, los embriones somáticos experimentan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos, entre los que se desatacan el equilibrio hormonal, el almacenamiento de sustancias de reserva y la adquisición de la tolerancia a la desecación (von Arnold y col., 2002). Merkle y col., (1995), hacen especial hincapié en la prevención de la germinación precoz de los embriones somáticos en los medios de maduración. Según estos autores la germinación precoz podría verse controlada mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, así como la monitorización de los niveles de compuestos de reserva de los embriones somáticos.

El desarrollo de los embriones cigóticos y los somáticos, se diferencia principalmente por las condiciones ambientales impuestas durante su desarrollo. Mientras que en la semilla los embriones cigóticos se desarrollan en el interior del tejido materno, los embriones somáticos crecen aislados de estas estructuras estando sujetos a las condiciones impuestas por el cultivo. Según la revisión de Yeung (1995), tanto el ambiente físico como el químico dentro de la semilla afecta al crecimiento y desarrollo de los embriones cigóticos. Por el contrario, el ambiente en el que los embriones somáticos se desarrollan no es el óptimo para su desarrollo, teniendo esto que ver con la baja frecuencia de conversión y la baja calidad de los embriones observada en muchas especies. Esto anima a reproducir *in vitro* las características únicas del ambiente *in ovulo*, incluyendo la composición hormonal y la osmolaridad, dando como resultado la formulación de medios de maduración adecuados para mejorar el desarrollo de los embriones.

El desarrollo de los embriones en coníferas se inicia con la parada de la capacidad proliferativa celular, mediante la retirada de auxinas y citoquininas del medio de cultivo y la aplicación de ABA (Stasolla y col., 2002). La proliferación excesiva del tejido embriogénico durante los tratamientos de maduración es el principal impedimento para que se complete la diferenciación de los embriones somáticos (Lelu y col., 1999; Harvengt, 2005). Algunos protocolos aplican tratamientos premadurativos en los que el material, antes de ser transferido a las condiciones de maduración, se subcultiva durante una semana en medios suplementados con CA y sin PGRs (Klimaszewska y Cyr, 2002). El CA altera las características físico-químicas del medio de cultivo. Estas alteraciones incluyen el

oscurecimiento del medio, la adsorción de sustancias tóxicas o inhibitorias y la adsorción de PGRs. Durante la embriogénesis somática de coníferas, el CA se utiliza generalmente para adsorber los restos de auxinas y citoquininas procedentes de la fase de proliferación (von Aderkas y col., 2002).

En general, la maduración de los embriones somáticos se logra en medio de cultivo sólido, aunque existen algunos trabajos en los que se cita la obtención de la maduración en medio de cultivo líquido (Attree y col., 1994; Gupta y Timmis, 1999; Gorbatenko y Hakman, 2001). Los cultivos se mantienen en condiciones de oscuridad o de baja intensidad luminosa durante 16 h (aprox. $5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

El ABA juega un papel importante en la diferenciación y maduración de los embriones somáticos en coníferas (von Arnold y col., 2002). El crecimiento normal de los embriones somáticos requiere del aporte exógeno de ABA, dependiendo su concentración de las especies y del genotipo. En las semillas, la mayor fuente de ABA la proporciona el megagametofito (Kong y col., 1999). A pesar del uso intensivo de este regulador de crecimiento durante el proceso embriogénico, no se conoce muy bien el papel en la estimulación del crecimiento del embrión *in vitro* (Stasolla y Yeung, 2003).

Se ha propuesto que la aplicación exógena de ABA podría:

- a) Parar la proliferación del tejido e iniciar el crecimiento del embrión a través de alteraciones en la síntesis de nucleótidos (Ashihara y col., 2001).
- b) Disparar cambios en el metabolismo del ácido ascórbico. Muchos estudios muestran que en semillas en desarrollo se requieren altos niveles de ácido ascórbico durante la morfogénesis (Arrigoni y col., 1992).
- c) Incrementar la concentración de ácido glutámico, glutamina y arginina. La presencia de estos aminoácidos es necesaria para la acumulación de sustancias de reserva durante la embriogénesis somática (Hakman y col., 1990; Flinn y col., 1991; Joy y col., 1991).

- d) Promover la acumulación de lípidos (Hakman y von Arnold, 1988; Feirer y col., 1989).
- e) Promover la síntesis de poliaminas. Altos niveles de poliaminas están relacionados con el desarrollo de los embriones somáticos de *Picea glauca* (Kong y col., 1999), *Picea abies* (Santanen y Simola, 1992) y *P. glauca x P. engelmannii* (Amarasinghe y col., 1996).

Las respuestas del tejido embriogénico en relación a la aplicación exógena de ABA es genotipo dependiente (Jalonen y von Arnold, 1991; Thompson y von Aderkas, 1992; Find y col., 1998a; Kong y von Aderkas, 2007). Se ha descrito en *Picea glauca x P. engelmannii* que los genotipos con capacidad madurativa mostraron una mayor utilización de ABA exógeno que los genotipos con menor capacidad (Kong y von Aderkas, 2007).

En la diferenciación de los embriones somáticos inmaduros hacia un estado cotiledonar no solo interviene el ABA. La restricción de la disponibilidad de agua y nutrientes también juega un papel importante en el desarrollo y la maduración de los embriones somáticos de coníferas (Ramarosandrata y col., 2001b). Esta restricción puede venir impuesta por el aumento de la osmolaridad del medio de cultivo, el incremento de la concentración del agente gelificante o una combinación de ambos.

El aumento de la osmolaridad en el medio se consigue disminuyendo el potencial hídrico mediante el empleo de agentes osmóticos. Es común la aplicación de altas concentraciones de carbohidratos en los medios de maduración, que además de proporcionar una fuente de carbono, actúan como osmóticos a dichas concentraciones (George, 1993; Lipavská y Konrádová, 2004). En coníferas, las respuestas de maduración varían en función del carbohidrato utilizado según la especie. Por ejemplo, la sacarosa ofreció mejores resultados en *Picea glauca*, *Picea mariana*, híbridos de *Larix* y *Larix laricina* (Lelu y col., 1994a; Klimaszewska y col., 1997; Iraqui y Tremblay, 2001). Sin embargo, la maltosa resultó mejor que la sacarosa en la maduración de embriones de *Abies nordmanniana* y *Pinus taeda* (Nørgaard, 1997; Li y col., 1998). Para la maduración de los embriones somáticos también es habitual utilizar un aditivo de alto peso molecular como el polietilenglicol (PEG), tal es el caso de *Picea glauca* (Attree y col., 1995); aunque en algunos casos se han observado efectos adversos en la germinación, como en *Picea abies*

(Bozhkov y col., 1998) y en otras coníferas (Stasolla y col., 2002). Se ha descrito que las mejores tasas de maduración se conseguían en *Abies nordmanniana*, *Pinus taeda* y *Pinus nigra* cuando se empleaba en los medios de maduración la combinación de PEG y maltosa (Nørgaard, 1997; Li y col., 1998; Salajová y col., 1999).

Otra alternativa para restringir la disponibilidad de agua y nutrientes en los cultivos embriogénicos se basa en el incremento de la concentración del agente gelificante, determinando un aumento de la dureza del gel. En embriogénesis somática se utilizan normalmente dos tipos de agentes gelificantes en los medios de cultivo: «gellan gum» (Gerlite[®] o Phytigel[™]) y agar (Klimaszewska y Smith, 1997). El «gellan gum» es un polisacárido bacteriano (*Pseudomonas elodea*) compuesto por ácido glucurónico, ramnosa y glucosa. El agar deriva de algas, representando un espectro de polisacáridos pertenecientes a la familia de los galactanos. Se han encontrado diferencias en las características físico-químicas de los geles en función del agente gelificante utilizado. Estas diferencias han hecho que surjan dudas respecto al efecto del agente gelificante *per se* en la maduración de los embriones somáticos de *Pinus strobus*. Klimaszewska y col., (2000) observaron en esta especie que las respuestas de maduración eran diferentes en función del agente gelificante empleado, a concentraciones correspondientes a la misma dureza de gel. Esto sugiere que las diferencias en las propiedades físico-químicas conferidas por los distintos agentes gelificantes puede haber influido en la respuesta de los cultivos embriogénicos. El «gellan gum» es el agente gelificante más utilizado en la maduración de embriones somáticos del género *Pinus*.

Klimaszewska y col., (2007) describieron que cuando los embriones somáticos se desarrollaban en un medio con alta concentración de agente gelificante, no necesitaban un tratamiento postmadurativo; además, en estos medios de maduración, los cultivos embriogénicos no necesitaban transferirse a medio fresco durante todo el periodo, que puede llegar a durar entre 10-16 semanas.

La reducción del contenido de agua celular mediante la desecación parcial también facilita la maduración. Se ha descrito que con la desecación parcial de callos embriogénicos de arroz se mejoraban las tasas de maduración y regeneración (Rancé y col., 1994). En *Pinus patula*, la desecación parcial de las masas embriogénicas hasta un

contenido en humedad relativa del 47% producía un incremento en el número de embriones somáticos obtenido (Malabadi y van Staden, 2005a) y en *Pinus kesiya*, con el mismo método, la reducción en el contenido de humedad hasta el 52% también originaba este incremento (Malabadi y col., 2004).

Se ha observado que el estrés causado por la ausencia de nutrientes puede ejercer un efecto regulador en el desarrollo de los embriones somáticos (Fernández-Guijarro y col., 1994; von Aderkas y Bonga, 2000). La inmersión transitoria, sistema de cultivo en medio líquido de importante desarrollo en los últimos años, tiene su base en la depleción de nutrientes, mostrando grandes posibilidades para regular el desarrollo en medio líquido de embriones somáticos de diferentes especies, sincronizando los cultivos, impidiendo la aparición de embriogénesis secundaria y estimulando la maduración (Cabasson y col., 1997; Etienne y col., 1997).

En coníferas, además del cultivo en medio sólido de masas embriogénicas, se puede aumentar la producción de embriones somáticos maduros con la disgregación previa al cultivo de las masas embriogénicas en medio de cultivo líquido, como ya se ha descrito en la fase de proliferación/mantenimiento (Klimaszewska y col., 2007). Lelu-Walter y col., (2006) optimizaron las respuestas de maduración en *Pinus pinaster* homogeneizando el tejido embriogénico junto con CA. Estos autores consideraron que el cubrir las células con partículas de CA producía un efecto beneficioso, relacionado con su capacidad de adsorción de reguladores del crecimiento residuales utilizados en la proliferación (von Aderkas y col., 2002); y debido a sus propiedades higroscópicas, el CA limitaría la disponibilidad de agua en los cultivos (Klimaszewska y Smith, 1997; Klimaszewska y col., 2000).

Generalmente, el crecimiento proliferativo del tejido embriogénico de coníferas se mantiene con la aplicación exógena de auxinas a concentraciones inferiores a las necesarias para la inducción. Sin embargo, se ha descrito que en algunas especies de *Abies* no es necesaria la aplicación exógena de auxinas ya que podrían sintetizarlas endógenamente. Find y col., (2002), describieron que la proliferación activa del tejido embriogénico en las condiciones de maduración, dificultaba el desarrollo de los embriones somáticos de *Abies nordmanniana*, lo que estaría relacionado con los niveles endógenos de auxinas. Por ello, tratamientos con agentes anti-auxínicos, como el PCIB (ácido 2-(p-

clorofenoxi) 2-metilpropiónico), en combinación con ABA fueron efectivos para controlar la proliferación continuada y mejorar las tasas de maduración. Por el contrario, en *Pinus pinaster* la inhibición de la proliferación por anti-auxinas no era efectiva en la maduración de los embriones somáticos (Breton y col., 2006).

Se ha descrito que la producción de etileno por los cultivos embriogénicos, puede ocasionar efectos deletéreos durante la morfogénesis. El etileno es un regulador del crecimiento gaseoso presente en las semillas en desarrollo a baja concentración. El número y la calidad de los embriones somáticos generados en *Picea glauca* se veía afectado por el incremento en la producción de etileno (Kong y Yeung, 1994). Se ha mostrado que los embriones cultivados en presencia de altos niveles de etileno presentaban anomalías estructurales en el meristemo apical, afectando al crecimiento postembriogénico y, por tanto, a la regeneración de plantas. La adición al medio de compuestos inhibidores de su síntesis (amino-etoxi-vinil-glicina) o de su acción (nitrato de plata) conducía a un incremento en el número y calidad de los embriones somáticos en *Picea glauca* (Kong y col., 1999). Una aireación controlada de los recipientes de cultivo durante la maduración, o la apertura regular de los envases en un ambiente estéril permitiría una reducción en la acumulación del etileno en los cultivos (Stasolla y col., 2003).

El nivel de organización de los cultivos embriogénicos se relaciona con la maduración de los embriones somáticos, estando también relacionado con el genotipo (Jalonen y von Arnold, 1991; Fourré y col., 1997; Egertsdotter y von Arnold, 1998; Lelu-Walter y col., 2006). Breton y col., (2005) indicaron que la capacidad de maduración de los embriones somáticos venía determinada por el morfotipo de los cultivos embriogénicos en *Pinus pinaster*, obteniéndose una mayor producción de embriones maduros en el morfotipo *picudo* que en el morfotipo *liso-granular*.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA SECUNDARIA:

En embriones somáticos maduros se puede reiniciar tejido embriogénico y por tanto, obtener embriogénesis somática secundaria. En la actualidad existen muy pocas especies de coníferas en las que se haya logrado este proceso, entre ellas algunas especies del género *Pinus* como el *P. strobus*, *P. banksiana* y *P. pinaster* (Park, 2002; Klimaszewska y col., 2009).

La obtención de embriogénesis secundaria resulta de gran interés para conseguir la integridad genética en las líneas obtenidas por embriogénesis somática, particularmente en pino, ya que en una semilla pueden existir embriones cigóticos con diferentes genotipos provenientes de la polinización de los arquegonios (Park, 2002). También permite el re-establecimiento de líneas embriogénicas cuando los cultivos embriogénicos iniciales han perdido su capacidad morfogénica, cuando los cultivos crioconservados se han contaminado o cuando se dispone de un stock reducido de material embriogénico (Klimaszewska y col., 2009).

Klimaszewska y col., (2007) indicaron que la reiniciación de embriogénesis secundaria en *P. strobus* y *P. pinaster*, pudiendo necesitar entre 6-8 semanas de cultivo, venía precedida de la formación de callo sobre la totalidad del embrión somático, seguida de la aparición de embriones somáticos tempranos en grupo o independientes que surgían en la superficie del callo.

GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN EN PLANTA:

La embriogénesis somática es un proceso complejo, en el que la calidad, la supervivencia y el crecimiento de las plantas somáticas regeneradas dependen de las condiciones utilizadas en las fases anteriores. Solamente los embriones somáticos maduros con morfología normal, con suficientes sustancias de reserva acumuladas y que hayan adquirido tolerancia a la desecación, podrán germinar y convertirse en plantas con éxito (von Arnold y col., 2002). La germinación conlleva el desarrollo coordinado del tallo y la raíz, mientras que la conversión se refiere a la supervivencia de las plántulas germinadas en condiciones *ex vitro*.

Ciertos aspectos de las condiciones de cultivo, tales como acumulación de ABA, residuos de los componentes osmóticos utilizados así como el régimen de cultivo durante la maduración, pueden inhibir la germinación de los embriones. Por ello, pueden necesitarse tratamientos postmadurativos que promuevan la elongación de la raíz y del brote apical. Ya que uno de los problemas asociados con el desarrollo de los embriones después de la maduración, puede estar relacionado con la ausencia de un régimen de desecación programado, similar a lo requerido por los embriones cigóticos, un tratamiento de desecación parcial de los embriones somáticos puede mejorar la sincronización del

crecimiento de la raíz y el tallo. Sobre todo, en cultivos que han requerido altos niveles de ABA para promover una apropiada acumulación de sustancias de reserva, pueden necesitar periodos más largos de desecación parcial para reducir los niveles de ABA endógenos y obtener un buen desarrollo posterior del embrión (Merkle y col., 1995; Dronne y col., 1997; Stasolla y col., 2002). Lelu y col., (1994b) en *Larix x leptoeuropaea* observaron que una desecación relativamente rápida hasta el 59% de humedad relativa, no tenía un efecto deletéreo en la germinación posterior de los embriones solamente si se realizaba a 4°C, acentuando el efecto beneficioso de la baja temperatura en la desecación parcial. Sin embargo, otros estudios indican que los tratamientos de desecación parcial pueden no ser necesarios en todas las especies si el contenido hídrico de los embriones maduros es lo suficientemente bajo al final del periodo de maduración, lo que puede ocurrir en medios con alto contenido en agentes gelificantes (Klimaszewska y Cyr, 2002).

Durante la maduración, las condiciones de cultivo pueden inducir la dormición de los embriones somáticos, siendo necesarios tratamientos específicos semejantes a los aplicados en los embriones cigóticos para estimular la germinación de los embriones, tales como el almacenamiento en frío o la adición de PGRs como el ácido indolbutírico o las giberelinas al medio de cultivo. Otros tratamientos como la aplicación de citoquininas pueden también aumentar el desarrollo de los embriones cuando se transfieren a las condiciones de germinación (Merkle y col., 1995).

La germinación de los embriones somáticos se lleva a cabo en medio de cultivo sólido, con sacarosa, sin PGRs, y pueden o no contener una fuente de nitrógeno orgánico y carbón activo. Si la maduración de los embriones somáticos se ha realizado en medios con alta concentración de gelificante, el medio de germinación debería contener concentraciones algo más bajas, para prevenir la hiperhidricidad en las plantas regeneradas. Los cultivos se mantienen, normalmente, en oscuridad o en luz tenue durante los primeros 7-10 días antes de su exposición a la luz. Esto asegura la elongación de los hipocótilos y reduce la síntesis de antocianinas, abundantes en embriones somáticos maduros de *Pinus strobus* y *Pinus pinaster* (Klimaszewska y col., 2007). La orientación de los embriones durante la germinación también es un factor que influye en el desarrollo de la raíz. Becwar y col., (1989) obtuvieron mejores respuestas de germinación en *Picea abies* cuando inclinaban los embriones somáticos durante la germinación o cuando clavaban los cotiledones en el medio de cultivo gelificado y luego invertían el tubo. Esta orientación de

los embriones permite la toma de las sustancias nutritivas del medio de cultivo (al igual que hacen los embriones cigóticos dentro del megagametofito), la mejor aireación de la raíz y la menor resistencia para el crecimiento de ésta. Klimaszewska y col., (2001) y Lelu-Walter y col., (2006) optimizaron la germinación de los embriones somáticos de algunas especies de *Pinus*, disponiendo los embriones horizontalmente en contacto con el medio en placas Petri inclinadas un ángulo de 40-45°, y con los hipocótilos orientados hacia abajo.

En coníferas, la germinación se completa con la elongación del epicótilo y el desarrollo de las acículas, que sucede después de las 12 o 16 semanas, dependiendo de las especies (Klimaszewska y Cyr, 2002).

Las condiciones de cultivo *in vitro* aportan a las plantas condiciones de alta humedad relativa, baja intensidad lumínica y ausencia de microorganismos (Merkle y col., 1990; Pierik, 1990). Estas condiciones hacen que las plantas regeneradas presenten una cutícula poco desarrollada y un funcionamiento anormal de los estomas, por lo que se produce una mayor transpiración cuando se transfieren a condiciones *ex vitro* (Merkle y col., 1995). Además, suelen ser plantas fotosintéticamente poco activas, y susceptibles de ser atacadas por microorganismos. Todas estas características hacen que su supervivencia se vea comprometida reduciéndose la tasa de conversión. En general, el sometimiento de las plantas a un proceso paulatino de endurecimiento para su aclimatación, usando condiciones de humedad relativa decrecientes y una mayor intensidad luminosa, permite el incremento en las tasas de conversión (Atree y col., 1990). No obstante, la aclimatación de las plantas micropropagadas es una de las grandes limitaciones de la micropropagación.

Al igual que la fase de iniciación de la embriogénesis, las fases de proliferación, maduración y germinación también se encuentran bajo cierto control genético. Se ha descrito que el control genético aditivo va disminuyendo según se avanza en el proceso, estando más limitada la posibilidad de realizar mejora en las fases de maduración o germinación que en la de iniciación (Park y col., 1994,1998).

1.6. CRIOCONSERVACIÓN

La crioconservación se basa en el almacenamiento de material biológico a temperaturas de nitrógeno líquido (-196°C), temperatura a la que se detienen las divisiones celulares y los procesos metabólicos. La conservación de células, tejidos y órganos vegetales en nitrógeno líquido (NL) permite el almacenamiento, teóricamente por tiempo indefinido, con las ventajas añadidas de la reducción de la erosión genética, mínimo espacio necesario, su aplicación en semillas ortodoxas y recalcitrantes, conservación de la variación inter e intrapoblacional y riesgo mínimo de enfermedades (Gradual y col., 1997).

La integración de la embriogénesis somática en la silvicultura operativa, supone la multiplicación de los genotipos deseados a gran escala, y la conservación de los clones superiores sin cambios genéticos o pérdida de capacidad de regeneración mientras se realizan los ensayos clonales (Häggman y col., 2000). La crioconservación de tejidos embriogénicos en coníferas se aplica exclusivamente en cultivos en fase proliferativa, aunque también se ha demostrado la posibilidad de crioconservar embriones cigóticos y somáticos (Cyr, 1999). Sin embargo, la aplicación a gran escala en cultivos embriogénicos está restringida según la capacidad de recuperación del crecimiento, que es genotipo dependiente.

La crioconservación de líneas embriogénicas permite:

- Prevenir la pérdida del potencial embriogénico (juvenilidad y regenerabilidad), ocasionada por los subcultivos prolongados.
- Prevenir la posible variación somaclonal generada por el mantenimiento de los cultivos embriogénicos en crecimiento activo.
- Disminuir el riesgo de contaminación tras los subcultivos.
- Almacenar un elevado número de genotipos hasta obtener los resultados de los test de progenie.
- Conservar genes a largo plazo de embriones somáticos iniciados a partir de árboles selectos en programas de mejora.

Hasta hoy, la experiencia y los artículos sobre los efectos de la crioconservación son limitados, así como los ensayos de fidelidad genética del material crioconservado. Aún así, los test de progeñe del material regenerado se han desarrollado en unas pocas especies como *Picea glauca*, *Picea glauca engelmannii*, *Picea abies*, *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus radiata* (Häggman y col., 2000).

Häggman y col., (2000) describen dos protocolos de crioconservación:

1. Protocolo clásico: consiste en enfriar el material, pretratado con crioprotectores, aplicando descensos de temperatura paulatinos en un corto periodo de tiempo hasta alcanzar una temperatura predefinida, seguido de la inmersión en NL. Este protocolo fue diseñado por Kartha y col., (1988) para la crioconservación de cultivos embriogénicos de *Picea glauca*, empleándose en la actualidad, con ligeras modificaciones, en cultivos embriogénicos de coníferas.

2. Protocolos alternativos: basados en procesos de vitrificación, que consisten en la deshidratación de las células mediante osmóticos y/o aire, y posterior congelación rápida en NL. En coníferas, el primer protocolo de vitrificación fue diseñado por Touchell y col., (2002) en cultivos embriogénicos de *Picea mariana*.

Hay que tener en cuenta una serie de parámetros en la crioconservación del material embriogénico, como el estado fisiológico del material de partida, la densidad celular en las suspensiones, la deshidratación mediante osmóticos previa a la congelación, la utilización de crioprotectores de las membranas celulares, y el régimen aplicado en el enfriamiento y descongelación (Zoglauer y col., 2003).

En coníferas se ha descrito que para una óptima recuperación de células viables tras la crioconservación, se han de seleccionar previamente cultivos con crecimiento activo (Kantha y col., 1988; Hargreaves y Smith, 1992), ya que las células con este tipo de crecimiento son de pequeño tamaño, citoplasma denso y bajo contenido en agua, características relacionadas con las células con capacidad embriogénica. Se ha observado que las células del suspensor en los cultivos embriogénicos no resisten al proceso de crioconservación debido a su alta vacuolización (Gupta y col., 1987; Lainé y col., 1992; von Arnold y col., 1995; Find y col., 1998b; Häggman y col., 1998). La recuperación del

crecimiento tras la crioconservación, también depende de la densidad de las suspensiones celulares en los precultivos. Find y col., (1998b) observaron una baja recuperación del crecimiento tanto con densidades celulares subóptimas, relacionado con la presencia de un bajo número de células con citoplasma denso, como con densidades celulares supraóptimas, ya que la recuperación del crecimiento posiblemente podría verse afectada por una elevada concentración de sustancias nocivas liberadas por las células dañadas durante la crioconservación.

El material embriogénico, antes de ser crioconservado, debe preservarse sometiéndolo a una serie de tratamientos orientados a la disminución del contenido de agua intracelular, ya que el enfriamiento lento de los cultivos provoca la formación de cristales de hielo intracelulares, produciéndose daños en las membranas y paredes celulares. La estrategia utilizada habitualmente consiste en la retirada del agua intracelular mediante el incremento de la osmolaridad de la suspensión celular, seguido de la adición de un agente crioprotector (Gupta y col., 2005). Para el incremento de la osmolaridad se utilizan carbohidratos como la glucosa, o azúcares alcoholes como el sorbitol, ampliamente utilizado en cultivos embriogénicos de coníferas (Cyr, 1999). El precultivo se lleva a cabo en oscuridad, durante un periodo de 18- 24 h y a temperatura ambiente. Momentos antes de la congelación se añade el agente crioprotector a la suspensión celular precultivada con sorbitol, utilizándose habitualmente el dimetil sulfóxido (DMSO), hasta alcanzar una concentración final en la suspensión del 5-10% (Klimaszewska y col., 1992; Häggman y col., 2000); el glicerol o el PEG también se utilizan como agentes crioprotectores pero con menor frecuencia. El DMSO se caracteriza por su bajo peso molecular, su estructura polar y la capacidad de formar uniones hidropónicas. Todo ello permite su penetración en la célula, sustituyendo una parte del agua intracelular y protegiendo, por tanto, las membranas biológicas (Zoglauer y col., 2003). El DMSO debe añadirse poco a poco debido al estrés osmótico que pueda causar a las células. También se han utilizado combinaciones de crioprotectores como la mezcla de glucosa, PEG y DMSO en *Picea abies*, *Pinus taeda*, *Pinus sylvestris* y en híbridos de *Abies cephalonica*, mejorando los resultados de recuperación del crecimiento frente al empleo de un solo crioprotector (Gupta y col., 1987; Häggman y col., 1998; Aronen y col., 1999).

Después de la crioprotección de los tejidos embriogénicos, se lleva a cabo la crioconservación mediante una congelación lenta, siendo muy importante la velocidad de enfriamiento. Häggman y col., (2000) indicaron que el enfriamiento debía ser lo suficientemente lento como para permitir una deshidratación que evitara la formación de hielo intracelular, y lo suficientemente rápido como para reducir cualquier daño ocasionado por el incremento en la concentración de solutos en el interior de la célula.

Se ha descrito que la tasa de enfriamiento suele ser de $0,3-0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar una temperatura final de aproximadamente -40°C (Cyr, 1999). Estas tasas se consiguen mediante la utilización de congeladores programables, aunque existen variantes que incluyen programas de congelación más complejos, diseñados para compensar cambios de temperatura durante la fase de transición (Cyr y col., 1994), y protocolos de congelación simplificados (Hargreaves y col., 1999; Ford y col., 2000a y b, Lelu-Walter y col., 2006; Salaj y col., 2007b). El método simplificado implica la incubación de los crioviales con las suspensiones celulares en unos recipientes que contienen isopropanol, comercializados como «Nalgene Cryo 1°C Freezing Container», durante 1-2 h a -80°C , lo que proporciona una tasa de enfriamiento de $0,99^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Una vez alcanzada la temperatura final definida, los crioviales se almacenan en nitrógeno líquido pudiendo permanecer en estas condiciones por tiempo ilimitado. Klimaszewska y col., (2007) indicaron no haber observado efectos deletéreos en material de *Pinus strobus* crioconservado durante 7 años.

La recuperación de los cultivos requiere una descongelación rápida de los crioviales, incubándolos en agua a unos 37°C durante 1-2 minutos. Después de la descongelación los agentes crioprotectores deben ser eliminados debido a su efecto citotóxico, bien depositando los cultivos sobre varios discos de papel de filtro que absorben la solución crioprotectora (Hargreaves y col., 2002; Salaj y col., 2007b), o bien filtrando mediante vacío el exceso de dicha solución (Park y col., 1994; Lelu-Walter y col., 2006), existiendo trabajos en los que además los cultivos se lavan con medio líquido (Häggman y col., 2000; Mathur y col., 2003). Después de la eliminación del agente crioprotector, los cultivos se transfieren a medio de cultivo sólido de proliferación donde permanecen 24-48h, y posteriormente se transfieren al mismo medio de cultivo fresco.

La recuperación del crecimiento de los cultivos se caracteriza por una fase de latencia que puede durar desde unos días a varias semanas, dependiendo de la especie y del genotipo (Häggman y col., 2000). Hargreaves y col., (2002) indicaron que en *Pinus radiata* se conseguía reducir la fase de latencia utilizando cultivos nodriza, existiendo algunas líneas embriogénicas que únicamente se recuperaban en presencia de estos cultivos. Los cultivos nodriza consistían en el cultivo del tejido crioconservado sobre masas proliferativas de genotipo diferente separados por una malla de nylon. El tejido nodriza actuaría facilitando la aireación del tejido recuperado, la retirada de los crioprotectores, y la absorción de compuestos liberados por las células dañadas durante la crioconservación. También sugirieron que los compuestos extracelulares excretados por el tejido nodriza al medio serían beneficiosos en la recuperación y desarrollo de los embriones.

La regeneración tras la congelación, se origina a partir de las células embriogénicas caracterizadas por tener citoplasma denso, y que han sobrevivido al pretratamiento y la congelación. Se considera que este proceso permite seleccionar una población celular más homogénea (permanencia de las células embrionales y eliminación de las células vacuoladas), incrementándose por ello el potencial embriogénico de los cultivos (Park y col., 1999; Engelmann, 2004). Häggman y col., (2000) también indicaron que la crioconservación podía mejorar o facilitar la maduración de los embriones somáticos en algunas especies.

Se han descrito diferencias en las respuestas de recuperación en función del genotipo en especies como *Abies nordmanniana* (Nørgaard y col., 1993a), *Picea abies* (Nørgaard y col., 1993b), *Pinus sylvestris* (Häggman y col., 1998) y *Abies cephalonica* (Aronen y col., 1999). Park y col., (1994) indicaron que estas diferencias no solamente serían atribuibles al genotipo sino también a la calidad de los cultivos, como en *Picea glauca*; o a la composición y morfología celular de los tejidos durante el precultivo, como en *Picea abies* y *Picea sitchensis* (Find y col., 1998b).

Como se ha comentado anteriormente, la crioconservación permite el almacenamiento de los cultivos por tiempo ilimitado preservándose su estabilidad genética. No obstante, se recomienda comprobar la fidelidad genética del material recuperado, ya

que podrían producirse variaciones genéticas atribuibles a la actividad de los crioprotectores como el DMSO (Aronen y col., 1999).

Básicamente se han llevado a cabo estudios morfológicos de los cultivos para la detección de una posible variación. Se ha descrito en híbridos *de Abies cephalonica*, *Larix x eurolepis*, *Picea abies*, *Pinus caribaea* y *Pinus sylvestris* que la crioconservación no afecta a las características morfológicas de los cultivos ni de las plantas regeneradas (Klimaszewska y col., 1992; Lainé y col., 1992; Nørgaard y col., 1993b; Häggman y col., 1998; Aronen y col., 1999). Park y col., (1998) evaluaron morfológicamente tanto el desarrollo *in vitro* de cultivos embriogénicos de *Picea glauca* crioconservados durante 3 y 4 años, como su crecimiento *ex vitro*, demostrando su estabilidad.

Existen muy pocos trabajos que utilicen marcadores de ADN para la detección de variabilidad genética como resultado de la crioconservación. En *Picea glauca engelmanni* se utilizaron RFLPs, no observándose evidencias de variación somaclonal (Cyr y col., 1994). Tampoco se encontraron variaciones con el empleo de marcadores de ADN tipo RAPDs en cultivos crioconservados de *Pinus sylvestris* (Häggman y col., 1998). Sin embargo, De Verno y col., (1999) detectaron con estos marcadores variaciones genéticas en algunas líneas embriogénicas de *Picea glauca* después de 2 y 12 meses de su recuperación, no observándose que estas variaciones afectaran a los correspondientes árboles regenerados. Estos autores sugirieron que el tejido embriogénico podría estar constituido por una mezcla de células alteradas y no alteradas genéticamente, de manera que las células que no sufrían alteraciones eran las que se regeneraban y eran capaces de diferenciar embriones somáticos normales y por tanto regenerar árboles sin variaciones genéticas.

1.7. FIDELIDAD CLONAL

La propagación vegetativa permite generar progenies en las que se captura todo el potencial genético, aditivo y no aditivo, del progenitor. Sin embargo, cuando aparece variabilidad intraclonal muchas de las ventajas de la propagación vegetativa se ven reducidas. Por ello, para cualquier método de propagación vegetativa que se aplique, es muy importante que se mantenga la fidelidad clonal (Park y col., 1998).

Las técnicas de cultivo de tejidos pueden causar variación somaclonal, observables fenotípicamente como resultado de una modificación del propio genoma o de su expresión, que a menudo es heredable (Larkin y Scowcroft, 1981). Debido al largo ciclo biológico de las coníferas, la variación somaclonal constituye un inconveniente para la micropropagación, ya que una mutación ocasional puede a menudo observarse muy tarde en el crecimiento del árbol regenerado o incluso en su descendencia, por ello es importante detectar esta variación cuanto antes. Las variaciones pueden ser analizadas a nivel fenotípico o genotípico. Las variaciones fenotípicas se detectan a través de marcadores morfológicos o proteínicos, que pueden ser resultado de la modificación del propio genoma o de su expresión. Las variaciones genotípicas pueden ser genómicas, cromosómicas o génicas, afectando al nivel de ploidía y detectándose mediante citometría o por recuento de cromosomas. Las mutaciones génicas pueden ser detectadas por marcadores moleculares como RAPDs (Fourré y col., 1997).

La variación somaclonal es un problema complejo que necesita varios enfoques tales como observaciones morfológicas y citológicas para asegurar la estabilidad genética del material micropropagado, sobre todo por que los marcadores moleculares pueden detectar cambios genéticos que realmente no se expresan fenotípicamente en el individuo regenerado (Fourré y col., 1997).

Además pueden observarse variaciones de origen epigenético en plantas regeneradas por cultivo *in vitro*, que pueden llegar a ser heredables aunque potencialmente reversibles. Estas variaciones se refieren a modificaciones en la expresión génica mediadas por cambios específicos en la estructura de la cromatina y/o metilaciones del ADN, en función de las condiciones ambientales (plasticidad o adaptación a las nuevas condiciones) (Tremblay y col., 1999).

Diversos estudios señalan la estabilidad genética de embriones somáticos y de las plantas generadas (Heinze y Schmidt, 1995). Se asume que la regeneración de plantas por embriogénesis somática es una vía menos expuesta a generar variación genética debido a que su consecución implica la expresión de muchos genes, y cualquier alteración en los mismos haría inviable el proceso (Vasil, 1995).



2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación se centra en el desarrollo de un protocolo para la obtención de embriogénesis somática, como vía de micropropagación clonal del pino piñonero, y como consecuencia la regeneración de árboles selectos.

Para ello se han estudiado diferentes aspectos relacionados con el desarrollo de las distintas etapas de la embriogénesis somática. La Memoria de tesis se ha dividido en varios apartados, relacionados con cada una de las etapas del proceso embriogénico. En cada uno de los apartados se han desarrollado diferentes objetivos parciales:

⌘ **Inducción de embriogénesis somática.**

- Efecto de factores como el tipo de explanto (embriones cigóticos o material vegetativo procedente de árbol adulto), época de recogida, estado de desarrollo de los embriones cigóticos, genotipo, composición del medio de cultivo, y tipos y niveles de reguladores del crecimiento.
- Establecimiento de líneas embriogénicas de árboles selectos.

⌘ **Proliferación y mantenimiento de las líneas embriogénicas.**

- Determinación de la composición del medio de cultivo y concentración de reguladores del crecimiento para la proliferación del material embriogénico.
- Efecto del procedimiento de cultivo de las masas embriogénicas sobre la proliferación celular.
- Influencia del genotipo en esta fase.

⌘ **Maduración de los embriones somáticos.**

- Efecto de distintas condiciones de cultivo previas a la fase de maduración.

- Efecto de factores tales como forma de aplicación y niveles de ABA, tipos y concentraciones de agentes osmóticos y gelficantes, desecación parcial y aplicación de anti-auxinas.
- Aislamiento de los embriones somáticos en maduración.
- Influencia del genotipo en esta fase.

⌘ Germinación y conversión de los embriones somáticos.

- Establecimiento de las condiciones óptimas para la germinación de los embriones: en función de la composición del medio de cultivo, almacenamiento en frío, y su disposición en el medio de cultivo.
- Definición de las condiciones óptimas para el establecimiento *ex vitro* de las plántulas obtenidas.

⌘ Crioconservación del material embriónico.

- Influencia de los agentes crioprotectores en la viabilidad de los cultivos.
- Efecto de la conservación a temperaturas de nitrógeno líquido, sobre la recuperación del crecimiento de distintas líneas embriónicas.
- Maduración y germinación de los embriones somáticos procedentes del material crioconservado.

En la Memoria se han abordado cada uno de los objetivos descritos, desarrollando en cada apartado las metodologías utilizadas, los resultados y su discusión. Como consecuencia, se proponen unos protocolos de regeneración y de crioconservación para su aplicación en pino piñonero.



3. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

3. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El material vegetal utilizado se obtuvo del Banco Clonal de pino piñonero “Cataluña Litoral”, instalado en el Centro Nacional de Mejora Genética Forestal de Puerta de Hierro (Madrid) (Fig. 13).

El Banco Clonal al que se hace referencia está constituido por 90 clones, seleccionados en 8 rodales de la provincia de Barcelona y 6 de Gerona, con un número variable de 3 a 9 clones por rodal. El diseño de la parcela es de siete bloques completos al azar, con unidades experimentales monoárbol, con un marco de plantación de 3x3 metros. La plantación se realizó en febrero de 1993, con planta injertada en el año anterior sobre brinzales de la misma especie (Mutke y col., 2003).



Figura 13: Banco Clonal de pino piñonero “Cataluña Litoral” (Centro Nacional de Mejora Genética Forestal de Puerta de Hierro -Madrid).

Los ensayos de iniciación de cultivos embriogénicos se llevaron a cabo en diferentes tipos de explantos:

- Embrionarios: embriones cigóticos maduros e inmaduros procedentes de piñas de diferentes clones selectos.
- No embrionarios: estróbilos femeninos, estróbilos masculinos, acículas en expansión, yemas y hojas de inserción aislada (braquiblastos).

3.1. CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE DESARROLLO DEL EMBRIÓN CIGÓTICO

3.1.1. Material y métodos:

En 2003 se midieron una serie de parámetros a lo largo de 12 fechas de recogida semanales, desde el 30 de mayo hasta el 10 de septiembre. Se midió el peso, longitud y diámetro de las piñas tomadas de los árboles pertenecientes a los genotipos 39, 47, 59, 61 y 62, mostrándose los datos como la media de los 5 valores obtenidos en cada uno de los parámetros para cada fecha de recogida. Además se caracterizó el color y dureza de las piñas, el color y grado de lignificación de las testas, junto con el tamaño y la textura de los piñones. En 2004, con el fin de caracterizar el desarrollo del embrión cigótico, desde la fecundación hasta el completo desarrollo del embrión cotiledonar, se realizaron observaciones microscópicas y macroscópicas del embrión cigótico en las mismas fechas de recogida que el año anterior. Para las observaciones microscópicas se realizaron tinciones con acetocarmín al 1%.

3.1.2. Resultados:

En las Tablas 2 y 3 se resumen los parámetros cualitativos analizados durante las diferentes recogidas en 2003 y los resultados de los parámetros analizados, respectivamente.

Tabla 2: Parámetros cualitativos analizados durante la recogida de 2003.





PIÑAS		
	Color externo	Dureza
	VO: Verde oscuro	+ Blandas
	VC: Verde claro	++ Endurecidas
	VA: Verde amarillento	+++ Muy duras
TESTAS		
	Color externo	Dureza (grado de lignificación)
	B: Blancas	+ Blandas: se pueden abrir con los dedos
	MC: Marrón claro	++ Endurecidas: se abren con ayuda de bisturí
	MO: Marrón oscuro	+++ Muy duras: se abren con cascapiñones
PIÑONES: Tamaño y textura		
	1 Longitud de 8-9 mm, brillante, translúcido y blando	
	2 Longitud de 10-12 mm, menos brillante, ligeramente opaco y blando	
	3 Longitud de 13-15 mm, mate, opaco y duro	
EMBRIÓN CIGÓTICO: Desarrollo		
	1 Pre-embrión	4 Embrión dominante
	2 Embrión temprana	5 Embrión precotiledonar
	3 «Cleavage»	6 Embrión cotiledonar

Tabla 3: Resultados de los parámetros analizados.

RECOGIDAS	COLOR PIÑAS	DUREZA PIÑAS	COLOR TESTAS	DUREZA TESTAS	TEXTURA PIÑONES	DESARROLLO EMBRIÓN
30.5	VO	+	B	+	1	1
6.6	VO	+	B	+	2	2
13.6	VO	++	MC	++	3	2
20.6	VC	+++	MO	+++	3	3
4.7	VA	+++	MO	+++	3	4
11.7	VA	+++	MO	+++	3	5
18.7-10.9	VA	+++	MO	+++	3	6

En la última semana de mayo, el peso medio de las piñas fue de 183 g aumentando éste hasta la 2ª semana de julio, momento en el que alcanzó un valor medio de 365,8 g. A partir de la 3ª semana de julio, el peso varió en un rango de 230 a 345 g, debido fundamentalmente a que las piñas en este estado de desarrollo mostraban gran

heterogeneidad. No se encontró un incremento paulatino de la longitud de la piña con el desarrollo, solamente entre las dos primeras fechas de recogida. Se observó un incremento paulatino del diámetro de las piñas en las tres primeras recogidas, estabilizándose en las siguientes aunque también se observó una cierta heterogeneidad en las medidas (Tabla 4).

Tabla 4: Valores medios de los parámetros peso, longitud (L) y diámetro (\emptyset), para los 5 genotipos y fecha de recogida en 2003.

RECOGIDA	PESO (g)	L (cm)	\emptyset (cm)
30.5	183,3	9,8	6,8
6.6	207,11	11	7,7
13.6	264,7	13	8,6
20.6	307,5	11,5	8,3
4.7	320,1	9,8	8,8
11.7	365,8	13,6	9,2
18.7	294,7	11,7	8,7
28.7	299,4	11,8	8,7
7.8	288,6	11,4	8,4
25.8	345,9	11,7	8,9
3.9	338,3	11,1	8,9
10.9	230,5	10,3	7,8

En 2004 se determinaron morfológicamente los distintos estados de desarrollo del embrión cigótico, desde la fecundación hasta la total formación del embrión. En mayo, los megagametofitos se mostraron translucidos y únicamente pudo apreciarse la región arquegonial (Fig.14A). La primera semana de junio, los megagametofitos eran ligeramente opacos observándose una división celular temprana, correspondiendo a un estado anterior a la poliembrionía de partición o «cleavage» (Fig.14B). En la segunda semana de junio, los megagametofitos eran opacos y muchos embriones se encontraban al comienzo de la fase de poliembrionía de partición, con las células embrionarias terminales y las células subterminales del suspensor penetrando en la cavidad de corrosión del megagametofito (Fig.14C). Para la tercera semana de junio, se hizo evidente la poliembrionía de partición. (Fig.14D). En la primera semana de julio, se apreció la dominancia de uno de los embriones resultantes del «cleavage» (Fig.14E). En la segunda semana de julio, se hizo patente el desarrollo del embrión dominante estableciéndose su polaridad y la parada del desarrollo de los embriones subordinados (Fig.14F). En la tercera semana de julio, se observó que el embrión dominante alcanzaba el desarrollo precotiledonar, manteniéndose la estructura del suspensor (Fig.14G). En el resto de recogidas se observaron embriones completamente desarrollados, con cotiledones elongados, apreciándose restos de células del suspensor adheridas a los embriones cigóticos. (Figs.14H-J).

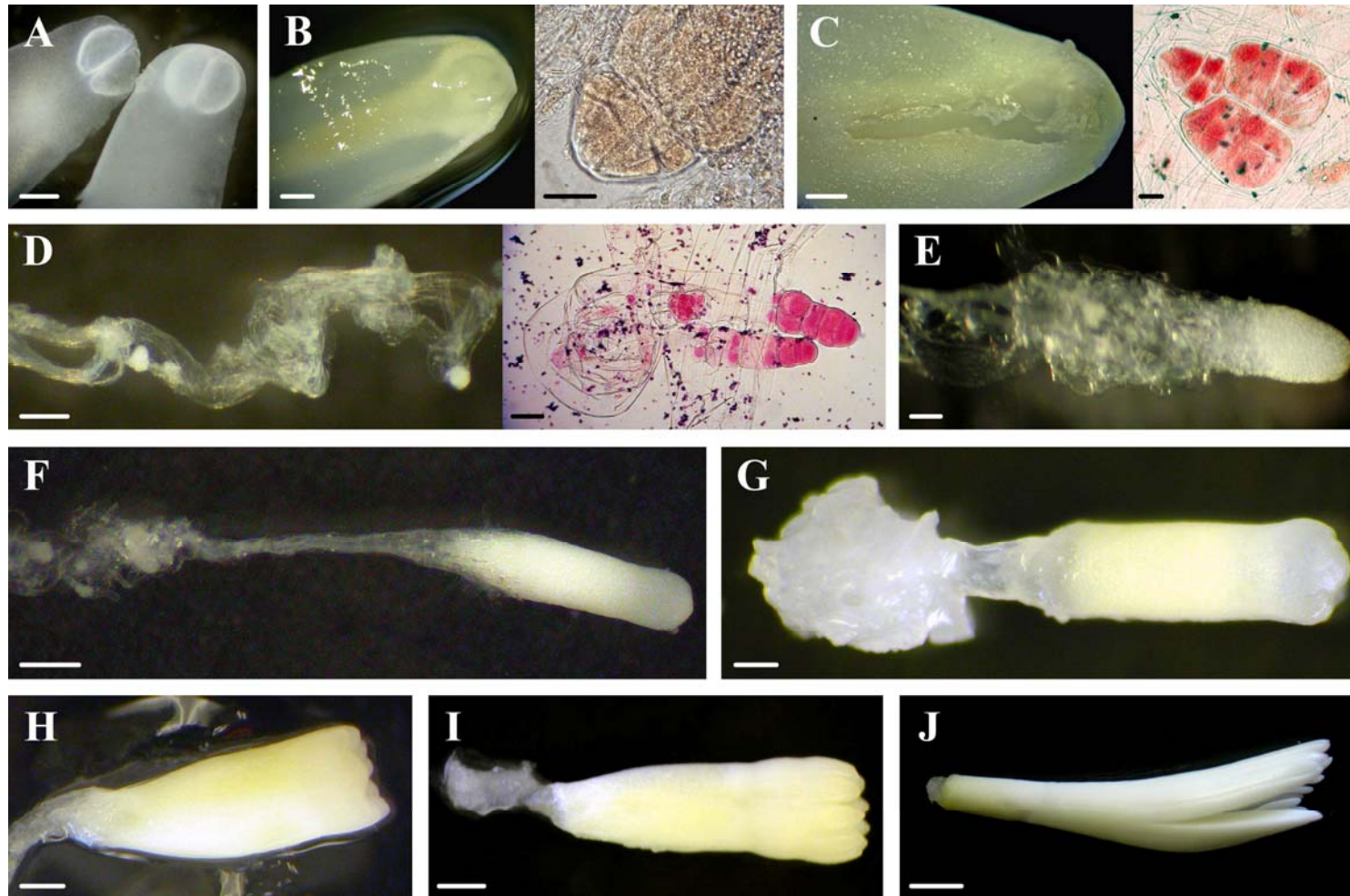


Figura 14: Secuencia del desarrollo del embrión cigótico. **A:** Última semana mayo, megagametofitos translúcidos con región arqueogonial. (barra=1mm). **B:** 1ª semana junio, embrión en estado de 16 células (barra=1 mm, barra=0,2 mm). **C:** 2ª semana junio, suspensor en el interior de la cavidad de corrosión y detalle de los embriones al comienzo del «cleavage» (barra=1 mm, barra=0,1 mm). **D:** 3ª semana junio, poliembrionía de partición o «cleavage» (barra=0,5mm, barra=0,1 mm). **E:** 1ª semana julio, desarrollo del embrión dominante (barra=0,25 mm). **F:** 2ª semana julio, embrión dominante con polaridad establecida (barra=0,5 mm). **G:** 3ª semana julio, embrión precotiledonar: desarrollo del meristemo apical (barra=0,5 mm). **H-J:** Última semana julio hasta mediados septiembre, embrión cotiledonar: elongación de los cotiledones (barras=1 mm). Tinciones con acetocarmín al 1%.

3.2. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE MATERIAL EMBRIONARIO

Se ha evaluado la competencia embriogénica de los embriones cigóticos pertenecientes a distintas familias de semihermanos (polinización abierta) en distintos estados de desarrollo, en relación a diferentes fechas de recolección, durante cuatro años consecutivos. Se ha evaluado la influencia de factores como la composición del medio nutritivo y el aporte de reguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas), así como la influencia del componente genético en la respuesta observada. En los siguientes apartados se describe el material vegetal utilizado, la metodología aplicada, los resultados y discusión de los mismos. En el Anexo 1 se describen las formulaciones de los medios de cultivo utilizados.

3.2.1. EMBRIONES CIGÓTICOS MADUROS. CONSERVACIÓN EN FRÍO

Se estudió el efecto del almacenamiento en frío de las piñas recogidas durante el periodo agosto-septiembre en los años 2003 y 2004, en la obtención de respuestas embriogénicas. En estas fechas, los embriones cigóticos se encontraban en estado cotiledonar avanzado, opacos por el acumulo de reservas (Fig.15). La duración del almacenamiento a 4°C fue de 7 meses.

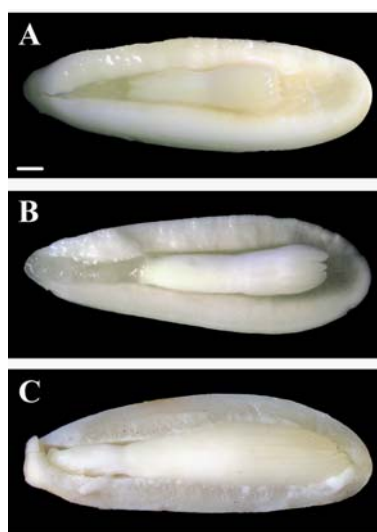


Figura 15: Estado de desarrollo del embrión cigótico. **A:** El 7.8.03 los cotiledones comienzan a elongar. **B:** El 25.8.03 los cotiledones siguen elongando y el embrión conserva aun el suspensor. **C:** El 10.9.03 se alcanza el desarrollo completo. Barra=1mm.

3.2.1.1. Material y métodos:

En 2003 se recogieron piñas en cuatro fechas (7.8, 25.8, 3.9 y 10.9), de árboles pertenecientes a los genotipos 39, 47, 59, 61 y 62. En 2004 se recogieron piñas solo en la fecha 25.8 pertenecientes a los genotipos 10, 11, 47, 70, 75, 87 y 88, coincidiendo en uno de ellos, con el fin de estudiar la respuesta en un rango más amplio de genotipos. Una parte de las piñas se utilizó en fresco y otra se almacenó durante 7 meses. Antes de almacenarlas, las piñas se lavaron con etanol al 75% (v/v) durante 5 minutos, a continuación se secaron al aire y se guardaron en bolsas de plástico.

De las semillas almacenadas se extrajeron los megagametofitos, esterilizándose a continuación con etanol al 75% (v/v) durante 30 segundos aplicando agitación intensa. Posteriormente se sumergieron en lejía comercial (3,5% cloro activo) diluida al 10% (v/v) y una gota de Tween 20[®] durante diez minutos en agitación. Luego se enjuagaron con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar. Ya que en ensayos previos (recolección en 2002) no se obtuvieron proliferaciones cultivando megagametofitos completos en este estado de desarrollo, se procedió al aislamiento del embrión cigótico para su introducción en cultivo.

En 2003, los embriones cigóticos frescos aislados se cultivaron en medios nutritivos basados en las formulaciones del medio LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984) con los macronutrientes diluidos a la mitad, y DCR (Gupta y Durzan, 1985). Los almacenados se cultivaron en los medios LP y 505 (Pullman y Johnson, 2002). Estos medios se suplementaron con hidrolizado de caseína, L- glutamina, ácido ascórbico, carbón activo, sacarosa o maltosa, Gerlite[®] y reguladores del crecimiento en las cantidades indicadas en el Anexo 2, denominándose: DCR, LP1 y PJ1. Se dispusieron de 5 a 49 embriones cigóticos por familia y por cada uno de los medios de cultivo ensayados. Los embriones cigóticos aislados en 2004 tanto frescos como almacenados, se cultivaron en medios basados en las formulaciones de los medios 505 y LV (Litvay y col., 1985). Este último con los macronutrientes diluidos a la mitad, cobalto reducido y adición de cloruro de níquel, según las modificaciones de Yill-Sung Park (comunicación personal). Los medios se suplementaron con hidrolizado de caseína, L- glutamina, ácido ascórbico, carbón activo, sacarosa o maltosa, Gerlite[®] y reguladores del crecimiento en las cantidades indicadas en el

Anexo 2, denominándose PJ1, PJ2, PJ3 y L-mLV₂. Se dispusieron de 5 a 14 embriones cigóticos por familia y medio de cultivo ensayado. Los explantos se cultivaron en placas Petri de 60 mm de diámetro conteniendo cada placa 10 ml de medio. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 23±1°C, con transferencias bisemanales a medio fresco. Se midieron los porcentajes de iniciación de proliferaciones celulares después de cuatro subcultivos en medio de iniciación, en las diferentes familias de semihermanos ensayadas.

Después de 8 semanas en los medios de iniciación, las masas proliferativas se subcultivaron en los medios de mantenimiento, con la misma composición que los medios de iniciación pero con la concentración de reguladores del crecimiento diez veces menor. En los subcultivos, las masas se transfirieron extendiéndolas sobre la superficie del medio, con el fin de favorecer el intercambio de nutrientes. Otras porciones de las masas se disgregaron por agitación en el medio líquido correspondiente, distribuyéndose alícuotas sobre el medio de mantenimiento sólido, con el fin de que el lavado de material favoreciera el crecimiento del tejido. Se realizaron subcultivos a medio fresco cada tres semanas.

Para la determinación de las estructuras embriogénicas se realizaron observaciones al microscopio, seleccionándose de las masas proliferativas aquellas porciones más externas y sueltas en contacto directo con el medio. Otras muestras se tiñeron con acetocarmín al 1% y azul de Evans al 0,05%.

3.2.1.2.Resultados:

En la primera semana en cultivo se observó el alargamiento de los cotiledones y del hipocótilo, observándose proliferaciones celulares en la mayoría de las familias y condiciones de cultivo ensayadas. Pudieron observarse distintas morfologías en las proliferaciones inducidas en los medios de iniciación según el regulador del crecimiento empleado. En presencia de TDZ (medios PJ1 y PJ2), las proliferaciones que aparecían en la región del hipocótilo mostraban estructuras filamentosas (Fig.16A y 16B). Si se empleaba la combinación de auxina y citoquinina (medios DCR, LP1, PJ3 y L-mLV₂), las proliferaciones aparecían a lo largo del cuerpo del embrión y cotiledones, formando agregados celulares más densos (Fig.16C y 16D).

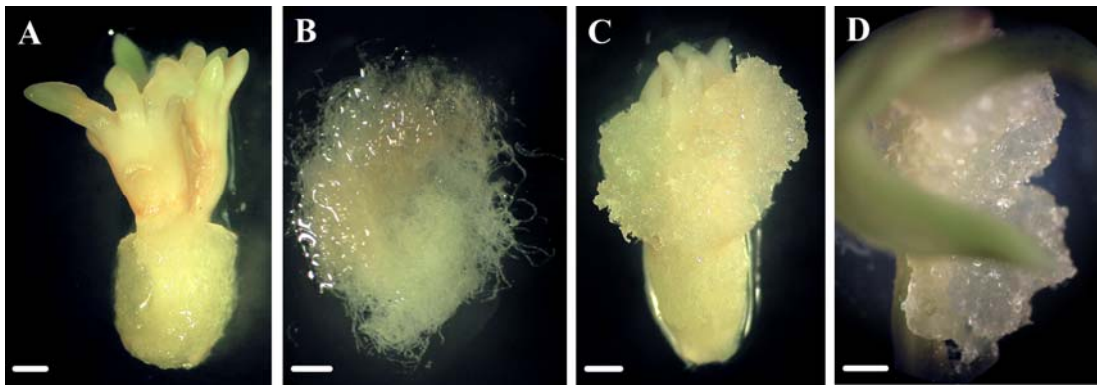


Figura 16: **A:** Embrión cigótico en estado cotiledonar cultivado en medio con TDZ (barra=1 mm). **B:** Proliferación en medio TDZ (barra=0,5 mm). **C:** Embrión cigótico en medio con combinación auxina-citoquinina (barra=1,5 mm). **D:** Proliferación en medio con combinación auxina-citoquinina (barra=1 mm).

El material de 2003 almacenado, cultivado en el medio LP1 (ANA y BAP) rindió mayores porcentajes de inducción de masas proliferativas que el material fresco. Los embriones cultivados en este medio mostraron mayor proliferación que los cultivados en el medio PJ1 (TDZ), siendo las familias 62, 47 y 61 las más competentes (Tabla 5). Los cultivos de material fresco formaron menos proliferación en el medio DCR que en el LP1 (Tabla 5).

Tabla 5: Embriones cigóticos 2003. Proliferaciones inducidas (%) a los 30 días en los medios de iniciación, en cinco familias de semihermanos.

FAMILIA	FRESCO		ALMACENADO	
	LP1	DCR	LP1	PJ1
39	3/5 (60)	4/5 (80)	35/46 (76,1)	25/48 (52,1)
47	4/5 (80)	3/5 (60)	18/20 (90)	32/49 (65,3)
59	3/5 (60)	2/5 (40)	39/49 (79,6)	25/40 (62,5)
61	4/5 (80)	2/5 (40)	23/27 (85,2)	16/33 (48,5)
62	4/5 (80)	3/5 (60)	43/45 (95,6)	32/45 (71,1)
Total	18/25 (72)	14/25 (56)	158/187 (84,5)	130/215 (60,5)

Por el contrario, el material fresco de 2004 rindió mayores porcentajes de inducción que el material almacenado, cultivados en los medios PJ3 y L-mLV₂, siendo el medio PJ3 el que proporcionó mejores resultados. En el medio PJ2 (TDZ) no se formaron proliferaciones (Tabla 6). El material del 2004 almacenado, cultivado en el medio PJ3 (ANA y BAP) rindió mayor proporción de masas proliferativas que los cultivados en el medio L-mLV₂ (2,4D y BAP) y PJ1 (TDZ), siendo las familias 10, 88, 47 y 70 las más competentes (Tabla 6).

Tabla 6: Embriones cigóticos 2004. Proliferaciones inducidas (%) a los 30 días en los medios de iniciación, en siete familias de semihermanos.

FAMILIA	FRESCO			ALMACENADO		
	PJ2	PJ3	L-mLV ₂	PJ1	PJ3	L-mLV ₂
10	0/6 (0)	6/6 (100)	6/6 (100)	4/9 (44,4)	5/6 (83,3)	3/6 (50)
11	0/6 (0)	5/6 (83,3)	6/8 (75)	5/10 (50)	7/10 (70)	6/12 (50)
47	0/8 (0)	6/8 (75)	3/8 (37,5)	7/12 (58,3)	9/12 (75)	8/12 (66,7)
70	0/6 (0)	5/6 (83,3)	3/6 (50)	4/10 (40)	6/8 (75)	6/10 (60)
75	0/6 (0)	5/6 (83,3)	2/5 (40)	3/9 (42,9)	4/6 (66,7)	5/8 (62,5)
87	0/6 (0)	4/6 (66,7)	5/6 (83,3)	5/10 (50)	10/14 (71,4)	4/10 (40)
88	0/6 (0)	6/6 (100)	3/6 (50)	5/8 (62,5)	8/10 (80)	5/8 (62,5)
Total	0/44 (0)	37/44 (84,1)	28/45 (62,2)	33/68 (48,5)	49/66 (74,24)	37/66 (56,1)

En el material de 2003, pudo observarse a las cuatro semanas de cultivo en el medio PJ1 de iniciación, en uno de los 49 embriones cigóticos almacenados de la familia 47, estructuras similares a los estados PEM I y PEM II del desarrollo del embrión somático (Fig.17) descritos por Filonova y col., (2000a).

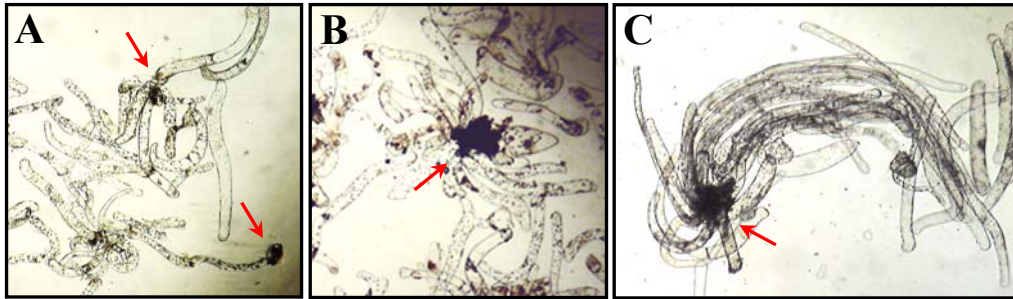


Figura 17: Estructuras pre-embriónicas inducidas en medio con TDZ en la familia 47 almacenada. **A:** Estado de desarrollo PEM I donde se aprecia el pequeño agregado de células densas (flecha) adyacente a una única célula de suspensor. **B-C:** Estado de desarrollo PEM II en el que se observan agregados celulares (flecha) con más de una célula de suspensor.

A las ocho semanas de cultivo, pudo observarse en uno de los 40 embriones cigóticos de la familia 59 y en uno de los 45 de la familia 62, cultivados en el medio PJ1 de mantenimiento, el desarrollo de embriones somáticos. Tinciones con acetocarmín y azul de Evans confirmaron la naturaleza embriogénica de las masas inducidas en este material almacenado (Fig.18).

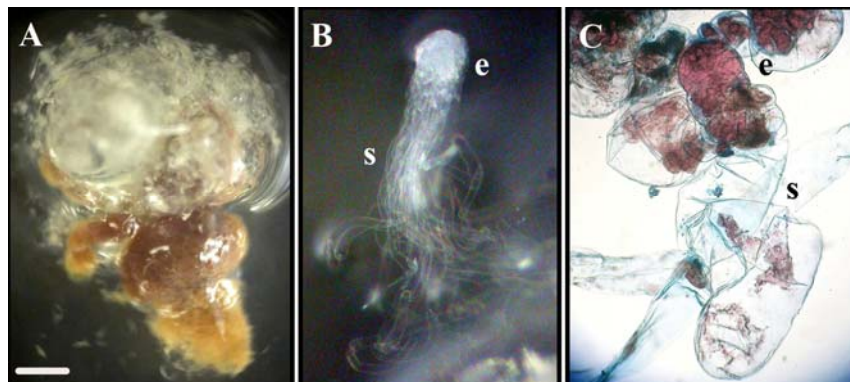


Figura 18: Embrión cigótico almacenado de la familia 59, cultivado en medio de mantenimiento PJ1. **A:** Masa embriogénica (barra=1 mm). **B:** Embrión somático en el que se aprecian células del suspensor (s) y células embrionarias (e). **C:** Tinción con acetocarmín y azul de Evans donde las células embrionarias (e) aparecen teñidas de rojo y las células del suspensor (s) de azul (X16).

En el material de 2004, pudo observarse que a las ocho semanas de cultivo en el medio PJ3 de mantenimiento, en uno de los 8 embriones cigóticos almacenados de la familia 70, aparecían numerosos embriones somáticos en sus fases iniciales del desarrollo (Fig.19).

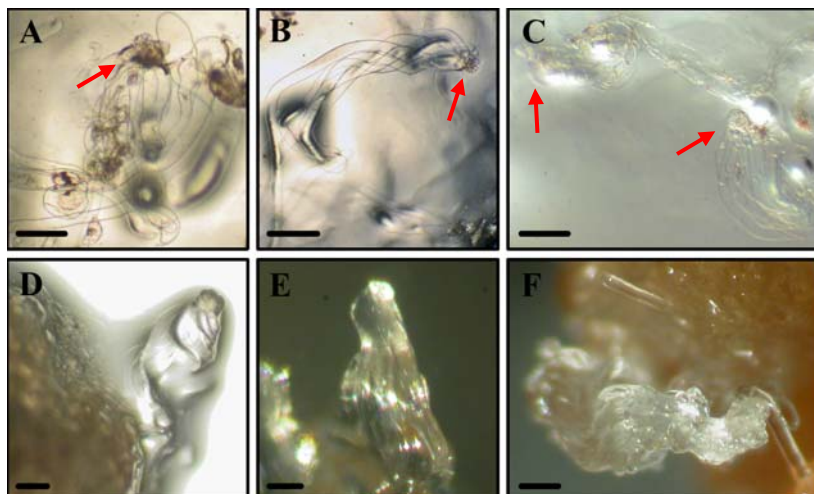


Figura 19: Diversos embriones somáticos de la familia 70 almacenada observados en el medio de mantenimiento PJ3. **A-C:** Embriones poco organizados con cabezas embrionarias pequeñas y células vacuoladas de suspensor (flechas; barra= 0,2 mm). **D-F:** Embriones más organizados. (Figs. D y E, barra= 0,2 mm; Fig. F, barra= 0,5 mm).

En ambos años, el material fresco no diferenció embriones somáticos a lo largo de los subcultivos.

En las condiciones de mantenimiento, la técnica de disgregar las masas proliferativas en medio líquido y posterior dispensación de alícuotas en placas con medio sólido, no favoreció el crecimiento de las masas. En todos los casos, las masas embriogénicas inducidas en los diferentes medios no mantuvieron su capacidad proliferativa a lo largo de los subcultivos, no siendo posible la diferenciación de los embriones somáticos inicialmente formados.

3.2.1.3. Discusión:

En coníferas, está ampliamente descrito que las mayores frecuencias de inducción de embriogénesis somática se obtienen a partir de embriones cigóticos inmaduros, frente a explantos con edad ontogénica mayor (embriones cigóticos maduros o tejidos vegetativos). Los embriones cigóticos inmaduros generalmente proporcionan respuestas embriogénicas en un estado de desarrollo muy concreto (*ventana de desarrollo*), pudiendo variar de un año a otro (Klimaszewska, 1995). La disponibilidad de este tipo de explanto quedaría pues

reducida a un corto periodo de tiempo, teniendo que esperar al año siguiente para realizar nuevas inducciones.

Se ha descrito que el almacenamiento en frío de las semillas inmaduras, produce una disminución en la frecuencia de la respuesta embriogénica, sobre todo con periodos superiores a tres meses, bien por que el embrión continúa desarrollándose o por que las bajas temperaturas producen la desecación del embrión (Hakman y Fowke, 1987).

En coníferas, la poliembrionía puede resultar de la fecundación de más de un óvulo y conducir al desarrollo inicial de múltiples embriones cigóticos con diferentes genotipos (Singh, 1978). En los pinos el megagametofito contiene varios arquegonios, por lo que es posible que el tejido embriogénico generado pueda contener mezcla de genotipos (Park, 2002). En *Pinus monticola* se observaron más de 10 embriones, lo que indicaba la fecundación de tres o cuatro arquegonios. En el tejido embriogénico extruído se observó la presencia de embriones subordinados mientras que el embrión dominante permanecía en la cavidad de corrosión, lo cual sugiere que el cultivo podría estar compuesto por varios genotipos, y los embriones somáticos maduros generados podrían tener diferente origen genético (Percy y col., 2000). Sin embargo, estos autores indicaron que todos los embriones somáticos obtenidos en sus cultivos eran genéticamente idénticos, sugiriendo que podría haber una presión selectiva a lo largo del cultivo que favoreciera la multiplicación de un único genotipo. Park (2002) indicó que la reiniciación de tejido embriogénico a partir de embriones somáticos maduros podría ser un sistema de *purificación* de líneas clonales.

Estos problemas podrían verse solventados mediante la utilización de semillas maduras, ya que se evitaría cualquier riesgo de tener líneas embriogénicas con mezcla de genotipos. Además, pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo sin cambios apreciables en la respuesta embriogénica, y así permitir una independencia sobre la floración irregular y las restricciones ocasionadas por la ventana de respuesta de los embriones inmaduros durante el año (Garin y col., 1998).

Generalmente aparece en la bibliografía que las piñas o las semillas se mantienen almacenadas en frío durante diferentes periodos antes de que los embriones cigóticos

maduros se introduzcan en cultivo, pudiendo variar unas horas (Deb y Tandon, 2002), unos meses (Radojevic y col., 1999), e incluso unos años en *Picea glauca*, *Picea mariana* y *Pinus sylvestris* (Tremblay, 1990; Cheliak y Klimaszewska, 1991; Hohtola, 1995).

Observaciones similares a las obtenidas con el cultivo de megagametofitos completos de pino piñonero se han descrito en otras especies. El cultivo de embriones cigóticos aislados del megagametofito ha favorecido la inducción de embriogénesis somática en *Pinus sylvestris* (Hohtola, 1995), *Pinus nigra* (Salajova y col., 1995; Radojevic y col., 1999), *Pinus koraiensis* (Bozhkov y col., 1997), *Pinus strobus* (Garin y col., 1998), *Pinus taeda* (Tang y col., 2001), *Pinus kesiya* (Deb y Tandon, 2002), *Picea glauca* (Tremblay, 1990), *Picea mariana* (Cheliak y Klimaszewska, 1991), *Picea abies* (Ramarosandratana y van Staden, 2003) o *Abies fraseri* (Guevin y Kirby, 1997).

En este trabajo se contempla la posibilidad de inducir respuestas embriogénicas en embriones cigóticos maduros frescos y almacenados en frío utilizando varias condiciones de cultivo. Nuestros datos muestran que 7 meses de almacenamiento de las piñas a 4°C, promueve la respuesta embriogénica de los embriones cigóticos maduros, obteniéndose la formación de embriones somáticos en un estado de desarrollo inicial. Sin embargo, en los ensayos con embriones cigóticos frescos en el mismo desarrollo, no se indujeron estructuras embriogénicas. Park y col., (1993) mostraron en *Picea glauca* diferencias en la iniciación de embriogénesis somática entre embriones maduros e inmaduros y entre frescos o almacenados a 4°C durante 2 meses. Obtuvieron un 25% de inducción en el material maduro fresco, frente a un 15% en los almacenados. También con el material inmaduro obtuvieron una disminución en la respuesta con el almacenamiento.

Al igual que en el piñonero, se observó que durante las primeras semanas en cultivo se producía el alargamiento de los cotiledones y del hipocótilo en *Pinus strobus*, seguido de la formación de proliferaciones celulares (Garin y col., 1998). En el pino piñonero, cuando se empleaba el medio de inducción con auxina-citoquinina, la aparición de las proliferaciones ocurría principalmente en la zona de transición entre los cotiledones y el hipocótilo, mientras que con TDZ se inducía la aparición de las proliferaciones mayoritariamente en la región del hipocótilo. En trabajos realizados con *Picea abies*, donde estudian en detalle diferentes secciones del embrión cigótico, se observó que la

región entre los cotiledones y el hipocótilo proporcionaba mayores respuestas embriogénicas en medios con auxina-citoquinina, sugiriendo que era una región de gran actividad meristemática (Ramarosandratana y van Staden, 2003). En *Abies fraseri* (Guevin y Kirby, 1997) se obtuvo un 3,5% de inducción en medios con TDZ. En pino piñonero las proliferaciones inducidas con TDZ mostraron agregados celulares similares a los descritos en la literatura y la diferenciación de algún embrión.

En general, las frecuencias de inducción de embriogénesis somática en material maduro son más bajas que en material inmaduro. En *Pinus sylvestris* (Hohtola, 1995), se obtuvo entre el 8-15% de inducción de embriogénesis, pero solamente del 1 al 2% se mantuvieron después de varios subcultivos. Estas menores frecuencias de inducción podrían relacionarse con el origen de las masas embriogénicas, principalmente en la región del suspensor, donde se encuentran uno o más de los embriones subordinados resultantes del proceso de «cleavage» (Becwar y col., 1991).

Ya que se utilizó un número bajo de explantos, no se han podido establecer diferencias significativas en las respuestas embriogénicas en función de las formulaciones de los medios, del tipo de reguladores del crecimiento y del genotipo.

Una optimización de las respuestas obtenidas en este trabajo podría conseguirse introduciendo en cultivo un mayor número de explantos iniciales. Además, esta proporción podría aumentarse si se aplicara una *mejora selectiva*, es decir seleccionando el árbol madre cuyas semillas inmaduras hubieran dado mejores respuestas en cultivo (Cheliak y Klimaszewska, 1991; Park y col., 1993; Niskanen y col., 2004; MacKay y col., 2006).

3.2.2. EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS

Durante los años 2005 y 2006 se estudió la capacidad de los embriones cigóticos inmaduros para producir respuestas embriogénicas en medios de iniciación. Basándonos en ensayos preliminares (recolección en 2002), donde no se obtuvieron proliferaciones embriogénicas cultivando embriones inmaduros extraídos del megagametofito, en este período se optó por cultivar los megagametofitos completos.

3.2.2.1. Material y métodos:

En ambos años se recogieron semanalmente piñas pertenecientes a cinco familias de semihermanos (11, 47, 58, 70 y 88). En el experimento llevado a cabo en 2005, las fechas de recolección fueron el 23 de junio y 1, 6, 13, 20, 27 de julio. En el año 2006 las recogidas se hicieron el 7, 14, 23 de junio y 1, 6, 13, 20, 27 de julio.

En cada una de las fechas de recogida, las piñas se guardaron en bolsas de papel y se almacenaron a 4°C durante un máximo de dos semanas, periodo en el que se completó la extracción de los megagametofitos. Antes de su almacenamiento, las piñas se limpiaron con etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos, sumergiéndolas a continuación en lejía comercial (3,5% cloro activo) diluida al 10% (v/v) durante 10 minutos, secándolas al aire.

Para su introducción en cultivo, los piñones de cada una de las cinco familias se esterilizaron con lejía comercial diluida al 10% (v/v) y una gota de Tween 20[®], durante 15 minutos en agitación orbital (110 rpm), enjuagándolas cuatro veces con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar. Luego, en condiciones de esterilidad se partieron las testas para la extracción de los megagametofitos. Los megagametofitos se depositaron en placas Petri (90 mm de diámetro) que contenían discos de papel de filtro humedecidos con agua destilada estéril, hasta su introducción en los medios de cultivo.

Para la iniciación de los cultivos embriogénicos se emplearon tres medios de cultivo en 2005 y cinco en 2006, siendo dos de ellos comunes en ambos años (Anexo 2).

Con el material recolectado en 2005, se empleó el medio de cultivo mL_V₂ basado en la formulación del medio Litvay (Litvay y col., 1985), con los macronutrientes reducidos a la mitad. Los micronutrientes se modificaron de la siguiente manera: las concentraciones de ácido bórico, sales de manganeso y zinc coincidían con la formulación original del medio LV; el molibdeno, cobre y yodo fueron reducidos a la mitad; el cobalto se redujo a 0,01 mg/l, y se añadieron 0,72 mg/l de NiCl₂ (Anexo 1). Se ensayaron tres combinaciones de reguladores del crecimiento a diferentes concentraciones (Anexo 2): baja, L-mL_V₂ (2,4 μM 2,4-D y 2,2 μM BAP); media, M-mL_V₂ (9 μM 2,4-D y 4,5 μM BAP); y alta, H-mL_V₂ (15 μM 2,4-D y 4,5 μM BAP) (Tabla 7). Todos los medios contenían 10 g/l de sacarosa.

Se cultivaron un total de 3.500 megagametofitos (6 fechas de recogida x 5 familias de semihermanos x 3 medios de cultivo x 10 semillas por repetición x 3-4 repeticiones por tratamiento).

Con el material recolectado en 2006, se emplearon los medios M-mLV₂ y H-mLV₂ descritos el año anterior, y un tercer medio suplementado con 20 µM 2,4-D y 4,5 µM BAP denominado UH-mLV₂ (Anexo 2). Los otros dos medios adicionales, coincidían con la formulación original del medio Litvay (mLV) modificado por Klimaszewska y col., (2001), con la concentración de macronutrientes reducida a la mitad, y los micronutrientes, Fe-EDTA y cofactores a concentración normal (Anexo 1). Estos medios contenían reguladores del crecimiento a concentración media, M-mLV (9,5 µM 2,4-D y 4,5µM BAP) y alta, H-mLV (15 µM 2,4-D y 4,5 µM BAP) (Tabla 7). Estos dos últimos medios contenían 20 g/l de sacarosa. Se cultivaron un total de 7.200 megagametofitos (8 fechas de recogida x 5 familias de semihermanos x 5 medios de cultivo x 10 semillas por repetición x 3-4 repeticiones por tratamiento).

Tabla 7: Modificaciones en los micronutrientes, reguladores del crecimiento y contenido en sacarosa en los medios de cultivo empleados para la iniciación y mantenimiento de los tejidos embriogénicos.

MEDIOS	SALES (mg/l)					PGRs (µM)		SACAROSA (g/l)
	NiCl ₂	CoCl ₂	CuSO ₄	Na ₂ MoO ₄	KI	2,4D	BA	
UH-mLV ₂	0,72	0,01	0,25	0,63	2,1	20	4,5	10
H-mLV ₂	0,72	0,01	0,25	0,63	2,1	15	4,5	10
M-mLV ₂	0,72	0,01	0,25	0,63	2,1	9	4,5	10
L-mLV ₂	0,72	0,01	0,25	0,63	2,1	2,4	2,2	10
H-mLV	-	0,125	0,5	1,25	4,15	15	4,5	20
M-mLV	-	0,125	0,5	1,25	4,15	9,5	4,5	20

Todos los medios se suplementaron con 1 g/l de hidrolizado de caseína y con una solución de 0,5 g/l de L-glutamina. Esta última se esterilizó por filtración y se añadió a los medios autoclavados a una temperatura entre 55-60°C. El pH se ajustó a 5,8 y se gelificaron con 4 g/l de Gerlite[®].

Se cultivaron diez megagametofitos completos por placa Petri (90 mm de diámetro), que contenía aproximadamente 25 ml de medio de cultivo. Las placas se sellaron con Parafilm® y se cultivaron en condiciones de oscuridad a 23 ± 1 °C durante la duración del experimento. Se realizaron tres o cuatro repeticiones (placas Petri) por tratamiento, dependiendo de la disponibilidad de material. Los cultivos se examinaron semanalmente para registrar la aparición de respuestas. No se realizaron subcultivos a lo largo de las 12 semanas del experimento.

Se consideró como *extrusión*, cuando el embrión cigótico emergía fuera del extremo del micropilo del megagametofito y proliferaba para formar una masa inicial de aspecto embriogénico. Se consideró como *establecimiento* o *iniciación*, cuando este tejido extruído mostraba un crecimiento continuo y producía una cantidad suficiente de ESM (masas de embrión-suspensor) para su subcultivo. Se contabilizaron como líneas embriogénicas establecidas aquellas ESM que mantenían el crecimiento activo en las condiciones descritas, después de 4 meses en cultivo.

Se evaluó el efecto del año de recolección, la fecha de recogida, la familia, el medio de cultivo y el genotipo realizando el ANOVA, mediante el programa Statistica para Windows 5.1 (StatSoft, Tulsa, OK). Los datos de las frecuencias de extrusión e iniciación de líneas embriogénicas se transformaron mediante el arcoseno $\sqrt{(\%)}$. Los datos de medias se muestran con sus errores estándar (es). Las diferencias significativas entre medias se determinaron mediante el test de Duncan con un nivel de significación del 5%.

3.2.2.2. Resultados:

En ambos años, transcurridas de 4 a 12 semanas en cultivo en medio de iniciación, se observaron las primeras extrusiones en la región del micropilo del megagametofito (Fig. 20). Estas masas de embrión-suspensor se mantuvieron en proliferación hasta alcanzar aproximadamente 60 mg, siendo éste el momento en el que se separaron del megagametofito y se subcultivaron en medio de mantenimiento.

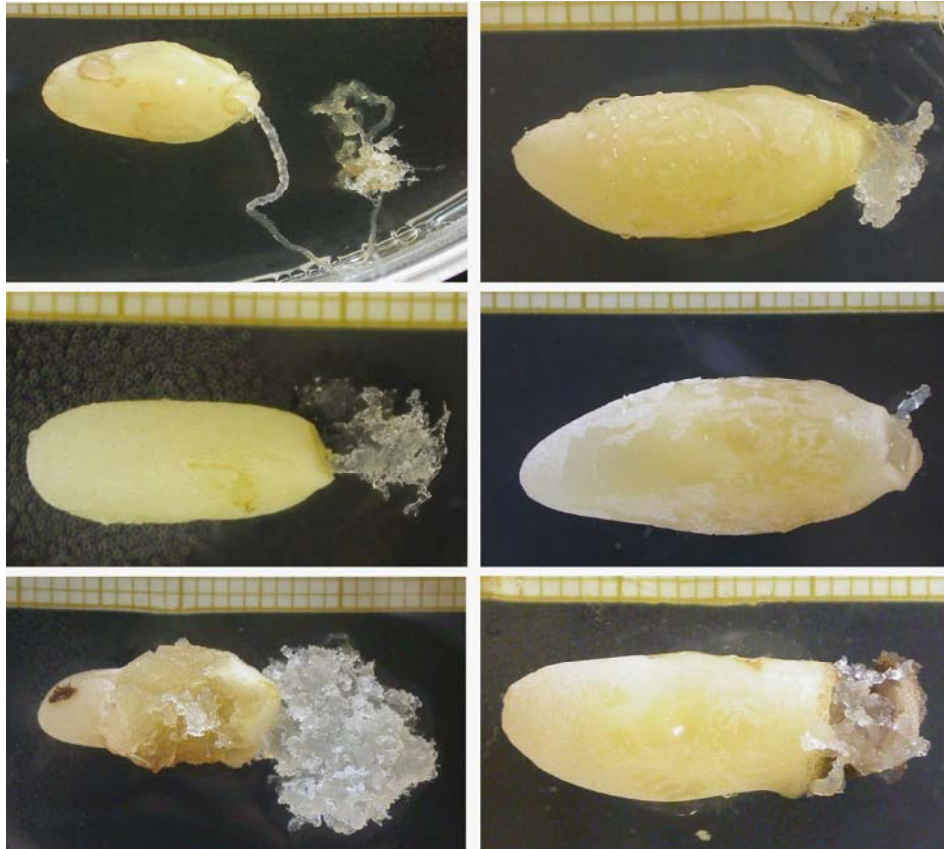


Figura 20: Tipos de extrusiones observadas en la región del micropilo del megagametofito, entre las 4 y 12 semanas de cultivo en medios de iniciación.

Pudo observarse que, en aquellos megagametofitos que extruía mayor cantidad de tejido embriónico, tras aislarlo del explanto original, seguía extruyendo nuevo tejido (Fig. 21). La extrusión podía mantenerse hasta un máximo de diez meses después de la primera.



Figura 21: Nueva extrusión emergiendo del explanto original y masa embriónica retirada en el subcultivo anterior.

Algunos explantos exhibieron proliferaciones de tejido blanco y mucilaginoso, los cuales se acompañaban en ocasiones de la ruptura del megagametofito a lo largo de su eje longitudinal (Fig. 22).



Figura 22: Megagametofito, con embrión cigótico en estado precotiledonar, rasgado a lo largo del eje longitudinal en cuyo interior se observa el tejido embriogénico en proliferación.

En ensayos anteriores se observó que a pesar de que muchos megagametofitos exhibían la extrusión de tejido embriogénico, solamente una parte de estas proliferaciones podían mantenerse en subcultivos sucesivos, contabilizándose por separado las respuestas de extrusión y de iniciación o establecimiento.

En todas las familias, medios de cultivo y fechas de recogida en 2005, se obtuvieron 152 extrusiones, representando el 4,3% de los 3500 explantos cultivados. Sin embargo, solamente se establecieron 7 líneas embriogénicas, representando el 0,2% de los explantos iniciales. En 2006, 406 megagametofitos mostraron extrusiones, representando el 5,6% de los 7200 explantos iniciales, pudiéndose establecer 34 líneas embriogénicas, representando el 0,5% de los explantos iniciales. Por tanto, parece que los explantos respondieron mejor en 2006 que en 2005. Cuando se consideraron los datos referentes a los medios de cultivo comunes para ambos años, se observó un efecto significativo del año tanto en la extrusión ($p=0,000$) como en la iniciación de ES ($p=0,042$) (Fig. 23).

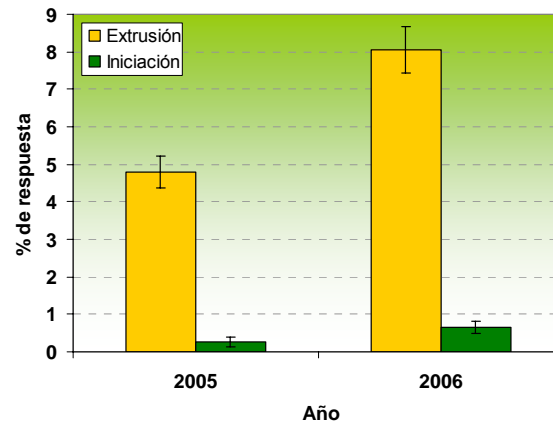


Figura 23: Frecuencia de extrusión y establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros, en los años 2005-2006. Los datos representan la media de cinco familias, en seis fechas de recogida y dos medios de cultivo comunes a ambos años. Los valores \pm es corresponden a la media de 233 repeticiones en 2005 y 228 repeticiones en 2006, de 7-10 semillas por repetición.

En el experimento llevado a cabo en 2006 se observó una influencia del medio de inducción en la frecuencia de iniciación ($p = 0,046$). Esto se debió principalmente a la composición basal de los medios, ya que el medio mLV₂ rindió frecuencias entre tres y cuatro veces más altas que las obtenidas con el medio mLV (Tabla 8). Según los datos obtenidos, concentraciones de 2,4-D en un rango de 9 a 20 μ M no afectó ni a la extrusión ni a la iniciación en ambos años. Los mejores resultados se obtuvieron en el medio M-mLV₂ en 2006 dando una frecuencia de iniciación 9 veces más alta que la obtenida en 2005. Sin embargo, el medio H-mLV₂ con concentraciones aumentadas de 2,4D se comportó igual en los experimentos de 2005 y 2006. La interacción entre familia x medio de cultivo no fue significativa.

Tabla 8: Iniciación de embriogénesis somática en *Pinus pinea*. Efecto del medio de cultivo en la frecuencia (%) de embriones cigóticos iniciales formando líneas embriogénicas establecidas. Los valores son la media \pm es de 117 y 144 repeticiones, de 7-10 semillas por repetición, dependiendo del año (cinco familias, y seis y ocho fechas de recogida en los años 2005 y 2006 respectivamente). Las medias en la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes a $p=0,05$ (Test de rango múltiple de Duncan)

MEDIO	2005	2006
UH-mLV ₂	--	0,7 \pm 0,2 b
H-mLV ₂	0,4 \pm 0,2 a	0,4 \pm 0,2 ab
M-mLV ₂	0,1 \pm 0,1 a	0,9 \pm 0,3 b
L-mLV ₂	0,1 \pm 0,1 a	--
H-mLV	--	0,1 \pm 0,1 a
M-mLV	--	0,3 \pm 0,1 ab

Aunque en el medio mLV₂ se obtuvieron mayores frecuencias de iniciación, algunas líneas embriogénicas perdían su capacidad proliferativa cuando se subcultivaban en el mismo medio de iniciación del que procedían, produciendo un tejido ligeramente oscuro y con un crecimiento menos vigoroso. Este fenómeno no se observó cuando se utilizó el medio M-mLV. Por tanto, todas las líneas embriogénicas obtenidas en los diferentes medios de iniciación, se subcultivaron en este medio para su mantenimiento. Cuando las líneas embriogénicas establecidas se subcultivaron en medios sin PGRs, las masas embriogénicas no proliferaron (datos no mostrados).

La capacidad de los explantos para formar extrusiones se vio influida significativamente por la fecha de recogida de las piñas en los experimentos realizados en 2005 ($p= 0,009$) y 2006 ($p= 0,000$). Por el contrario, no se detectó un efecto significativo de este factor en la iniciación de la ES. La frecuencia de extrusión tuvo un patrón casi idéntico en ambos años. Era nula o muy baja en las primeras fechas de recogida, incrementándose hasta finales de junio, alcanzándose su máximo durante la primera semana de julio cuando los embriones cigóticos estaban en el estado posterior a la poliembrionía de partición, y decayendo hacia la mitad de julio, cuando la mayoría de los embriones cigóticos comenzaban a desarrollar los cotiledones (Fig 24). En las siguientes fechas de recogida, a pesar de no tener un efecto significativo, se obtuvieron frecuencias de extrusión más altas. La disminución observada a mediados de julio pudo deberse principalmente a la falta de respuesta de las familias 58 y 70 en el año 2005 y de la familia 58 en 2006. La frecuencia de iniciación de ES mostró patrones similares en ambos años. Los valores máximos se alcanzaron a principios de julio, pero con un ligero retraso en el año 2005. (Fig 24).

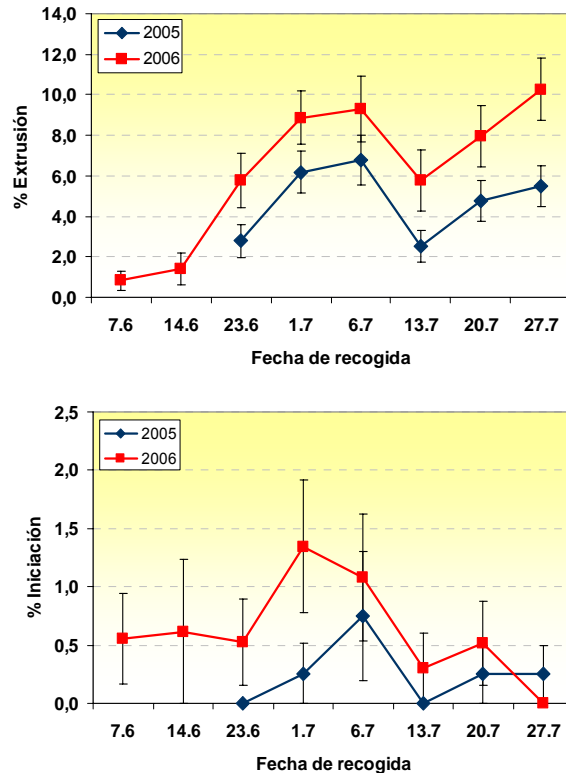


Figura 24: Efecto de la fecha de recogida en las frecuencias de extrusión y establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros, en los años 2005-2006. Cada punto representa la media de las cinco familias, en los dos medios de cultivo comunes a ambos años. Los valores \pm es corresponden al valor medio de 34-40 repeticiones en 2005 y 27-42 repeticiones en 2006, de 7-10 semillas por repetición.

El nivel de significación del efecto familia en la frecuencia de líneas establecidas fue cercano al 5%, tanto en 2005 ($p = 0,053$) como en 2006 ($p = 0,062$), para el análisis de los datos referentes a todas las fechas de recogida y medios de cultivo. Se observó gran variación en el valor medio de la frecuencia de iniciación de ES entre las familias (Fig.25). En el ensayo de 2005, no respondieron los explantos pertenecientes a las familias 47 y 88, solamente se estableció una línea embriogénica en las familias 58 y 70, y cinco líneas en la familia 11. En el ensayo de 2006, se obtuvieron seis líneas en la familia 11, seis en la 47, doce en la 58, una en la 70 y nueve en la familia 88. A pesar de no existir diferencias significativas en la interacción familia x fecha de recogida, cuando se observó el comportamiento de cada una de las familias de forma independiente a lo largo de todas las fechas de recogidas, se apreciaron patrones muy diferentes en la frecuencia de iniciación (Fig. 26). Aunque la mayor parte de las familias mostraron una *ventana de respuesta* relativamente estrecha, la familia 11, la única que respondió de igual forma en 2005 y 2006

(0,7 y 0,4% de iniciación no significativamente diferentes; 5 y 6 líneas embriogénicas establecidas, respectivamente), mostró un periodo de respuesta más amplio.

De los 10700 megagametofitos cultivados, se iniciaron 558 cultivos embriogénicos en los diferentes medios de cultivo ensayados en los experimentos de 2005 y 2006, pero solamente el 7,3% se establecieron como líneas embriogénicas (7 en 2005 y 34 en 2006) en un periodo superior a 6 meses. De todas las familias ensayadas se obtuvieron líneas embriogénicas.

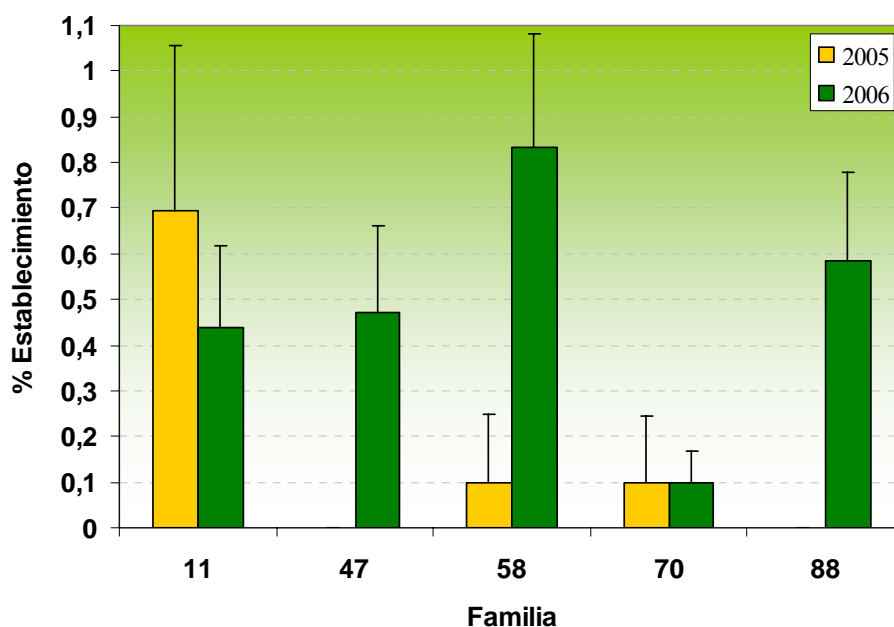


Figura 25: Efecto de la familia en la frecuencia de establecimiento de líneas embriogénicas a partir de embriones cigóticos inmaduros. Los datos son medias de todos los medios de cultivo ensayados, y fechas de recogida en 2005 y 2006. Los valores \pm es corresponden al valor medio de 68-72 repeticiones en 2005 y 134-159 en 2006, y 7-10 semillas por re petición.

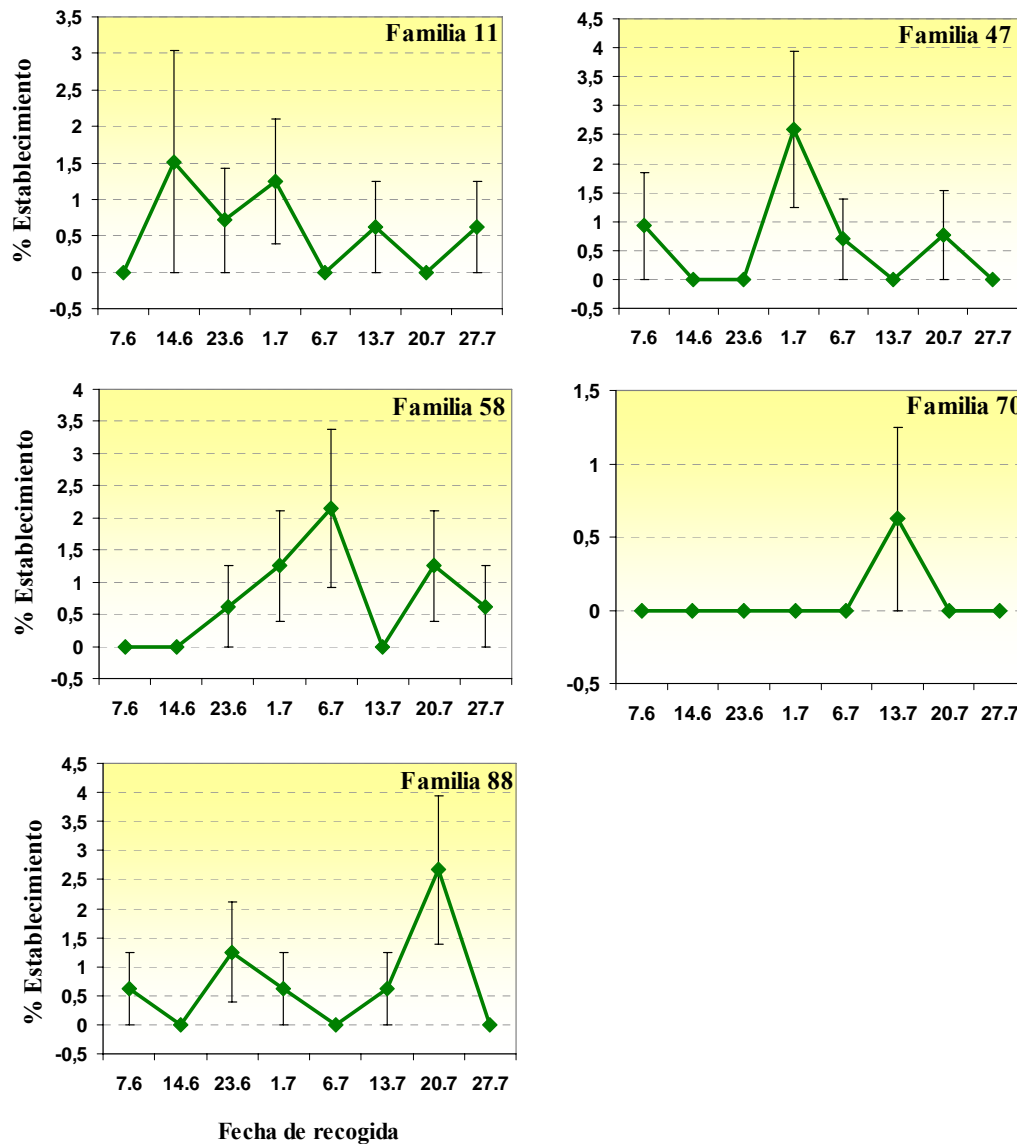


Figura 26: Efecto de la fecha de recogida en la frecuencia de establecimiento de líneas embriogénicas en 2006, para cada una de las familias estudiadas. Cada punto representa la media de todos los medios de cultivo. Los valores \pm corresponden a la media de 9-16 repeticiones, de 7-10 semillas por repetición.

3.2.2.3. Discusión:

La iniciación de ES en megagametofitos completos se consiguió en una frecuencia baja, con una media de aproximadamente el 0,5%. Aunque los primeros artículos referidos a la ES en otras especies de pino como el *P. strobus* (Finer y col., 1989), señalaban que las frecuencias de iniciación eran bajas, no lo suponían como un factor limitante. Las frecuencias de iniciación para la mayoría de las especies descritas en estos estudios iniciales también fueron muy bajas (Becwar y col., 1990; Percy y col., 2000). Por ello, para

evitar problemas de erosión genética en programas de mejora, sería deseable capturar tantos genotipos como fuera posible.

En el género *Pinus* se están desarrollando nuevos protocolos para mejorar las frecuencias de iniciación (Pullman y Johnson, 2002), y por lo tanto es de esperar que sea posible incrementar la eficiencia de ES en pino piñonero. Por ejemplo, con un protocolo optimizado, se pudo incrementar la frecuencia de iniciación en *P. strobus* en un total del 76% (Klimaszewska y col., 2001).

Aunque la mayoría de las extrusiones a partir del megagametofito podían establecerse como líneas embriogénicas en algunas especies (Miguel y col., 2004; Salajová y Salaj 2005), en otras se observaron diferencias entre las frecuencias de extrusión e iniciación de ES (Percy y col., 2000; Pullman y Johnson, 2002). Este hecho supondría un problema para la aplicación de la ES en silvicultura multivarietal en algunas especies de pino, puesto que limitaría el número de genotipos capturados.

Sin embargo, la extrusión es necesaria para la iniciación de ES. En *P. taeda*, 1/5 de las extrusiones acabaron siendo líneas embriogénicas (MacKay y col., 2006). En el caso del pino piñonero, solo 1/20 de las extrusiones en el experimento de 2005, y 1/12 en el de 2006 llegaron a establecerse como líneas embriogénicas. Estas diferencias entre proporciones en los diferentes años pueden indicar la existencia de factores que controlan la viabilidad de las extrusiones. Por tanto, su identificación y manipulación podrían incrementar las frecuencias de iniciación de ES en el pino piñonero. MacKay y col., (2006) observaron en *P. taeda*, que la extrusión de masas embriogénicas y la iniciación se encontraba bajo diferentes tipos de control genético.

En pino piñonero se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de iniciación entre los años 2005 y 2006. La presencia del megagametofito podría estar relacionada con estas diferencias. Nuestros resultados indican claramente que las diferencias entre ambos años se mantuvieron en todas las fechas de recogida. Estas diferencias también han sido descritas en otras especies de pinos, tales como *P. pinaster* (Miguel y col., 2004) y *P. nigra* (Salajová y Salaj, 2005). En *P. taeda*, las diferencias en las frecuencias de iniciación de masas embriogénicas se debieron a compuestos

estimuladores producidos por el gametofito femenino (Pullman y Johnson, 2002). Algunos autores también han señalado que los efectos maternos observados en la iniciación de líneas embriogénicas, podrían estar relacionados con la presencia del megagametofito (MacKay y col., 2006). Entre las coníferas, el pino piñonero presenta uno de los mayores megagametofitos y, por tanto, es posible que esta influencia merezca ser estudiada.

Los ensayos basados en la composición de los medios no fueron lo suficientemente amplios como para llegar a conclusiones acerca de su efecto en la iniciación de líneas embriogénicas. No obstante, parece que las concentraciones de 2,4D y BAP, empleadas dentro del rango comúnmente utilizado en otras especies de pinos, fueron menos importantes que la formulación del medio basal. Una respuesta similar se observó en *P. pinaster*, en el que la formulación del medio basal fue más importante que las concentraciones de 2,4D, utilizadas en un rango entre 2,4 y 13,5 μM (Park y col., 2006). El efecto de la concentración de 2,4D podría estar influido por el contenido endógeno de reguladores, pudiéndose así explicar las diferencias observadas entre años en el pino piñonero. Aunque algunos estudios destacan que la composición del medio nutritivo no es determinante para la obtención de ES en algunas coníferas, el pino piñonero parece pertenecer al grupo de especies dependientes del medio nutritivo (Li y col., 1998; Miguel y col., 2004; Park y col., 2006). Ensayos preliminares en los que se emplearon muchas de las formulaciones normalmente utilizadas en coníferas, no dieron resultados en pino piñonero. La utilización del medio mLV suplementado con níquel y bajo contenido en cobalto, medio que mejoró la frecuencia de iniciación en la especie recalcitrante *P. banksiana* (Park y col., 2006), y micronutrientes modificados proporcionó respuestas positivas en el pino piñonero. Este medio fue superior al medio estándar mLV (Klimaszewska y col., 2001) cuando se compararon en los experimentos de 2006. Aunque la presencia de níquel, cobalto reducido y otros micronutrientes posiblemente sea beneficiosa, no se puede descartar la presencia de sacarosa a diferentes concentraciones. Por tanto, serían necesarios estudios más exhaustivos para poder determinar el papel de los componentes del medio en la mejora de las frecuencias de iniciación en el pino piñonero. En ocasiones se ha descrito que el contenido en minerales y PGRs utilizados en los medios de iniciación no resultaban apropiados para el mantenimiento de las masas embriogénicas. Esto también se encontró en el pino piñonero, en el que el medio estándar mLV suplementado con 9,5 μM 2,4-D, 4,5

μM BAP y 20 g/l sacarosa, fue el mejor medio para el mantenimiento de las líneas embriogénicas.

La selección de explantos competentes es crítica para la inducción de ES en coníferas (Tautorus y col., 1991). En el pino piñonero, las frecuencias de inducción más altas se obtuvieron cuando los embriones cigóticos se encontraban entre el estado de desarrollo posterior a la poliembrionía de partición y el estado cotiledonar. Estas fases del desarrollo son comunes a otras especies de pinos, en los que el estado precotiledonar es el más adecuado para la obtención de respuestas embriogénicas (Lelu y col., 1999; Klimaszewska y col., 2001; Salajová y Salaj, 2005). Hay que señalar, que la *ventana de desarrollo* para la respuesta embriogénica en pino piñonero fue prácticamente idéntica a la descrita en *P. pinaster*, otra especie mediterránea de pino (Miguel y col., 2004). En ambas especies, las frecuencias máximas de iniciación de ES se obtuvieron entre finales de junio y la primera semana de julio. En nuestro estudio, en ambos años, se observó una disminución en el porcentaje de establecimiento de líneas embriogénicas entre el 6 y el 13 de julio, seguido de una ligera recuperación, coincidiendo con lo descrito en *P. pinaster* (Miguel y col., 2004).

Está establecido que las diferentes fases de regeneración de plantas por ES están bajo control genético (Park y col., 1993, 1994). Se han descrito diferencias significativas en la respuesta embriogénica entre familias de coníferas tales como *Picea mariana* (Cheliak y Klimaszewska, 1991), *Pinus strobus* (Garin y col., 1998; Klimaszewska y col., 2001), *P. monticola* (Percy y col., 2000), *P. pinaster* (Miguel y col., 2004) *P. taeda* (MacKay y col., 2006), y *P. sylvestris* (Niskanen y col., 2004; Lelu-Walter y col., 2008). En el pino piñonero, se encontraron diferencias significativas entre las familias para la extrusión, y cercanas a la significación para la iniciación. Algunas de las familias respondieron mejor que otras, lo que sugiere un control genético aditivo en la iniciación de ES en el pino piñonero, como se señala en otras coníferas (Park y col., 1993; MacKay y col., 2006). En nuestro estudio se observaron diferencias en la iniciación de ES entre árboles madre: la familia 58 casi duplicó el valor de la media global, mientras que la familia 70 mostró valores cinco veces inferiores a la media, respecto a la frecuencia de iniciación. Estos datos son similares a los obtenidos en un experimento más amplio realizado en *P. pinaster* donde emplearon 20 familias de semihermanos, y en el que la mejor familia produjo valores tres

veces superiores a la media y la peor familia fue seis veces inferior a la media (Miguel y col., 2004). Aunque las frecuencias de iniciación en el pino piñonero fueron muy bajas, es alentador el hecho de que se obtuviera tejido embriogénico en todas las familias ensayadas.

Aunque el número de familias utilizadas en este estudio fue relativamente bajo, la diferencia en su capacidad para iniciar ES mostró que con una selección apropiada de los árboles madre se podría incrementar el número de genotipos capturados. Este estudio no detectó ningún efecto significativo en la interacción entre las familias y las fechas de recogida, como se indicó en *P. strobus* (Klimaszewska y col., 2001). Como ya se describió en *P. strobus*, en el pino piñonero también se identificaron diferencias en los patrones temporales para la iniciación de ES en las distintas familias, lo cual refleja disparidades en el desarrollo, como también se ha descrito en especies como *P. sylvestris* y *P. pinaster* (Lelu y col., 1999), donde también mostraron una familia con mayor rango de respuesta más amplio que otras. Es interesante que además esta familia también se comportara de igual forma en ambos años. La búsqueda y selección de estos *genotipos de amplio espectro* para la capacidad de iniciación, como árboles madre en cruzamientos controlados, podría ser útil para incrementar el número de genotipos capturados en programas de mejora. La selección del árbol madre más favorable ha sido propuesta para mejorar la respuesta de iniciación de ES (Niskanen y col., 2004; MacKay y col., 2006).

3.3. INICIACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS A PARTIR DE MATERIAL NO EMBRIONARIO

La recolección del material vegetal se realizó en mayo de 2004, enero de 2005, febrero de 2006 y marzo de 2008. En cada una de las recogidas se ensayaron distintas condiciones de cultivo y tipos de explanto para la obtención de la respuesta embriogénica. En los siguientes apartados se describe el material vegetal utilizado, la metodología aplicada y los resultados obtenidos. Por último, se incluye una discusión general en base a dichos resultados en cada tipo de explanto. En el Anexo 1 se describe la formulación de los medios de cultivo utilizados.

3.3.1. INFLORESCENCIAS FEMENINAS Y MASCULINAS (MAYO 2004)

3.3.1.1. Material y métodos:

Estróbilos femeninos

Se recogieron durante su primer periodo vegetativo y antes de la polinización, encontrándose las escamas ovulíferas aún cerradas (Fig. 27). Solamente se dispuso de 5 estróbilos (tres pertenecientes al genotipo 47, uno al 48 y otro al 61), por tener este material un gran valor en los ensayos llevados a cabo en el Banco Clonal (al ser la floración femenina uno de los parámetros de estudio). Para su puesta en cultivo, se esterilizaron con el procedimiento que se describe a continuación y posteriormente se cortaron en cuatro partes, un cuarto por placa Petri, colocándose una de las zonas de herida en contacto con el medio de cultivo. Los medios empleados se basaron en las formulaciones del medio LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984) con los macronutrientes diluidos a la mitad, y del medio 505 (Pullman y Johnson, 2002) (Anexo 3).

Los estróbilos pertenecientes al genotipo 47, se cultivaron dos en medio LP1 y uno en medio PJ1 (Anexo 3). El estróbilo del genotipo 48 en el medio LP1 y el del genotipo 61 en medio PJ1. Las placas se sellaron con Parafilm® y los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad.

En la primera transferencia bisemanal a medio fresco, se procedió a la separación de la masa proliferativa inducida del explanto inicial, disgregándola en un pequeño volumen de medio de cultivo líquido (aprox. 1,5 ml) con el fin de evitar su oscurecimiento. El disgregado se depositó sobre el mismo medio de inducción fresco. Dichas proliferaciones se amplificaron mediante su transferencia semanal a medio fresco, realizando cada vez la disgregación anteriormente descrita.



Figura 27: Estróbilo femenino antes de la polinización.

Estróbilos masculinos

Estas inflorescencias se recolectaron en árboles de los genotipos 11, 16, 39, 47, 48, 59 y 73, estando los microesporangios poco desarrollados (tamaño pequeño y tonalidad verde oscura). Para su puesta en cultivo, se separaron cada uno de los microesporangios de la inflorescencia a la que pertenecían quitando a cada uno de ellos las cubiertas externas presentes en su base (Fig. 28). Cada microesporangio previamente esterilizado, se partió por la mitad, colocándose ambas partes con la zona de corte en contacto con el medio de inducción en una placa Petri. Se introdujeron 12 microesporangios (24 mitades) por genotipo y medio de cultivo. Se ensayaron los medios de cultivo PJ1, LP1 y LP2 (Anexo 3). Las placas se sellaron con Parafilm[®] y los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ en oscuridad.

Las proliferaciones celulares formadas se transfirieron semanalmente directamente sobre el mismo medio de cultivo fresco, realizando una ligera extensión de la masa.



Figura 28: Estróbilo masculino y microesporangio.

Acículas en expansión de inflorescencias masculinas

El material introducido correspondió a los siete genotipos anteriormente descritos. Se tomaron las acículas de la parte superior de las inflorescencias masculinas (Fig. 29) y se procedió a su esterilizado de la forma descrita a continuación. Las acículas se dispusieron horizontalmente en el medio de cultivo, colocándose tres pares de acículas por placa Petri. Se introdujeron entre 9 y 15 pares de acículas (dependiendo del número de inflorescencias masculinas recogidas para cada uno de los genotipos) por repetición (tres o cuatro repeticiones) por medio de cultivo y genotipo. Se ensayaron los medios de cultivo LP1, LP3, PJ2, PJ3 y PJ4 (Anexo 3). Las placas se sellaron con Parafilm® y los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ en oscuridad.

Se realizaron repicados a medio fresco bisemanales, sin manipular las masas. Después de 8 semanas en el medio de inducción, las proliferaciones celulares inducidas se transfirieron a medios de mantenimiento (misma formulación en nutrientes pero con concentraciones de reguladores del crecimiento reducidos 10 veces). Se realizaron tinciones del material proliferativo con acetocarmín al 1%.

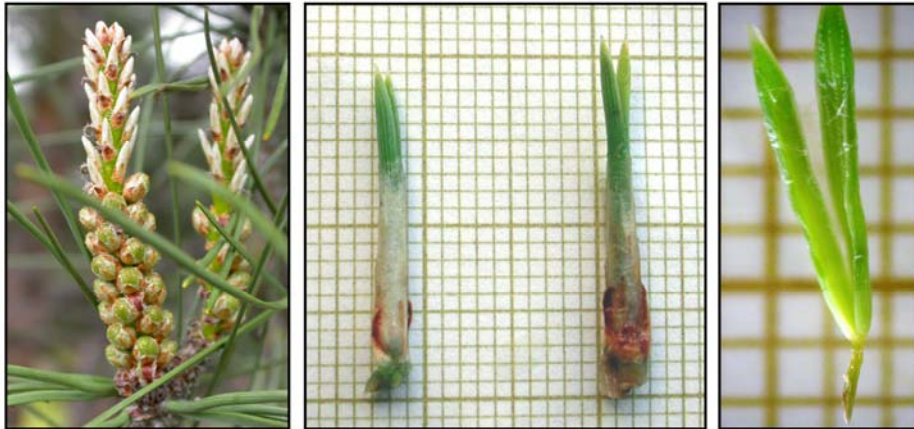


Figura 29: Inflorescencia masculina con acículas en expansión.

Antes de su introducción en cultivo, el material vegetal descrito se esterilizó, siguiendo los pasos siguientes:

- Los estróbilos completos se lavaron con etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos en agitación intensa, posteriormente se pusieron bajo el grifo con agua templada durante diez minutos.
- El material se mantuvo durante 24 horas en oscuridad a 25°C envuelto en papel de filtro, previamente humedecido y metido en bolsa de plástico con autocierre.
- Transcurrido ese tiempo se volvió a lavar con agua, a la que se le añadieron 2 gotas de Tween 20, agitándose durante 30 segundos, aclarándose posteriormente.
- En cabina de flujo laminar, se aplicó etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos con agitación intensa al estróbilo femenino, microesporangios y acículas. Posteriormente se pasaron a lejía comercial diluida al 10% (v/v) (3,5% cloro activo) con 2 gotas de Tween 20 durante 15 minutos, aplicando vacío para extraer las burbujas de aire durante unos segundos. Se agitó regularmente cada cinco minutos. Por último, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril.
- En el caso de las acículas, después de retirar las vainas, se volvieron a esterilizar con etanol al 70% (v/v) y agitación intensa durante 30 segundos, aclarándose

posteriormente con agua destilada estéril. A continuación, se sumergieron en lejía comercial diluida al 10% (v/v) durante 5 minutos, siguiendo con tres aclarados con agua destilada estéril.

3.3.1.2. Resultados:

Estróbilos femeninos

A las cinco semanas de su puesta en cultivo en el medio LP1, se observó la aparición de proliferaciones celulares en las cuatro porciones del estróbilo del genotipo 48. Estas proliferaciones se formaron en la zona de herida y presentaban color blanco-transparente de consistencia granulosa. Tinciones con acetocarmín al 1% mostraron la presencia de células redondeadas en división, así como células más alargadas y vacuoladas que nos podrían recordar a las células de suspensor, típicas de las formaciones embriogénicas en coníferas (Fig. 30). Se observó que en el explanto original seguían apareciendo nuevas proliferaciones hasta el tercer repicado bisemanal. Sin embargo, las proliferaciones disgregadas y subcultivadas tomaron color castaño y una consistencia más dura después de nueve semanas en cultivo, perdiéndose sus características iniciales. Las porciones de los estróbilos del genotipo 47 no respondieron en ninguno de los dos medios ensayados, y el estróbilo del genotipo 61 se contaminó en su totalidad.

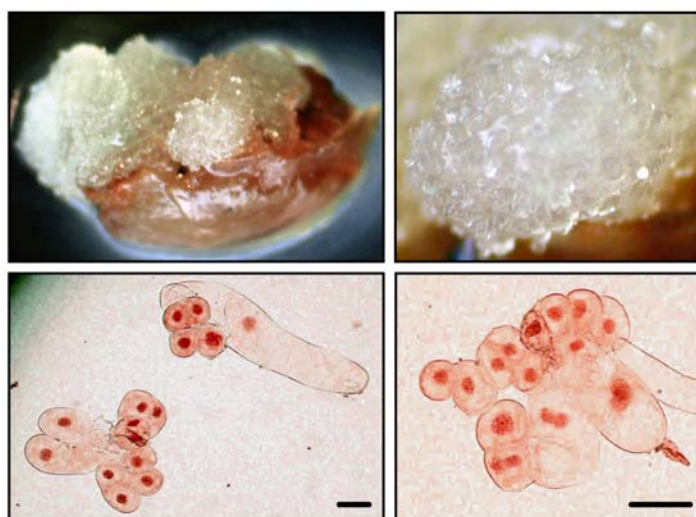


Figura 30: Proliferaciones celulares inducidas en el medio de cultivo LP1, en estróbilo femenino del genotipo 48. Núcleos celulares teñidos con acetocarmín al 1% similares a embriones somáticos muy iniciales. (Barras= 0,1mm)

Estróbilos masculinos

El porcentaje de contaminación obtenido durante las cuatro primeras semanas en cultivo fue alto. Después de 6 a 10 semanas en cultivo, se observó la aparición de proliferaciones celulares blanco-transparentes en los medios de cultivo LP1 y LP2. En el medio PJ1 no se formaron proliferaciones celulares (Tabla 9).

Tabla 9: Porcentaje de explantos (estróbilos masculinos) con proliferación en cada uno de los genotipos y medio de cultivo ensayado.

Genotipo	Medios de cultivo		
	PJ1	LP1	LP2
11	0% (0/24)	4,2% (1/24)	4,2% (1/24)
16	0% (0/24)	0% (0/24)	4,2% (1/24)
47	0% (0/24)	8,3% (2/24)	0% (0/24)
48	0% (0/24)	0% (0/24)	8,3% (2/24)
73	0% (0/24)	16,7% (4/24)	37,5% (9/24)
Total	0% (0/120)	5,8% (7/120)	10,8% (13/120)

Estas proliferaciones mostraron estructuras friables, más mucilaginosas y globulares las formadas en medio con 2,4-D que con NAA (Fig. 31), dando lugar a proliferaciones más compactas a lo largo de cuatro subcultivos semanales, similares a las formadas en el estróbilo femenino. No se obtuvieron proliferaciones con estas características en el medio con TDZ.

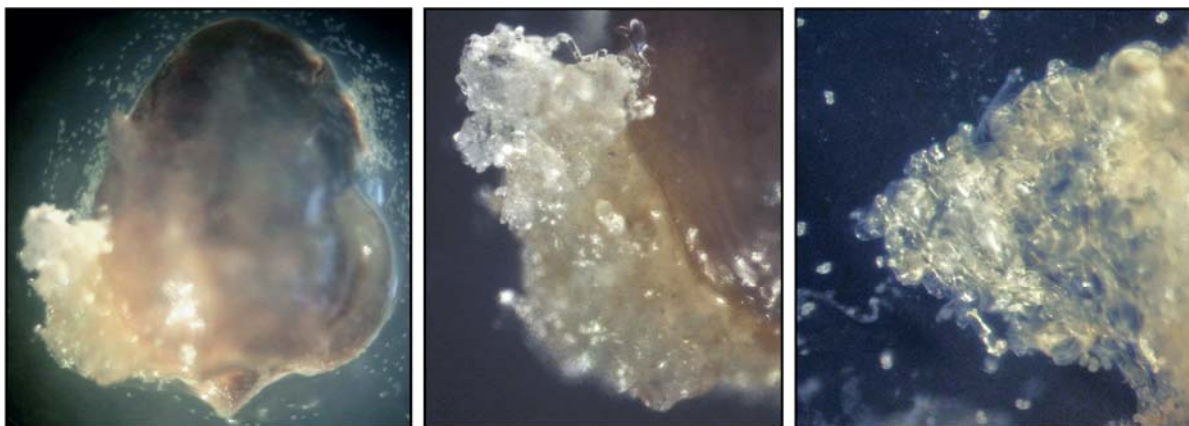


Figura 31: Proliferaciones celulares inducidas en el medio LP1 y LP2, en estróbilos masculinos del genotipo 47.

Acículas en expansión de las inflorescencias masculinas

El porcentaje medio de contaminación observado durante las cuatro primeras semanas en cultivo fue del 40%. Solamente se observó la formación de proliferaciones celulares, blanco-transparentes de aspecto mucilaginoso y con presencia de células filamentosas, en las acículas pertenecientes al genotipo 47, cultivadas en los medios LP1 y PJ3, ambos conteniendo NAA. Tampoco se observó respuesta en presencia del regulador TDZ. De los aproximadamente 60 pares de acículas cultivados por medio, ocho explantos en el medio LP1 (13,3 %) y cinco en el medio PJ3 (8 %) formaron proliferaciones celulares, entre las 3 y 7 semanas desde su puesta en cultivo (Fig. 32). Sin embargo, tampoco se logró mantener el desarrollo de estas estructuras en las masas generadas en los sucesivos repicados, aún reduciendo la concentración de reguladores presentes en el medio de cultivo (medio de mantenimiento).

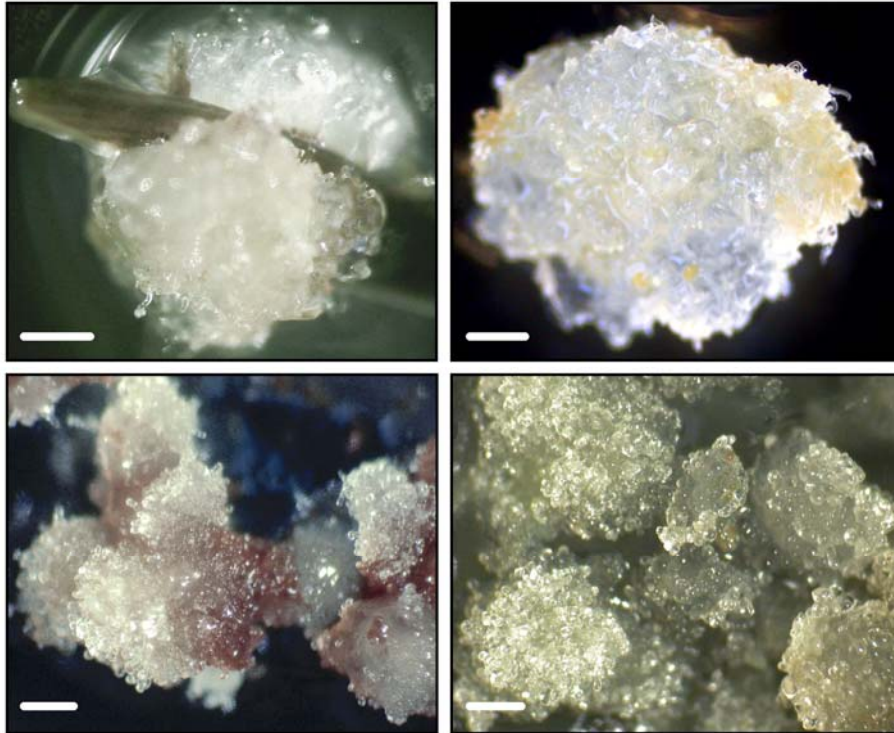


Figura 32: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en el medio LP1 en acículas de estróbilo masculino del genotipo 47. Al inicio presentan aspecto mucilaginoso con células filamentosas, adquiriendo las células una morfología más redondeada con los subcultivos. (Barras= 1mm).

3.3.2. FORZADO DE ESTACAS PARA LA EXPANSIÓN DE ACÍCULAS Y EMISIÓN DE BRAQUIBLASTOS (ENERO 2005)

3.3.2.1. Material y métodos:

Se tomaron ramas de árboles adultos pertenecientes a los genotipos 11, 47, 59, 62 y 87, situados en el Banco Clonal. Las ramas se localizan en las partes bajas del árbol con las yemas del año antes de elongar. Se colocaron entre 21 y 32 estacas por genotipo en condiciones de alta humedad para su forzado.

El procedimiento de limpieza del material de campo se ajustó de la siguiente manera:

1. El material se cortó en estacas de aproximadamente 20 cm de longitud, quitando las acículas y procurando dejar parte de la vaina.

2. Las estacas se lavaron bajo el grifo con agua templada, cepillándolas con un cepillo de raíz.
3. Las estacas se sumergieron en una solución fungicida de 1 g/l de Captosan R[®] (8% carbendazim y 40% de captan) y 1 g/l de Benoagrex[®] (50% benomilo) durante 20 minutos.
4. Las estacas se dispusieron en bandejas con perlita húmeda y se regaron semanalmente con agua corriente. Se colocaron en cámara de cultivo de alta humedad (80-90%) con $25 \pm 5^\circ$ C de temperatura y fotoperiodo de 16 horas de luz.
5. El día anterior a la toma de material para cultivo, se volvieron a pulverizar las estacas con solución fungicida de 2 ml/l de Previcur N[®] (propamocarb 60,5%).

El procedimiento de esterilización de los distintos explantos antes de su introducción *in vitro* fue el siguiente:

- Lavados del material con etanol al 70% durante 30 segundos en agitación intensa, realizándose posteriormente tres aclarados en agitación con agua destilada durante diez minutos.
- El material se mantuvo durante 24 horas en oscuridad a 25° C envuelto en papel de filtro humedecido y guardado en bolsa de plástico con autocierre.
- En el caso de las **acículas**, en cabina de flujo laminar, después de retirar las vainas externas que recubren la base, se volvieron a esterilizar con etanol al 70% y agitación intensa durante 30 segundos, aclarándose posteriormente con agua destilada estéril. A continuación, se sumergieron en lejía comercial diluida al 10% durante 5 minutos, siguiendo con tres aclarados con agua destilada estéril.
- En el caso de los **braquiblastos**, se esterilizaron enteros. Después de lavarse con etanol al 70% durante 30 segundos en agitación intensa, se volvieron a lavar con la solución fungicida descrita (1 g/l de Captosan R[®] + 1 g/l de Benoagrex[®]) durante 10 minutos. Luego se lavaron con agua destilada con dos gotas de Tween 20 en agitación. Posteriormente en una disolución desinfectante con 0,35 % de cloro activo (pastillas de Millipore[™] con 1,5 g de cloro activo) con 2 gotas de Tween 20 durante

15 minutos, aplicando vacío. Por último, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

- En el caso de las **yemas**, en cabina de flujo laminar, se lavaron con etanol al 70% (v/v) durante 30 segundos con agitación intensa. Posteriormente, en una disolución desinfectante con 0,35 % de cloro activo (pastillas de Millipore™ con 1,5 g de cloro activo) con 2 gotas de Tween 20 durante 15 minutos, aplicando vacío para extraer burbujas de aire durante unos segundos. Se agitó regularmente cada cinco minutos. Por último, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Se retiraron las escamillas que recubren la yema asépticamente, dejando las yemas verdes. Se volvieron a esterilizar con etanol 70% (v/v) y agitación intensa 30 segundos. Posteriormente, con la misma disolución desinfectante anterior más unas gotas de Tween 20 durante 10 minutos, agitando levemente. Luego, se realizaron tres aclarados con agua destilada estéril. Por último, se cortaron rodajas de 1mm y se colocaron sobre el medio de cultivo en dirección de las agujas del reloj, comenzando por el ápice.

Cuando se obtuvieron las acículas en expansión y los braquiblastos después de un periodo de forzado en cámara de cultivo de alta humedad (Fig. 33), se procedió a su esterilización siguiendo los pasos anteriormente descritos, y puesta en cultivo. Se introdujeron 4 acículas por placa, y de 4 a 6 placas por medio ensayado y repetición. Se realizaron entre 3 y 4 repeticiones según la disponibilidad de acículas. En los braquiblastos inducidos se separaron las hojas de inserción aislada (HIA), colocándose 4 por placa y medio.



Figura 33: Expansión de acículas y emisión de braquiblastos en estacas tomadas en enero.

Los medios empleados se basaron en las formulaciones del medio LV (Litvay y col., 1985) con los macronutrientes diluidos a la mitad, reducción de cobalto y adición de cloruro de níquel y en las del medio 505 (Pullman y Johnson, 2002). Estos medios los denominamos: L-mLV₂, PJ1, PJ3 (Anexo 3). Los repicados a medio fresco se realizaron semanalmente, una parte del material al mismo medio de inducción fresco y otra parte a medio fresco con concentraciones de reguladores reducidas a la décima parte (medio de mantenimiento). Se realizaron tinciones del material proliferativo con acetocarmín al 1%.

3.3.2.2. Resultados:

Transcurridos 30 a 52 días desde su puesta en condiciones de brotación forzada en condiciones de alta humedad, se obtuvieron acículas en expansión solo en los genotipos 62 y 87. Solo el genotipo 47 proporcionó dos braquiblastos.

Después de tres ó cuatro semanas desde su puesta en cultivo, se observó la formación de proliferaciones celulares en las acículas de los dos genotipos ensayados (62 y 87), en los medios de cultivo que contenían NAA ó 2,4-D, y no en el que contenía TDZ (Tabla 10). El aspecto de las mismas varió en función de los medios ensayados: en medio PJ3 las masas

eran gelatinosas con formaciones en pico y células transparentes (Fig. 34); en medio L-mLV₂ las masas eran más compactas con algunas formaciones en pico y amarillentas.

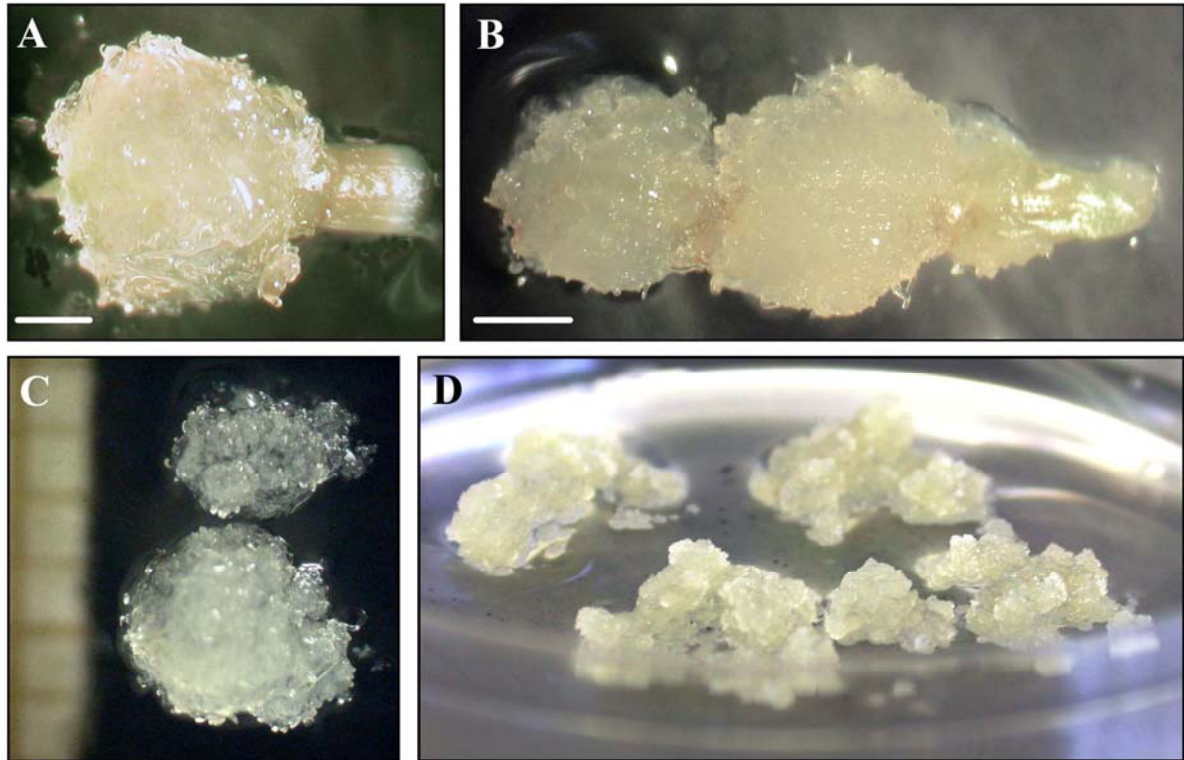


Figura 34: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en acículas del genotipo 62 en el medio PJ3 y en el medio L-mLV₂. **A:** Barra=0,5 mm. **B:** Barra= 1mm.

Las masas proliferativas obtenidas en los medios PJ3 y L-mLV₂ al cabo de 4 semanas en cultivo, mostraron algunas estructuras con apariencia de embrión en las fases iniciales de su desarrollo (Fig. 35). Con los subcultivos las proliferaciones fueron perdiendo estas estructuras, tornándose globulares y muy friables.

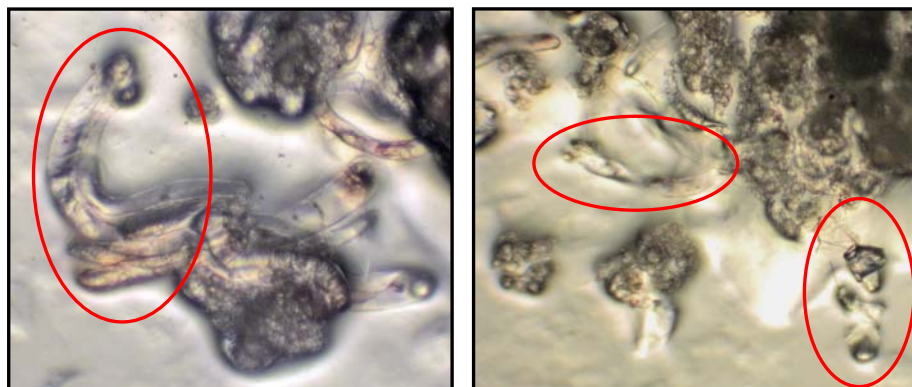


Figura 35: Estructuras con apariencia de embrión en las fases iniciales de su desarrollo.

El mismo comportamiento se observó en las inducidas en hojas de inserción aislada (Tabla 10). Muestras de tejido proliferativo teñidas con acetocarmín, mostraron grupos de células redondeadas con núcleo patente en división y células alargadas vacuoladas que nos indican un cierto grado de organización pre-embriónica. Sin embargo, estos grupos celulares no fueron capaces de producir masas de embrión-suspensor a lo largo de los subcultivos (Fig. 36).

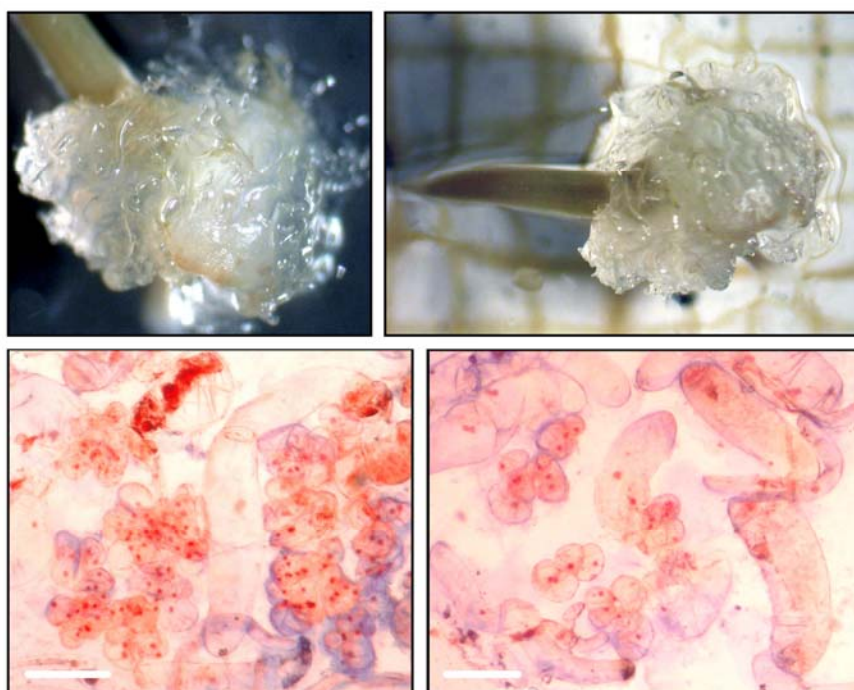


Figura 36: Proliferaciones celulares inducidas en el medio PJ3, en hojas de inserción aislada del genotipo 47 y detalle de células de las proliferaciones con núcleo patente. (Barras= 100 μ M)

Tabla 10: Porcentaje de explantos (acículas y HIA) con proliferación en cada uno de los genotipos , tipo de explanto inicial y medio de cultivo.

Genotipo	Tipo explanto	Medio de cultivo		
		PJ1	PJ3	L-mLV ₂
62	ACÍCULAS	0% (0/84)	75% (66/88)	35,8% (33/92)
87	ACÍCULAS	0% (0/28)	46,8% (15/32)	10,7% (3/28)
47	HIAs	0% (0/16)	43,7% (7/16)	12,5% (2/16)
Total		0% (0/128)	64,7% (88/136)	27,9% (38/136)

3.3.3.FORZADO DE ESTACAS PARA EL DESARROLLO DE YEMAS Y EMISIÓN DE BRAQUIBLASTOS (FEBRERO 2006)

3.3.3.1. Material y métodos:

En este año la toma de material en campo y su procesado fue el mismo que el descrito el año anterior. Las ramas se tomaron de árboles pertenecientes a los genotipos 47, 58, 62, 87 y 88. Sin embargo, para favorecer la emisión de braquiblastos, una parte de las estacas se pulverizó con una solución acuosa de citoquinina (1/5 de medio nutritivo SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) con DMSO al 1%, Tween 20 al 0,1% y 2 g/l de BAP). Se pulverizaron una vez a la semana hasta la primera evidencia de emisión de los braquiblastos (Fig. 37). Con la utilización del medio nutritivo se trató de aportar nutrientes a las estacas, y con el efecto mojante del Tween y el DMSO mejorar la penetración de la citoquinina y los nutrientes al interior de los tejidos. Se dispusieron 60 estacas por genotipo y tratamiento.



Figura 37: Emisión de braquiblastos en estacas tomadas en febrero.

Los medios de cultivo ensayados se basaron en las formulaciones del medio LV (Litvay y col., 1985); con los macronutrientes diluidos a la mitad y una reducción en la concentración de cobalto junto con la adición de cloruro de níquel (Park y col., 2006). Se emplearon dos combinaciones de reguladores del crecimiento: H-mLV₂ y P-mLV₂ (Anexo 3). Este último medio contenía la combinación de reguladores del crecimiento descrita para la inducción de ES en yemas de *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005a).

Las yemas cortadas en rodajas de 1 mm de grosor se introdujeron en cultivo por orden, en sentido de las agujas del reloj, de manera que la primera rodaja correspondía al extremo apical de la yema (Fig. 38). Se dispuso una yema por placa y 10 hojas de inserción aislada por placa, sin distinguir si procedían de las estacas tratadas o sin tratar.

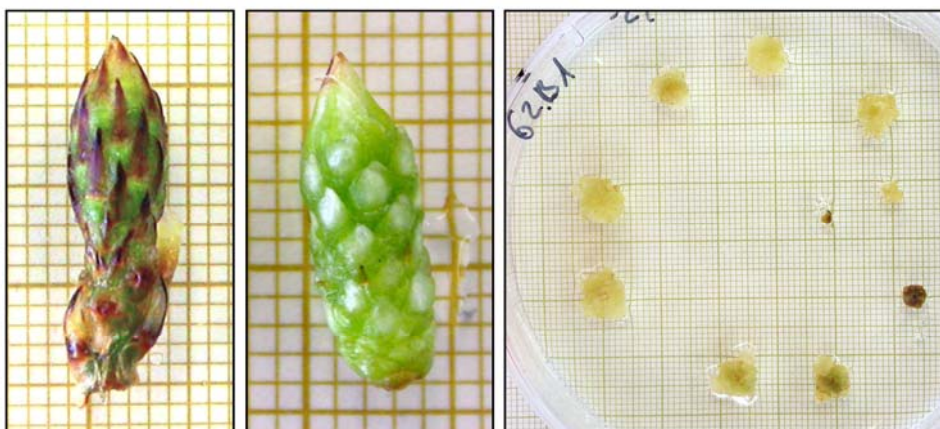


Figura 38: Yemas en elongación y rodajas introducidas en cultivo

Los repicados a medio fresco se realizaron bisemanalmente. A las 8 semanas de cultivo, las proliferaciones con aspecto embriogénico se repicaron a medio fresco con concentraciones de reguladores reducidas a la décima parte (medio de mantenimiento). Después de otras cuatro semanas, pequeñas porciones de las proliferaciones cultivadas en el medio de mantenimiento se transfirieron a medios de maduración para su desarrollo.

Los medios de maduración estaban formados por los medios basales empleados para la inducción, pero con la adición de 9 g/l de Gerlite[®], 60 g/l de sacarosa y 80 μ M de ABA. Se disgregaron porciones de masa proliferativa en medio líquido y posteriormente se dispusieron alícuotas en los distintos medios de maduración.

3.3.3.2. Resultados:

Transcurridos unos 15 días desde la colocación de las estacas en condiciones de humedad, se comenzaron a recoger las yemas que estaban hinchadas y verdes pero aún sin comenzar a elongar las acículas (Tabla 11).

Tabla 11: Material emitido por genotipo para su introducción en cultivo, en estacas tratadas y no tratadas con BAP.

Genotipo	Estacas no tratadas		Estacas tratadas con BAP	
	Yemas hinchadas	Braquiblastos emitidos	Yemas hinchadas	Braquiblastos emitidos
47	2	1	14	0
58	20	5	12	0
62	29	13	51	6
87	8	22	6	0
88	44	17	26	13
Total	103/300	58/300	109/300	19/300

El tratamiento de las estacas con BAP no favoreció la emisión de braquiblastos ya que se obtuvo un mayor número en las estacas no pulverizadas (58 frente a 19). Pudo observarse que la eliminación de la yema terminal ejerció una mayor influencia sobre la emisión de braquiblastos que el tratamiento con BAP, ya que el mayor número se obtuvo

después de dicha eliminación. La aparición de braquiblastos se localizó tanto en la zona apical como en el primer entrenudo (Fig. 37). Tanto en las yemas cortadas en rodajas como en las hojas de inserción aislada, se obtuvo el desarrollo de proliferaciones celulares con aspecto similar a las descritas como embriogénicas. Un 14 % de las yemas y un 10% de las HIA puestas en cultivo formaron este tipo de proliferaciones, presentando mejor morfología las inducidas con 2,4-D que con la mezcla de 2,4-D más NAA (Tabla 12). Cuando las masas proliferativas alcanzaron un determinado tamaño en los medios de inducción, se subcultivaron en los mismos medios de inducción, o en medios con concentraciones de reguladores del crecimiento reducidas diez veces (medios de mantenimiento).

Tabla 12: Porcentaje de inducción de proliferaciones en yemas y HIA

Genotipo	Yemas		HIA	
	H-mLV ₂	P-mLV ₂	H-mLV ₂	P-mLV ₂
47	0% (0/8)	0% (0/8)	0% (0/9)	0% (0/12)
58	0% (0/16)	0% (0/16)	0% (0/45)	0% (0/46)
62	21,4% (9/42)	15,2% (5/38)	11,3% (22/195)	11,3% (19/168)
87	12,5% (1/8)	16,7% (1/6)	6,5% (11/170)	4,5% (8/179)
88	17,1% (6/35)	22,9% (8/35)	22,5% (42/187)	11% (25/228)
Total	14,5% (16/109)	13,6% (14/103)	12,4% (75/606)	8,2% (52/633)

Las Figuras 39 y 40 muestran el aspecto de las proliferaciones celulares inducidas en ambos tipos de tejidos. Sin embargo, no se consiguió mantener su proliferación a lo largo de los sucesivos subcultivos, en los distintos medios de cultivo ensayados, y por lo tanto no se pudo confirmar su naturaleza embriogénica. Las porciones de masas que se cultivaron en medios de maduración no mostraron la diferenciación celular esperada por la presencia del ácido abscísico y el mayor potencial osmótico del medio.

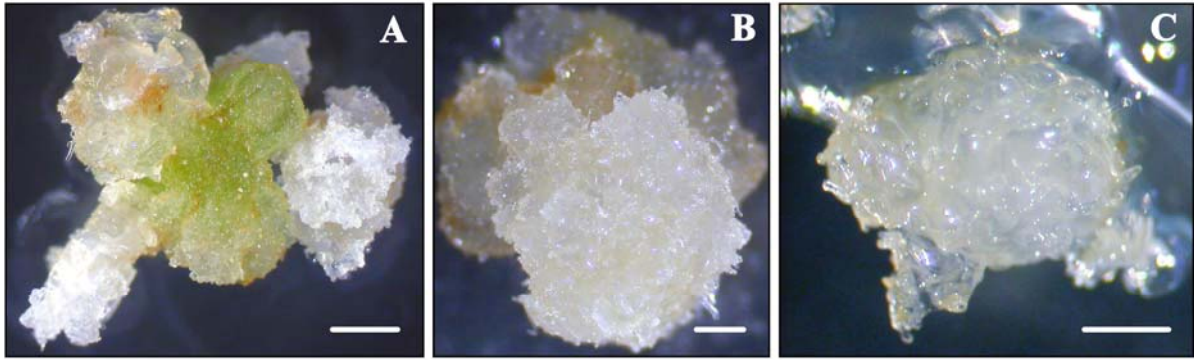


Figura 39: Proliferaciones celulares inducidas en el medio H-mLV₂, en rodajas de yemas apicales del genotipo 88. A: Barra= 2mm. B-C: Barras= 1 mm.

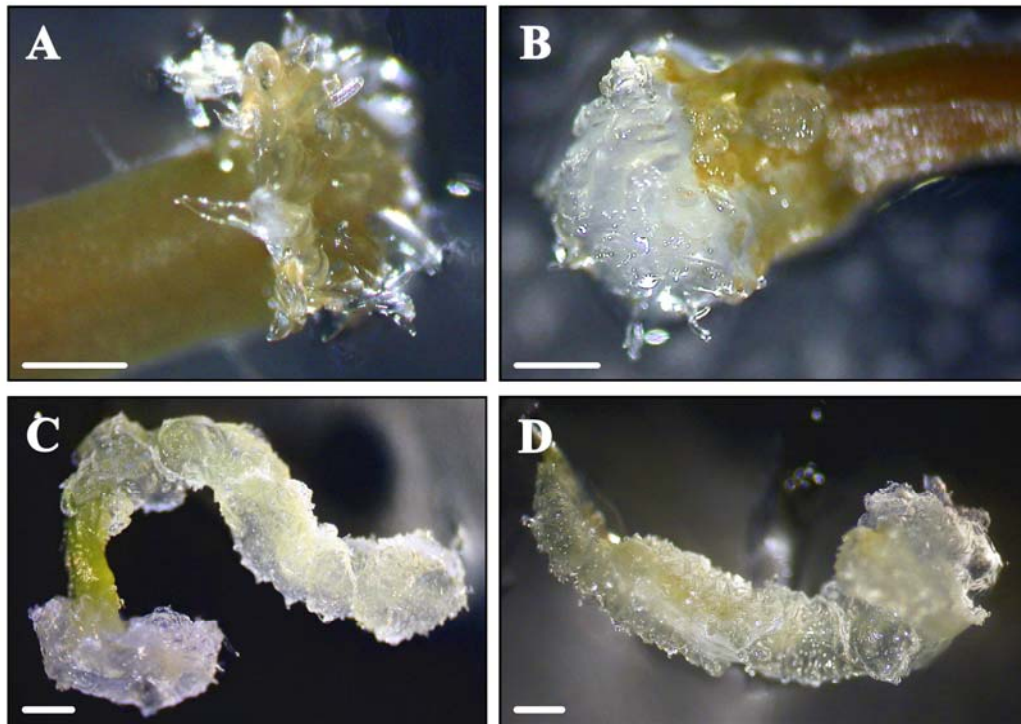


Figura 40: Crecimiento de las proliferaciones celulares inducidas en el medio H-mLV₂, en hojas de inserción aislada del genotipo 88. A-B: Barras= 1mm. C-D: Barras= 2mm.

3.3.4.FORZADO DE ESTACAS PARA EL DESARROLLO DE YEMAS Y EMISIÓN DE BRAQUIBLASTOS (MARZO 2008)

3.3.4.1. Material y métodos:

En este año la toma de material en campo se optimizó respecto a años anteriores. Las ramas se tomaron de árboles pertenecientes a los mismos genotipos del año anterior, pero con las yemas en un estado de desarrollo vegetativo más avanzado. Sólo se eligieron las estacas procedentes del brote principal, siendo más homogéneas y conteniendo su extremo apical intacto.

Se colocaron sesenta estacas por genotipo (47, 62, 58, 87 y 88) en cámara de cultivo de alta humedad, con el fin de promover el engrosamiento de las yemas apicales y forzar la emisión de braquiblastos (Fig. 41). El proceso de limpieza del material y su esterilización fue el mismo ya descrito.



Figura 41: Estacas con yema apical engrosada y yema en elongación

Se ensayaron 5 condiciones de cultivo (PJ3, PJ5, PJ6, H-mLV₂ y U-mLV₂) (Anexo 3). Se cultivaron 12 yemas (10 rodajas por yema y por placa) y 10 braquiblastos (10-15 HIA por braquiblasto y placa), por genotipo y tratamiento.

Después de 3 semanas en el medio de inducción, las rodajas que formaron proliferaciones se distribuyeron en tres procedimientos: se mantuvieron sin repicar en la misma placa, se repicaron al mismo medio de inducción fresco, y se transfirieron a medio de mantenimiento (medio mLV con 9,5 µM de 2,4 D y 4,5 µM de BAP, 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0,5 g/l de glutamina, 20 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite®).

Después de otras 3 semanas en cultivo se transfirieron las rodajas a medio fresco, observándose la apariencia de los cultivos en los tres procedimientos ensayados. Transcurridas otras 3 semanas en cultivo, se seleccionaron de entre los distintos medios y genotipos, pequeñas masas transparentes y mucilaginosas con posibles características embriogénicas, volviéndose a subcultivar en medio de mantenimiento en forma de masa o en forma disgregada. Para ello, se pesaron cantidades determinadas de masa proliferativa y a continuación se procedió a su disgregación en medio líquido y posterior filtrado con vacío. Cantidades entre 90 y 280 mg de peso fresco se dispusieron en frascos de 25 ml conteniendo 10 ml de medio basal de mantenimiento, y tras agitación hasta la disgregación de la masa se procedió a su filtrado a través de embudo y con vacío. El papel de filtro con el disgregado se colocó en placa con medio sólido de mantenimiento. Se realizaron transferencias bisemanales a medio fresco, alternando el procedimiento de la transferencia de las masas seleccionadas con aspecto embriogénico sin disgregar, con la disgregación y filtrado de las mismas.

En el cultivo de las HIA procedentes de los braquiblastos, los subcultivos de realizaron bisemanalmente. Después de dos subcultivos en el medio de inducción, las HIA se dispusieron en frascos de 25 ml conteniendo 10 ml de medio líquido basal de mantenimiento (10 HIA/placa/frasco), y tras agitación hasta la disgregación de la masa se procedió a su filtrado a través de embudo y con vacío. El papel de filtro con el disgregado se colocó en placa con medio sólido de mantenimiento. Se realizaron transferencias bisemanales a medio fresco, alternando el procedimiento de la transferencia de las masas

seleccionadas con aspecto embriogénico sin disgregar con la disgregación y filtrado de las masas.

3.3.4.2. Resultados:

Después de 2-3 semanas en condiciones de alta humedad todas las estacas mostraron hinchamiento de las yemas, siendo los genotipos 62 y 88 los más precoces. La emisión de braquiblastos se obtuvo entre las 3 y 9 semanas, siendo los genotipos 58 y 87 los más tardíos y los genotipos 62 y 88 los que emitieron en mayor cantidad. En esta recogida, aunque estas estacas terminales eran muy delgadas, se obtuvo un gran número de braquiblastos en un periodo dilatado de tiempo, indicándose las fechas de recogida de braquiblastos para su introducción en cultivo (Tabla 13).

Tabla 13: Fechas de emisión de braquiblastos en los genotipos ensayados.

Genotipo	Fechas de emisión de braquiblastos				Total
	11.4	17.4	6.5	28.5	
47	2	0	19	5	26
58	0	0	10	12	22
62	1	19	32	11	63
87	1	1	25	9	35
88	1	12	26	12	51
Total	5	32	112	49	197

Después de 3 semanas en cultivo, se observó que en los medios de inducción PJ3 y PJ5 se produjo el mayor porcentaje de yemas con masas proliferativas de células transparentes y alargadas (con características embriogénicas) (Figs. 42 A y B), siendo los genotipos 87, 62 y 47 los más productivos en el total de los medios ensayados (Tabla 14).

Tabla 14: Porcentaje de yemas con proliferaciones inducidas, a las 3 semanas en cultivo.

Genotipo	Condiciones de cultivo					Total
	PJ3	PJ5	PJ6	H-mLV ₂	U-mLV ₂	
47	71,4% (5/7)	25% (1/4)	33,3% (2/6)	75% (6/8)	0% (0/6)	45,2% (14/31)
58	25% (3/12)	40% (2/5)	50% (4/8)	33,3% (1/3)	20% (1/5)	33,3% (11/33)
62	90% (9/10)	33,3% (4/12)	54,5% (6/11)	36,4% (4/11)	18,2% (2/11)	45,5% (25/55)
87	100% (12/12)	91% (10/11)	42% (5/12)	22,2% (2/9)	9,1% (1/11)	54,5% (30/55)
88	36,3% (4/11)	20% (2/10)	0% (0/10)	22,2% (2/9)	0% (0/9)	16,3% (8/49)
Total	63,5% (33/52)	45,2% (19/42)	36,2% (17/47)	37,5% (15/40)	9,5% (4/42)	39,5% (88/223)

En el tercer subcultivo (9 semanas), no se encontraron diferencias cualitativas entre los tres procedimientos (Figs. 42 C y D). Sin embargo, en el medio de mantenimiento los cultivos mostraron mayor proliferación de las masas iniciales pero con un aumento de la formación de células transparentes y redondeadas frente a las alargadas (Fig. 43)

En el cuarto subcultivo (12 semanas), las masas disgregadas y cultivadas en medio de mantenimiento crecieron poco, conservando parte de las características de células alargadas y transparentes. Las masas cultivadas sin disgregar comenzaron a oscurecerse y formaron acúmulos celulares más compactos y redondeados. (Fig. 42 E). No se pudo cuantificar, mediante el incremento relativo de su peso fresco, la capacidad proliferativa de los cultivos presumiblemente embriogénicos al no progresar a lo largo de los subcultivos.

A partir de las 17-19 semanas en cultivo, todos los cultivos mostraron un mismo aspecto compacto con algunas proliferaciones de células redondeadas y transparentes (Fig. 42 F).

Tampoco con este procedimiento se pudo mantener la proliferación de las masas con células alargadas y vacuoladas más típica de las células de suspensor, inicialmente inducidas en los distintos medios de inducción.

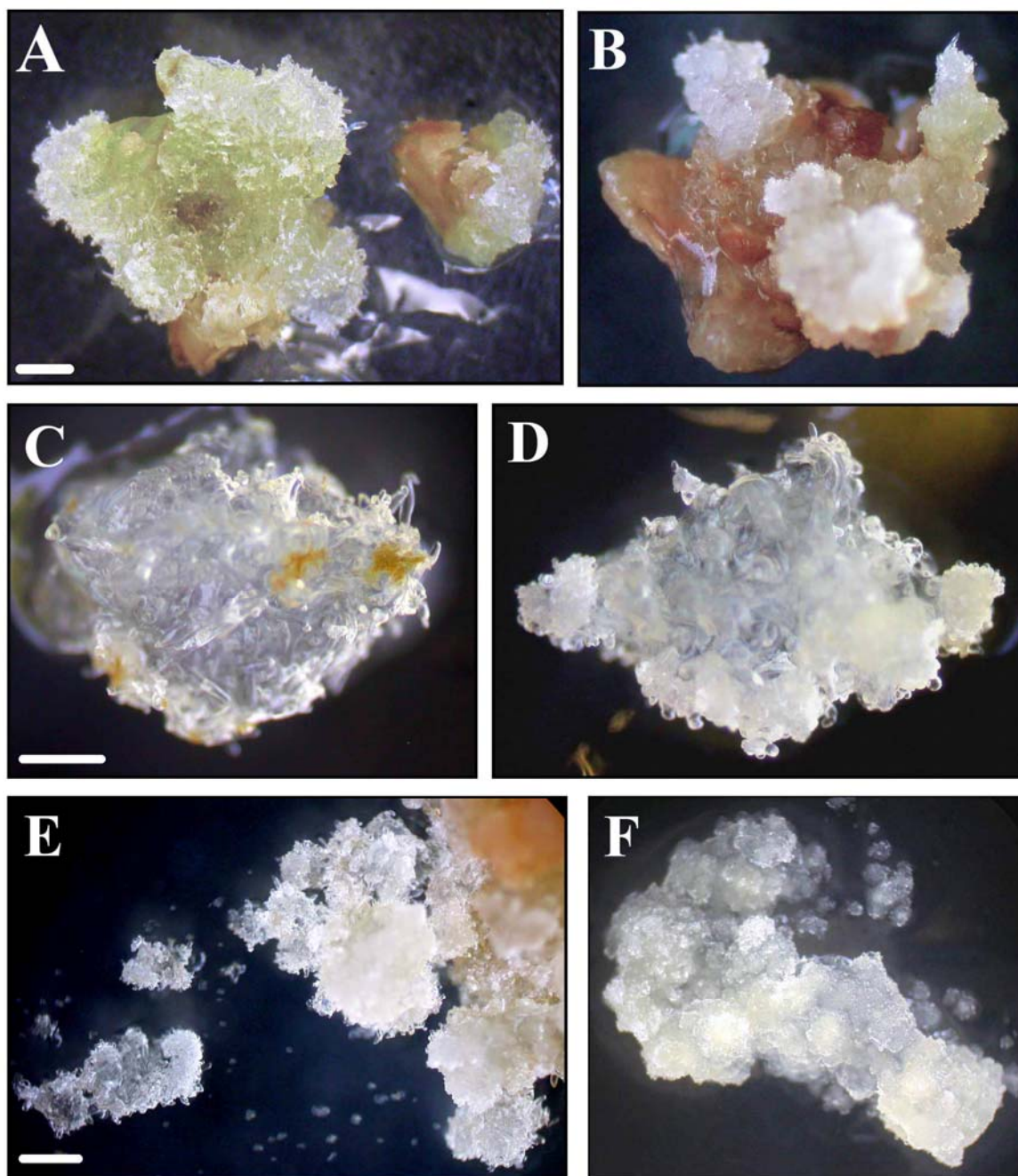


Figura 42: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en rodajas y cultivadas en forma de masa, en distintos medios y genotipos. **A-B:** a las 3 semanas (barra= 1,5mm). **C-D:** a las 9 semanas (barra= 0,5 mm). **E:** a las 12 semanas. **F:** a las 17 semanas en cultivo (barra= 2mm).

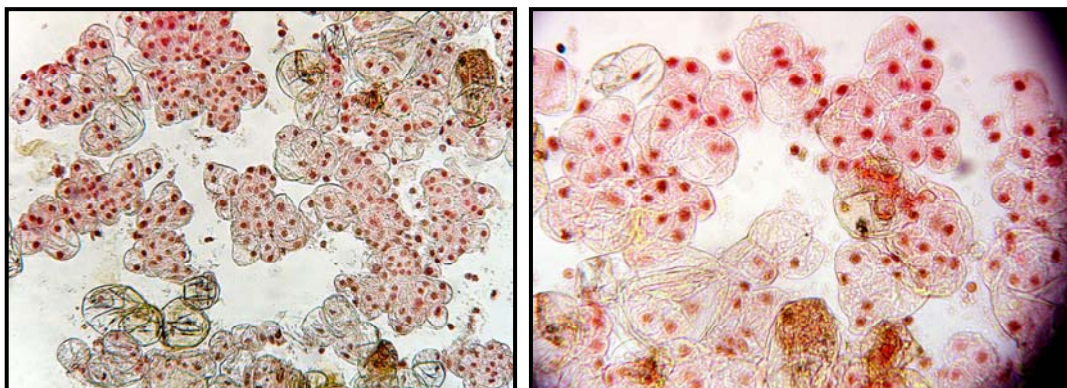


Figura 43: Células en división con núcleo patente y células anucleadas de tejido proliferando en medio PJ3. Tinción realizada con acetocarmín al 1%.

Las hojas de inserción aislada comenzaron a formar masas proliferativas a las dos semanas. A las tres semanas la mayoría de las masas medían entre 2-4 mm, respondiendo todos los genotipos en el medio PJ3 (Tabla 15). A las 4 semanas, las masas disgregables se subcultivaron tomando sus pesos con el fin de evaluar su capacidad proliferativa. Estas medidas no se continuaron realizando más allá del cuarto subcultivo. En estas condiciones, los cultivos de hojas de inserción aislada tampoco progresaron más allá de las nueve semanas en cultivo (Fig. 44).

Tabla 15: Porcentaje de HIA con proliferaciones inducidas, a las tres semanas en cultivo.

Genotipo	Medios de cultivo			
	PJ3	PJ5	PJ6	H-mLV ₂
47	79,1% (87/110)	74% (37/50)	0%	0%
58	71,6% (43/60)	58% (29/50)	0%	0%
62	65,4% (68/104)	55,7% (39/70)	57,5% (23/40)	23,2% (25/108)
87	43,6% (31/71)	45% (18/40)	0%	45% (18/40)
88	52% (39/75)	0%	0%	54,4% (49/90)

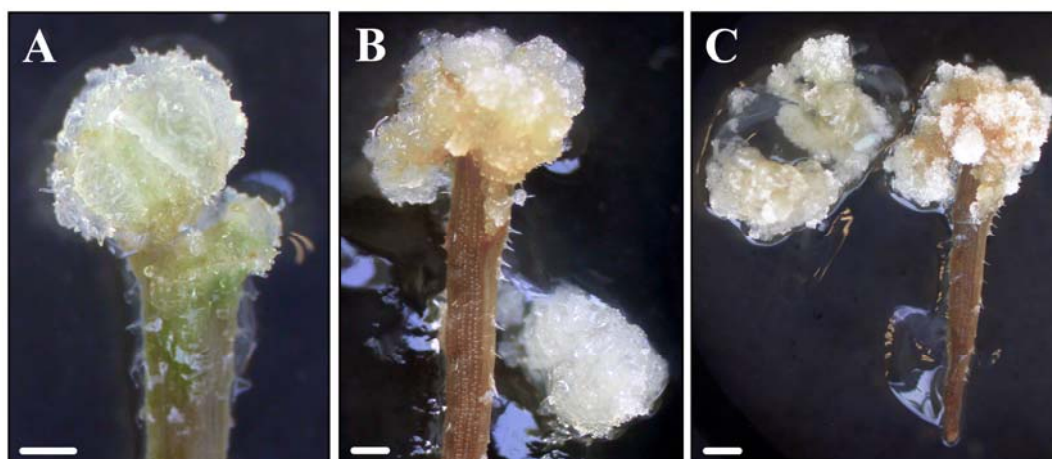


Figura 44: Evolución de las proliferaciones celulares inducidas en el medio PJ en hojas de inserción aislada del genotipo 62. **A:** a las 3 semanas. **B:** a las 6 semanas. **C:** a 12 semanas en cultivo. Barras=1mm.

3.3.5. DISCUSIÓN GENERAL DEL MATERIAL NO EMBRIONARIO

Muchos autores han enfatizado que la regeneración a través de la inducción de embriogénesis somática en tejidos vegetativos que proceden de árboles selectos, brinda la posibilidad de contrarrestar las desventajas asociadas con la regeneración a partir de explantos cigóticos. Por ello, es importante realizar más esfuerzos dirigidos a solventar los condicionamientos que muestran los tejidos adultos para responder a las condiciones de cultivo.

Está ampliamente descrito que la iniciación de cultivos embriogénicos está influida por muchos factores y entre ellos los más determinantes son el genotipo, el grado de madurez del explanto elegido y la fecha de su recolección. La importancia de estos dos últimos radica en que los tejidos en diferentes estados de desarrollo muestran diferencias en su competencia para responder *in vitro*. La composición del medio nutritivo y la aportación de reguladores del crecimiento también modificarían dicha respuesta. Como describieron Stasolla y Yeung (2003), la embriogénesis comprende la consecución de una secuencia de etapas que comienza por la inducción y proliferación de un tejido embriogénico; respuesta que depende estrictamente de las características juveniles del explanto (por ejemplo los embriones inmaduros o las hojas cotiledonares). Filonova y col., (2000a) describieron que las masas pre-embriogénicas inducidas por la presencia de auxinas y citoquininas, estaban compuestas por unas agrupaciones de pequeñas células vacuoladas redondas con núcleo patente sostenidas por una célula vacuolada alargada.

Estos agregados progresaban formando agrupaciones de estas células alargadas. La consecución del proceso embriogénico estaría limitada por anomalías producidas en la estructura de estas agrupaciones a lo largo de los subcultivos. Gupta y Durzan (1987) denominaron las estructuras embriogénicas con el término «embryonal suspensor masses» o masas de suspensor-embrión, describiéndolas con apariencia blanca, translúcida, mucilaginosa y constituidas por embriones en un estado inicial. Estas estructuras embriogénicas presentan una región apical formada por células pequeñas con citoplasma denso y núcleo grande sustentado por células alargadas altamente vacuoladas que forman el sistema suspensor. Las masas no embriogénicas aparecen con una cierta organización anatómica, opacas, friables y que pueden tornar a verdes.

El tipo de explanto sería pues uno de los primeros factores por determinar para el establecimiento de cultivos embriogénicos, ya que como indicaran Lelu y col., (1987) el potencial embriogénico de los órganos aislados depende de la edad ontogénica de los tejidos. Se han descrito unos pocos trabajos de inducción de embriogénesis en coníferas a partir de cotiledones y de acículas secundarias.

Ruaud y col., (1992) indujeron callo embriogénico en acículas de plántulas de 14 meses obtenidas de embrión somático. También encontraron que la capacidad embriogénica decrecía conforme los tejidos eran ontogénicamente más viejos. La capacidad embriogénica fue más alta en acículas de plántulas obtenidas de embrión somático que en las obtenidas de embrión cigótico.

Attree y col., (1990) describieron en cotiledones de plántulas de 21 días en *Picea glauca* y de 30 días en *Picea mariana*, en un medio modificado de von Arnold y Eriksson (1981) conteniendo BAP y 2,4-D, que las células epidérmicas y subepidérmicas comenzaban a elongar adquiriendo una apariencia retorcida, produciendo luego células mucilaginosas y traslúcidas. Los embriones surgían después de 6 semanas de cultivo y en contacto con el medio de cultivo. Berlyn y col., (1991) iniciaron también cultivos embriogénicos a partir de acículas de plántulas de 3 meses de *Pinus caribaea* pero sin conseguir la transición a embriones maduros.

Deb y Tandon (2002) en acículas de plántulas de 6 meses de *Pinus kesiya* cultivadas en medio MS suplementado con una mezcla de 2,4-D y NAA, describieron la formación de pre-embriones globulares en medio con los reguladores reducidos 10 veces. El desarrollo a embriones cotiledonares se obtuvo en medio basal sin reguladores.

Basándonos en estas experiencias, este trabajo de tesis contempla la utilización de varias condiciones de cultivo diferentes en materiales vegetales con distintas características en función de su grado de madurez, con el fin de testar su grado de competencia al efecto inductor de embriogénesis.

En base a los resultados obtenidos, parece que tanto las hojas de inserción aislada que componen el braquiblasto, como las yemas en elongación tomadas en febrero-marzo y cortadas en finas rodajas, son los tejidos con respuestas más prometedoras. Aunque ambos tejidos formaron masas mucilaginosas compuestas de células redondeadas con núcleo patente y células alargadas vacuoladas semejantes a las células embrión-suspensor en los medios de inducción, no fueron capaces de diferenciarse y formar embriones somáticos en ninguna de las condiciones de cultivo ensayadas. El hecho de subcultivar las proliferaciones presumiblemente embriogénicas en los mismos medios de inducción, o en medios de mantenimiento con concentraciones reducidas de reguladores, no promovió la diferenciación de estructuras embriogénicas. Tampoco los distintos periodos de permanencia de los cultivos en el medio antes de su transferencia (frecuencia de transferencia) mostraron diferenciación alguna. El tratamiento de las masas para su proliferación (en forma de masa o dispersas) tampoco favoreció su desarrollo. No se pudieron encontrar diferencias en las respuestas en función de las formulaciones de los medios basales, ni con los contenidos en reguladores del crecimiento, ni diferencias debidas al genotipo.

Resultados en esta línea podemos encontrar en la bibliografía. Callos inducidos en yemas apicales de *Pinus sylvestris*, mostraban divisiones asimétricas en las células y elongación después de 2 semanas en cultivo (medio MS con 4,5 μM de 2,4-D más 0,2 μM de BAP). Sin embargo, también describieron la deterioración de la estructura celular con el tiempo en cultivo, provocándose un oscurecimiento y la muerte del cultivo (Hohtola, 1995).

Bonga (1996) describió el desarrollo de estructuras parecidas a embriones a partir de pequeños nódulos esféricos con una superficie epidérmica generadas en masas mucilaginosas inducidas en yemas apicales de árboles adultos de *Larix decidua* y *L. x eurolepis*. Al contrario de como ocurría en el cultivo de tejidos juveniles (embriones cigóticos), los embriones formados a partir de nódulos verdosos inducidos (en los medios de cultivo AFC y ½ LM, en ausencia de reguladores) en yemas de *L. decidua*, recolectadas cuando comienzan a desarrollar el primordio de las acículas, surgían sin suspensores pero que, aunque germinaran, no eran capaces de formar raíces funcionales (Bonga, 2004).

Solo recientemente se han descrito protocolos que describan la inducción de embriogénesis en material adulto. Se ha obtenido en *Pinus kesiya* (Malabadi y col., 2004) cultivando yemas apicales cortadas en rodajas finas, en medio DCR suplementado con una mezcla de 22,6 µM de 2,4-D, 26,8 µM de NAA y 8,9 µM BAP. También en *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005a y b) con el mismo tipo de explanto, en medio DCR suplementado con una mezcla de 20 µM de 2,4-D, 25 µM de NAA y 9 µM BAP, se describió microscópicamente el callo embriogénico como blanco mucilaginoso revelando células alargadas mientras que un callo blanco y duro con células redondas con prominente núcleo no producía masas de embrión-suspensor.

Ya que muchos estudios indican que determinadas condiciones ambientales pueden inducir cambios en el estado fisiológico de las células, alterando así su potencial para responder al efecto inductor; un rango más amplio de condiciones y un mayor número de genotipos podrían ensayarse para la inducción de la respuesta embriogénica en material adulto del pino piñonero. Por ejemplo, valorar el potencial embriogénico de las yemas del año en distintas fechas de recolección. El efecto de un pretratamiento de almacenamiento en frío de las yemas y otras variaciones en la composición de los medios de cultivo, también podrían estudiarse.

Un gran número de investigaciones se han llevado a cabo con el fin de averiguar los parámetros físicos, químicos y ambientales que influyen en el proceso embriogénico para así poder desarrollar su potencial para la micropropagación clonal. Aun así, el establecimiento y posterior manejo de los sistemas embriogénicos son empíricos, aunque haya algunos principios generales subyacentes (Krikorian, 2000). Como indicara Hohtola

(1995) en unas conclusiones “la investigación en embriogénesis somática en coníferas, en la mayoría de las ocasiones, demanda un enorme trabajo e innumerables experimentos para conseguir dar un pequeño paso adelante”.



4. PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO

4. PROLIFERACIÓN Y MANTENIMIENTO

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Después de 4 a 12 semanas en medios de iniciación, las masas proliferativas inducidas en embriones cigóticos inmaduros, recolectados entre junio y julio de 2005 y 2006 (Capítulo 3, apartado 3.2.2), se separaron del megagametofito para subcultivarlas bisemanalmente en medio de mantenimiento. El medio de mantenimiento empleado fue el M-mLV ya descrito, independientemente del medio utilizado en la fase de iniciación. Sin embargo, se realizó un ensayo previo para evaluar el efecto de la ausencia de reguladores en el medio de mantenimiento.

Se estudió el efecto de dos procedimientos en la proliferación del material embriogénico:

☞ **Subcultivo en forma de masa**, en el que se transfirieron pequeñas porciones de las zonas periféricas de las diferentes líneas embriogénicas, descartándose la región central. Los explantos iniciales fueron masas individuales de alrededor de 100 mg de peso fresco. Se subcultivó una masa en placa Petri, realizándose cinco repeticiones por línea ensayada, correspondiendo cada repetición a una placa. Después de cada subcultivo bisemanal, cada masa individual se dividió en cuatro fragmentos los cuales se volvieron a depositar en una placa.

☞ **Subcultivo en forma de disgregado** (Klimaszewska y Smith, 1997; Lelu-Walter y col., 2006). En este procedimiento se suspendieron 100 mg de tejido fresco en 10 ml de medio de cultivo líquido M-mLV, agitándose vigorosamente para disgregar el tejido en una suspensión fina. El disgregado se depositó sobre un disco de papel de filtro de 50 mm de diámetro (80 gr/m², 60-68 µm poro. Filter-Lab, ANOIA, Barcelona, España) dispuesto en un embudo Büchner. Se aplicó vacío en un pulso a baja presión para drenar el líquido. El disco de papel con las células adheridas se depositó en la superficie del medio de cultivo sólido M-mLV (Fig. 45). Se pusieron cinco repeticiones de muestra inicial por línea embriogénica, de manera que cada disco de papel con el tejido embriogénico fue una unidad experimental. Los discos se subcultivaron bisemanalmente.



Figura 45: Proliferación del material embriogénico de pino piñonero. **A:** Placa Petri (90 mm Ø) con masas embriogénicas. **B:** Tejido embriogénico sobre disco de papel.

Se eligieron cinco líneas embriogénicas procedentes de diferentes familias: 7F11 y 2F70 iniciadas en 2005; 2F47, 9F58 y 6F88 iniciadas en 2006, para cultivarlas en ambos procedimientos para estudiar el efecto del procedimiento y del genotipo.

Se registró la tasa de crecimiento para cada línea embriogénica a las 2, 4 y 6 semanas, en oscuridad a 23 ± 1 °C. Para determinar la tasa de crecimiento, se determinó el peso fresco del material embriogénico al comienzo de cada subcultivo mediante la sustracción del peso de una placa con medio fresco, del peso de la misma placa conteniendo el medio fresco y el tejido embriogénico.

La variable dependiente fue el incremento relativo en peso fresco después de cada periodo, definido como el peso fresco al final de cada periodo menos el peso fresco inicial, dividido por el peso fresco inicial.

El efecto del genotipo y del procedimiento de cultivo fue evaluado mediante el ANOVA (Statistica Windows 5.1, StatSoft, Tulsa, OK). Los datos del crecimiento relativo fueron transformados mediante la función logarítmica. Los valores de las medias se muestran junto a los errores estándar (es). Se utilizaron placas Petri (90 mm de diámetro) selladas con Parafilm[®], conteniendo 25 ml de medio de cultivo por placa. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 23 ± 1 °C. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas del tejido embriogénico. Para las observaciones microscópicas las muestras se tiñeron con acetocarmín al 1%.

4.2. RESULTADOS

La proliferación de las MES en el pino piñonero se consigue mediante la formación continua de estructuras pre-embriogénicas a través de poliembrionías de partición (Fig. 46) y embriones en estado inicial del desarrollo, la cual confiere diferentes morfotipos, descritos para otras especies de coníferas (Ramarosandratana y col., 2001a; Breton y col., 2002, 2005). En el morfotipo *liso* se observan muy pocos embriones, apareciendo agregados de pocas células (Figs. 47 A y B). En el morfotipo *granular* se observan estructuras pre-embriónicas, en ocasiones acompañadas por células de suspensor poco organizadas (Figs. 47 C y D). En el morfotipo *picudo* se observan numerosos embriones en fase temprana del desarrollo, con suspensores más largos, desarrollados y organizados (Figs. 47 E y F; Fig. 48). El desarrollo de estos morfotipos parece ser genotipo dependiente, aunque en ocasiones pueden observarse cambios de morfotipo en determinados genotipos a lo largo del cultivo de forma no controlada.

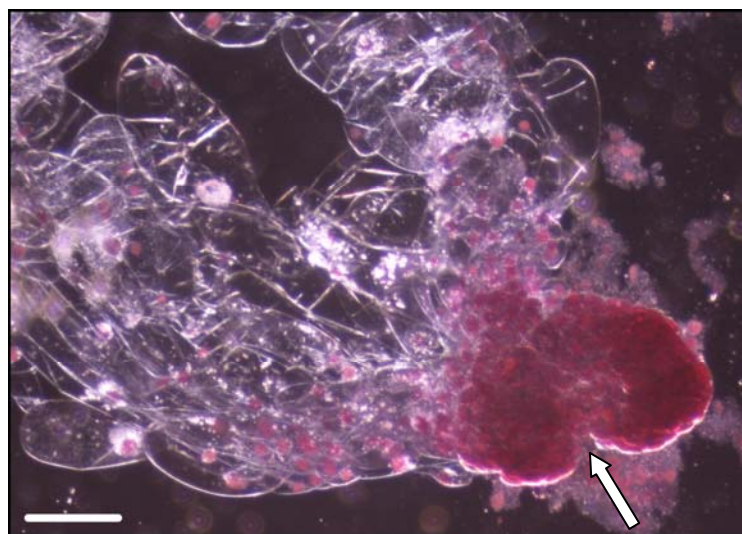


Figura 46: Embrión somático de pino piñonero durante el proceso de poliembrionía de partición (flecha). Tinción con acetocarmin al 1%. (Barra=130 μ M).

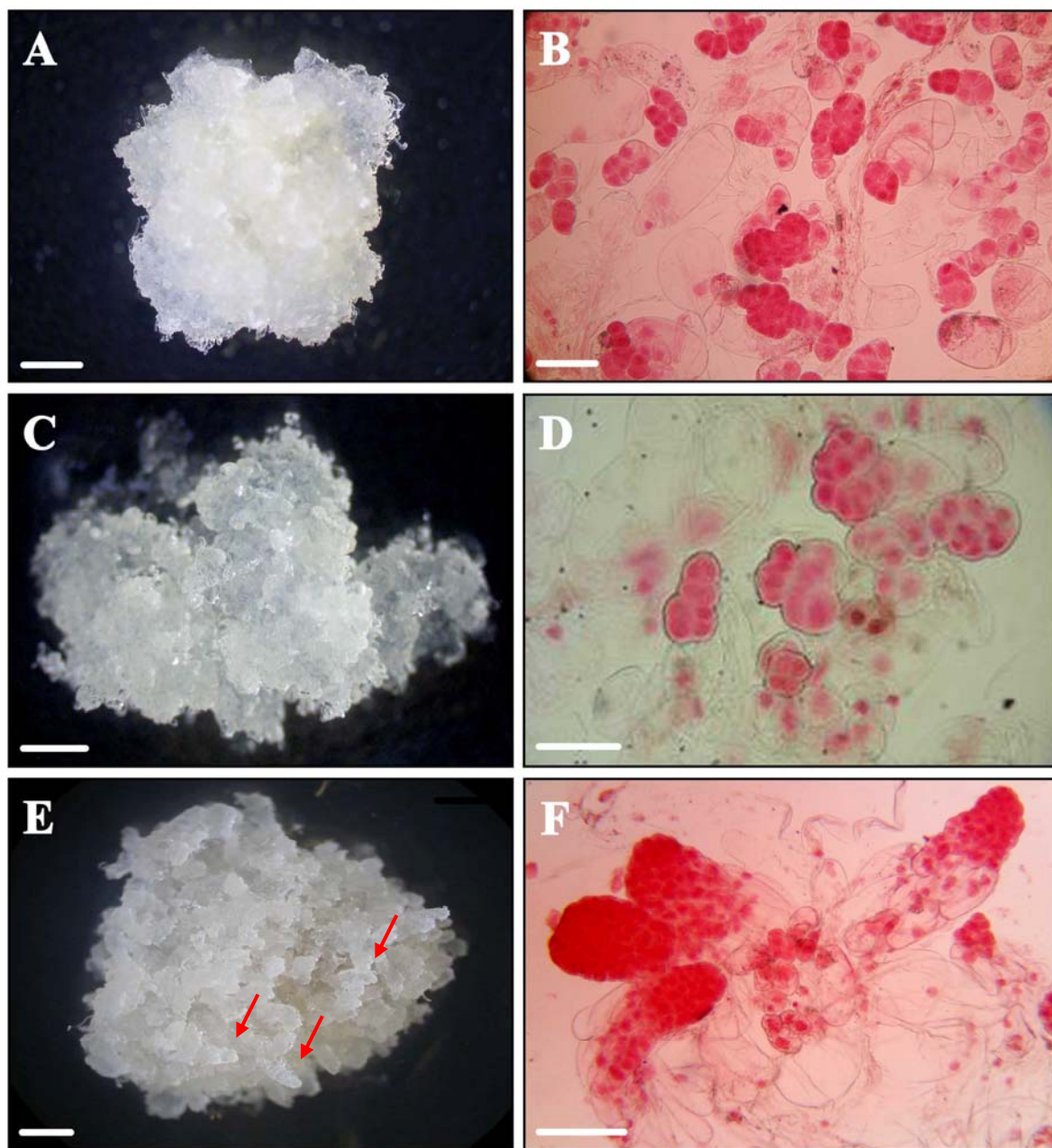


Figura 47: Diferentes morfotipos de las masas de embrión suspensor de pino piñonero. **A-B:** Morfotipo *liso* (barras= 2mm; 100 μ M). **C-D:** Morfotipo *granular* (barras= 2 mm; 100 μ M). **E-F:** Morfotipo *picudo* (barras= 2mm; 200 μ M) donde se observan los embriones emergiendo de las masas (flechas).



Figura 48: Embriones somáticos emergiendo de una masa de embrión suspensor (barra= 1mm).

Para el mantenimiento de la capacidad proliferativa del material embriogénico del pino piñonero, fue imprescindible el aporte de reguladores del crecimiento. La ausencia de los reguladores 2,4D y BAP resultó en un cambio en la morfología de las MES, adquiriendo un aspecto hiperhidratado, llegando a perder vigor.

Con el **subcultivo en forma de disgregado** se incrementó significativamente el crecimiento de todas las líneas respecto al **subcultivo en forma de masa** (Tabla 16). Cuando las masas embriogénicas se separaron en pequeñas porciones y se subcultivaron, la tasa de crecimiento aumentó, generándose 16 masas por cada masa inicial introducida, después de dos cultivos bisemanales. No obstante, cuando el material fue disgregado y depositado sobre discos de papel de filtro, se obtuvieron mejores tasas de proliferación. El tejido en crecimiento estaba constituido por estructuras pre-embriogénicas y embriogénicas tempranas con suspensores largos, dando lugar en la mayoría de los casos a cultivos con morfotipo *picudo*. Las diferencias entre genotipos solo se evidenciaron después de cuatro semanas en cultivo, aunque el comportamiento de los genotipos variaba dentro de cada procedimiento (interacción, $p = 0,000$) en los tres subcultivos.

Tabla 16: Efecto del procedimiento de subcultivo en el incremento del peso fresco relativo total (IT1, IT2, IT3) del material embriogénico en proliferación, al término de cada subcultivo mensual. Los datos representan las medias \pm es de cinco genotipos.

PROCEDIMIENTO	IT1	IT2	IT3
Disgregación	8,5 \pm 0,7	32,8 \pm 4,2	65,8 \pm 6,9
Masa	2,7 \pm 0,3	9,8 \pm 1,3	28,3 \pm 4,0
Genotipo	p=0,059	p=0,467	p=0,002
Procedimiento	p=0,000	p=0,000	p=0,000
Interacción	p=0,000	p=0,000	p=0,000

Después de seis semanas en cultivo, no se observaron diferencias significativas entre el crecimiento de las masas iniciadas en 2005 y las iniciadas en 2006, tanto en el procedimiento de subcultivo en forma de masa como en forma de disgregado. Se evidenciaron diferencias entre los genotipos para la variable incremento en peso fresco relativo del tejido embriogénico ($p = 0,002$), manteniéndose las diferencias con el procedimiento (masa vs disgregación) ($p = 0,000$) y la interacción ($p= 0,000$). Con el cultivo de 100 mg de masa fresca como masa individualizada se consiguió incrementar en 28,3 veces su peso fresco después de tres subcultivos bisemanales, mientras que el cultivo de la misma cantidad inicial de material, utilizando el procedimiento de disgregación incrementó en 65,8 veces su peso fresco. La interacción entre el procedimiento de dispersión con el genotipo también fue notable (Tabla 16). En el caso más extremo, el genotipo 6F88, cuando se subcultivó en forma de masa, el peso fresco inicial después del tercer subcultivo bisemanal se multiplicó por 8, mientras que cuando se empleó el procedimiento de disgregación el peso fresco inicial se multiplicó aproximadamente por 96 (Fig. 49).

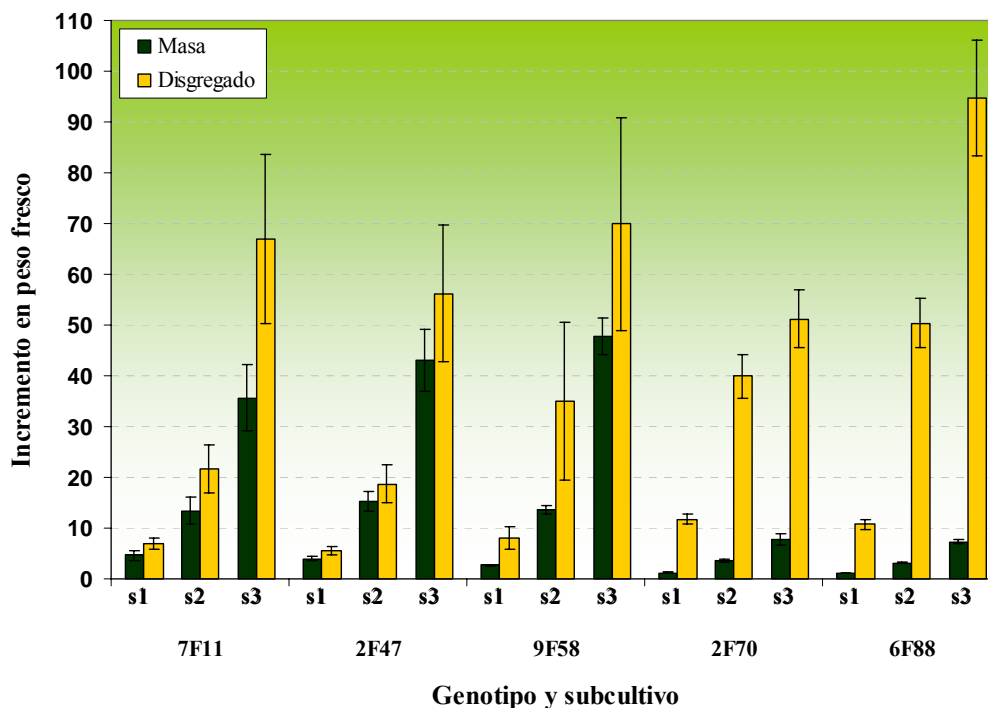


Figura 49: Efecto del procedimiento de subcultivo y genotipo en el incremento en peso fresco relativo acumulado, de las MES en proliferación, a lo largo de tres subcultivos bisemanales. Los datos representan los valores medios \pm es de 5 repeticiones de tejido en forma de masas y tejido disgregado en discos de papel de 5 líneas embriogénicas, tomados después de 2 (s1), 4 (s2) y 6 (s3) semanas en cultivo. La anotación de los genotipos incluye la familia a la que pertenecen.

En 6 de las 41 líneas embriogénicas obtenidas, (8F11, 9F11, 10F11 3F58, 2F70 y 2F88) cuando se subcultivaban en forma de masa en medio de mantenimiento mostraban una tasa de crecimiento muy baja, tasa que se veía sensiblemente incrementada cuando se subcultivaban en forma de disgregado.

De forma rutinaria dependiendo del vigor multiplicativo de cada línea embriogénica, se procedió a su subcultivo en uno de los dos procedimientos descritos. Aquellas líneas con mayor capacidad proliferativa se subcultivaron en forma de masa.

Sin embargo, se ha podido comprobar que tras un período de 20 meses en cultivo, algunas líneas embriogénicas (10F11, 11F11, 5F47, 3F58, 1F88 y 2F88) han perdido su capacidad proliferativa. Por ello, para solventar este problema se ha recurrido a su conservación en nitrógeno líquido (crioconservación).

4.3. DISCUSIÓN

Los cultivos embriogénicos pueden sufrir una disminución gradual de su crecimiento tras los subcultivos, pudiendo perder su capacidad embriogénica. La dispersión de los tejidos en medio líquido de mantenimiento, seguida del subcultivo en papel de filtro supone una vía para la recuperación de los cultivos. Este procedimiento fue originalmente desarrollado para rescatar tejido embriogénico de *Pinus strobus* (Klimaszewska y Smith, 1997) y *Pinus banksiana* (Park y col., 1999) con bajas tasas de crecimiento.

Los cultivos de pino piñonero seguían también este patrón, el tejido crecía más de forma disgregada que cuando se subcultivaba en forma de pequeñas masas, multiplicándose la cantidad inicial de 100 mg de 52 a 96 veces, dependiendo del genotipo, tras 6 semanas en cultivo. Este efecto se vio muy acentuado en el caso de los genotipos con menores tasas de crecimiento, en los que el crecimiento se incrementó 12 veces cuando se subcultivaba siguiendo el procedimiento de disgregación. Lelu-Walter y col., (2008) también indicaron que el cultivo de extrusiones iniciales de *Pinus sylvestris* siguiendo este procedimiento, podría incrementar el número de líneas embriogénicas establecidas. Según Percy y col., (2000) las células de la región central de las MES disponen de menos oxígeno que las zonas periféricas, provocando una necrosis parcial de las mismas. En este proceso se liberan compuestos citotóxicos que inhiben la proliferación celular. La disgregación del material contrarrestaría este efecto, obteniéndose por tanto mayores tasas de proliferación.

En aquellas ocasiones en las que es necesario disponer de una cantidad elevada de tejido embriogénico para acometer diferentes ensayos, el método de disgregación es muy útil al permitir mayores rendimientos en tiempos más reducidos y con menores costes (Klimaszewska y Cyr, 2002; Lelu-Walter y col., 2006).

Se ha descrito que en la mayoría de las coníferas es necesaria la presencia de reguladores tanto en los medios de inducción como en los de mantenimiento (Salajova y col., 1995; Klimaszewska y Cyr, 2002; Percy y col., 2000; von Arnold y col., 2002; Lelu-Walter y col., 2008). Zoglauer y col., (2003) describieron que la presencia de auxinas y citoquininas en el medio de proliferación producía una multiplicación continua de los embriones, promoviendo poliembrionías de partición continuas, en detrimento de la

diferenciación. Sin embargo, en *Pinus sylvestris*, *Pinus pinaster* (Lelu y col., 1999), *Pinus radiata* (Chandler y Young, 1995) y *Araucaria angustifolia* (Silveira y col., 2000) se describieron mejores tasas de proliferación en ausencia de PGRs en el medio de mantenimiento de los cultivos embriogénicos.



5. MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

5. MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS

Al igual que el genotipo y la presencia de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo influyen en la inducción y mantenimiento de las líneas embriogénicas, el posterior desarrollo de los embriones está determinado además por la ausencia de estos reguladores en el medio, junto con el aporte de ABA y agentes osmóticos, principalmente. En base a estos requerimientos, se plantearon diferentes condiciones de cultivo para la obtención de embriones somáticos maduros capaces de convertirse en plantas. En el Anexo 1 se describen las formulaciones de los medios de cultivo utilizados.

5.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron varias líneas embriogénicas producidas en los distintos medios de iniciación a partir de diferentes familias de semihermanos, con el fin de determinar su capacidad para producir embriones somáticos maduros. Los cultivos permanecieron entre 1 y 10 meses en el medio de mantenimiento M-mLV, antes de someterlos a las condiciones de maduración.

Se ensayaron distintos procedimientos de precondicionamiento del material embriogénico antes de someterlo a los tratamientos de maduración, basándonos en la bibliografía existente. (Lelu y col., 1999; Klimaszewska y col., 2001; Find y col., 2002; Bonga 2004; Lelu-Walter y col., 2006). Los cultivos permanecieron en oscuridad a $23\pm 1^\circ\text{C}$, y los tratamientos se mantuvieron durante 16 semanas.

Cada unidad experimental consistió en una placa Petri (90 mm diámetro) con medio de maduración, sobre el que se depositó un disco de papel de filtro conteniendo 50 mg de peso fresco de tejido embriogénico. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento y línea ensayada. El pH de los medios se ajustó a 5,8 antes del autoclavado. Las soluciones de ABA, PCIB (ácido 2-(p-clorofenoxi) 2-metilpropiónico) y glutamina se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio templado.

La capacidad de maduración se midió como el número de embriones somáticos con morfología normal (opacos, presencia de cotiledones e hipocótilo y polo radical

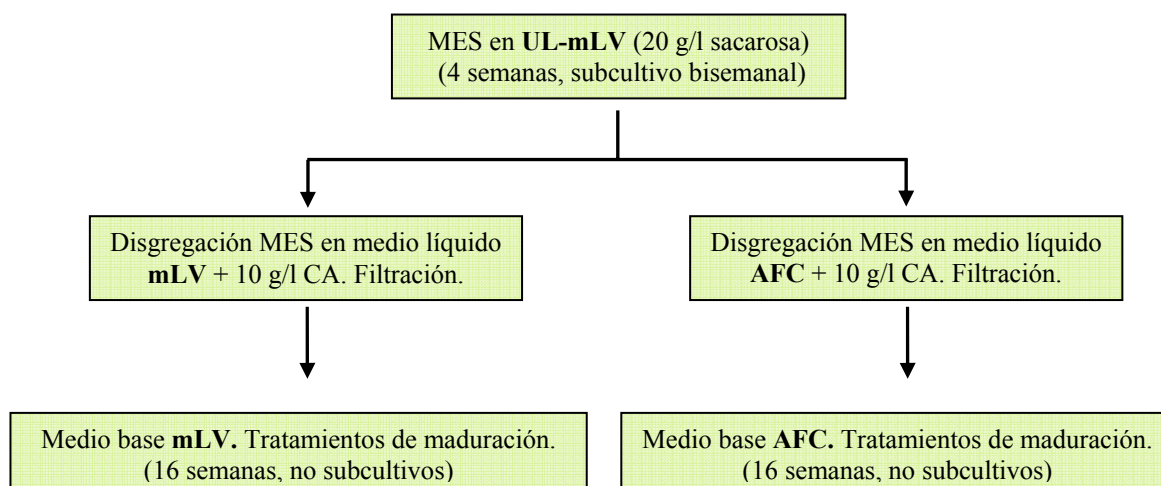
diferenciados) obtenidos en 250 mg de peso fresco de masa embriogénica, y por línea embriogénica dentro de cada tratamiento. Las medidas se realizaron a las 12 y 16 semanas en cultivo. Con el fin de relacionar proliferación vs. maduración, también se midió en algunos ensayos la capacidad proliferativa de los cultivos en los medios de maduración a través del incremento relativo en peso fresco a las 4, 8 y 12 semanas o solo después de 12 semanas, respecto del peso al inicio del ensayo.

Se evaluó el efecto de los tratamientos y del genotipo con un ANOVA de dos vías, mediante el programa Statistica para Windows 5.1 (StatSoft, Tulsa, OK). Los datos de crecimiento se transformaron logarítmicamente y los de conteo mediante la raíz cuadrada. Se realizaron cinco repeticiones por tratamiento y línea embriogénica. Los valores medios se muestran junto a los errores estándar (es). Las diferencias significativas entre medias se determinaron mediante el test de Duncan con un nivel de significación del 5%. Se realizó el análisis de correlación entre las variables peso del material embriogénico y número de embriones a las doce semanas, mediante el programa SPSS 16.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

5.1.1. Efecto del medio nutritivo, azúcar, agente gelificante y ABA.

Cuatro líneas embriogénicas, 7F11, 5F47, 13F58 y 2F70, se preacondicionaron mediante subcultivo de las MES en un medio con baja concentración de PGRs (UL-mLV: medio nutritivo mLV suplementado con 0,24 μ M 2,4-D y 0,22 μ M BAP) con 20 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite[®]. Luego, se preparó una suspensión de 10 g de peso fresco de masa embriogénica por litro de medio (sin Gerlite[®], PGRs, ni glutamina) al que se añadieron 10 g/l de carbón activo (CA). Los medios utilizados para la suspensión y maduración del material embriogénico se basaron en las formulaciones de los medios mLV y AFC (Klimaszewska y col., 2001; Bonga, 2004). La formulación del medio AFC esta basada en una modificación del medio LV donde los niveles de nitrato de amonio se reducen 10 veces y el MgSO₄ un tercio, el calcio se aporta como fosfato incrementándose así al doble los niveles de este ión. Se dispersaron alícuotas de 5 ml del disgregado (50 mg de peso fresco de masa) sobre discos de papel de filtro, de la forma ya descrita, para su cultivo en diferentes medios de maduración. Los tratamientos de maduración se llevaron a cabo de acuerdo a un diseño factorial completo para el estudio del efecto del medio

nutritivo (mLV vs. AFC), tipo de azúcar (maltosa vs. sacarosa, ambas a 60 g/l), agente gelificante (20 g/l de Plantagar vs. 10 g/l de Gerlite[®]), y concentraciones de ABA (80, 121 y 161 μ M). Considerando los 4 genotipos, se incluyeron 96 tratamientos en este experimento. Los cultivos no se transfirieron a medio fresco durante las 16 semanas en cultivo.

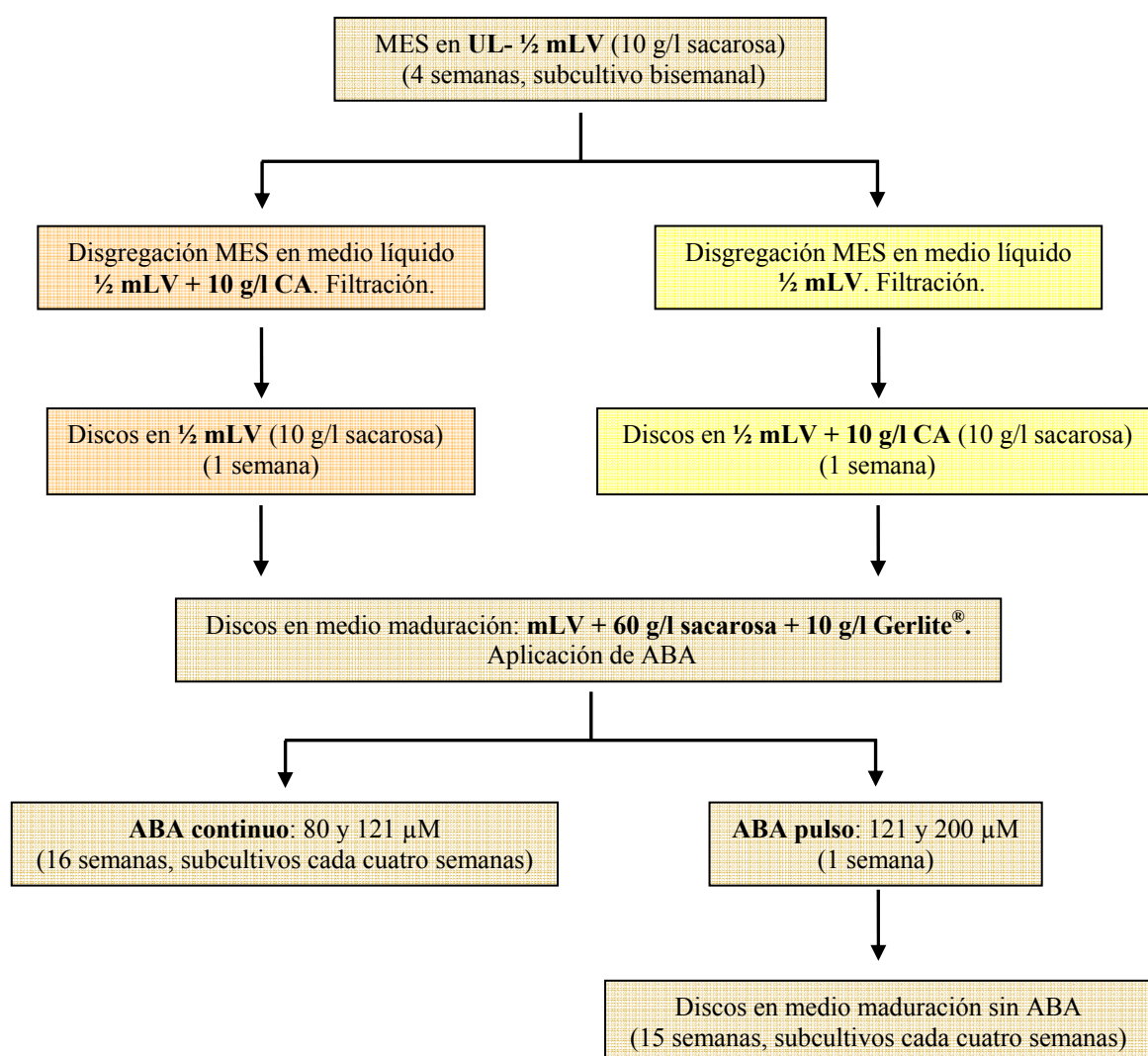


	TRATAMIENTOS DE MADURACIÓN					
	Maltosa			Sacarosa		
	80 μ M	121 μ M	161 μ M	80 μ M	121 μ M	161 μ M
Gerlite [®]	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Plantagar	✓	✓	✓	✓	✓	✓

5.1.2. Efecto de la forma de aplicación de ABA y carbón activo.

Se utilizaron las cuatro líneas embriogénicas anteriores 7F11, 5F47, 13F58, 2F70 más tres diferentes 2F47, 9F58, y 2F88. El precondicionamiento se realizó en el medio de cultivo UL-mLV con todos los componentes del medio nutritivo reducidos a la mitad (UL- $\frac{1}{2}$ mLV) suplementado 10 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite[®]. Ya que los resultados obtenidos en el apartado anterior no fueron muy concluyentes, y en base a la optimización de los resultados obtenidos con este medio en *Pinus strobus* (Klimaszewska y col., 2001), *Pinus pinaster* (Lelu y col., 2006) y *Pinus sylvestris* (Lelu y col., 2008) se eligió el medio mLV. La disgregación del tejido embriogénico se realizó en medio $\frac{1}{2}$ mLV líquido con /

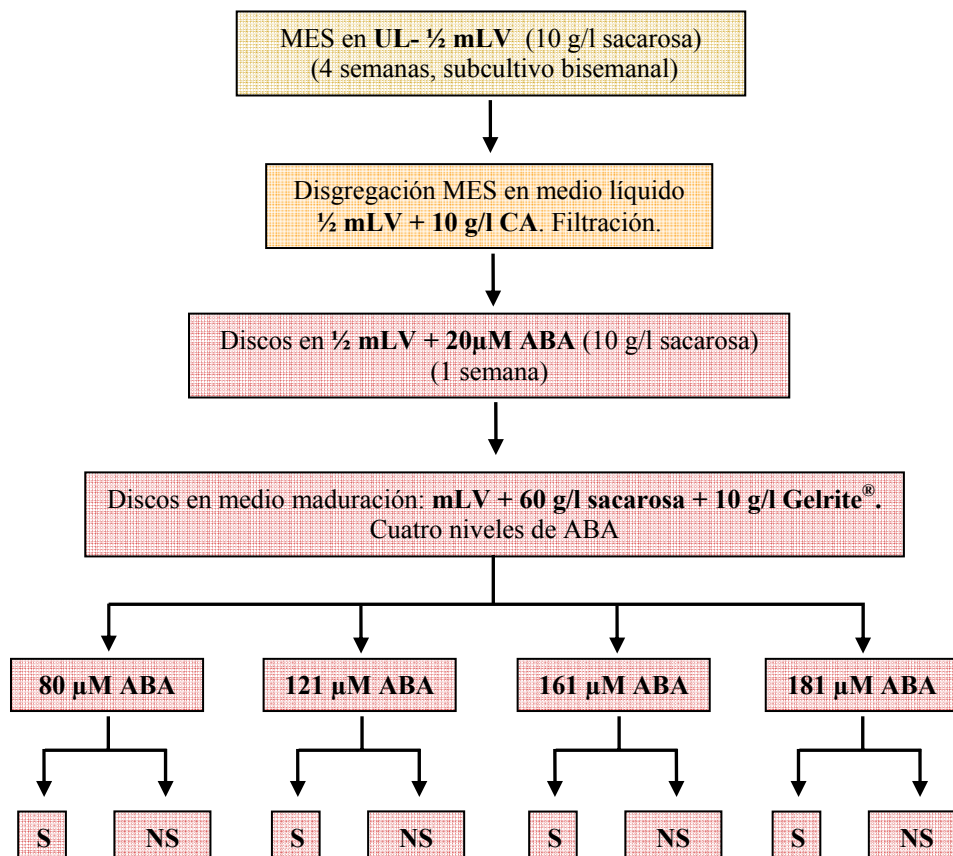
sin CA (10 g/l). Se dispensaron alícuotas de 5 ml de los disgregados (50 mg de peso fresco de masa) sobre discos de papel de filtro, de la forma ya descrita, para su cultivo durante 1 semana en medio $\frac{1}{2}$ mLV sólido con / sin CA (10 g/l). Trascurrido este precultivo, los discos con el material embriogénico se transfirieron a los medios de maduración (mLV con 60 g/l de sacarosa y 10 g/l de Gerlite[®]). Se ensayaron dos vías de aplicación del ABA: continua vs. pulso, a dos concentraciones, 80 y 121 μ M; y 121 y 200 μ M, respectivamente. En total se realizaron 56 tratamientos. En la aplicación continua, se realizaron subcultivos cada cuatro semanas. En el pulso, los cultivos estuvieron en contacto con el ABA durante 1 semana, transfiriéndose después cada cuatro semanas a medio sin ABA.



5.1.3. Efecto de diferentes niveles de ABA.

Seis líneas embriónicas, 1F11, 7F11, 2F47, 9F58, 2F70 y 6F88, cuatro de ellas coincidentes con el ensayo anterior, se preconditionaron como en el apartado 5.1.2, suspendiendo los tejidos en medio con 10 g/l de CA. Los discos se cultivaron durante 1 semana en el medio sólido $\frac{1}{2}$ mLV, pero suplementado con 20 μ M de ABA. Se ensayaron cuatro niveles de ABA (80, 121, 161 y 181 μ M). Además se estudió el efecto de subcultivar (S) el material cada cuatro semanas, o de no subcultivarlo (NS) durante la duración del experimento.

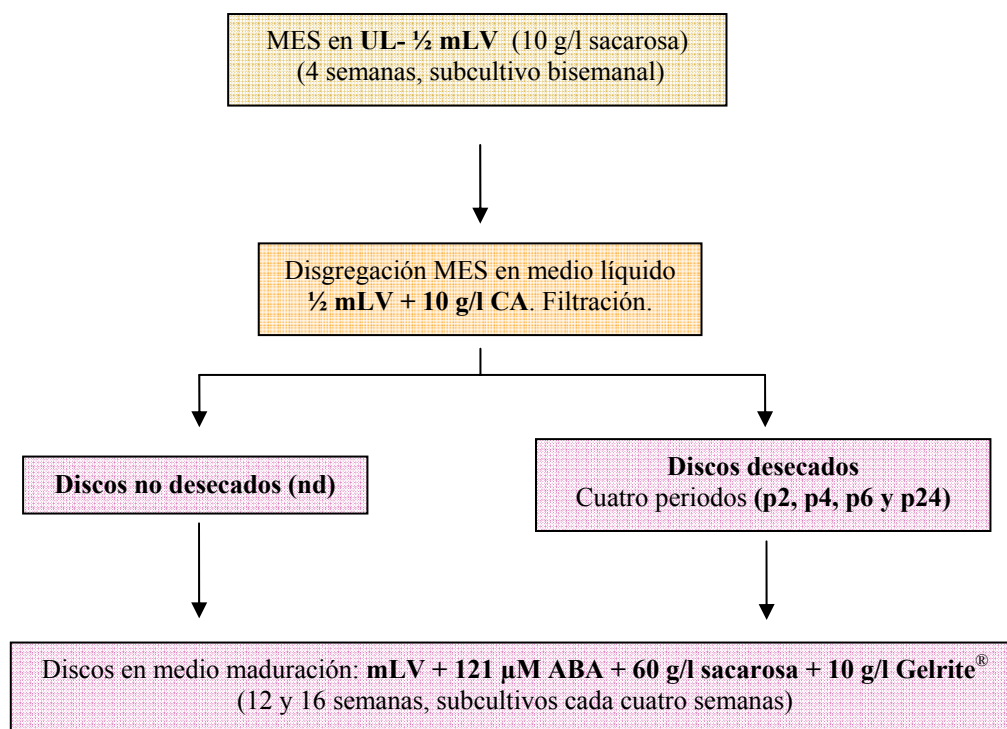
En total se realizaron 48 tratamientos. En el material subcultivado, al realizar cada transferencia, se aislaron de la MES los embriones que se encontraban en estado precotiledonar, para cultivarlos en la misma placa pero en contacto directo con el medio de cultivo, con el fin de facilitar su desarrollo. Partiendo de 50 mg de masa embriónica por placa, se pesó el tejido embriónico y se contó el número de embriones normales maduros y aberrantes, después de 12 semanas en cultivo. También se realizó un recuento de embriones a las 16 semanas.



5.1.4. Efecto de la desecación parcial.

Las líneas embriogénicas 1F11 y 9F58, se preacondicionaron como en el apartado 5.1.2, suspendiendo los tejidos en medio $\frac{1}{2}$ mLV con 10 g/l de CA. Los discos de papel con 50 mg de material embriogénico se colocaron en placas Petri vacías (60 mm de diámetro) cerradas y sin sellar. Estas placas se mantuvieron en cabina de flujo laminar para su desecación, con iluminación y temperatura ambiente (25 ± 2 °C). Se ensayaron 4 periodos de desecación: a las 2 (p2), 4 (p4), 6 (p6) y 24 horas (p24). Para medir la pérdida de humedad del soporte, se pusieron placas con los discos conteniendo CA y sin el material vegetal. La pérdida de humedad del material embriogénico se calculó por gramo de tejido, mediante el peso fresco inicial menos el peso fresco al final de cada periodo de desecación, dividido por el peso fresco inicial, y multiplicado por 100. Los resultados se compararon con cultivos no desecados (nd).

Transcurridos los distintos periodos de desecación, los discos con el material se depositaron en el medio de maduración mLV con 121 μ M de ABA, 60 g/l de sacarosa y 10 g/l de Gerlite[®]. Como en el apartado anterior, los cultivos se transfirieron a medio fresco cada cuatro semanas, aislándose los embriones precotiledonares. También se evaluó el incremento relativo en peso fresco de las MES desecadas, después de 4, 6 y 12 semanas en cultivo. Se contó el número de embriones normales maduros y aberrantes, a las 12 y 16 semanas en cultivo.



5.1.5. Efecto de la anti-auxina PCIB.

El tejido embriogénico del pino piñonero se caracteriza por su gran capacidad proliferativa, por ello se ensayó el efecto en el crecimiento de las MES de un inhibidor de la actividad auxínica con el fin de reducir la proliferación. Cuatro líneas embriogénicas, dos de crecimiento activo (1F11 y 2F47) y dos con poco crecimiento (9F58 y 6F88), se preacondicionaron como en el apartado 5.1.2, pero suspendiendo sin CA. Luego, los discos se cultivaron durante 1 semana en el medio 1/2 mLV, suplementado con CA (10 g/l).

Se realizaron cuatro tratamientos y un control, aplicando una concentración de 5,4 mg/l de la anti-auxina PCIB en distintos momentos.

Control: se cultivaron los discos con el material embriogénico en el medio de maduración (MM) mLV con 121 µM de ABA, 60 g/l de sacarosa y 10 g/l de Gerlite®, durante la duración del ensayo.

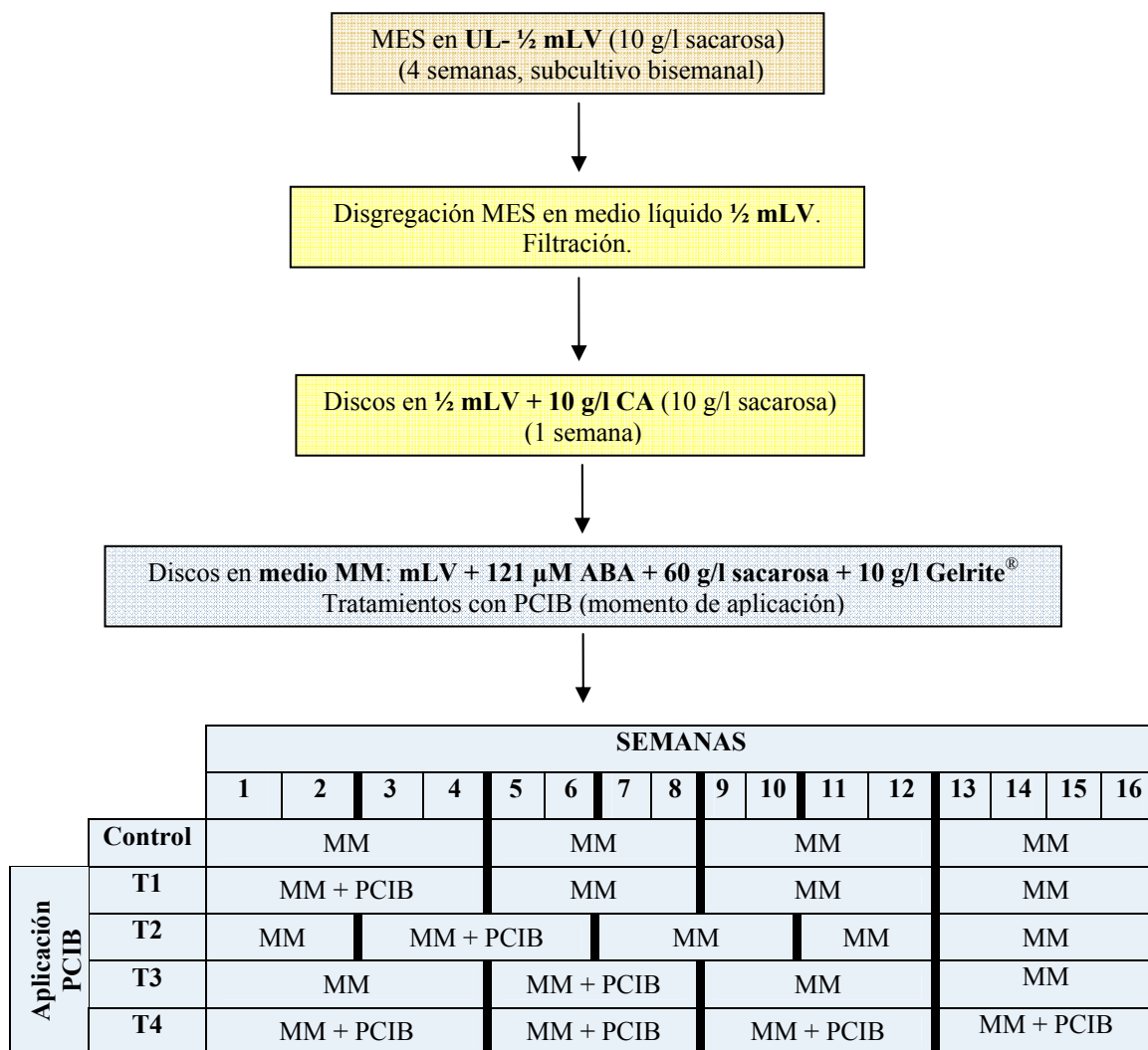
Tratamiento 1 (T1): el material embriogénico se cultivó en el medio de maduración suplementando con PCIB durante las primeras cuatro semanas. Luego, los cultivos se transfirieron al mismo medio pero sin la anti-auxina.

Tratamiento 2 (T2): los discos se cultivaron en el medio de maduración durante dos semanas. Posteriormente, se transfirieron al mismo medio suplementado con PCIB durante cuatro semanas. Luego, los cultivos se transfirieron al medio de maduración sin la anti-auxina.

Tratamiento 3 (T3): los discos se cultivaron en el medio de maduración durante cuatro semanas. Posteriormente, se transfirieron al mismo medio suplementado con PCIB durante cuatro semanas. Luego, los cultivos se transfirieron al medio de maduración sin la anti-auxina.

Tratamiento 4 (T4): los discos se cultivaron en el medio de maduración suplementando con PCIB durante la duración del ensayo.

El crecimiento proliferativo de las MES se evaluó en cada subcultivo, a las 4, 8 y 12 semanas, salvo en uno de los tratamientos que se evaluó a las 12 semanas. El peso de la placa y el disco se sustrajo del peso total. Como en el apartado anterior, se aislaron los embriones precotiledonares en cada transferencia. Se contó el número de embriones normales maduros y aberrantes, a las 12 y 16 semanas en cultivo.



5.2. RESULTADOS

5.2.1. Efecto del medio nutritivo, azúcar, agente gelificante y ABA.

En este experimento solamente se obtuvieron 9 embriones somáticos maduros entre todas las líneas embriogénicas y las 24 combinaciones de medios de maduración. La mejor línea fue la 5F47, produciendo 7 embriones maduros en la combinación de medio basal AFC con maltosa, Plantagar y 121 μM ABA (Fig. 50), y 1 embrión en el mismo medio pero suplementado con 161 μM de ABA. La línea 13F58 proporcionó 1 embrión en el medio AFC con sacarosa, Plantagar y 80 μM de ABA. No se obtuvieron embriones maduros en ninguna de las combinaciones basadas en el medio mLV, ni tampoco en aquellas con el medio AFC solidificado con Gerlite[®].

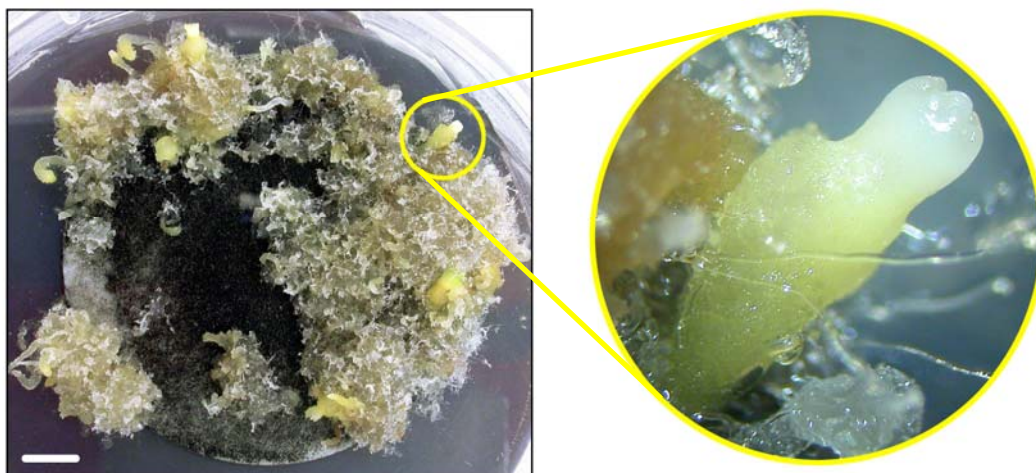


Figura 50: Embriones somáticos maduros pertenecientes a la línea 5F47 (barra= 5mm). Embrión precotiledonar.

5.2.2. Efecto de la forma de aplicación de ABA y carbón activo.

En estas condiciones se obtuvieron embriones somáticos maduros en el medio mLV, respondiendo 4 de las 7 líneas ensayadas (Fig.51). Es posible que la formulación en nutrientes del medio mLV diluido a la mitad resulte equivalente al del medio AFC. Por otra parte, cuando el tejido embriogénico se homogenizó con CA, se obtuvieron de 4 a 5

veces más embriones maduros que cuando se empleaba el CA incluido en el medio de cultivo. Además, el cultivo continuo en ABA dio de 4 a 5 veces más embriones maduros que con el pulso de ABA (Tabla 17). Cuando el tejido se homogenizó con CA y se cultivó de forma continua en presencia de 121 μM de ABA se amplió el número de genotipos que responden. En ningún caso se observó germinación precoz de los embriones maduros.

Tabla 17: Efecto del CA durante el precondicionamiento (PA) del tejido embriogénico, forma de aplicación y concentraciones de ABA, en el número de embriones somáticos (ES) maduros en 250 mg de tejido y por línea embriogénica (entre paréntesis), a las 16 semanas en cultivo.

PA	n° de ES maduros (línea embriogénica)						Total combinado
	ABA - continuo			ABA - pulso			
	80 μM	121 μM	Total	121 μM	200 μM	Total	
Tejido en contacto directo con el CA		2 (5F47)					
	3 (5F47)	3 (2F47)	21	1(5F47)	1 (5F47)	6	27
	9 (9F58)	3 (9F58)		2(9F58)	2 (9F58)		
	1 (2F70)						
CA en el medio	1 (5F47)	1 (5F47)	6	0	0	0	6
	2 (9F58)	2 (9F58)					
Total	15	12	27	3	1	6	33



Figura 51: Cultivo en medio de maduración en el que aparecen embriones somáticos en diferentes estados de desarrollo (barra= 3mm). Embrión somático con cotiledones en elongación.

5.2.3. Efecto de diferentes niveles de ABA.

Después de 12 semanas en cultivo, aunque el crecimiento proliferativo de las MES en su conjunto no varió en función de si se subcultivaba o permanecía sin subcultivar durante todo el periodo, si se mostraron diferencias en el crecimiento de las líneas en función del procedimiento de cultivo (interacción significativa) (Tabla 18). Mientras que las líneas 7F11 y 9F58 mostraron mayor tasa de crecimiento cuando se subcultivaron, la línea 6F88 mostró menor crecimiento con los subcultivos. Los crecimientos de las líneas se vieron influidos por las concentraciones de ABA aplicadas, la mayor tasa de crecimiento se obtuvo con 181 μ M, mostrándose menores crecimientos con los niveles de 80 y 161 μ M (Tabla 18).

Considerando que las únicas líneas que diferenciaron embriones somáticos maduros fueron la 1F11 y la 2F47 se trató de relacionar su mayor crecimiento respecto del resto de las líneas con su capacidad de maduración (Fig. 52). Ambas líneas mostraron la mayor tasa de crecimiento cuando se aplicó 181 μ M de ABA (Tabla 18). El procedimiento del subcultivo del material sí favoreció significativamente la maduración de los embriones, formándose 10,5 veces más embriones maduros con los subcultivos (Tabla 18). La tasa de maduración no varió con los distintos niveles de ABA ensayados, aunque cada línea se comportó de forma diferente (interacción significativa) (Tabla 18). Mientras que la línea 1F11 rindió mayor número de embriones con 181 μ M de ABA, la 2F47 lo obtuvo con 161 μ M (Fig. 52).

En la mayoría de los tratamientos se observaron embriones con morfología aberrante (cotiledones fusionados, hipocótilo reducido, en ocasiones coloración amarillo-verde). Solo el procedimiento influyó sobre la formación de embriones con esta morfología, produciéndose 5 veces más con el subcultivo del material, resultado directamente relacionado con la mayor producción de embriones normales (Tabla 18).

Tabla 18: Análisis de la varianza del crecimiento proliferativo de los cultivos y del número de embriones maduros normales y aberrantes, a las 12 semanas. Los datos referentes al crecimiento corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA (cinco repeticiones por nivel) y a seis y dos líneas embriogénicas. Los datos referentes al número de embriones maduros corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA (cinco repeticiones por nivel) y dos líneas embriogénicas.

	Nivel de significación			
	Crecimiento (6 líneas)	Crecimiento (1F11 y 2F47)	Embriones normales	Embriones aberrantes
Procedimiento	p= 0,371	p= 0,926	p= 0,000	p= 0,000
Nivel de ABA	p= 0,001	p= 0,032	p= 0,794	p= 0,632
Línea embriogénica	p= 0,000	p= 0,935	p= 0,000	p= 0,079
Línea x Procedimiento	p= 0,002	p= 0,469	p= 0,000	p= 0,274
Línea x Nivel de ABA	p= 0,181	p= 0,592	p= 0,028	p= 0,864
Procedimiento x Nivel de ABA	p= 0,724	p= 0,296	p= 0,680	p= 0,517

El análisis de correlación entre las variables peso del material embriogénico y número de embriones normales maduros, a las 12 semanas en cultivo, mostró la no relación entre ambas (coeficiente de correlación de Pearson $r_{pe} = 0,103$; $p = 0,384$). El mayor crecimiento mostrado por la línea 1F11 con $181\mu\text{M}$ estaba relacionado con el mayor número de embriones que maduran, sin embargo no ocurría de esta misma forma con la línea 2F47, ya que mientras que el mayor crecimiento se obtenía con la misma concentración de ABA el mayor número de embriones maduros se obtuvo con $161\mu\text{M}$ de ABA (Fig. 52).

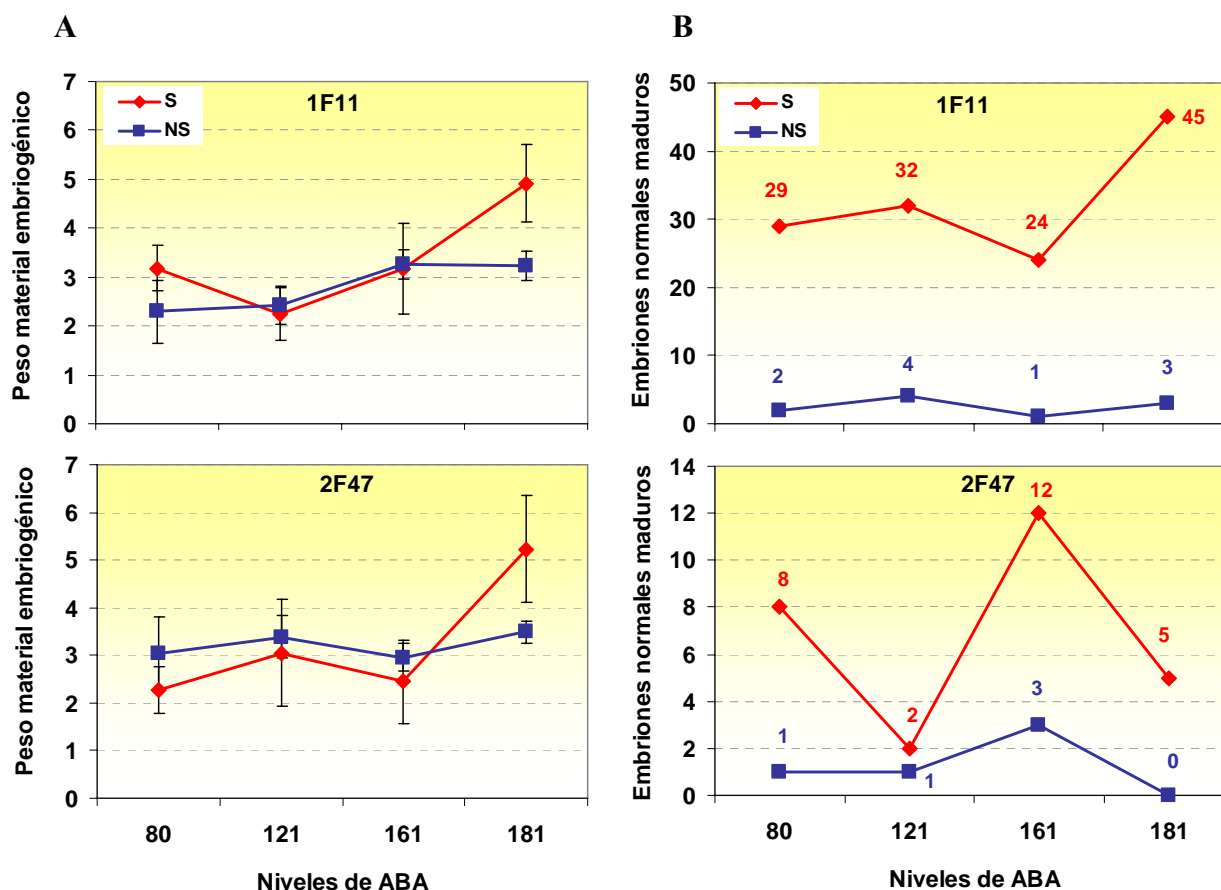


Figura 52: **A:** Incremento en peso fresco de las MES (50 mg). Los valores \pm es son medias de 5 repeticiones por tratamiento con distintos niveles de ABA, y en material subcultivado (S) y no subcultivado (NS). **B:** Número de embriones somáticos maduros por 250 mg de tejido en dos líneas embriogénicas, en distintos niveles de ABA, y en material S y NS. Los datos de peso y n° de embriones fueron tomados a las 12 semanas en cultivo.

Ya que el desarrollo de los embriones progresaba en el tiempo, se realizó un nuevo recuento con cuatro semanas más de cultivo. Ambas líneas incrementaron 1,2 veces el número de embriones normales con un subcultivo más, suponiendo un incremento en 31 embriones para la línea 1F11 y 6 embriones para la línea 2F47. Con 16 semanas de cultivo, la formación de embriones maduros normales pasó a ser 13 veces mayor cuando se subcultivaba, no incrementándose cuando el material no se subcultivaba. El número de embriones aberrantes no varió (Tabla 19).

En relación al nivel de ABA aplicado, con un subcultivo más tampoco emergieron diferencias en cuanto al número de embriones maduros normales formados (Tabla 20). Sin embargo, la línea 1F11 rindió mayor número de embriones con 121 μ M de ABA, mientras que la 2F47 lo hizo con 161 μ M (interacción significativa) (Tabla 20). Mientras que la

línea 1F11 incrementó solo en 1 embrión con 181 μM de ABA, ese incremento fue de 19 embriones con 121 μM de ABA.

Tabla 19: Embriones normales y aberrantes en 250 mg de tejido, a las 16 semanas en cultivo. Los valores corresponden a material subcultivado y no subcultivado, y tratado con distintos niveles de ABA.

Procedimiento	Línea	ABA (μM)				Total
		80	121	161	181	
Subcultivo	1F11	37/27	51/18	27/14	46/20	161/79
	2F47	8/0	2/5	18/5	5/7	33/17
	Total	45/27	53/23	45/19	51/27	194/96
No subcultivo	1F11	2/12	4/12	1/8	3/16	10/48
	2F47	1/1	1/1	3/3	0/4	5/9
	Total	3/13	5/13	4/11	3/20	15/57

Tabla 20: Análisis de la varianza del número de embriones maduros normales y aberrantes, a las 16 semanas en cultivo. Los datos corresponden a dos procedimientos, cuatro niveles de ABA (cinco repeticiones por nivel) y dos líneas embriogénicas.

Embriones maduros	Nivel de significación	
	Normales	Aberrantes
Procedimiento	p= 0,000	p= 0,000
Nivel de ABA	p= 0,820	p= 0,632
Línea embriogénica	p= 0,000	p= 0,079
Línea x Procedimiento	p= 0,000	p= 0,274
Línea x Nivel de ABA	p= 0,012	p= 0,864
Procedimiento x Nivel de ABA	p= 0,923	p= 0,517

5.2.4. Efecto de la desecación parcial.

Con dos horas de desecación (p2) el material embriogénico perdió un 6,4% de humedad, incrementándose hasta un 14,2% con cuatro horas (p4), un 28,3% con 6 horas (p6) y a las 24 horas un 68,5% (p24). Con 2, 4 y 6 horas de desecación, la línea 1F11 perdió más humedad que la 9F58 (p=0,000), aunque con 24 horas la pérdida de humedad fue la misma para ambas líneas. (Fig. 53).

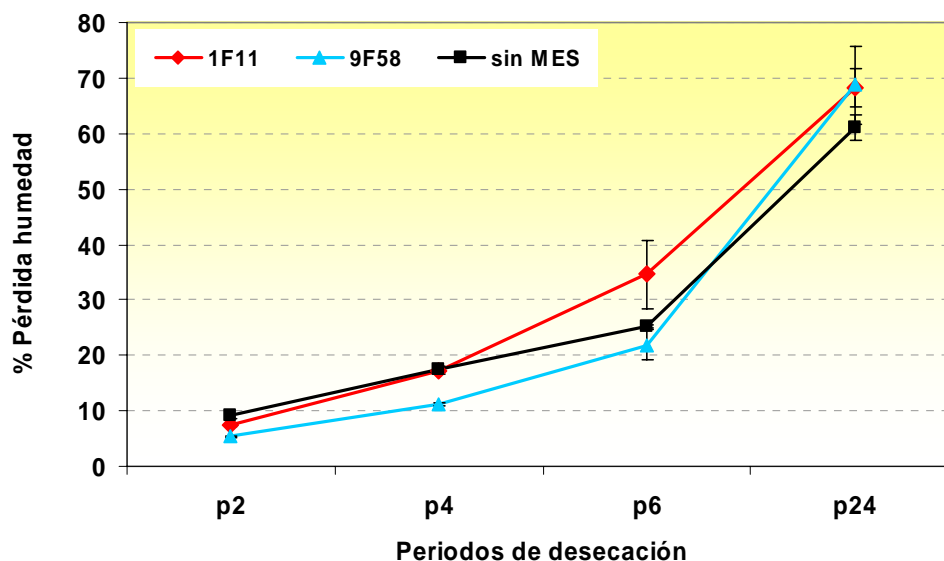


Figura 53: Pérdida de humedad (%) en las líneas 1F11 y 9F58 (por gramo de MES) y del soporte (sin MES). Los valores \pm es son medias de 5 repeticiones por tratamiento.

Con periodos de desecación superiores a 2h se favoreció la capacidad proliferativa después de cuatro semanas de cultivo, observándose un incremento significativo en el peso fresco de 2,8 veces con 4 h de desecación y de 3,7 veces con 6 y 24h, respecto del material no desecado ($p=0,000$). Cuando el material desecado se cultivó durante ocho semanas, se observó que el incremento significativo en el crecimiento respecto del no desecado se mantuvo para las 4h y 6h de desecación ($p=0,000$). Con 2 y 24h el material creció al nivel del no desecado (Figura 54). A las doce semanas, las tasas de crecimiento de los cultivos desecados durante 2, 4 y 6 h se igualaron a las del material no desecado, solo en el caso de 24 h de desecación se produjo una inhibición del crecimiento ($p=0,001$).

Únicamente se obtuvieron embriones maduros en la línea 1F11, observándose la diferenciación de los embriones a partir de ocho semanas en cultivo. Con 24 h de desecación (68% de pérdida de humedad) se inhibió la maduración de embriones ($p=0,000$), no habiendo diferencias significativas en el número de embriones maduros normales obtenidos con periodos de desecación inferiores. Sin embargo, con 4h de desecación (17% de pérdida de humedad) se obtuvo un incremento en el número de embriones maduros formados (Fig. 54).

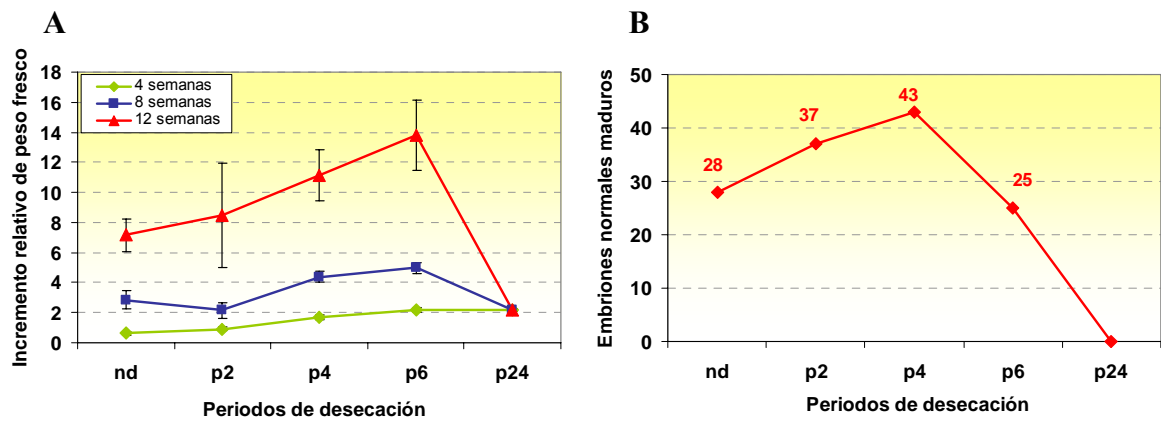


Figura 54: **A:** Incremento relativo de peso fresco a las 4, 8 y 12 semanas en cultivo de la línea embriogénica 1F11, no desecada (nd) y con 2, 4, 6 y 24 horas de desecación (p2, p4, p6 y p24). Los valores \pm es son medias de cinco repeticiones por tratamiento. **B:** Número de embriones normales maduros obtenidos por 250 mg de tejido en las condiciones indicadas, a las 12 semanas en cultivo.

Del análisis de correlación entre las variables incremento relativo de peso fresco y número de embriones normales maduros obtenidos a las 12 semanas en cultivo, se obtuvo una correlación positiva entre ambas (coeficiente de correlación de Pearson $r_{pe} = 0,500$; $p = 0,013$) (Fig.55).

Ya que el desarrollo de los embriones progresaba en el tiempo, se realizó un nuevo recuento con cuatro semanas más de cultivo. Mientras que el cultivo no desecado incrementó en 4 embriones, con 2h de desecación (7,5 % de pérdida de humedad) se obtuvo el mayor incremento (18 embriones normales), aunque no difirió significativamente con los otros dos periodos. Con 4h y 6h de desecación (17,2 y 34,6 % de pérdida de humedad, respectivamente) se obtuvieron 12 y 11 embriones respectivamente. Con 24 horas de desecación (68,3% de pérdida de humedad) no se obtuvo maduración.

El análisis de correlación entre las variables pérdida de humedad y número de embriones normales maduros después de 16 semanas en cultivo, mostró una relación inversa entre ambas (coeficiente de correlación de Pearson $r_{he} = -0,562$; $p = 0,003$). La mayor pérdida de humedad de las MES no incrementaba la formación de embriones maduros (Fig. 55).

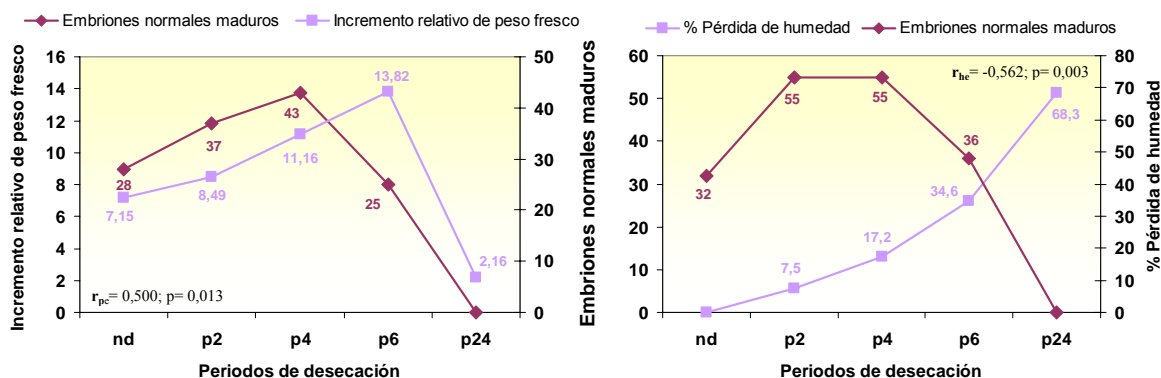


Figura 55: Análisis de correlación entre las variables incremento relativo de peso fresco y número de embriones normales maduros obtenidos a las 12 semanas en cultivo; y entre las variables pérdida de humedad y número de embriones normales maduros después de 16 semanas en cultivo.

En los cultivos no desecados el 30% del total de embriones maduros obtenidos presentó morfología aberrante. En los desecados se obtuvo entre el 28 y el 31%, sin diferencias significativas.

5.2.5. Efecto de la anti-auxina PCIB.

A las cuatro semanas en cultivo, los cultivos tratados con la anti-auxina (T1, T4) crecieron 2 veces menos que los no tratados (C, T3) (Fig. 56). Las líneas 1F11 y 2F47 (crecimiento activo) crecieron la mitad y cinco veces menos respectivamente, mientras que las líneas 9F58 y 6F88 (crecimiento lento), no variaron. A las ocho semanas en cultivo, los cultivos tratados con la anti-auxina (T1, T3, T4) crecieron 1,6 veces menos que los no tratados; produciéndose en las líneas 2F47 y 9F58 una disminución significativa del crecimiento con el tratamiento continuo de PCIB (Tabla 21) (Fig. 56).

A las doce semanas en cultivo (sin PCIB), los cultivos tratados con anti-auxina mostraron una ligera recuperación del crecimiento respecto al control. Es en este periodo cuando se midió el crecimiento en el tratamiento T2, ya que la aplicación de la anti-auxina se realizó entre la 3 y la 6 semana (Fig. 57). Se observaron diferencias en el incremento en peso entre las líneas de crecimiento lento (9F58 y 6F88) y las de crecimiento activo (1F11 y 2F47). Las líneas 1F11 y 6F88 no mostraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control. Sin embargo, las líneas 2F47 y 9F58 disminuyeron su

crecimiento significativamente con la aplicación continua de la anti-auxina (T4) (Tabla 21) (Fig. 57).

Tabla 21: Análisis de la varianza del incremento relativo de peso fresco de los cultivos, a las 4, 8 y 12 semanas. Los datos corresponden a cuatro líneas embriogénicas, cuatro tratamientos con anti-auxina y un control (cinco repeticiones por tratamiento).

Incremento relativo de peso (1F11,2F47, 9F58 y 6F88)	Nivel de significación		
	4 semanas	8 semanas	12 semanas
Línea embriogénica	p= 0,000	p= 0,000	p= 0,000
Tratamiento	p= 0,747	p= 0,000	p= 0,000
Línea x Tratamiento	p= 0,000	p= 0,274	p= 0,001

Las líneas 1F11 y 2F47, de crecimiento activo, a las ocho semanas en cultivo, desarrollaron embriones mientras que no se obtuvieron en las líneas con poco crecimiento. A las doce semanas, los cultivos tratados con anti-auxina en distintos periodos, formaron una media de 12,5 embriones normales mientras que los cultivos control formaron una media de 25 embriones, mostrándose diferencias significativas entre ambas líneas ($p=0,015$). La línea 1F11 formó 13,5 embriones de media mientras que la 2F47 formó 11,5 embriones. Solo la aplicación continua de PCIB inhibió drásticamente la maduración de los embriones en ambas líneas (interacción, $p=0,035$) (Fig. 57).

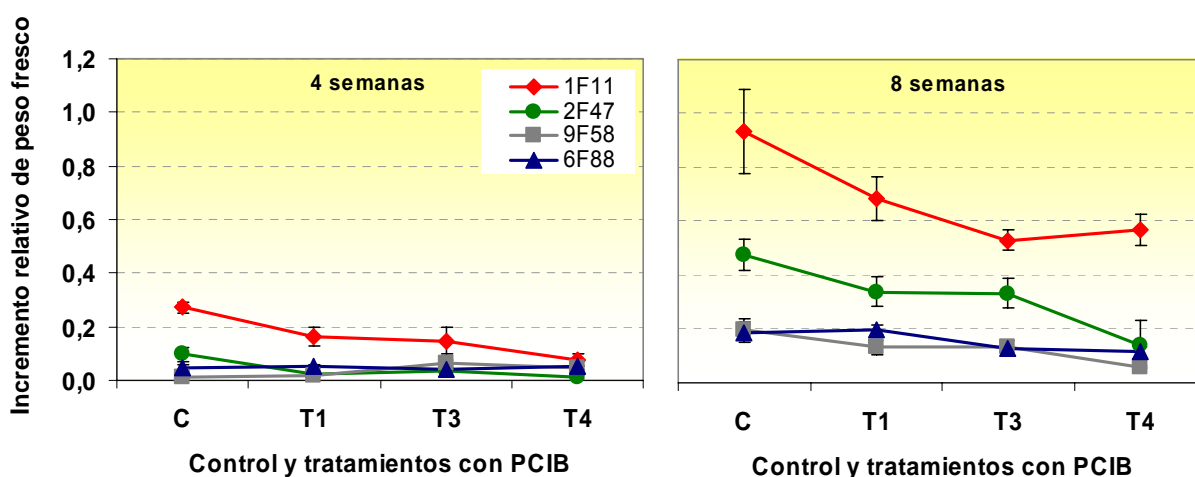


Figura 56: Incremento relativo de peso fresco en el control (C) y en los tratamientos 1, 3 y 4, en cuatro líneas embriogénicas, a las 4 y 8 semanas en cultivo. Los valores \pm es son medias de cinco repeticiones por tratamiento.

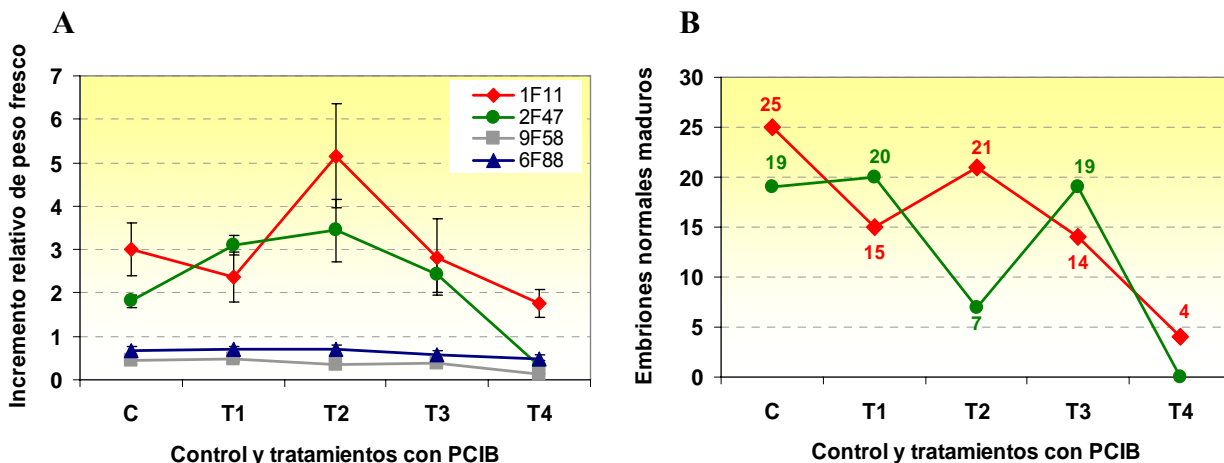


Figura 57: A: Incremento relativo de peso fresco, en las líneas 1F11 y 2F47 en las cuatro líneas, en el control (C) y en cada uno de los tratamientos con PCIB, a las 12 semanas en cultivo. Los valores \pm es son medias de 5 repeticiones por tratamiento. B: N° de embriones normales maduros obtenidos en 250 mg de tejido, a las 12 semanas en cultivo.

Del análisis de correlación entre las variables incremento relativo de peso fresco y número de embriones maduros normales después de 12 semanas en cultivo, se obtuvo que ambas variables no estaban relacionadas en ninguna de las dos líneas (Fig. 58).

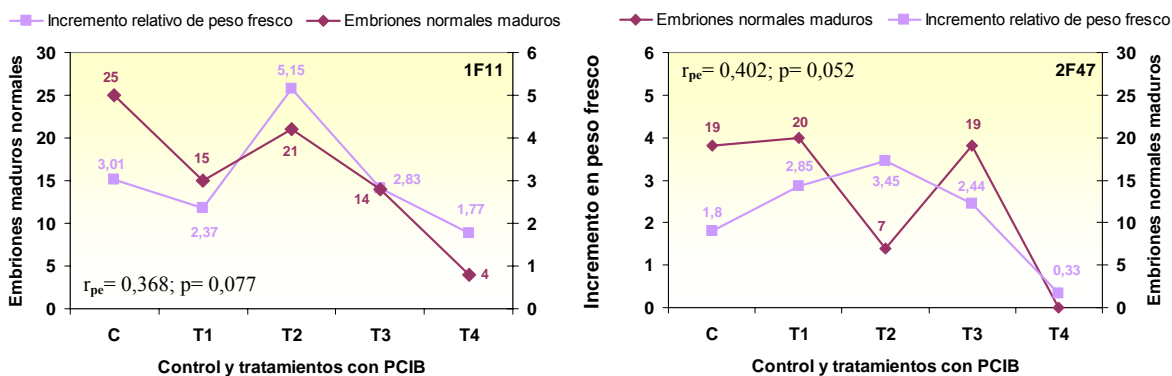


Figura 58: Análisis de correlación entre el incremento relativo de peso fresco y número de embriones maduros normales, a las 12 semanas en cultivo.

Con un nuevo subcultivo, las dos líneas ya no diferían en cuanto al número medio de embriones maduros formados en los tratamientos con PCIB, formándose 26 embriones en los cultivos tratados con la anti-auxina frente a los 37 embriones formados en los cultivos control. En ambas líneas se obtuvo un número de embriones muy bajo con la aplicación

continua de PCIB (T4). La aplicación del PCIB durante las cuatro primeras semanas (T1) en la línea 2F47 produjo un incremento en el número de embriones maduros obtenido aunque no difirió significativamente del resto (Fig. 59).

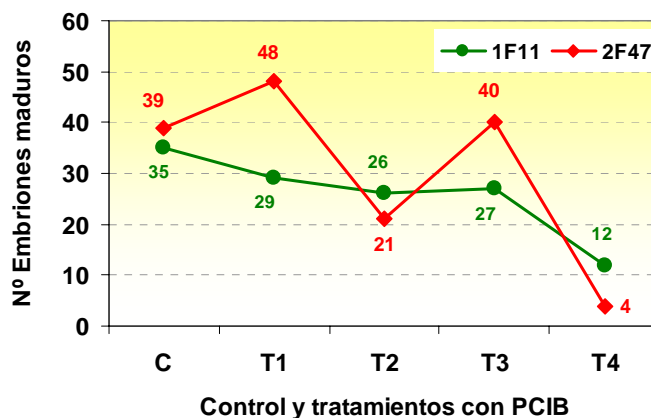


Figura 59: N° de embriones maduros normales en 250 mg de tejido, en las líneas 1F11 y 2F47, en el control (C) y en cada uno de los tratamientos ensayados a las 16 semanas.

Se obtuvo un 45% de embriones con morfología aberrante en los cultivos tratados con PCIB frente a un 39% en los cultivos control ($p=0,003$), obteniéndose un 51% en la línea 2F47 y un 35% en la 1F11 ($p=0,000$). La aplicación continua de la anti-auxina durante 16 semanas (T4) inhibió la formación de embriones aberrantes, al igual que la de normales (Tabla 22).

Tabla 22: Embriones aberrantes en 250 mg de tejido, a las 16 semanas en cultivo. Los valores corresponden a las líneas 1F11 y 2F47, en el control y en cada uno de los tratamientos con PCIB. Se muestra la relación de embriones normales / aberrantes totales formados.

Línea	Control	Tratamientos				Total
		T1	T2	T3	T4	
1F11	18	15	15	17	3	94/50
2F47	30	48	33	33	4	113/118
Total	74/48	77/63	47/48	67/50	16/7	207/168

A continuación se representa la diferenciación y maduración de los embriones somáticos con morfología normal (Fig. 60) y algunos ejemplos de embriones somáticos con morfología aberrante (Fig. 61).

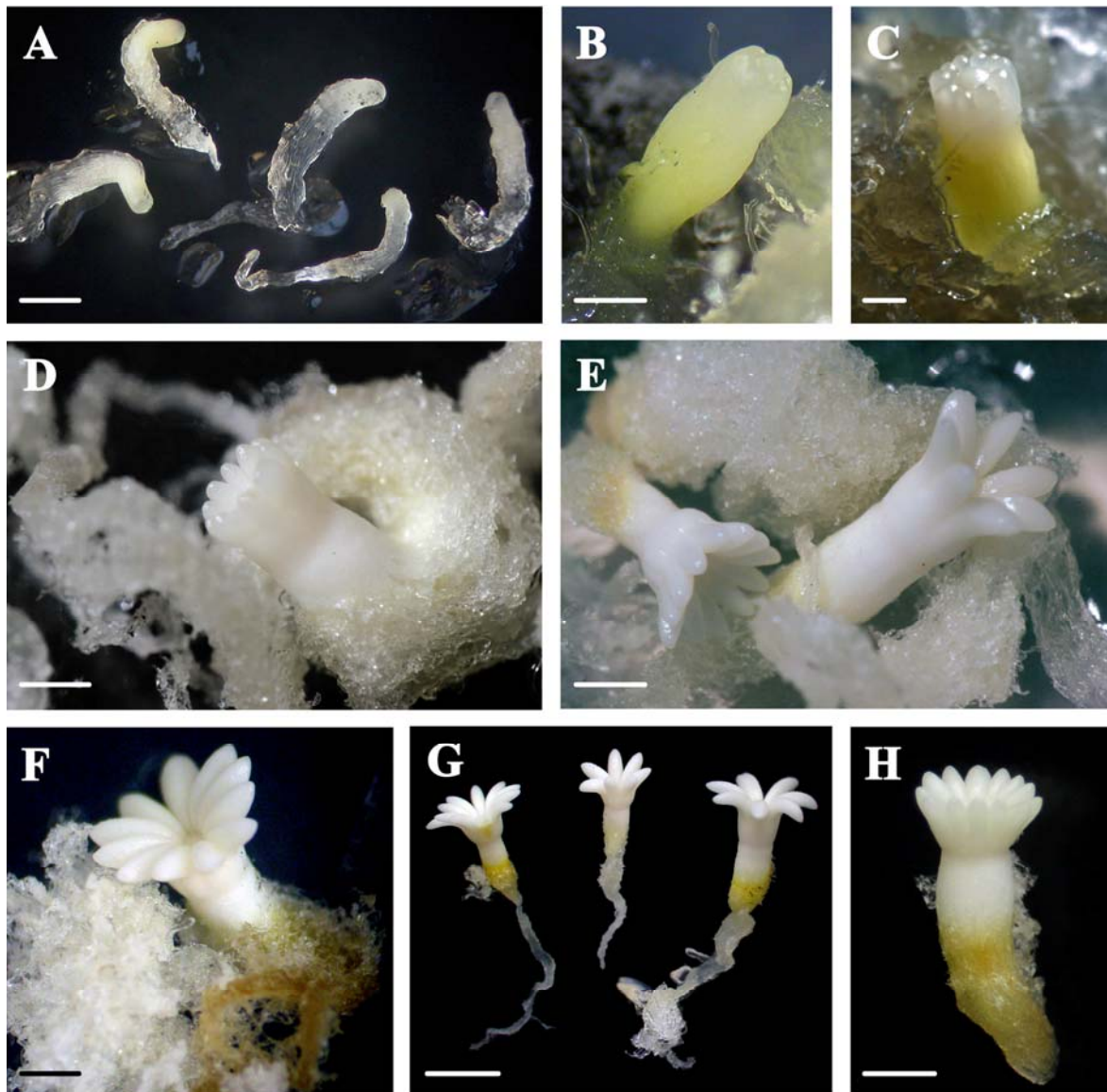


Figura 60: Diferenciación y maduración de los embriones somáticos con morfología normal. **A:** Embriones somáticos aislados después de 4 semanas en los tratamientos de maduración (barra= 1mm). **B:** Inicio de la formación de los cotiledones donde se aprecia el domo apical, a partir de las 8 semanas en condiciones de maduración (barra= 1mm). **C-D:** Elongación de los cotiledones (barras= 0,5mm; 1mm). **E-H:** Embriones completamente desarrollados donde se aprecia la variación en el número de cotiledones (barras= 1mm; 1mm; 3mm; 1mm) .

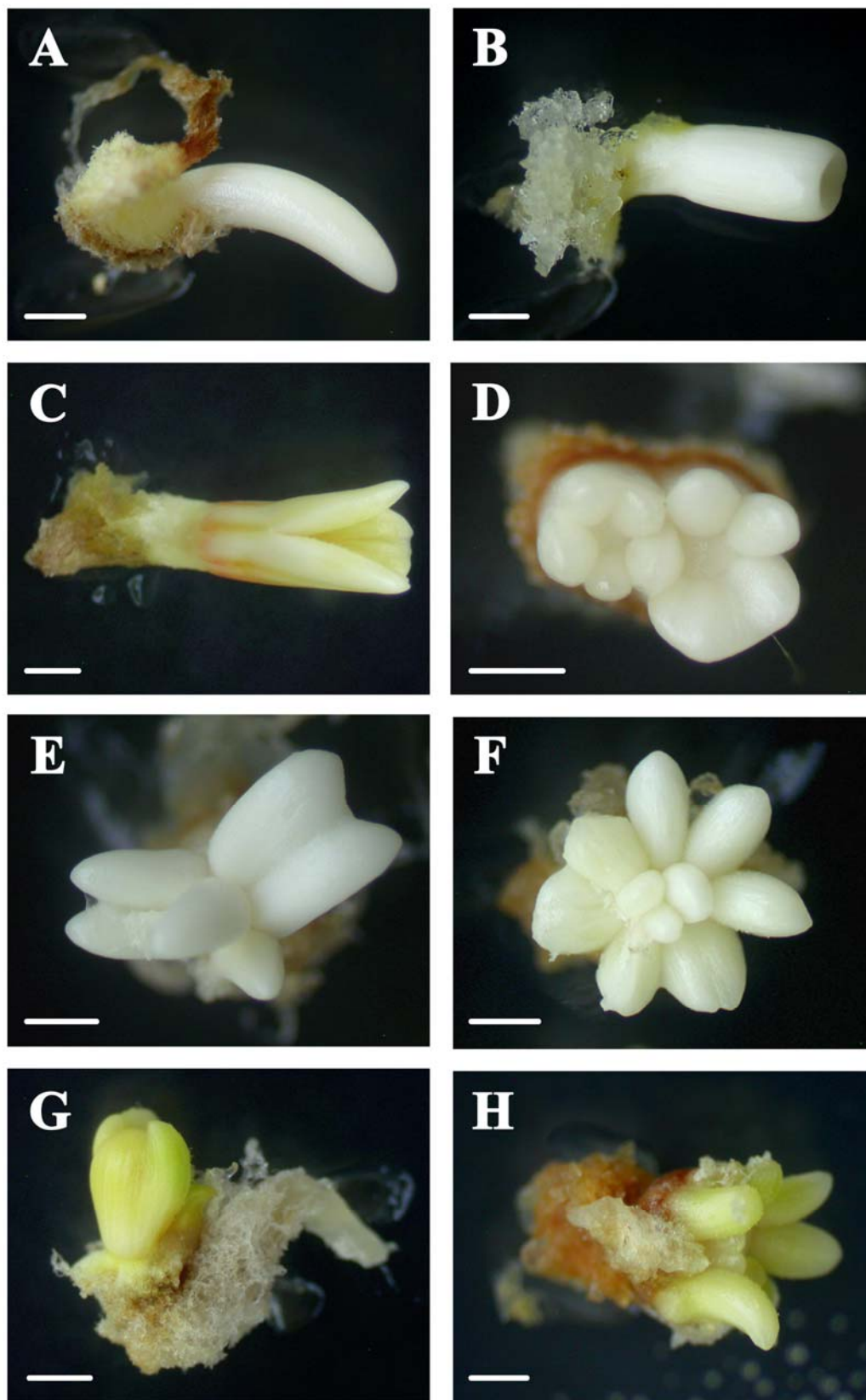


Figura 61: Embriones somáticos con morfología aberrante. **A:** Embrión con un solo cotiledón. **B:** Embrión con todos sus cotiledones fusionados presentando morfología típica de tubo. **C-F:** Embriones con varios cotiledones fusionados y distribuidos de forma anómala **G:** Embriones con ligero estrangulamiento e hipocótilo corto. **H:** Embriones con cotiledones desarrollados asincrónicamente y con ligera proliferación secundaria. Barras= 1mm.

5.3. DISCUSIÓN

El principal objetivo de los ensayos de maduración en este trabajo, fue demostrar que se puede obtener la diferenciación y maduración de los embriones a partir de las líneas embriogénicas establecidas. Como se puede observar en la revisión reciente de Klimaszewska y col., (2007), uno de los factores críticos para promover el desarrollo de un gran número de embriones somáticos es la restricción de la disponibilidad hídrica mediante medios físicos como el cultivo sobre filtros de papel, con osmóticos, o con ambos. Además, los medios de maduración necesitan contener incluso altas concentraciones de ABA y pueden incluir además carbón activo.

En ensayos previos, con el cultivo de porciones de MES de pino piñonero en los medios de maduración no se producía diferenciación de embriones (datos no mostrados). Sin embargo, utilizando el procedimiento de disgregación del material embriogénico descrito en otras especies se consiguió mejorar las respuestas de maduración, posiblemente debido al aumento de la superficie de contacto con los componentes del medio de maduración. Uno de los primeros trabajos en los que el material embriogénico se disgrega para optimizar las tasas de obtención de embriones maduros en medios de maduración, fue el publicado en *Pinus strobus* por Klimaszewska y Smith (1997). Posteriormente, también se ha aplicado en otras especies del género *Pinus* (Park y col., 1999; Ramarosandratana y col., 2001b; Pullman y col., 2003a; Salajová y Salaj, 2005; Lelu-Walter y col., 2006; Kim y Moon, 2007).

La fase de diferenciación de los embriones conlleva la detención del proceso proliferativo lo que requiere, además de la retirada de auxinas y citoquininas del medio de cultivo, la aplicación de estrés osmótico a través de la aplicación de agentes osmóticos o por reducción de la disponibilidad de agua aumentando el contenido del agente gelificante. La proliferación vigorosa del tejido embriogénico del pino piñonero aplicando estas condiciones no se ha conseguido controlar completamente, dificultándose por ello la diferenciación y maduración de los embriones somáticos. Como se ha descrito en otras coníferas, la excesiva proliferación del tejido embriogénico durante el tratamiento de maduración es el principal impedimento para emprender la embriogénesis tardía (Lelu y col., 1999; Breton y col., 2006). Estos últimos autores postularon que solo una pequeña

parte del tejido embriogénico es sensible a los tratamientos de maduración y que la variabilidad en las respuestas de maduración entre muestras de la misma línea embriogénica podría explicarse como una selección no intencionada del tejido embriogénico durante los subcultivos. También se ha descrito que las condiciones de cultivo previas a las condiciones de maduración (maltosa y subcultivos frecuentes) pueden mantener tanto el crecimiento vigoroso como la calidad óptima del tejido para la maduración (Breton y col., 2005)

Con la aplicación de un protocolo donde los cultivos se mantenían en un medio con depleción en nutrientes previo a las condiciones de maduración, se consiguió estimular la maduración de los embriones en pino piñonero. Luego la disminución del crecimiento observada con un precultivo con nutrientes reducidos podría relacionarse con la mejora en la maduración obtenida en el pino piñonero. En un primer ensayo se utilizó un precultivo con los nutrientes completos dando como resultado la producción de 9 embriones en 250 mg de tejido, respondiendo dos de las cuatro líneas ensayadas. En estas condiciones de maduración, la mejor línea y condición rindió 7 embriones. Cuando se utilizó un precultivo con la mitad de los nutrientes se incrementó la producción dando 21 embriones, respondiendo cuatro de las siete líneas ensayadas. En estas condiciones se obtuvieron 9 embriones en la mejor línea y condición.

El hecho de homogeneizar el tejido embriogénico con CA mejoró la maduración en el pino piñonero, incrementándose en 4,5 veces el número de embriones maduros obtenidos en relación con la inclusión del CA en el medio de cultivo. Este resultado estaría relacionado con la mayor capacidad de adsorción del CA de sustancias de producción endógena con actividad inhibidora de la diferenciación, al estar directamente en contacto con el tejido (von Aderkas y col., 2002). Esta hipótesis se ha desarrollado en el *Pinus pinaster* (Lelu-Walter y col., 2006), donde el número de embriones maduros que se obtenía era 5,3 veces superior al homogeneizar los tejidos con CA.

Trabajos realizados en *Pinus banksiana* (Park y col., 1999), *Pinus strobus* (Klimaszewska y col., 2001), *P. pinaster* (Lelu-Walter y col., 2006), *Pinus rigida x Pinus taeda* (Kim y Moon, 2007) o *Pinus sylvestris* (Lelu-Walter y col., 2008) describen que los cultivos no se transfieren a medio fresco durante la duración de los tratamientos de

maduración, que suelen durar entre 12 y 16 semanas. Sin embargo, en el piñonero se obtuvieron mejores tasas de maduración cuando el material se transfirió cada cuatro semanas a medio fresco. Sirva de ejemplo la obtención de 51 embriones en la línea 1F11 en el medio mLV con sacarosa, Gerlite® y 121µM ABA cuando se subcultivaba frente a los 4 embriones obtenidos sin subcultivos, a las 16 semanas. Con la transferencia del material a medio fresco se renuevan los componentes del medio de cultivo y también el ambiente gaseoso del interior de las placas, con la consiguiente eliminación, entre otros, de los efectos negativos que el etileno pueda ejercer en la maduración de los embriones (Kong y col., 1999; Stasolla y Yeung, 2003).

Aunque la bibliografía existente no lo menciona, el desarrollo cotiledonar de los embriones somáticos de pino piñonero se logró mejorar al aislarlos del tejido proliferativo para cultivarlos en contacto directo con el medio de maduración.

La mejora en la respuesta de maduración con la aplicación continua de ABA obtenida en el piñonero respecto de la aplicación en pulso, podría relacionarse con la mayor disponibilidad del ABA por los tejidos durante el periodo de cultivo. Dunstan y col., (1992) indicaron que el ABA era completamente metabolizado en ocho días en cultivos en suspensión de *Picea glauca*. Kong y von Aderkas (2007) indicaron una utilización del ABA diferente según la capacidad de distintas líneas embriogénicas de *Picea glauca* x *P. engelmanni* para madurar. Todas las líneas utilizaban la mitad del ABA exógeno entre dos y tres semanas. No hemos encontrado en la bibliografía referencias sobre las respuestas de maduración con la aplicación en forma de pulso del ABA con el fin de estudiar su utilización por parte de las distintas líneas embriogénicas.

Aunque las tasas de maduración de las líneas embriogénicas de pino piñonero no mostraron diferencias significativas entre los cuatro niveles de ABA ensayados, cada línea mostró distinta sensibilidad en relación a los niveles de ABA aplicados. La línea 1F11 rindió mayor número de embriones con 181µM mientras que la 2F47 con 161µM. Con un subcultivo más en presencia de ABA la línea 1F11 formó mayor número de embriones con 121µM. Este resultado podría estar relacionado con un efecto inhibitorio a largo plazo de la concentración más alta de ABA aplicada. Estos resultados están en la línea de lo descrito en otras especies, donde las respuestas del tejido embriogénico en relación a la aplicación

exógena de ABA es genotipo dependiente (Jalonen y von Arnold, 1991; Thompson y von Aderkas, 1992; Find y col., 1998a; Kong y von Aderkas, 2007).

En este estudio, la reducción del contenido hídrico celular mediante la desecación parcial del material embriogénico del piñonero, junto con la restricción física del agua disponible mediante el aumento de la concentración de Gerlite[®], y el incremento del potencial osmótico del medio al aumentar la concentración de sacarosa, no mostró los mismos resultados de maduración en las líneas utilizadas. En la línea 1F11, con una pérdida de humedad entre el 17 y el 35% el crecimiento proliferativo de las MES se incrementó con respecto al tejido no desecado. Sin embargo, el mayor incremento en el número de embriones maduros se obtuvo cuando el tejido perdía entre un 7,5 y un 17% de humedad. Con un 68% de pérdida de humedad tanto el crecimiento proliferativo como la maduración resultó inhibido. Se ha descrito que en coníferas un prerrequisito para el completo desarrollo de los embriones durante la maduración es el cese del crecimiento proliferativo (Zoglauer y col., 2003), sin embargo nuestros resultados muestran una relación directa entre la estimulación del crecimiento del tejido con la producción de embriones maduros, como consecuencia de la desecación parcial del tejido. Podríamos decir pues, en la línea de lo descrito por Klimaszewska y col., (2000), que la reducción en la disponibilidad de agua estimula un cambio en el patrón del desarrollo desde la proliferación de las células embriogénicas, mediante la poliembrionía de partición, hacia el desarrollo de los embriones. Los tratamientos de desecación parcial de los embriones somáticos maduros generalmente mejoran las frecuencias de conversión a planta, lo que se asemeja a la transición desde el estado tardío del embrión cigótico a la germinación (Stasolla y Yeung, 2003). Mejoras en la diferenciación de los embriones somáticos mediante la desecación parcial de masas embriogénicas se han observado también en *Pinus patula* (Malabadi y van Staden, 2005a) y en *Pinus kesiya* (Malabadi y col., 2004), indicándose que este resultado podría relacionarse con los niveles endógenos de ABA (Malabadi y col., 2004). Rancé y col., (1994) sugirieron que con la disminución del potencial hídrico se producen cambios bioquímicos en el material embriogénico, apareciendo proteínas específicas en respuesta al estrés hídrico, mejorándose la maduración. Klimaszewska y col., (2007) indicaron que no son necesarios tratamientos postmadurativos cuando los embriones somáticos se desarrollan en medios con altas concentraciones de agentes gelificantes, ya que la restricción de la disponibilidad de agua

en estas condiciones es suficiente para producir embriones somáticos maduros con bajo contenido hídrico.

En general, la aplicación exógena de auxina es esencial para el crecimiento proliferativo del tejido embriogénico en coníferas. Sin embargo, como postularon Find y col., (2002), en algunas especies de *Abies* este regulador puede producirse endógenamente en el cultivo embriogénico, lo que podría explicar el fallo en la maduración. Por ello, estudiaron el efecto de agentes anti-auxínicos como el PCIB en combinación con ABA sobre los niveles endógenos de auxinas o su actividad, durante la maduración de embriones somáticos de *Abies nordmanniana*. La inclusión de este agente, redujo la proliferación del material e incrementó significativamente el número de embriones maduros con morfología normal. En el pino piñonero se observó que aún en presencia de PCIB en los medios de maduración, la proliferación de los tejidos no disminuía significativamente, obteniéndose maduración en dos de las cuatro líneas ensayadas (las de crecimiento activo). Find y col., (2002) también indicaron que la respuesta de los cultivos dependía de la concentración y el momento de aplicación del PCIB. Los cultivos de pino piñonero tratados con la anti-auxina durante las cuatro primeras semanas, o durante la 4-8 semanas, o de forma continua, mostraron menor crecimiento proliferativo que el control a las ocho semanas de cultivo. Sin embargo, con un subcultivo más (en ausencia de la anti-auxina) la proliferación de los cultivos tratados alcanzó niveles similares al control. Solamente con la aplicación continua del PCIB se observó inhibición del crecimiento. Con ninguno de los tratamientos se obtuvo una estimulación de la maduración de los embriones por encima de los formados en los cultivos control. Con otras cuatro semanas más de cultivo sin PCIB, solamente en la línea 2F47 se obtuvo un ligero incremento en la tasa de maduración cuando el PCIB se aplicó durante las cuatro primeras semanas. La inclusión de la anti-auxina en los medios de maduración no influyó en el crecimiento proliferativo de los tejidos embriogénicos de piñonero ni en el desarrollo de los embriones, salvo en el caso de la aplicación continua durante todo el periodo. Este resultado podría hacernos pensar que la posible presencia de auxina endógena no estaría relacionada con la respuesta de proliferación y maduración de nuestros cultivos.

La formación de embriones con desarrollo aberrante se hizo patente en los controles y en los ensayos realizados, aumentando hasta un 79% cuando el material no se

subcultivaba durante el cultivo en condiciones de maduración. Sin embargo, ni entre líneas, ni los distintos niveles de ABA, ni la desecación parcial del material embriogénico influyeron significativamente sobre la formación de embriones aberrantes. Los distintos tratamientos con PCIB formaron más embriones aberrantes que los cultivos control, obteniéndose más embriones en la línea 2F47 que en la 1F11. En piñonero se observaron alteraciones como la disminución en el número de cotiledones, la fusión de cotiledones y el acortamiento del cuerpo del embrión. En el embrión cigótico pudo observarse una variación natural en el número de cotiledones encontrándose entre 6 y 14, observándose diferencias en el número medio entre familias (Carneros y col., 2001); en los embriones somáticos se obtiene esta misma variación. Find y col., (2002) también encontraron desarrollos anormales en embriones somáticos de *A. normanniana*, mostrándose una disminución en el número de cotiledones con las exposiciones prolongadas al PCIB.

Es ampliamente conocido que las respuestas morfogénicas son genotipo dependientes. Existen muchas evidencias de una fuerte varianza genética aditiva en la iniciación de embriogénesis somática, siendo el control genético menos fuerte en la proliferación, maduración y germinación (Park y col., 1994; Klimaszewska y col., 2007). Entre todos los ensayos realizados en este trabajo, el número de líneas embriogénicas donde se obtuvo producción de embriones maduros fue del 45%, lo que indicó una fuerte influencia del genotipo en la capacidad de diferenciar embriones maduros. Si consideramos la influencia familiar en la respuesta de maduración, se obtuvo maduración en el 80% de las familias estudiadas.

El porcentaje de genotipos con respuesta es comparable a otras especies de pino (Miguel y col., 2004). Si se compara la tasa de obtención de embriones somáticos maduros normales por gramo de tejido en la mejor condición (220 embriones, en la línea 1F11 con 2 ó 4 horas de desecación parcial, en presencia de 121 μ ABA), con las obtenidas en otras especies de pino, se observa que es similar o incluso superior: 287 embriones en *Pinus monticola* (Percy y col., 2000), 230 en *Pinus taeda* (Pullman y col., 2003a), 147 embriones en *Pinus strobus* (Klimaszewska y col., 2001) ó 54 embriones en *Pinus nigra* (Salajová y Salaj, 2005). En *Pinus pinaster* el número varió entre 24 y 441, excepto en una línea que produjo solamente 2 embriones (Lelu-Walter y col., 2006).

Al igual que se describió en *Picea abies* (Jalonen y von Arnold, 1991) o en *Pinus pinaster* (Ramarosandratana y col., 2001a), en pino piñonero también se observó que aquellas líneas embriogénicas donde predominaba el morfotipo *picudo* o «spiky» mostraban mayor capacidad de diferenciación (1F11, 2F47 y 13F58).

Con el fin de ampliar el número de genotipos que respondan a las condiciones de maduración e incrementar la tasa de embriones maduros convertibles en planta, podría optimizarse el protocolo abordando aspectos como la utilización de otros agentes osmóticos como polialcoholes u otros azúcares (Li y col., 1998a; Ramarosandratana y col., 2001b; Miguel y col., 2004), reguladores de niveles de etileno (Kong y Yeung 1994; Kong y col., 1999; El Meskaoui y Tremblay, 2001; Stasolla y Yeung, 2003), o poliaminas (Minocha y col., 2004).



6. GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN EN PLANTA

6. GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN EN PLANTA

Las condiciones utilizadas en las fases previas a la germinación de los embriones somáticos condicionan el éxito de la germinación y conversión. Durante la maduración, las condiciones de cultivo pueden inducir dormición en los embriones somáticos, siendo necesarios tratamientos específicos para estimular la germinación de los embriones, como el almacenamiento en frío (Merkle y col., 1995). Otros tratamientos como la aplicación de reguladores del crecimiento como citoquininas, ácido indólbútírico (IBA) o ácido giberélico, también estimulan la germinación de los embriones (Merkle y col., 1995; George, 1996). La orientación de los embriones en los medios de germinación parece tener un papel importante en su desarrollo (Becwar y col., 1990). En el Anexo 1 se describen las formulaciones de los medios de cultivo utilizados.

6.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Los embriones somáticos cotiledonares con morfología normal, procedentes de los diferentes ensayos de maduración, se sometieron a varias condiciones para su germinación y aclimatación.

La capacidad de germinación se midió como el número de embriones en los que comenzaba a emerger la raíz (Lelu y col., 1994b), realizándose recuentos semanales, de 4 a 8 semanas (según ensayos). En función del número de embriones, se evaluó la respuesta de una media de diez embriones por repetición, realizándose de 5 a 6 repeticiones en el tiempo, por periodo de almacenamiento en frío en el ensayo 2, y por medio de cultivo en el ensayo 3. Los datos de frecuencias de germinación se transformaron mediante arcoseno para realizar el ANOVA utilizando el programa Statistica para Windows 5.1 (StatSoft, Inc. 1996). Las diferencias significativas entre medias se determinaron mediante el test de Duncan con un nivel de significación del 5%.

Las plántulas con plúmula y raíz desarrolladas, se transfirieron *ex vitro* a alveolos forestales de plástico (240 ml) con sustrato compuesto por turba y perlita (3:1 v/v) y 3 g/l de fertilizante de liberación lenta Osmocote[®], humedecido con abono soluble Peters (2 g/l)

y tratado con el agente fungicida Previcur (2ml/l). Se mantuvieron durante una semana en cámara de cultivo de alta humedad, $24\pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h de luz ($120\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cubiertas con envases de plástico invertidos y agujereados en la base para reducir la evapo-transpiración. Durante ese periodo, los envases se retiraron aproximadamente 4 horas diarias, con la finalidad de que se fueran aclimatando paulatinamente a condiciones de humedad relativa más baja. Después de esta semana, los envases se retiraron definitivamente.

Después de dos meses, las plantas con crecimiento activo se transfirieron a contenedores forestales de mayor volumen (1000 ml) con el mismo sustrato, y se trasladaron a condiciones de invernadero con riego por nebulización. Después de un mes se registró el número total de plantas que sobrevivieron al proceso completo de aclimatación.

6.1.1. Desarrollo de los embriones germinados en medio líquido.

Los embriones somáticos cotiledonares pertenecientes a los genotipos 2F47, 5F47 y 9F58 con morfología normal, obtenidos en el ensayo de maduración del apartado de maduración 5.1.2 (Forma de aplicación de ABA y carbón activo), se colocaron horizontalmente en contacto con el medio, con los cotiledones en la misma dirección, en placas Petri de 90 mm de diámetro. El medio de cultivo se basó en la formulación del medio nutritivo AFC (Bonga, 2004), suplementado con 30 g/l de sacarosa, 6 g/l de Plantagar, y sin reguladores del crecimiento. Los cultivos se almacenaron en frío durante 4 semanas como tratamiento pregerminativo. Luego, las placas se trasladaron a la cámara de cultivo para la germinación de los embriones, disponiéndolas en posición inclinada un ángulo aproximado de 40° , quedando los embriones colocados con sus hipocótilos orientados hacia abajo. Los cultivos se mantuvieron a $23\pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 h de luz tenue (tubos fluorescentes de Sylvana Gro-lux[®] y Philips cool-white, $17\text{--}20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$). Se realizó el recuento de los embriones germinados a las 4 semanas en cultivo.

Con el fin de promover el desarrollo de los embriones germinados, con radícula mayor o igual a 5 mm, se transfirieron a dos condiciones (Fig. 62): (a) tubos de cultivo con puente de papel sobre 30 ml de medio de cultivo líquido AFC suplementado con 10 g/l

sacarosa, sin nitrógeno orgánico, y sin PGRs. (b) a recipientes “De Wit” (W1607, Duchefa Biochimie B.V., 2003) con perlita estéril (\varnothing 2 mm) y 18 ml del mismo medio de cultivo líquido. Los cultivos se mantuvieron durante tres meses, en las mismas condiciones que las utilizadas durante la germinación pero con mayor intensidad de luz ($120\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Las plántulas que mostraron desarrollo de la plúmula (aprox. 15 mm) se transplantaron a alvéolos forestales con sustrato para su aclimatación.



Figura 62: Plántulas creciendo en tubos con puente de papel y en recipientes “De Wit”, en medio AFC líquido.

6.1.2. Periodos de almacenamiento en frío y aplicación de PGRs.

Los embriones somáticos cotiledonares de los genotipos 1F11 y 2F47 con morfología normal, obtenidos en los ensayos de maduración del apartado 5.1.3. (Efecto de diferentes niveles de ABA), se cultivaron en las mismas condiciones de germinación anteriormente

descritas. Como tratamiento pregerminativo, los cultivos pertenecientes al genotipo 1F11 se almacenaron en frío durante 4 u 8 semanas, realizándose un cultivo control sin frío. Los cultivos pertenecientes al genotipo 2F47 solo se almacenaron 4 semanas por los pocos embriones disponibles. Transcurrido el almacenamiento en frío, las placas almacenadas y control se trasladaron a la cámara de cultivo en las condiciones descritas anteriormente (6.1.1), realizándose un subcultivo a las cuatro semanas. El número de embriones con emisión de raíz se midió semanalmente durante 8 semanas. Los datos de germinación se obtuvieron a partir de 5 repeticiones de 10 embriones por repetición en el genotipo 1F11 y periodo de almacenamiento en frío.

Para estimular el desarrollo de los embriones germinados, con radícula mayor o igual a 5 mm, se transfirieron a recipientes ECO2 (E1654, Duchefa Biochimie B.V., 2003) con 350 ml de medio de cultivo basado en la formulación del medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Se ensayaron dos condiciones de cultivo en función de la ausencia o presencia de PGRs (0,25 μ M IBA + 0,11 μ M BAP). Los embriones se mantuvieron en las mismas condiciones de cultivo anteriores, aumentando la intensidad luminosa (120-180 μ mol m⁻² seg⁻¹), durante tres meses. Las plántulas que mostraron desarrollo de la plúmula se transplantaron a alveolos forestales con sustrato para su aclimatación en condiciones de alta humedad.

6.1.3. Germinación de los embriones con los cotiledones insertados en el medio de cultivo. Efecto de la formulación del medio de cultivo.

Los embriones somáticos cotiledonares del genotipo 1F11, obtenidos en los ensayos de maduración del apartado 5.1.4 (Efecto de la desecación parcial), se cultivaron en las condiciones pregerminativas descritas en el apartado 6.1.1. Después de cuatro semanas de almacenamiento en frío, los embriones se transfirieron a recipientes “De Wit”, dispuestos del siguiente modo: en su tapa se depositaron 1,5 ml de medio de cultivo sólido, y en su base un soporte de perlita estéril (\varnothing 2 mm). Se colocó un embrión por recipiente, insertando sus cotiledones en el agar, quedando el hipocótilo suspendido (Fig. 63), siendo las condiciones de cultivo de 23 \pm 1 °C y luz tenue (17-20 μ mol m⁻² seg⁻¹).



Figura 63: Embrión somático (aprox. 5 mm) en medio de germinación con los cotiledones insertados en el medio de cultivo.

Se ensayaron tres medios de cultivo, basados en las formulaciones de los medios AFC, mL_V y Harvengt (Harvengt, 2005), suplementados con 30 g/l de sacarosa, 6 g/l de Plantagar, y sin reguladores del crecimiento. La perlita se humedeció con 18 ml del medio de cultivo líquido correspondiente diluido cuatro veces, sin sacarosa, sin nitrógeno orgánico, y sin PGRs.

Durante 8 semanas se realizaron observaciones semanales de la evolución del desarrollo de los embriones, midiéndose las frecuencias de germinación al final de este periodo. El material no fue subcultivado durante la duración del ensayo. Se dispusieron entre 57-60 embriones por tratamiento, con 8-10 embriones por repetición y 6 repeticiones por tratamiento. Las plántulas que mostraron desarrollo del epicótilo se transplantaron a alveolos forestales con sustrato para su aclimatación bajo condiciones de alta humedad.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Desarrollo de los embriones germinados en medio líquido.

Dado el pequeño número de embriones disponible por genotipo no se consideró su efecto, por lo que el ensayo de germinación se realizó con la mezcla de los embriones obtenidos en las tres líneas. De los 33 embriones cotiledonares puestos en cultivo, 23 de ellos germinaron (Tabla 23). Debido al escaso número de embriones no se pudo relacionar

la germinación con las condiciones de maduración previas de los embriones. Solamente podríamos reseñar que los embriones tratados de forma continua con 121 μM de ABA germinaron en mayor proporción que los tratados con 80 μM ABA. No es concluyente el resultado de germinación obtenido con el pulso de ABA al tratarse solo de 6 embriones.

Tabla 23: Porcentajes de germinación en medio AFC de los embriones somáticos obtenidos en el ensayo de maduración 5.1.2.

P-A	ABA - continuo			ABA - pulso		
	80 μM	121 μM	Total	121 μM	200 μM	Total
Tejido en contacto directo con el CA	58,3% (7/12)	77,7% (7/9)	66,6% (14/21)	66,6% (2/3)	100% (3/3)	83,3% (5/6)
CA en el medio	66,6% (2/3)	66,6% (2/3)	66,6% (4/6)	ne	ne	ne
Total	60% (9/15)	75% (9/12)	66,6% (18/27)			

ne: no ensayado

Los embriones que emitieron radícula, se distribuyeron entre las dos condiciones descritas para estimular su desarrollo, obteniéndose crecimiento del epicótilo y desarrollo de la radícula en siete de los cultivados en recipientes “De Wit”. Estas plántulas se transfirieron a sustrato bajo condiciones de alta humedad, manteniéndose el crecimiento activo en las siete. Después de un mes en condiciones de invernadero sobrevivieron cuatro de ellas (Fig.64).

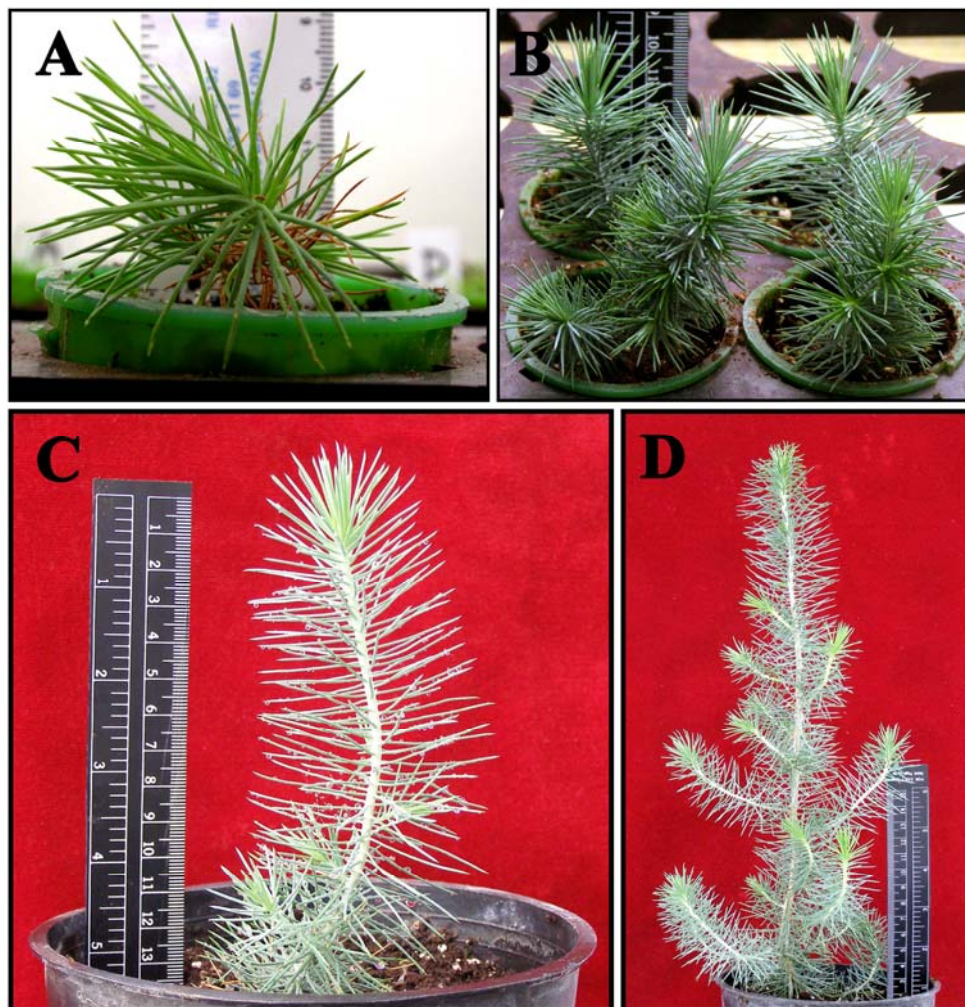


Figura 64: A-B: Plántulas de 1,5 y 2 meses en fase de aclimatación. C-D: Plántulas de 9 y 15 meses en condiciones de invernadero.

No se apreciaron diferencias morfológicas entre las diferentes condiciones ensayadas para la promoción del crecimiento. En general, la longitud de los cotiledones de los embriones somáticos germinados era menor que la de los embriones cigóticos. La raíz era blanca y algo gruesa durante las dos primeras semanas, a partir de ese tiempo comenzaba a oscurecer y a reducir su grosor. El hipocótilo creció durante las dos primeras semanas.

6.2.2. Periodos de almacenamiento en frío y aplicación de PGRs.

Después de una semana en cultivo, el 69% de los embriones de la línea embriogénica 1F11, almacenados en frío 4 semanas, comenzaron a emitir la raíz frente al 35% en los no

almacenados, pero las diferencias entre las tres condiciones no fueron significativas ($p=0,058$). Sin embargo, el almacenamiento en frío estimuló la germinación significativamente ($p=0,022$) obteniéndose una frecuencia media del 62% (Fig. 65). A las tres semanas en cultivo, las diferencias iniciales desaparecieron aunque el almacenamiento en frío proporcionó una frecuencia de germinación del 79% frente al 67% en las no tratadas ($p=0,130$). Con seis semanas de cultivo en el medio de germinación las frecuencias en las tres condiciones se estabilizaron, germinando un 81% las almacenadas frente a un 71% las no almacenadas, no siendo significativamente diferentes ($p=0,093$). Estos datos nos indican que el almacenamiento en frío estimuló ligeramente el inicio de la germinación, manteniendo unas frecuencias de germinación similares después de seis semanas en cultivo (Fig. 65).

Se observa la influencia del genotipo en la respuesta de germinación, en los embriones almacenados durante 4 semanas ($p=0,030$). La línea 1F11 mostró una frecuencia de germinación del 79% y la línea 2F47 del 61%, a las seis semanas en cultivo.

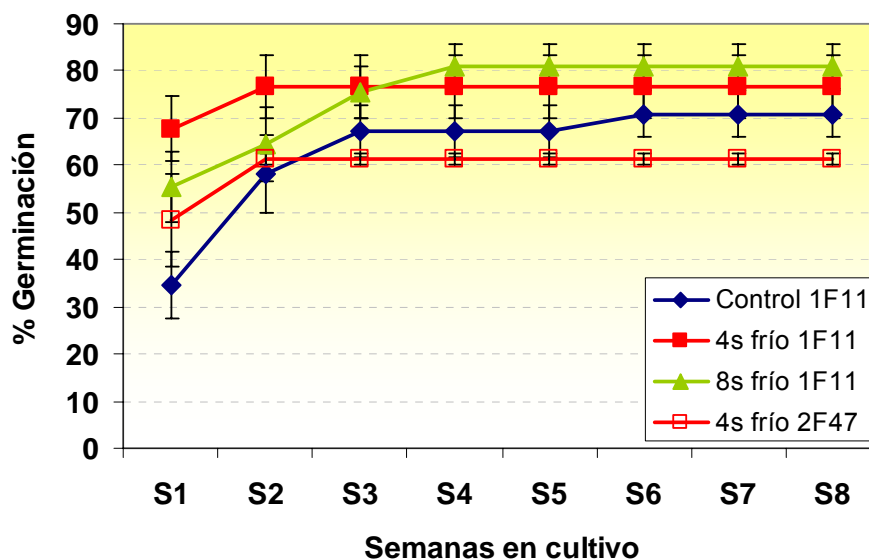


Figura 65: Porcentaje de germinación en medio AFC de embriones procedentes de las líneas 1F11 y 2F47. Los datos muestran el valor medio \pm es de 3-5 repeticiones de 10-12 embriones por condición (4 u 8 semanas de almacenamiento en frío) durante varias semanas en cultivo.

Dado el pequeño número de embriones cotiledonares desarrollados en cada uno de los tratamientos de maduración con ABA, no se pudo relacionar el efecto de las concentraciones de ABA durante la maduración del embrión con su capacidad germinativa. Por ello, no se consideró este efecto en las frecuencias de germinación de los embriones. Sin embargo, en la Tabla 24 se describen los datos de germinación por condición de maduración.

Tabla 24: Porcentajes de germinación en medio AFC de los embriones somáticos obtenidos en el ensayo de maduración 5.1.3, a las 8 semanas en cultivo, en función de los tratamientos previos a las condiciones de germinación.

Genotipo	Almacenamiento en frío	Concentración de ABA en medios de maduración (μM)				
		80	121	161	181	TOTAL
1F11	0	60% (9 de 15)	86,6% (13 de 15)	60% (6 de 10)	73,3% (11 de 15)	70,9% (39 de 55)
	30d	60% (3 de 5)	91,6% (11 de 12)	70% (7 de 10)	80% (12 de 15)	78,5% (33 de 42)
	60d	90% (9 de 10)	90% (18 de 20)	85,7% (6 de 7)	73,3% (11 de 15)	84,6% (44 de 52)
TOTAL		70 % (21 de 30)	89,4% (42 de 47)	70,4% (19 de 27)	75,5% (34 de 45)	77,8% (116 de 149)
2F47	30d	0% (0 de 3)	ne	72,2% (13 de 18)	60% (6 de 10)	61,3% (19 de 31)

ne= no ensayado

Los embriones germinados (Fig. 66) procedentes de las tres condiciones anteriores, con radícula igual o mayor a 5 mm, se distribuyeron equitativamente entre las dos condiciones descritas para estimular su desarrollo (Fig. 67). Para medir la respuesta se agruparon los embriones procedentes de los dos periodos de frío de la línea embriogénica 1F11, para su comparación con los procedentes del control. Los datos obtenidos en esta línea embriogénica nos muestran que la aplicación de PGRs incrementa el crecimiento del epicótilo, aunque no se puede apreciar su significación debido al bajo número de embriones. Este resultado no coincidió con el obtenido en la línea embriogénica 2F47 (Tabla 25). También se pudo observar, curiosamente, que los embriones de la línea 1F11

no almacenados se desarrollaron en mayor proporción que los almacenados. Las plántulas procedentes de la línea 2F47 se desarrollaron mejor que las procedentes de la línea 1F11, aunque no se analizó estadísticamente (Tabla 25).



Figura 66: Embriones de pino piñonero germinados en medio AFC.

Tabla 25: Porcentaje de embriones germinados que desarrollan raíz y epicótilo en medio SH con y sin PGRs, después de tres meses en cultivo.

Genotipo	Pretratamiento	Tratamientos desarrollo plántulas		TOTAL
		SH	SH+IBA+BAP	
1F11	0	50% (8 de 16)	62,5% (10 de 16)	56,2% (18 de 32)
	FRIO	12,5% (4 de 32)	18,9% (7 de 37)	15,9% (11 de 69)
2F47	FRÍO	100% (6 de 6)	61,5% (8 de 13)	73,4% (14 de 19)

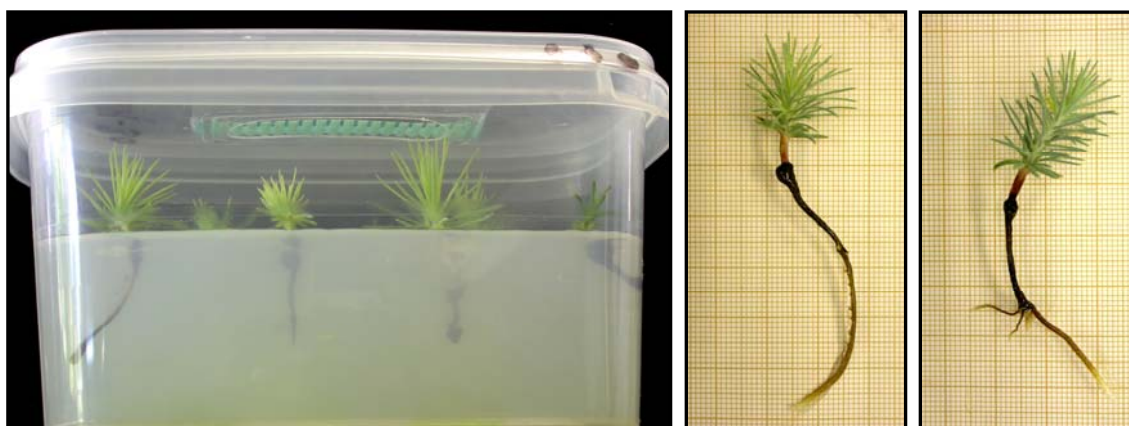


Figura 67: Plántulas de piñonero desarrollándose en recipientes ECO2 con medio SH y plántulas en desarrollo con raíz emitiendo ramificación secundaria.

Las plántulas con plúmula y raíz desarrolladas (29 de la 1F11 y 14 de la 2F47) se transfirieron a sustrato bajo condiciones de alta humedad, manteniéndose el crecimiento activo en 15 de ellas (35%) (Tabla 26). Los datos obtenidos nos muestran que la aplicación de PGRs disminuyó ligeramente la frecuencia de aclimatación, aunque no se analizó estadísticamente.

Tabla 26: Porcentaje de plántulas aclimatadas en condiciones de alta humedad.

Genotipo	SH	SH+IBA+BAP	TOTAL
1F11	33,3% (4 de 12)	29,4% (5 de 17)	31% (9 de 29)
2F47	50% (3 de 6)	37,5% (3 de 8)	42,8% (6 de 14)
TOTAL	38,8% (7 de 18)	32% (8 de 25)	34,8% (15 de 43)

6.2.3. Germinación de los embriones con los cotiledones insertados en el medio de cultivo. Efecto de la formulación del medio de cultivo.

Después de una semana en cultivo, el 19% de los embriones cultivados en AFC, el 16% en el medio Harvengt y el 12% de los cultivados en medio mL_V, comenzaron a emitir la raíz. A la segunda semana ya se mostraron diferencias significativas, siendo el medio mL_V el que proporcionó menor frecuencia de germinación ($p=0,002$). Estas diferencias se

mantuvieron a lo largo de las siguientes semanas. Según el medio de cultivo empleado, el máximo de germinación se obtuvo a las 4 semanas en el medio AFC, a las 5 en medio mLV y las 6 semanas en el medio Harvengt. Después de ocho semanas, algunos de los embriones que germinaron en los medios mLV y AFC se necrosaron (Figura 68). Los embriones cultivados en el medio Harvengt desarrollaron el epicótilo mejor que en las otras formulaciones.

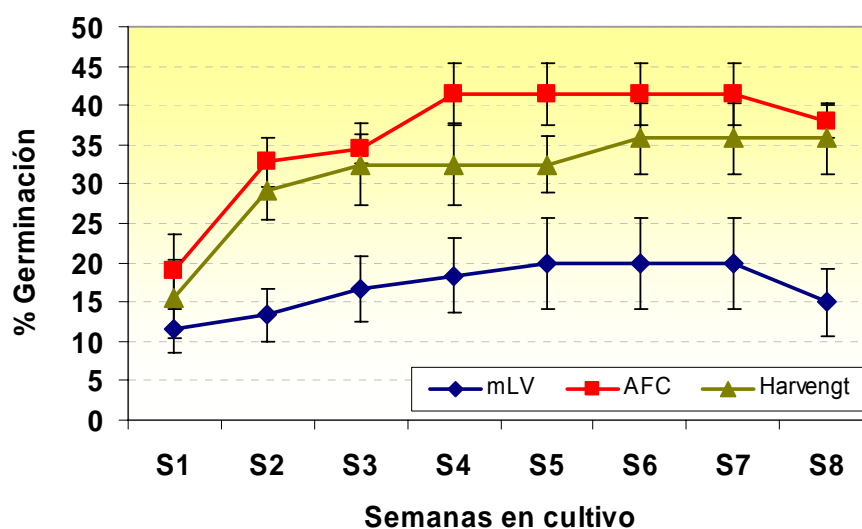


Figura 68: Porcentaje de embriones germinados en diferentes medios de germinación en cada una de las fechas de observación. Los datos muestran el valor medio \pm es de 6 repeticiones de 8-10 embriones por condición.

La inserción de los cotiledones en el medio de cultivo estimuló el crecimiento del epicótilo, pero no de forma muy diferente comparando con el cultivo horizontal del embrión. (Fig. 69). Las plántulas cultivadas en el medio Harvengt mostraron un mayor crecimiento que las cultivadas en los otros dos medios, alcanzando el desarrollo de la plúmula 18 de las 21 plantas germinadas (86%). Las cultivadas en medio AFC desarrollaron la plúmula 15 de 22 en (68%) y 6 de 9 en las cultivadas en mLV (67%).

Después de dos meses de crecimiento en contenedores forestales bajo condiciones de alta humedad, 2 de las 18 plántulas procedentes del medio Harvengt, y 1 de las 15 procedentes del medio AFC lograron mantener el crecimiento activo. No se consiguieron mantener las plántulas procedentes del medio mLV.

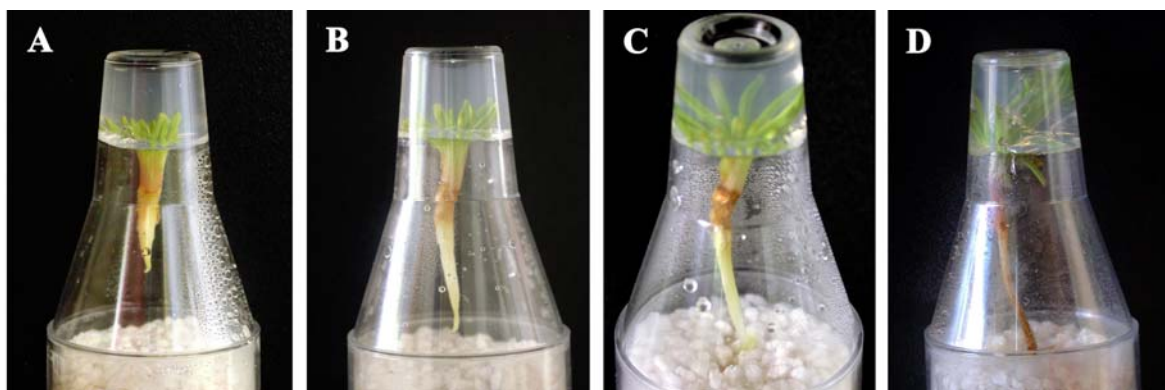


Figura 69: Germinación y desarrollo de embrión somático de pino piñonero en medio AFC. **A:** Raíz emergiendo a la semana. **B:** Elongación de la raíz a las dos semanas. **C:** Raíz penetrando en el sustrato a la cuarta semana. **D:** Desarrollo de la plúmula a las ocho semanas.

6.3. DISCUSIÓN

El objetivo final de la embriogénesis somática es la regeneración de plantas. Sin embargo, en la mayoría de las especies donde se ha desarrollado esta técnica, la tasa de maduración y conversión en planta es aún un factor limitante para la aplicación a gran escala de esta vía de regeneración (Hay y Charest, 1999).

Durante la maduración, los embriones somáticos acumulan las reservas necesarias para su desarrollo posterior (hidratos de carbono como fuentes de carbono y energía), y otros compuestos necesarios para la protección del embrión en las siguientes fases (Konrádová y col., 2003). Estas autoras indicaron que, el almacenamiento a 4°C durante tres semanas de los embriones somáticos de *Picea abies* tenía un efecto positivo en la germinación, relacionándolo con la acumulación del oligosacárido rafinosa, implicado en la adquisición de tolerancia al estrés. Por ello propusieron que el almacenamiento en frío podría ser una alternativa a los tratamientos de desecación parcial en los protocolos de embriogénesis en coníferas. Pond y col., (2002) indicaron que un tratamiento en frío de los embriones de *Picea glauca* previo al tratamiento de desecación parcial, confería tolerancia a la desecación e incrementaba la producción de embriones con mayores capacidades para la germinación.

En los embriones somáticos de pino piñonero que maduraron en presencia de ABA, el almacenamiento en frío promovió ligeramente, aunque no significativamente, su germinación. Dado que estos resultados se refieren solamente a un genotipo, se tendría que

ensayar el tratamiento en embriones de un mayor número de líneas embriogénicas para poder confirmar el efecto promotor del frío en la germinación de los embriones del pino piñonero.

Modificaciones en el medio de cultivo podrían también modificar la capacidad germinativa de los embriones somáticos. Habitualmente se emplean los mismos medios de cultivo utilizados en el mantenimiento de las líneas, sin embargo pueden requerirse otras formulaciones nutritivas para optimizar las respuestas en germinación. Los medios de germinación habituales en el género *Pinus* son el mLV (Klimaszewska y col., 2001) en *P. strobus*, los medios DCR, mLV y Harvengt el en *P. pinaster* (Harvengt, 2005; Lelu-Walter y col., 2006; Miguel y col., 2004; Ramarosandratana y col., 2001a), el LV en *P. sylvestris* (Lelu y col., 1999), el DCR en *P. nigra* (Salajová y Salaj, 2005). Bonga (2004) indicó que el medio de cultivo AFC favorecía la elongación del tallo en estructuras similares a embriones producidas en *Larix decidua*. Cultivando los embriones somáticos de pino piñonero en tres medios con formulaciones diferentes, insertando los cotiledones en el medio de cultivo, el mejor desarrollo de los embriones se obtuvo en el medio de Harvengt, aunque no muy diferente respecto del medio AFC.

En relación a esto, parece que la orientación de los embriones *in vitro* influye en la germinación y desarrollo de los embriones. Ya que durante la germinación del embrión cigótico, los cotiledones y los meristemos apical y radical de los embriones están en contacto con el tejido nutritivo del megagametofito, Brown y Grifford (1958) cultivaron por primera vez embriones cigóticos de *Pinus lambertiana* insertando los cotiledones en el medio de cultivo, describiendo que los nutrientes, especialmente la sacarosa, absorbidos directamente por los cotiledones, incrementaba la tasa de germinación de los embriones y el crecimiento de la raíz. Becwar y col., (1989) estudiaron el efecto de la orientación de embriones somáticos de *Picea abies* durante la germinación, disponiendo los embriones: (1) horizontalmente en la superficie del medio de cultivo inclinado con el hipocótilo orientado hacia abajo (2) con los cotiledones insertados en el medio, dejando el hipocótilo y la radícula libres, y los tubos de ensayo invertidos durante el periodo de cultivo (3) con la radícula y la parte basal del hipocótilo sumergida en el medio, dejando la parte superior del hipocótilo y cotiledones libre. Estos autores obtuvieron mejores frecuencias de germinación y crecimiento de la raíz cuando cultivaron los embriones en las posiciones 2 y

1 respectivamente, posiciones en las que los cotiledones estaban total o parcialmente en contacto con el medio de cultivo. Lin y Leung (2002) realizaron estudios similares en embriones cigóticos aislados de *Pinus radiata*, obteniendo mejor crecimiento de la raíz cuando los cotiledones se insertaban en el medio, pero el crecimiento de los cotiledones fue inferior al de los controles.

Por el contrario, Klimaszewska y col., (2001) y Lelu-Walter y col., (2006) describieron que la germinación de los embriones somáticos de algunas especies de *Pinus* puede optimizarse, disponiendo los embriones horizontalmente en contacto con el medio en placas Petri inclinadas 40°, y con los hipocótilos orientados hacia abajo. Esta disposición permite el contacto de la raíz con el medio facilitando la absorción de nutrientes, y evitando los posibles efectos negativos de la inmersión de la raíz en el medio de cultivo. El resultado de la inserción de los cotiledones de pino piñonero en el medio de cultivo, fue la disminución de las frecuencias de germinación respecto a la germinación en placa inclinada, estimulándose débilmente el crecimiento de los cotiledones.

Al igual que en muchas coníferas (Lelu y col., 1994b; Vágner y col., 2005), en el pino piñonero la emisión de la raíz primaria de los embriones somáticos se inicia a los pocos días en cultivo, mientras que el hipocótilo elonga más lentamente durante las primeras semanas. El desarrollo del epicótilo es más tardío y lento.

Aunque en general no hay muchas referencias sobre tratamientos específicos para el desarrollo del embrión germinado, podemos encontrar algunos protocolos de germinación/conversión donde se incluyen PGRs como el IBA, las giberelinas (GA3), y en algunos casos el BAP para estimular el crecimiento del epicótilo y del hipocótilo en el embrión germinado. En *Pinus elliottii* (Newton y col., 2005) los medios de cultivo se suplementaron con IBA (0,5 mg/l) y GA3 (0,1 mg/l), junto con 0,05% de CA. En *Pinus taeda* (Tang y Newton, 2005) las plántulas obtenidas de los medios de germinación se transfirieron a medios que contenían 2,2 μ M de BAP para estimular el desarrollo. En los embriones germinados de pino piñonero, cuando se cultivaron en un medio suplementado con IBA y BAP, no se estimuló apreciablemente la elongación del epicótilo, aunque esta respuesta no es concluyente debido principalmente al pequeño número de embriones ensayados. De igual forma, la diferente respuesta observada en los dos genotipos ensayados no puede confirmar la influencia del genotipo en la respuesta. La utilización del

medio de cultivo SH para el desarrollo de los embriones germinados se decidió en base a los resultados de germinación obtenidos en *Quercus suber* por miembros de nuestro equipo (Toribio y col., 2005). Tremblay (1990) también utilizó este mismo medio para la elongación del hipocótilo y de la raíz de embriones somáticos germinados de *Picea glauca*.

No se encuentran muchos trabajos donde se ensayen distintos sistemas de germinación y conversión en planta. Como indican Klimaszewska y col., (2007) quizá se deba a la dificultad para regenerar grandes cantidades de embriones somáticos de calidad (similares morfológicamente a los embriones cigóticos). La conversión en planta sigue siendo más difícil de conseguir que la germinación, influyendo también el genotipo en la respuesta. Los primeros trabajos publicados en germinación/conversión en aquellas especies donde se ha conseguido regenerar plantas, mostraban frecuencias bajas. Respuestas más altas se han ido consiguiendo a través de la optimización de los primeros protocolos. No se dispone de muchos de estos resultados ya que la mayoría están bajo patente. Según los autores antes mencionados, los mayores esfuerzos se han realizado en *Pinus taeda*, *Pinus radiata*, *Pinus pinaster* y *Pinus strobus*. También indican como un aspecto beneficioso para la elongación de la parte aérea, la exposición a bajas intensidades luminosas. El hipocótilo también se ve estimulado por el cultivo horizontal de los embriones en placa inclinada, de forma que las raíces no penetren en el medio. Merkle y col., (2005) también indicaron que la calidad de la luz durante la pregerminación y germinación también podría influir. La longitud de onda roja durante estos procesos resultó en el incremento de las frecuencias de germinación y conversión en embriones somáticos de *Pinus radiata*, *Pinus elliotii* y *Pinus palustris*.

Aunque los resultados obtenidos demuestran la capacidad de los embriones somáticos de piñonero para germinar y desarrollar plantas completas, debemos señalar que su validez es tan solo relativa debido a las pocas líneas embriogénicas ensayadas y al número limitado de embriones cotiledonares disponible. La optimización del proceso pasaría por estudiar nuevos factores que incrementen la tasa de obtención de embriones cotiledonares de buena calidad, similares a los cigóticos, y de unas condiciones de cultivo que favoreciesen la germinación y conversión en planta; como por ejemplo la inclusión de giberelinas, de ácido ascórbico o de carbón activo al medio de cultivo, otras condiciones de luz, etc.



7. PROTOCOLO DE REGENERACIÓN

7. PROTOCOLO DE REGENERACIÓN

INDUCCIÓN

- Cultivo de megagametofitos completos conteniendo embriones cigóticos en un estado de desarrollo entre la poliembrionía de partición y el estado cotiledonar.
- Medio de inducción M-mLV₂, basado en la formulación del medio Litvay, con los macronutrientes reducidos a la mitad y los micronutrientes modificados con CuSO₄, Na₂MoO₄ y KI reducidos a la mitad, CoCl₂ reducido a 0,01 mg/l y suplemento de 0,72 mg/l NiCl₂; Fe-EDTA y vitaminas completos, 0,5 g/l de L-glutamina, 1 g /l de hidrolizado de caseína, 10 g/l de sacarosa y 4 g/l Gerlite[®]. Se utiliza una combinación de PGRs de 9 μM 2,4-D y 4,5 μM BAP. El pH de todos los medios se ajusta a 5,8 antes del autoclavado.
- El material permanece en el medio de inducción sin ser repicado a medio fresco durante 4-12 semanas, a 23°C en oscuridad.

MANTENIMIENTO / PROLIFERACIÓN

- Transferencia de las masas embriónicas aisladas del megagametofito para mantener su proliferación a un medio M-mLV, basado en la formulación del medio Litvay con los macronutrientes reducidos a la mitad y los micronutrientes, Fe-EDTA y vitaminas completos; suplementado con 0,5 g/l de L-glutamina, 1 g l⁻¹ de hidrolizado de caseína, 20 g/l de sacarosa y 4 g/l Gerlite[®]. Se utiliza una combinación de PGRs de 9,5 μM 2,4-D y 4,5μM BAP.
- Subcultivo bisemanal de porciones externas de las masas embriónicas. Según las capacidades proliferativas de las líneas embriónicas se subcultivan en forma de masa (más activas) o en forma de disgregado (menos activas). El material permanece en oscuridad a 23°C.

MADURACIÓN

- Seleccionar masas embriónicas con crecimiento vigoroso y de morfotipo *picudo*, obtenidas de subcultivos recientes.
- Precultivo del tejido embriónico en medio UL-1/2mLV, basado en la formulación del medio Litvay con los nutrientes reducidos a la mitad y bajas concentraciones de

auxina y citoquinina (0,24 μM 2,4-D y 0,22 μM BAP). El cultivo permanece durante 4 semanas a 23°C en oscuridad, con un subcultivo bisemanal.

- Disgregación de las masas embriogénicas en medio líquido $\frac{1}{2}$ mLV + 10 g/l de CA. Filtración con disco de papel y vacío.
- Dsecación parcial del material embriogénico disgregado en el disco de papel (entre el 7 y 17% de pérdida de humedad).
- Cultivo de las masas disgregadas en el medio mLV suplementado con 60 g/l de sacarosa, 121 μM ABA y 10 g/l de Gerlite[®]. El cultivo permanece entre 12-16 semanas a 23°C en oscuridad, con subcultivos cada cuatro semanas.
- Cultivo de los embriones, al comienzo de su diferenciación, de forma aislada en el mismo medio de maduración hasta alcanzar el estado cotiledonar.

GERMINACION

- Los embriones cotiledonares bien conformados se transfieren a un medio de cultivo basado en la formulación del medio AFC (medio LV modificado, donde NO_3NH_4 se reduce 10 veces, el MgSO_4 un tercio, el calcio se aporta como fosfato incrementándose así los niveles al doble), sin PGRs y suplementado con 30 g/l sacarosa y 6 g/l Plantagar. Las placas Petri se almacenan a 4°C durante cuatro semanas.
- Los cultivos se transfieren a las condiciones de germinación. Los embriones se cultivan en la misma placa, dispuesta con una inclinación de 40° quedando los embriones dispuestos con los hipocótilos orientados hacia abajo, a 23°C y con un fotoperiodo de 16 h de luz tenue (17-20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), durante 8 semanas con un subcultivo a las cuatro semanas.
- Los embriones germinados que alcanzan una radícula igual o mayor a 5 mm, se transfieren para continuar su desarrollo a recipientes ECO2, con medio de cultivo SH ó AFC sin PGRs, suplementado con 30 g/l sacarosa y 6 g/l Plantagar. Se cultivan bajo intensidad luminosa más alta (120-180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$), durante tres meses.

CONVERSIÓN

- Las plántulas con plúmula y raíz desarrolladas se transfieren *ex vitro* a alvéolos forestales (240 ml), con una mezcla de turba y perlita (3:1 v/v) humedecida con abono soluble Peters (2 g/l). Se añaden 3 g/l de fertilizante de liberación lenta Osmocote®, y se trata con el agente fungicida Previcur (2ml/l). Se mantienen en cámara de cultivo de alta humedad a $24\pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h de luz ($120\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 8 semanas para su aclimatación.
- Las plantas con crecimiento activo se transfieren a contenedores forestales de mayor volumen (1000 ml) con el mismo sustrato, y se trasladan a condiciones de invernadero con riego por nebulización hasta su completa aclimatación.

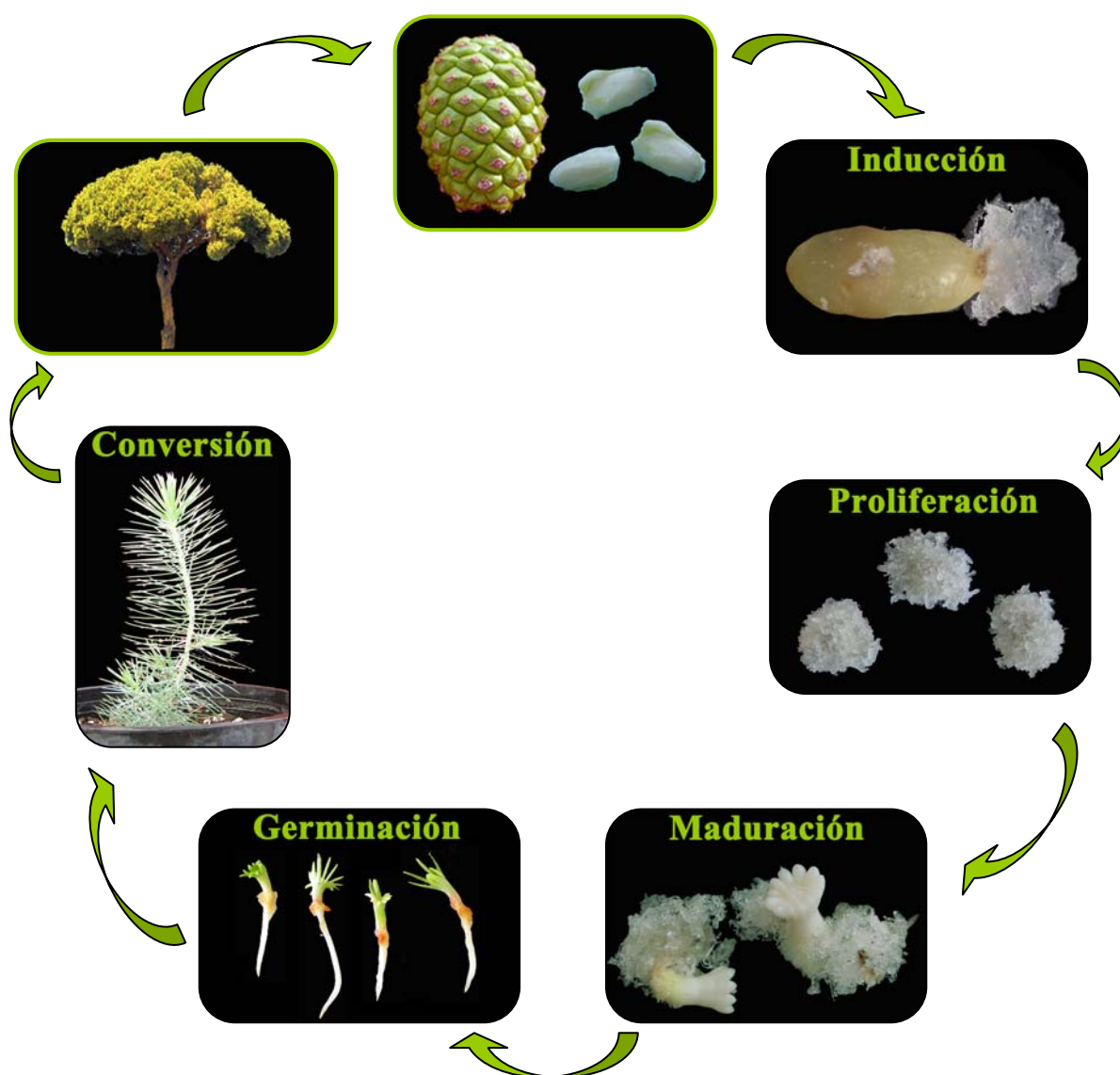


Figura 70: Regeneración de *Pinus pinea* L. por embriogénesis somática.



8. CRIOCONSERVACIÓN

8. CRIOCONSERVACIÓN

Se ha abordado por primera vez la crioconservación de líneas embriogénicas en esta especie. Se ha determinado la posibilidad de conservar masas proliferativas (MES) de pino piñonero a temperaturas de nitrógeno líquido (NL). Para ello, se ha evaluado en primer lugar el posible efecto nocivo de los agentes crioprotectores sorbitol y dimetil-sulfoxido (DMSO) sobre el crecimiento de los cultivos embriogénicos. En segundo lugar, se ha evaluado la recuperación del crecimiento de distintas líneas embriogénicas después de la descongelación. También se ha estudiado la capacidad de las líneas recuperadas tras la crioconservación para producir embriones cotiledonares cuando se someten a condiciones de maduración, y su conversión en plantas.

8.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron seis líneas embriogénicas pertenecientes a cuatro familias, inducidas en embriones cigóticos inmaduros en los años 2005 (7F11) y 2006 (2F47, 5F47, 3F58, 9F58, 6F88). Estas líneas se mantuvieron en crecimiento activo en el medio mLV con 9,5 μ M de 2,4-D, 4,5 μ M de BAP, 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0,5 g/l de L-glutamina, 0,1 g/l de mioinositol, 20 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite[®]. El protocolo de crioconservación utilizado se basó en el descrito por Park y col., (1994). La evaluación del crecimiento de los cultivos embriogénicos se realizó en las condiciones de mantenimiento ya descritas.

8.1.1. Pretratamiento. Efecto de los agentes crioprotectores sorbitol y DMSO.

Se preparó una solución estéril con el medio de mantenimiento líquido (M-mLV) y sorbitol a una concentración de 0,4 M en viales de 25 ml (Duran[®] Group). Una muestra de 1g de tejido embriogénico se suspendió en 3,5 ml de esta solución de sorbitol. Las suspensiones se mantuvieron durante 16 horas en agitación orbital a 115 rpm, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

Se prepararon soluciones crioconservantes con 0,4 M de sorbitol y tres concentraciones de DMSO: 4,5%, 7,5% y 15%, esterilizado por filtración (Fig. 71). Las soluciones estériles de sorbitol/DMSO se prepararon en el momento de su utilización,

manteniéndolas en hielo. En la Tabla 27 se detallan los volúmenes utilizados de las soluciones de los crioprotectores para conseguir la concentración final de DMSO por criovial.

Tabla 27: Preparación de las soluciones sorbitol/DMSO en función de la concentración final de DMSO utilizada por criovial, en cada uno de los tratamientos.

Solución sorbitol/DMSO	Solución 0.4 M sorbitol	DMSO	DMSO en solución sorbitol/DMSO	DMSO final
DMSO 4,5	25,5 ml	4,5 ml	15 %	4,5 %
DMSO 7,5	22,5 ml	7,5 ml	25 %	7,5 %
DMSO 15	15 ml	15 ml	50 %	15 %

Transcurridas las 16 horas en esta primera fase de precultivo, las suspensiones celulares se colocaron en hielo y sobre ellas se fueron añadiendo 250 μ l de la solución sorbitol/DMSO correspondiente a cada concentración. Esta operación se repitió cada cinco minutos hasta 6 veces, agitándose las suspensiones después de cada adición. El volumen final de las suspensiones fue de 5 ml (1g de tejido + 3,5 ml de 0,4 M sorbitol + 1,5 ml de solución sorbitol/DMSO). La mezcla se dejó equilibrar durante 30 minutos en hielo, agitándose frecuentemente. Se tomaron alícuotas de 1 ml (200 g de MES) que se dispusieron en cada uno de los crioviales a utilizar por tratamiento.

En el análisis del efecto de las soluciones sorbitol/DMSO en el crecimiento de los cultivos embriogénicos, se utilizaron muestras pretratadas y no congeladas. Se utilizó como control el mismo material embriogénico sin pretratamientos con los crioprotectores.

En la cabina de flujo laminar, se desinfectó la superficie de los crioviales con etanol al 70% (v/v), dejándose secar antes de abrirlos. El contenido del criovial se filtró a través de un disco de papel sobre un embudo Büchner estéril aplicando vacío, con el fin de retirar la solución crioprotectora (Fig. 72). Luego se transfirió el disco de papel con el tejido embriogénico (aprox. 100 mg de MES) a placa Petri con medio de mantenimiento (M-mLV). Las placas se precintaron con Parafilm[®] y se incubaron en oscuridad a 23 \pm 1 °C durante 24 horas. Posteriormente, para eliminar por difusión el resto de crioprotectores que

quedara en el tejido, los discos se transfirieron a medio de cultivo fresco. En adelante, los cultivos se transferirían bisemanalmente a medio de mantenimiento fresco, en las condiciones de cultivo mencionadas. Se realizaron cinco repeticiones por línea embriogénica y por tratamiento.

La variable incremento relativo en peso fresco de las MES se midió a través del peso del disco de papel con el material embriogénico restando el peso de la placa Petri. Se tomaron los datos al inicio de la puesta en cultivo, y después de transcurrir 2, 4, 6 y 8 semanas. Los resultados se analizaron mediante el ANOVA, utilizando el programa Statistica para Windows[®] 5.1 (StatSoft, Inc. 1996). Los datos se transformaron logarítmicamente. Los valores de las medias se muestran junto a los errores estándar. Las diferencias significativas entre medias se determinaron con el test de Duncan con un nivel de significación del 5%. El crecimiento de los cultivos pretratados (T) se muestra en relación al crecimiento de los cultivos control (C), representando estos el 100% del crecimiento ($T \times 100 / C$). También se calculó la tasa de crecimiento de los cultivos después de 2, 4, 6 y 8 semanas como el cociente entre el peso fresco alcanzado en cada subcultivo (restando el peso de la placa y del papel de filtro) y el peso inicial.

8.1.2. Congelación en nitrógeno líquido.

Se realizó un pretratamiento del material tal y como se indica en el apartado 8.1.1. De los 5 ml de la suspensión celular en solución sorbitol/DMSO, se tomaron alícuotas de 1 ml (200 mg de MES) que se dispusieron en cada uno de los cinco crioviales a utilizar por tratamiento (Fig. 71). Los crioviales se introdujeron en contenedores “Mr. Frosty” (Nalgene[®] Cryo 1°C Freezing Containers) (Schrijnemakers y van Iren, 1995), a los que previamente se les añadió 250 ml de isopropanol (Ford y col., 2000), y se mantuvieron durante 2 horas a 4 ± 1 °C. A continuación se realizó el enfriamiento paulatino de las muestras, colocándolas a -20 ± 1 °C durante 40 minutos, y luego a -70 ± 1 °C durante 2 horas. Por último, los crioviales se colocaron en cañas de crioconservación para su introducción en tanques de nitrógeno líquido (NL), donde permanecieron 24 horas. Se realizaron cinco repeticiones por línea embriogénica y por tratamiento.

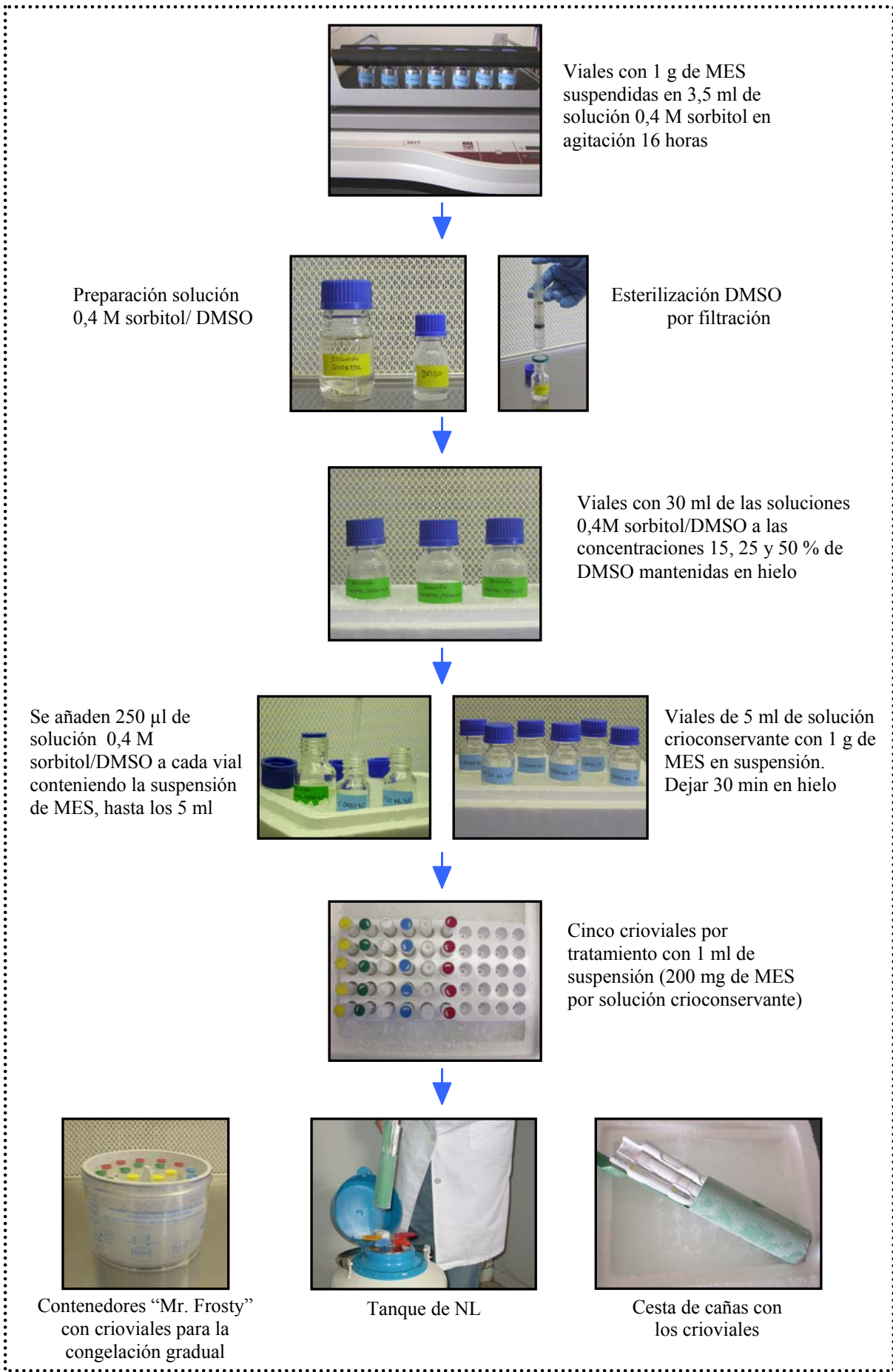


Figura 71: Protocolo de crioconservación.

8.1.3. Descongelación. Recuperación del crecimiento.

Los crioviales se extrajeron del tanque de NL y se introdujeron en un baño con lejía comercial diluida al 10% (v/v) (3.5% cloro activo) y unas gotas de Tween 20, a una temperatura de 40° C durante 3 minutos, hasta que el contenido se descongelara un 70 %.

En la cabina de flujo laminar, se procedió como ya se ha descrito para el tejido no congelado. El contenido del criovial se filtró para retirar la solución crioprotectora, transfiriéndose el disco de papel con el tejido embriogénico (aprox. 100 mg) a placa Petri con medio de mantenimiento (M-mLV). Las placas precintadas se incubaron en oscuridad a 23 ± 1 ° C durante 24 horas. Posteriormente, los discos se transfirieron a medio de cultivo fresco, subcultivándolos bisemanalmente en las condiciones de cultivo mencionadas.

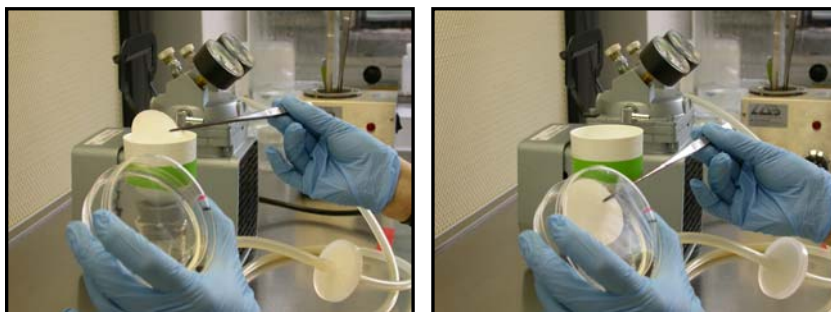


Figura 72: Filtración de la suspensión crioconservada y puesta en cultivo.

Para analizar el efecto de la crioconservación en la recuperación del crecimiento de las líneas embriogénicas, se utilizó como control el mismo material embriogénico sin pretratamientos con los crioprotectores, ni congelación. Se realizaron cinco repeticiones por línea embriogénica y por tratamiento.

La variable incremento relativo en peso fresco de las MES se midió a través del peso del disco de papel con el material embriogénico restando el peso de la placa Petri. Se tomaron los datos al inicio de la puesta en cultivo, y después de transcurrir 2, 4, 6 y 8 semanas. Los resultados se analizaron mediante el ANOVA, utilizando el programa Statistica para Windows[®] 5.1 (StatSoft, Inc. 1996). Los datos se transformaron

logarítmicamente. Los valores de las medias se muestran junto a los errores estándar. Las diferencias significativas entre medias se determinaron con el test de Duncan con un nivel de significación del 5%. El crecimiento de los cultivos crioconservados (Cr) se muestra en relación al crecimiento de los cultivos control (C), representando estos el 100% del crecimiento ($Cr \times 100/C$). También se calculó la tasa de crecimiento de los cultivos después de 2, 4, 6 y 8 semanas como el cociente entre el peso fresco alcanzado en cada subcultivo (restando el peso de la placa y del papel de filtro) y el peso inicial.

8.1.4. Maduración y conversión.

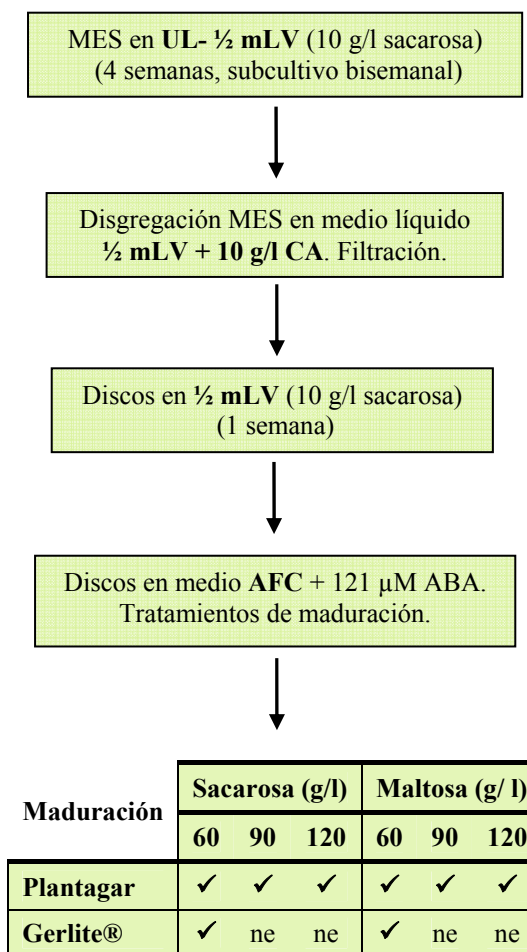
Se utilizaron tres líneas embriogénicas recuperadas tras la crioconservación, la 7F11 (de 7,5% DMSO), la 3F58 y la 9F58 (de 15% DMSO). Los cultivos permanecieron entre 9 y 14 meses en medio de mantenimiento M-mLV, antes de someterlos a las diferentes condiciones de maduración. Como control se utilizaron las líneas originales sin pretratar ni congelar.

Antes de someter los cultivos a las condiciones de maduración, el material embriogénico se preconditionó, siguiendo el esquema adjunto. El material se cultivó en medio UL- ½ mLV, donde los componentes nutritivos se redujeron a la mitad y los reguladores 2,4-D a 0,24 μ M y BAP a 0,22 μ M, 10 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite[®]; durante cuatro semanas con un repicado a las dos semanas.

Se prepararon suspensiones con 10 g/l de peso fresco de MES en ½ mLV líquido (sin PGRs ni glutamina) y 10 g/l de CA. Se dispensaron alícuotas de 5 ml (50 mg de MES) sobre discos de papel de filtro, de la forma ya descrita. Los discos con el material embriogénico se cultivaron en medio ½ mLV suplementado con 20 μ M de ABA o sin el, con 10 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gerlite[®], durante una semana.

Transcurrido este precultivo, los discos se transfirieron a las condiciones de maduración. Se utilizó la formulación en nutrientes del medio AFC, suplementado con 121 μ M de ABA y 20 g/l de Plantagar. Se ensayaron dos tipos de azúcares (maltosa vs sacarosa) a concentraciones de 60, 90 y 120 g/l. Se ensayaron dos tipos de agentes gelificantes (20 g/l de Plantagar vs 10 g/l Gerlite[®]) en el medio suplementado con 60 g/l de

sacarosa o 60 g/l de maltosa. El pH se ajustó a 5,8 antes del autoclavado. Las soluciones de glutamina y ABA se esterilizaron por filtración y se añadieron al medio templado. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a $23\pm 1^\circ\text{C}$, transfiriéndose cuatro veces a medio fresco cada 4 semanas. Se emplearon cinco repeticiones (50 mg) por tratamiento y línea ensayada, siendo cada placa Petri (90 mm de diámetro) una unidad experimental.



(ne: no ensayado)

La capacidad de maduración de las líneas embriogénicas en cada uno de los tratamientos, se midió como el número de embriones cotiledonares normales formados en 250 mg de tejido embriogénico al final del tratamiento. Transcurridas 16 semanas en los medios de maduración, se seleccionaron los embriones cotiledonares bien conformados y se colocaron horizontalmente sobre el medio de germinación (AFC, sin PGRs, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar) con los cotiledones dispuestos todos en la misma dirección. Las placas Petri (90 mm x 16 mm) se llenaron con 25 ml de medio de cultivo.

Como tratamiento pregerminativo, los embriones se almacenaron durante 4 semanas a 4°C y oscuridad. Luego, se transfirieron a la cámara de cultivo a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con 16-h de fotoperiodo ($17\text{--}20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 8 semanas. Las placas Petri se inclinaron un ángulo de 40° de manera que los embriones tuvieran los cotiledones en la zona con mayor inclinación y el polo radical dirigido hacia abajo. Se realizaron recuentos semanales del número de embriones germinados, durante un total de 8 semanas.

Para promover el desarrollo del epicótilo, los embriones germinados que emitieron una radícula de unos 15 mm, se transfirieron a recipientes ECO2 (Duchefa) con 350 ml de medio SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) suplementado con $0,25 \mu\text{M}$ de IBA y $0,11 \mu\text{M}$ de BAP, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar, introduciendo la raíz en el medio de cultivo. Se cultivaron a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y 16 h de fotoperiodo ($120\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$) entre 2 y 3 meses, hasta que la plúmula alcanzó una longitud de 1 cm.

Las plántulas con plúmula y raíz desarrolladas, se transfirieron *ex vitro* a alvéolos forestales de plástico (240 ml) con sustrato compuesto por turba y perlita (3:1 v/v) y 3 g/l de fertilizante de liberación lenta Osmocote[®], humedecido con abono soluble Peters (2 g/l) y tratado con el agente fungicida Previcur (2ml/l). Se mantuvieron en cámara de cultivo de alta humedad a $24 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 h de luz ($120\text{--}180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Durante la primera semana se cubrieron con envases de plástico invertidos y agujereados en la base para reducir la evapo-transpiración, retirándolos 4 horas cada día, para una aclimatación paulatina. Luego, los envases se retiraron definitivamente. Transcurridos dos meses, las plantas se transfirieron a condiciones de invernadero con nebulización hasta su completa aclimatación.

8.2. RESULTADOS

8.2.1. Pretratamiento. Efecto de los agentes crioprotectores.

A las dos semanas en cultivo, el crecimiento relativo medio de los cultivos pretratados fue muy bajo (Tabla 28), suponiendo una media del 30% del crecimiento alcanzado por los cultivos sin tratar (Tabla 29) lo que indica un cierto grado de toxicidad

ejercido por los crioprotectores. La mayor toxicidad se mostró en la dosis más alta de DMSO al obtenerse el menor crecimiento relativo medio (0,6) (Tabla 28). La baja tasa de crecimiento de los cultivos en este primer periodo se suele denominar fase de latencia, y supuso una tasa de crecimiento medio del 3,4% respecto del inicio del cultivo (Tabla 30). La línea 9F58 fue la que mostró mayor capacidad de crecimiento, principalmente cuando se aplicó la menor concentración de DMSO (Fig. 73) (Anexo 4).

A las cuatro semanas en cultivo, se mantuvo el menor crecimiento de los cultivos pretratados que los controles (Tabla 28), suponiendo una media del 40,5% del crecimiento alcanzado por los cultivos sin tratar (Tabla 29). Las diferencias entre los crecimientos relativos medios de los cultivos pretratados con los tres niveles de DMSO no fueron significativas, debido principalmente a la mayor tasa de recuperación de los cultivos tratados con 15% DMSO (Tabla 28). La línea 9F58 siguió mostrando la mayor capacidad de recuperación del crecimiento (Fig. 73) (Anexo 4), no encontrándose diferencias significativas entre el tratamiento con 4,5% DMSO y el control.

A las seis semanas en cultivo, los cultivos pretratados siguieron creciendo menos que los controles. Entre los tres pretratamientos, el mayor crecimiento se obtuvo cuando se aplicó 7,5% DMSO (Tabla 28), suponiendo un 71,2% del control (Tabla 29). Los cultivos pretratados con esta concentración de DMSO mostraron la tasa de crecimiento más alta (26,9) respecto del inicio del cultivo (Tabla 30). Las líneas 2F47 y 9F58 pretratadas alcanzaron crecimientos similares a los controles (Fig. 73) (Anexo 4).

Después de 8 semanas en cultivo, los cultivos pretratados siguieron mostrando menor crecimiento relativo que los cultivos control (Tabla 28). Los cultivos pretratados con 7,5 y 4,5% DMSO mantuvieron el mayor crecimiento relativo medio no diferenciándose significativamente entre ellos (Tabla 28), lo que suponía un 86,5% y un 83,2% respectivamente del crecimiento del control (Tabla 29). Los cultivos tratados con 7,5% DMSO mostraron la tasa de crecimiento más alta (40,3) respecto del inicio del cultivo (Tabla 30). Con esta concentración de DMSO, el crecimiento de las líneas pretratadas fue similar a los cultivos control, excepto la línea 6F88 que mostró una acusada disminución del crecimiento en las tres concentraciones (Fig. 73) (Anexo 4). La línea 9F58 pretratada

con las tres concentraciones de DMSO, mostró crecimientos superiores aunque no significativamente diferentes del control.

Mientras que los cultivos no tratados incrementaron 48,5 veces el peso inicial a las 8 semanas en cultivo, los cultivos pretratados lo incrementaron entre 32,3 y 40,3 veces, siendo esta última tasa la correspondiente al pretratamiento con 7,5% DMSO (Tabla 30).

Hay que señalar que, los crecimientos de las líneas embriogénicas pretratadas se igualaron a los crecimientos control después de otros dos subcultivos bisemanales (datos a las 12 semanas no mostrados).

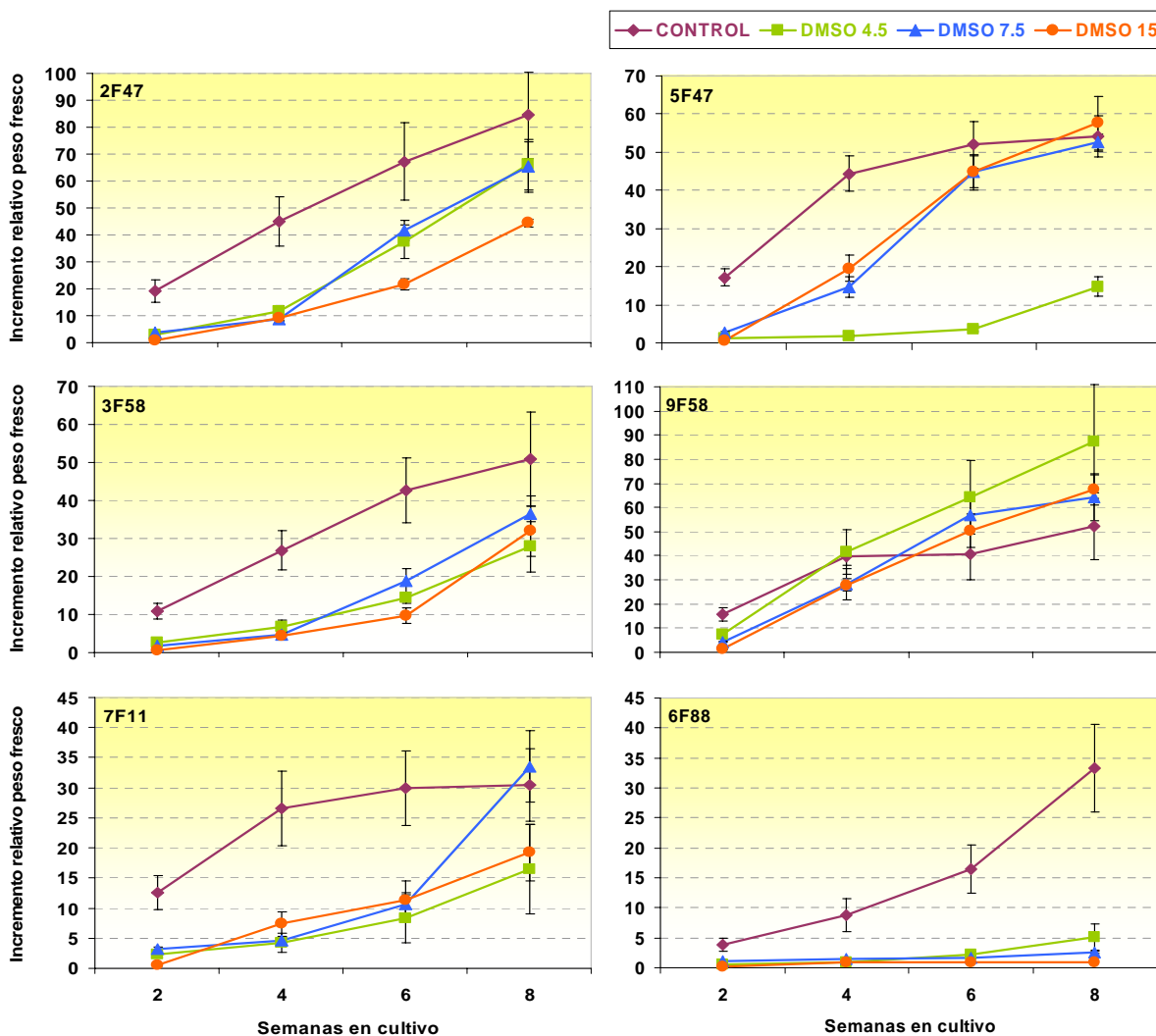


Figura 73: Incremento relativo en peso fresco de seis líneas embriogénicas después de pretratamientos con 0,4 M sorbitol y tres concentraciones de DMSO, durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha tratado con crioprotectores. Los datos son medias \pm es de 5 repeticiones.

8.2.2. Descongelación. Recuperación del crecimiento.

Inicialmente, tras la descongelación, el tejido viable mostraba un aspecto mucilaginoso y las cabezas embrionarias apareciendo en forma de pequeños agregados. A las dos semanas en cultivo se observó una ligera recuperación del crecimiento en los cultivos descongelados apareciendo agregados celulares en multiplicación activa (Fig. 75 A), suponiendo una media del 15% del crecimiento alcanzado por los cultivos sin tratar (Tabla 29). No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre genotipos (Tabla 31). La tasa de crecimiento medio en esta fase de latencia fue del 1,7% respecto del inicio del cultivo (Tabla 30).

A las cuatro semanas apenas se incrementó el crecimiento de los cultivos (Tabla 28), no encontrándose tampoco diferencias entre tratamientos ni entre genotipos (Tabla 31). Las cabezas embrionarias aparecen en forma de pequeños agregados con células del suspensor (Fig. 75 B). Ya que la tasa de crecimiento medio de los cultivos recuperados fue muy baja (1,8) (Tabla 30), los crecimientos relativos a los de los cultivos control fueron inferiores, suponiendo una media del 6,9% (Tabla 29).

A las seis semanas, aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre genotipos (Tabla 31), ya se observó una ligera recuperación del crecimiento en los cultivos pretratados con 15% DMSO (Tabla 28), correspondiendo a un 5,9% respecto de los cultivos control (Tabla 29). Pudieron observarse agrupaciones embriogénicas en multiplicación por partición (Fig. 75 C). El crecimiento de estos cultivos fue el doble respecto del peso fresco inicial (Tabla 30).

A las ocho semanas en cultivo, emergieron las diferencias entre tratamientos y genotipos (Tabla 31). La mayor recuperación del crecimiento se obtuvo en los cultivos pretratados con 15% DMSO, incrementando 2,7 veces el peso fresco inicial (Tabla 28), representando un 8,4% del crecimiento alcanzado por los cultivos control (Tabla 29). En este periodo de cultivo, los tejidos pretratados con 4,5% de sorbitol apenas incrementaron su peso fresco inicial entrando en una fase estacionaria. Los tejidos pretratados con 7,5% y 15% de sorbitol alcanzaron una tasa de crecimiento respecto del peso inicial 2,6 y 3,5

veces, respectivamente (Tabla 30). Los cultivos ya mostraron embriones somáticos en desarrollo (Fig. 75 D).

Las seis líneas embriogénicas crioconservadas fueron capaces de recuperar su capacidad proliferativa después de la descongelación (Fig. 74). Sin embargo, después de 4 subcultivos bisemanales, el crecimiento relativo medio de los cultivos crioconservados fue muy inferior al de los cultivos control, suponiendo el 4,3, 5,6 y 8,4% conforme se incrementaba la concentración de DMSO (Tabla 29). El peso fresco inicial se incrementó en 1,7 veces con 4,5% DMSO, 2,6 veces con 7,5% DMSO, y 6,4 veces con 15% DMSO (Tabla 30). Las líneas 3F58 y 9F58 mostraron la mayor capacidad de recuperación del crecimiento después de la crioconservación, sobre todo cuando se pretrataron con 15% de DMSO (Tabla 31) (Anexo 4).

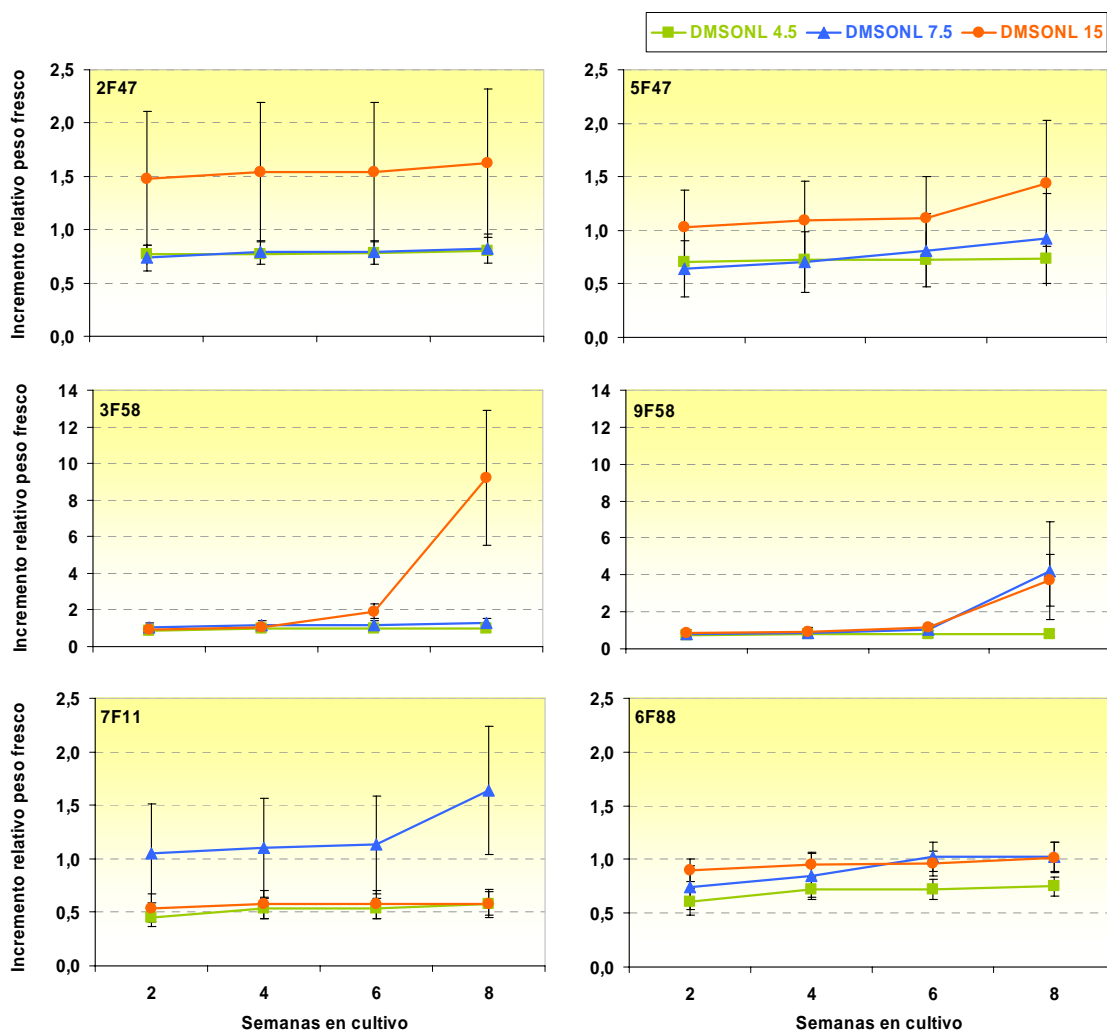


Figura 74: Incremento relativo en peso fresco de seis líneas embriogénicas recuperadas tras la crioconservación, durante cuatro subcultivos bisemanales. Los cultivos se pretrataron con 0,4 M sorbitol y tres concentraciones de DMSO. Los datos son medias \pm es de 5 repeticiones.

Hay que señalar que los crecimientos de las líneas crioconservadas se equipararon a las no crioconservadas ni pretratadas transcurridas 14 semanas en cultivo. Pudo observarse que algunas líneas embriogénicas crioconservadas perdían su capacidad proliferativa después de varios subcultivos. La línea 6F88 recuperada mantuvo su capacidad proliferativa durante 2 meses, la 5F47 durante 8 y la 2F47 durante 11 meses.

El crecimiento de algunas de las líneas originales, como la 7F11, 5F47 y 3F58 declinó después de 24 a 36 meses en cultivo, mientras que las recuperadas tras la crioconservación mantienen su crecimiento activo hasta el momento (22 meses). Además, la línea 7F11 original no producía embriones maduros en condiciones de maduración, sin embargo en la crioconservada se promovió la maduración de los embriones.

Tabla 28: Incremento relativo en peso fresco ($(P_f - P_i) / P_i$) de cultivos embriogénicos después de pretratamientos con 0,4M sorbitol y tres concentraciones de DMSO y congelación en NL, durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha tratado con crioprotectores ni congelado. Los datos son medias \pm es de 30 repeticiones. P_f : peso fresco final; P_i : peso fresco inicial.

Semanas en cultivo	Incremento relativo en peso fresco						
	Control	Pretratamiento			Pretratamiento y congelación		
		DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15	DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15
2	13,2 \pm 1,4	2,8 \pm 0,5	2,7 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
4	31,6 \pm 3,2	11,2 \pm 3,0	8,6 \pm 1,8	11,6 \pm 1,9	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1
6	41,5 \pm 4,5	21,9 \pm 5,1	25,8 \pm 4,0	23,2 \pm 3,8	0,8 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,2
8	50,9 \pm 5,2	37,7 \pm 7,3	40,0 \pm 5,0	36,7 \pm 4,8	0,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,5	2,7 \pm 0,8

Tabla 29: Crecimiento en peso fresco de cultivos embriogénicos después de pretratamientos con crioprotectores y congelación en NL, en relación al crecimiento de los cultivos control (=100%), durante cuatro subcultivos bisemanales. El control es tejido que no se ha pretratado ni congelado.

Semanas en cultivo	% Crecimiento relativo al control					
	Pretratamiento			Pretratamiento y congelación		
	DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15	DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15
2	31,6	28,9	29,5	15,4	14,0	15,7
4	42,5	33,8	45,2	7,1	6,4	7,1
6	61,0	71,2	64,3	5,3	5,0	5,9
8	83,2	86,5	80,9	4,3	5,6	8,4

Tabla 30: Tasa de crecimiento de cultivos embriogénicos (Pf_f / Pf_i) en varios subcultivos bisemanales, después de pretratamientos con crioprotectores y congelación en NL. El control es tejido que no se ha pretratado ni congelado. Los datos son el cociente entre el peso alcanzado en cada subcultivo (Pf_f) y el peso inicial (Pf_i).

Semanas en cultivo	Tasa de crecimiento respecto del peso inicial						
	Control	Pretratamiento			Pretratamiento y congelación		
		DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15	DMSO4,5	DMSO7,5	DMSO15
2	13,0	3,3	3,6	3,3	1,6	1,7	1,8
4	29,4	10,0	9,6	11,5	1,7	1,8	1,8
6	39,4	19,2	26,9	21,9	1,7	1,9	2,0
8	48,5	32,3	40,3	33,9	1,7	2,6	3,5

Tabla 31: Nivel de significación al 5% de probabilidad según ANOVA de la recuperación del crecimiento de cultivos embriogénicos pretratados y cultivos embriogénicos crioconservados, en diferentes subcultivos. Los datos para ver el efecto de los crioprotectores corresponden a seis líneas embriogénicas y cuatro tratamientos (control, 4,5% DMSO, 7,5% DMSO y 15% DMSO). Los datos para ver el efecto de la crioconservación corresponden a seis líneas embriogénicas y tres tratamientos (4,5% DMSO, 7,5% DMSO y 15% DMSO). Se realizaron cinco repeticiones por línea y tratamiento ensayado.

Efecto de los crioprotectores	Semanas en cultivo			
	2	4	6	8
Línea embriogénica	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.000
Tratamiento	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.000
Línea x Tratamiento	p= 0.030	p= 0.000	p= 0.000	p= 0.000
Efecto de la crioconservación				
Línea embriogénica	p= 0.393	p=0.280	p= 0.653	p= 0.002
Tratamiento	p= 0.573	p= 0.649	p= 0.208	p= 0.005
Línea x Tratamiento	p= 0.948	p= 0.957	p= 0.907	p= 0.065

En el Anexo 4 se muestran los datos de los incrementos relativos de peso fresco de las líneas embriogénicas controles y crioconservadas.

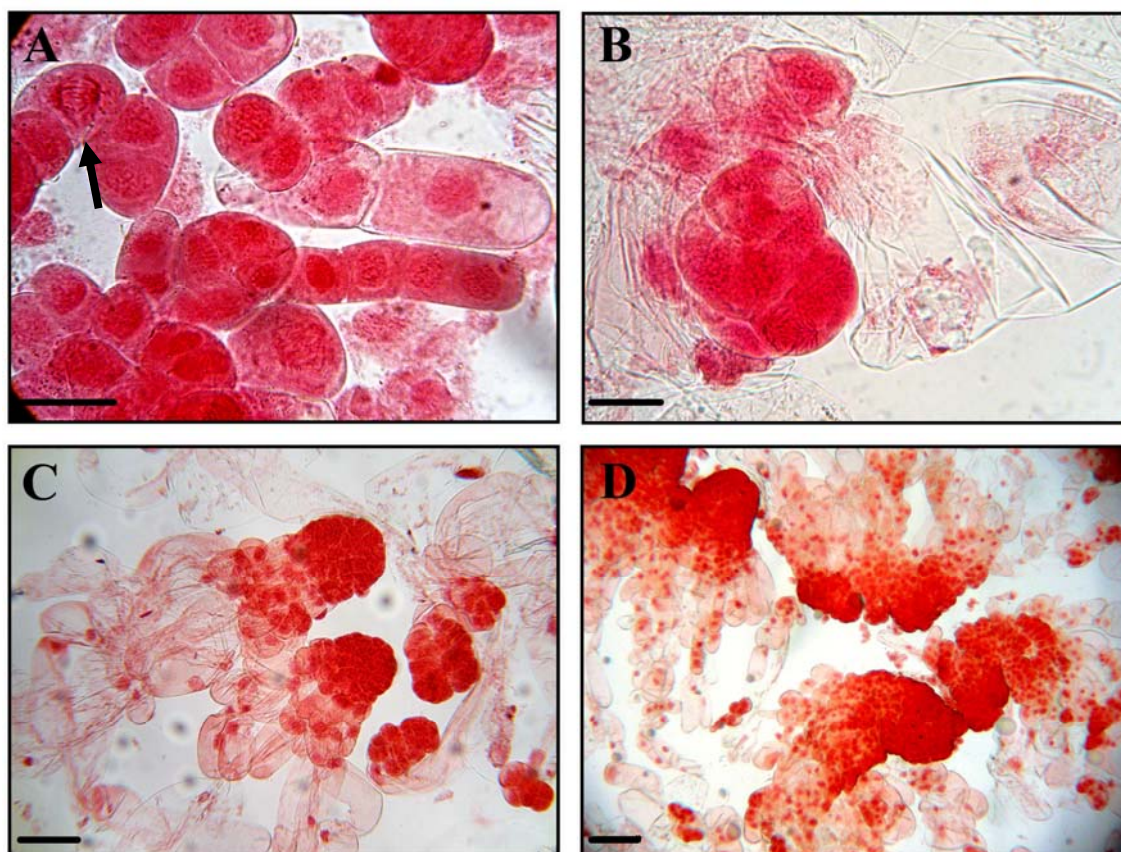


Figura 75: Cultivos embriogénicos crioconservados creciendo en medio de mantenimiento. **A:** Agregados celulares en multiplicación activa después de dos semanas en cultivo. La flecha señala célula en anafase (barra= 50 μ M). **B:** Las cabezas embrionarias aparecen en forma de pequeños agregados con células del suspensor, después de cuatro semanas en cultivo (barra=25 μ M). **C:** Embriones somáticos en desarrollo, a las seis semanas en cultivo (barra= 0,2 mm). **D:** Agrupaciones embriogénicas en multiplicación por partición, después de 8 semanas en cultivo (barra= 0,2 mm).

8.2.3. Maduración y conversión.

La crioconservación modificó el comportamiento frente a la maduración de dos líneas. Mientras que la 9F58 original formó embriones cotiledonares en algunas de las condiciones de maduración ensayadas, tras la crioconservación no se obtuvieron embriones cotiledonares. En la línea 7F11 original no se obtuvieron embriones en ninguna de ellas, mientras que tras la crioconservación proporcionó embriones cotiledonares en alguno de los medios ensayados. En la línea 3F58 recuperada no se desarrollaron embriones cotiledonares. Se obtuvo un pequeño número de embriones cotiledonares en presencia de sacarosa, por ello no se pudo definir la concentración más idónea. Los cultivos solidificados con Plantagar o Gerlite[®], proporcionaron el mismo número de embriones, pero tampoco se pudo definir su idoneidad (Tabla 32).

Tabla 32: Número de embriones normales maduros en 250 mg de tejido embriogénico, obtenidos en distintas condiciones de maduración; ne: no ensayado.

Maduración	AFC					
	Sacarosa (g/l)			Maltosa (g/l)		
	60	90	120	60	90	120
Plantagar	4	6	5	0	0	0
Gerlite®	4	ne	ne	0	ne	ne

De los 19 embriones obtenidos en la línea 7F11 recuperada de la crioconservación, germinaron 4 de ellos (21% germinación). Solamente una planta logró aclimatarse completamente, no observándose hasta el momento diferencia alguna respecto de las plantas obtenidas de otras líneas no crioconservadas (Fig. 76).

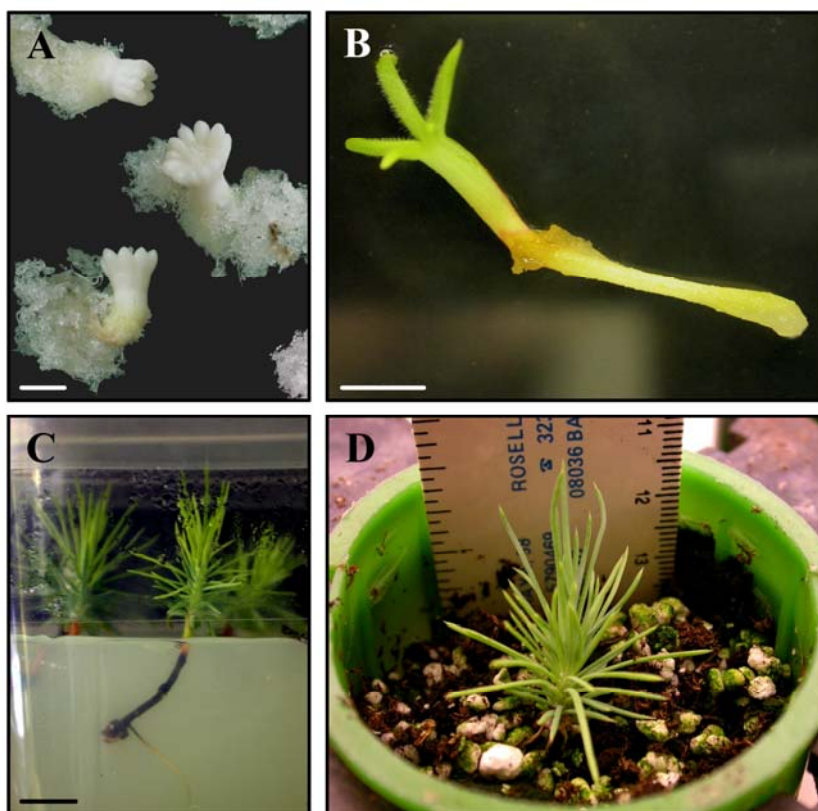


Figura 76: **A:** Embriones somáticos cotiledonares obtenidos en la línea 7F11 crioconservada, después de 16 semanas en medio AFC con 121 μ M de ABA. (barra= 1 mm). **B:** Germinación de un embrión somático de tejido recuperado tras la crioconservación. (barra= 5 mm). **C:** Plántulas de embrión somático creciendo en tarrinas de cultivo ventiladas con medio SH (Dimensiones de la tarrina= 125 mm x 65 mm x 80 mm). **D:** Planta regenerada de línea embriogénica crioconservada, creciendo en contenedor forestal (Diámetro máximo del contenedor = 52 mm).

8.3. DISCUSIÓN

Se han ensayado algunos de los factores que intervienen en el establecimiento de un protocolo apropiado de crioconservación en cultivos embriogénicos de pino piñonero. Estos factores incluyen tanto el régimen aplicado en el enfriamiento y descongelación, el estado fisiológico del material embriogénico, la concentración de tejido en las suspensiones, como la osmolaridad del medio de congelación y concentración del crioprotector DMSO (Zoglauer y col., 2003). Por ello, como primer paso, se ha tratado de ajustar la concentración de DMSO en los rangos utilizados en la bibliografía a través de su efecto en el crecimiento de los cultivos embriogénicos de pino piñonero antes y después de su congelación en NL.

Las soluciones más utilizadas en la crioconservación de cultivos embriogénicos de coníferas incluyen al sorbitol a concentraciones entre de 0.2 M y 0.4 M y el DMSO a concentraciones entre el 5 y el 20% (Häggman y col., 1998, Gupta y col., 2005). El sorbitol reduce el contenido hídrico de las células y el DMSO reemplaza parte del agua intracelular y estabiliza las membranas. Debido a su toxicidad, la concentración de DMSO tiene que ajustarse debidamente y extraerse de los tejidos inmediatamente después de la descongelación.

Los resultados en pino piñonero mostraron que la concentración de 15% de DMSO resultó más citotóxica que las concentraciones menores, en las dos primeras semanas de cultivo de las líneas embriogénicas pretratadas. Sin embargo, esta toxicidad se revertía en los siguientes subcultivos, mostrándose un crecimiento medio del 83,5 % respecto de los cultivos control después de 8 semanas; e igualándose con ellos cuando transcurrían 12 semanas en cultivo.

Estos resultados están en la línea con lo descrito en *Picea glauca*, donde los cultivos sufrían una reducción del crecimiento cercano al 40% como consecuencia de una citotoxicidad inicial del DMSO. Dicha toxicidad revertía con los sucesivos subcultivos, y no aumentaba con el incremento de su concentración. Se ha observado que durante el tratamiento con sorbitol y DMSO se eliminaban la mayoría de las células del suspensor (Karthä y col., 1988). Según Aronen y col., (1999) el enriquecimiento en cabezas embrionales obtenido en los cultivos pretratados de *Abies cephalonica* podría contribuir al

incremento de los crecimientos observados comparados con los controles. Encontraron una correlación negativa entre el peso inicial de la muestra y su capacidad de crecimiento posterior; ya que los tratamientos que incrementaron más su tasa de crecimiento, también tenían los pesos iniciales menores. Los autores piensan que este incremento estaría más conectado con la variación del peso inicial de la muestra después del tratamiento al inicio del cultivo, que con los tratamientos en si mismos. No se ha observado esta disminución en el peso de las muestras después de los pretratamientos en los cultivos de pino piñonero.

En *Picea mariana* (Klimaszewska, 1995) y *Picea sitchensis* (Find y col., 1993), el crecimiento de las muestras tratadas con agentes crioprotectores no congeladas era comparable a las congeladas. Häggman y col., (1998) indicaron que, los cultivos embriogénicos de *Pinus sylvestris* pretratados y no congelados mostraron mayores tasas de crecimiento que los cultivos control; por lo que sugirieron que los pretratamientos con crioprotectores podrían ser una alternativa para conseguir mejorar la capacidad embriogénica, o incrementar el desarrollo sincrónico de los embriones somáticos. Klimaszewska y col., (1992) puntualizaron la importancia para la supervivencia de los cultivos crioconservados que tras un precultivo con sorbitol, la aplicación de la solución crioconservante de sorbitol y DMSO fuera paulatina.

Ya que todas las líneas pretratadas de pino piñonero recuperaron el crecimiento al nivel de los controles con los subcultivos, puede indicarnos como en otras especies que las soluciones crioprotectoras ensayadas tuvieron un efecto limitado en el metabolismo celular de las masas embriogénicas de piñonero. Pudo observarse que las seis líneas embriogénicas mostraban distintas sensibilidades respecto a las concentraciones de DMSO aplicadas. Después de 8 semanas en cultivo, la línea 7F11 en 7,5% de DMSO y la 5F47 en 15% de DMSO mostraron crecimientos similares a los controles. Mientras que la línea 6F88 mostró una reducción drástica en su crecimiento, la 9F58 mostró crecimientos superiores que el control, en todas las concentraciones de DMSO ensayadas.

Los resultados mostrados en la bibliografía sobre los efectos de la crioconservación en la recuperación del crecimiento de los cultivos en coníferas pueden ser contradictorios. En ocasiones la recuperación del crecimiento puede ser menor, igual o mayor que en los cultivos controles. La crioconservación de *Abies nordmanniana* disminuía las tasas de

crecimiento de los cultivos embriogénicos (Nørgaard y col., 1993a). En *Picea abies*, en los primeros meses de cultivo después de la descongelación mostraron un crecimiento lento, pero tras subcultivos prolongados éste se recuperaba siendo equiparable a los cultivos controles (von Arnold y col., 1995). En *Pinus radiata* (Smith y col., 1994) y *Pinus sylvestris* (Häggman y col., 1998) la tasa de crecimiento de los cultivos crioconservados era mayor que los controles.

Generalmente, después de la crioconservación los tejidos pueden permanecer en estado de reposo (fase de latencia o estacionaria) pudiendo durar desde unos días hasta algunas semanas dependiendo de las especies, el genotipo o el explanto utilizado. En *Pinus roxburghii* esta fase estacionaria podía durar entre 2-7 días (Mathur y col., 2003), unos 3 días en *Pinus pinaster* (Bercetche and Pâques 1995), en *Abies nordmanniana* (Nørgaard y col., 1993a) como en *Pinus sylvestris* (Häggman y col., 1998) la fase varió entre 2 y 4 semanas. David y col., (1995) indicaron que el precultivo, el pretratamiento y el proceso de congelación inducían una fase estacionaria antes de la recuperación del crecimiento en *Pinus caribaea*. Sugirieron que esta fase estacionaria podría inducirse más por el precultivo (plasmolisis) y el pretratamiento (DMSO) que por la congelación propiamente dicha, ya que encontraron diferencias muy ligeras entre las curvas de crecimiento del material no congelado pero tratado y el congelado.

En pino piñonero los crecimientos de las líneas congeladas fueron muy inferiores a los de las pretratadas y no congeladas. A las 8 semanas en cultivo, las líneas crioconservadas crecieron un 6,1% del crecimiento obtenido por los cultivos control, mientras que las pretratadas y no congeladas crecieron un 83,5%. Sin embargo, los crecimientos de las líneas crioconservadas se igualaron con 6 semanas más en cultivo. Estos resultados indicaban que la fase estacionaria en los cultivos del pino piñonero era más larga pero estaban en la línea de lo referido en otras especies, donde la duración de esta fase puede depender también del protocolo de crioconservación aplicado. El tratamiento que produjo mayor reducción del crecimiento fue con 4,5 % de DMSO. Este resultado está de acuerdo con el descrito por Ford y col., (2000a) donde la combinación de 0,4M de sorbitol y 5% de DMSO produjo incrementos en peso fresco de cultivos de *Pinus patula* muy bajos.

Cultivos de *Pinus roxburghii* crioconservados con 0,3 M de sorbitol y 5% de DMSO mostraron un incremento en peso fresco del 70 % frente a los 158 % de los cultivos no tratados ni congelados, después de 5 semanas en cultivo (Mathur y col., 2003). Estos cultivos mostraron una fase de latencia en la recuperación del crecimiento de una semana, similar a lo observado en *Picea sitchensis* por Find y col., (1993). Ford y col., (2000b) mostraron que una línea embriogénica de *Pinus patula* pretratada con 0,3 M de sorbitol y 10% de DMSO incrementó 13 veces el peso fresco inicial a las 5 semanas en cultivo, mientras que la crioconservada incrementó 7 veces. Los autores indicaron que el tejido sufría un daño durante el proceso de congelación. Con este protocolo recuperaron un 60 % de los genotipos crioconservados. En *Pinus nigra*, de las seis líneas crioconservadas sobrevivieron cinco, mostrando tasas de crecimientos variables entre ellas, pero superiores a los controles (Salaj y col., 2007b). Marum y col., (2004) indicaron que la densidad inicial de las suspensiones antes de los pretratamientos era determinante para la recuperación del crecimiento de los cultivos de *Pinus pinaster* tras la crioconservación. Con una densidad de 250 mg/ml las tasas de recuperación fueron más altas que con densidades inferiores.

Con el protocolo de crioconservación descrito para el pino piñonero, se recuperaron la totalidad de las líneas embriogénicas tras la descongelación. Con la mejor combinación (0,4M de sorbitol y 15 % de DMSO) y utilizándose una densidad de 200 mg/ml de tejido, el daño producido por la congelación se reflejó en que las líneas incrementaron el peso fresco inicial 3,5 veces, mientras que las no congeladas y pretratadas incrementaron 34 veces, a las 8 semanas en cultivo.

Se ha observado que los cultivos embriogénicos más vigorosos son los más apropiados para abordar la crioconservación, ya que tienen mayores posibilidades de recuperación de su crecimiento tras la descongelación (Kartha y col., 1988). Sin embargo, los resultados obtenidos en pino piñonero mostraron que las líneas originales con crecimiento más activo como la 2F47, 5F47 y 9F58 en orden decreciente, no mostraron el mismo orden en sus capacidades de recuperación del crecimiento. Las mayores tasas de recuperación se obtuvieron en las líneas 3F58 y 9F58.

En otras especies también se han descrito diferencias en las respuestas de recuperación, indicándose que la capacidad de los cultivos embriogénicos para tolerar la

crioconservación es genotipo dependiente (Nørgaard y col., 1993 a y b; Häggman y col., 1998; Aronen y col., 1999, Cyr y col., 1999; Mathur y col., 2003).

Muchos autores han descrito que la regeneración tras la descongelación ocurría a partir de células embriónicas caracterizadas por tener citoplasma denso y que sobreviven al pretratamiento y congelación. Malabadi y Nataraja (2006) indicaron que inicialmente el tejido que sobrevivía a la crioconservación mostraba cabezas embrionarias y después de 4 semanas en proliferación se observaba la poliembrionía de partición. Este proceso de eliminación de las células vacuoladas de los suspensores y permanencia de las células densas de las cabezas embrionales se ha asociado con la mejora en el potencial embriogénico que se obtiene en algunas especies, sugiriendo una sincronización del estado de desarrollo de los cultivos. Sin embargo, von Arnold y col., (1995) encontraron que esta respuesta se debía a un efecto al azar que no ha sido demostrado en un gran número de genotipos testados. Cyr (1999) sugirió que la recalcitrancia de las líneas podría ser un reflejo de una alta tasa de células de suspensor en los cultivos, ya que normalmente no sobreviven al pretratamiento con los crioconservantes ni a la congelación (Zoglauer y col., 2003). Los autores observaron que los cultivos podían continuar su crecimiento proliferativo incluso a partir de unas pocas células embrionales supervivientes.

Las observaciones microscópicas realizadas en los cultivos crioconservados del pino piñonero podrían sugerir las mismas conclusiones, ya que mostraron varias semanas de fase estacionaria y aparente destrucción de las células del suspensor (Fig. 74).

Engelmann (2004) sugirió que la crioconservación podría usarse como una herramienta para el rejuvenecimiento de los cultivos cuando su capacidad proliferativa disminuye, ya que permite seleccionar una población de células embriónicas más homogénea, con lo que se obtendría un potencial embriogénico mayor.

En muchos casos la crioconservación mejora o facilita la maduración de los embriones y posterior conversión en planta (Häggman y col., 2000). En los cultivos recuperados de pino piñonero, la maduración no se obtuvo en la línea 3F58, no se mejoró en la 9F58, pero se pudo promover en la 7F11. Este resultado podría tener relación con la hipótesis de Engelmann (2004) en relación al rejuvenecimiento de los cultivos

embriogénicos, ya que la línea 7F11 se mantuvo en crecimiento activo durante 18 meses, no obteniéndose con anterioridad en ninguno de los ensayos embriones cotiledonares.

Con este protocolo, se ha obtenido en una línea recuperada un porcentaje de germinación inferior a los obtenidos con el material embriogénico de otras líneas no crioconservadas, al igual que el número de plantas aclimatadas. Este resultado podría estar más relacionado con el efecto del genotipo en la respuesta que con el protocolo en sí, ya que no se dispuso del resultado de germinación con la línea sin crioconservar. Los embriones que maduraron después de la crioconservación, se desarrollaron hasta convertirse en planta de forma similar a los obtenidos en los cultivos no crioconservados.

El protocolo de crioconservación descrito en este trabajo podría aplicarse en algunas líneas embriogénicas de pino piñonero. En aquellas líneas en las que se han obtenido tasas de recuperación del crecimiento bajas tras la descongelación y en las que no se ha promovido el desarrollo de los embriones formados, tendrían que ensayarse protocolos alternativos de crioconservación.

Podemos concluir que para poder utilizar la embriogénesis somática con fines operativos en los programas de forestación clonal, los protocolos de crioconservación deben poder aplicarse a un amplio rango de genotipos. Por ello el presente protocolo de crioconservación debe optimizarse para poder aplicarlo a un rango más amplio de líneas embriogénicas de pino piñonero. La optimización de este protocolo conllevaría estudios sobre el efecto de otras combinaciones de crioprotectores, mayores concentraciones de tejido en las suspensiones, sistemas para eliminar los crioprotectores de los tejidos, entre otros.

8.4. PROTOCOLO DE CRIOCONSERVACIÓN

✿ Se suspende 1g de tejido embriogénico en 3,5 ml de una solución estéril con el medio M-mLV líquido y 0,4 M de sorbitol. Viales de 25 ml (Duran® Group) con las suspensiones se mantienen durante 16 horas en agitación orbital a 115 rpm, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

* A los viales con las suspensiones celulares mantenidos en frío, se les añade paulatinamente la solución crioprotectora 0,4 M sorbitol/15% DMSO, agitándose después de cada adición. Se deja equilibrar durante 30 minutos en hielo, 5 ml de la mezcla (1g de tejido + 3.5 ml de 0,4 M sorbitol + 1,5 ml de solución sorbitol/DMSO), agitándose frecuentemente.

* Se dispensan alícuotas de 1 ml (200 mg de MES) en cada uno de los crioviales que se introducen en contenedores “Mr. Frosty” de Nalgene® conteniendo 250 ml de isopropanol. Después de 2 horas a 4 ± 1 °C, se realiza el enfriamiento paulatino de las muestras, colocándolas a -20 ± 1 °C durante 40 minutos, y luego a -70 ± 1 °C durante 2 horas.

* Las diferentes líneas embriogénicas contenidas en los crioviales se colocan en cañas de crioconservación para su introducción en tanques de nitrógeno líquido (NL) durante tiempo indefinido.

* Para recuperar el crecimiento de las líneas, se extraen los crioviales del tanque y se introducen en un baño a 40° C durante 3 minutos hasta su descongelación.

* En la cabina de flujo laminar, el contenido del criovial se filtra para retirar la solución crioprotectora, transfiriéndose el disco de papel con el tejido embriogénico (aprox. 100 mg) a placa Petri con medio de mantenimiento (M-mLV). Las placas se incuban a 23 ± 1 °C en oscuridad durante 24 horas.

* Para promover el crecimiento proliferativo de las líneas embriogénicas recuperadas, los cultivos se transfieren a medio fresco bisemanalmente en las condiciones de mantenimiento descritas. Tras la descongelación, la línea recupera el crecimiento habitual de la línea original aproximadamente a las 14 semanas en cultivo.

* Para la regeneración de plantas, los cultivos recuperados se transfieren a las condiciones ya descritas en el protocolo de maduración, conversión y aclimatación.



9. CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES

1.- Se ha desarrollado, por primera vez, un **protocolo de regeneración** de árboles selectos vía embriogénesis somática en embrión cigótico inmaduro, con posibilidad de aplicación en embriones maduros, lo que abre una nueva oportunidad de aplicación de esta técnica en los planes de mejora de la especie.

2.- Se han **establecido líneas embriogénicas** a partir de megagametofitos completos procedentes de cinco familias selectas de semihermanos (polinización abierta). Aunque el tejido embriogénico inicial prolifera por poliembrionía de partición a partir del embrión cigótico y extruye a través del micrópilo a las 4-12 semanas de cultivo, puede que no mantenga un crecimiento continuo en los siguientes subcultivos, lo que condiciona el establecimiento de la línea embriogénica. Las frecuencias de iniciación de tejido embriogénico en el pino piñonero han sido bajas y menores que las de extrusión, pero similares a las obtenidas inicialmente en otras especies. De los 10.700 megagametofitos testados, se han establecido 41 líneas embriogénicas (7,3 %)

3.- El estado de desarrollo del embrión cigótico (fecha de recogida), el genotipo (familias de semihermanos) y el medio de cultivo (nutrientes y PGRs), son factores que influyen en la **iniciación** del tejido embriogénico. Las mayores respuestas de iniciación se obtienen cuando el embrión se encuentra entre el estado de poliembrionia de partición hasta el estado cotiledonar inicial. Las frecuencias de iniciación difieren entre familias y entre años de recolección. El mejor medio de iniciación ha sido el Litvay modificado, suplementado con L-glutamina e hidrolizado de caseína, 9 μM de 2,4-D y 4,5 μM de BAP.

4.- La **proliferación** de las líneas embriogénicas se mantiene mediante el subcultivo en un medio nutritivo diferente del de inducción. El crecimiento se maximiza utilizando la técnica de suspender las masas embriogénicas en medio líquido y subcultivar en forma de disgregado, y resulta especialmente útil en aquellas líneas embriogénicas con menores tasas de crecimiento. Los crecimientos de algunas líneas declinaron después de 12 a 36 meses en cultivo, lo que es común a otras especies.

5.- Se ha establecido la posibilidad de desarrollar embriones somáticos en distintas condiciones de **maduración**. La mayor frecuencia de maduración se obtiene con un precultivo del tejido embriogénico en medio con nutrientes reducidos y bajas concentraciones de auxina y citoquinina, una desecación parcial del tejido disgregado incluyendo CA (entre 7,5 y 17% de pérdida de humedad) y la posterior puesta en cultivo en un medio Litvay modificado, suplementado con 60 g/l de sacarosa, 121 μ M de ABA y 10 g/l de Gerlite[®]. Se puso de manifiesto la influencia del genotipo en esta fase. La tasa de obtención de embriones cotiledonares normales por gramo de tejido fresco, 220 embriones en el mejor genotipo y condición, es comparable a otras especies de pino. Sin embargo, la alta tasa de proliferación de los cultivos del pino piñonero, aún en estas condiciones, dificulta la maduración de los embriones.

6.- Las mejores tasas de **germinación** de los embriones somáticos se obtiene cultivándolos horizontalmente en placa con medio AFC, sin PGRs, 30 g/l sacarosa, 6 g/l Plantagar, y baja intensidad luminosa. Como tratamiento pregerminativo, el almacenamiento en frío de los embriones cotiledonares, mejora la respuesta germinativa. La transferencia del embrión germinado a recipientes ventilados ECO2 con medio de cultivo SH o AFC sin PGRs, suplementado con 30 g/l sacarosa, 6 g/l Plantagar, e intensidad luminosa más alta, estimula el desarrollo del epicótilo e hipocótilo.

7.- Se ha conseguido la **regeneración de plantas** a partir de alguna de las líneas embriogénicas establecidas. El porcentaje de plantas que sobrevive al proceso completo de aclimatación es del 35%, manteniéndose durante los 2 primeros meses en cámara climatizada de alta humedad y un mes más en condiciones de invernadero con nebulización intermitente.

8.- Se ha desarrollado un **protocolo de crioconservación** de líneas embriogénicas de pino piñonero, que permite mantener la capacidad proliferativa y diferenciación en alguna de ellas. El pretratamiento de las masas embriogénicas de seis líneas con una mezcla crioconservante de sorbitol y DMSO, produce un cierto grado de toxicidad, que revierte después de 12 semanas de cultivo, equiparándose al crecimiento de las líneas no tratadas. La mayor tasa de recuperación se obtiene con la mezcla de 0,4 M de sorbitol más 7,5 % de

DMSO, alcanzándose a las 8 semanas de cultivo un 86,5 % del crecimiento de los cultivos control. Se ha evidenciado la influencia del genotipo en la respuesta.

9.- Aunque la recuperación del crecimiento de las seis líneas crioconservadas ha sido lenta (fase de latencia), pudo igualarse al crecimiento de las líneas originales transcurridas 14 semanas de cultivo. La mayor tasa de recuperación se ha obtenido con la mezcla de 0,4 M de sorbitol más 15 % de DMSO, alcanzándose a las 8 semanas de cultivo un 8,4 % del crecimiento respecto a los cultivos control. La capacidad proliferativa de tres de las líneas recuperadas declinó después de 6 a 11 meses en cultivo. La crioconservación ha modificado el comportamiento frente a la maduración de dos de las líneas, mientras que una de las líneas pierde la capacidad de diferenciación de embriones cotiledonares, en otra de ellas se promueve.

10.- Las plantas regeneradas a partir de los embriones somáticos que han madurado y germinado normalmente después de la crioconservación, muestran un desarrollo similar que las procedentes de los cultivos activos.

11.- Sin embargo, es necesaria más investigación en este área, a través de la optimización de los protocolos de regeneración vía embriogénesis somática y crioconservación, con el fin de obtener no solo tasas de iniciación y conversión suficientemente altas; sino también para avanzar en el conocimiento del proceso embriogénico en esta especie, aplicables no solo a material embrionario sino también a material no embrionario, de gran importancia en los programas de mejora.

10. BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abellanas B (1990)** Estudios básicos para la mejora genética del pino piñonero (*Pinus pinea* L.): Comportamiento reproductivo. Tesis Doctoral. E.T.S. Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- Abellanas B, Butler I, Monteagudo FJ (2000)** Estudios de la rentabilidad económica de una parcela de injertos de pino piñonero a los nueve años de su instalación. Actas (II) del Primer Simposio del Pino Piñonero (*Pinus pinea* L.), Valladolid, pp 101-110
- Aitken-Christie J (1984)** Clonal propagation: gymnosperms. En: Vasil, IK (eds.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1. Academic Press, Orlando, Fla. (USA), pp 82-95
- Alonso P, Moncaleán P, Fernández B, Rodríguez A, Centeno ML, Ordás RJ (2006)** An improved micropropagation protocol for Stone pine (*Pinus pinea* L.). Ann. For. Sci. 63: 879-885.
- Amarasinghe V, Dharmi R, Carlson JE (1996)** Polyamine biosynthesis during somatic embryogenesis in interior spruce (*Picea glauca* x *Picea engelmannii* complex). Plant Cell Rep. 15: 495-499.
- Aronen TS, Krajnakova J, Häggman HM, Ryyänen LA (1999)** Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. Plant Sci. 142: 163-172
- Arrigoni O, De Gara L, Tommasi F, Liso R (1992)** Changes in the ascorbate system during seed development in *Vicia faba* L. Plant Physiol. 99: 235-238
- Arya S, Kalia RK, Arya ID (2000)** Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. Plant Cell Rep. 19: 775-780
- Ashihara H, Stasolla C, Loukanina N, Thorpe TA (2001)** Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine and inosine Plant Sci. 160: 647-657
- Attree SM, Budimir S, Fowke LC (1990)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black spruce and white spruce (*Picea mariana* and *Picea glauca*). Can. J. Bot. 68: 30-34
- Attree SM, Fowke L (1993)** Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 35: 1-35

- Attree SM, Pomeroy MK, Fowke LC (1994)** Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.]. Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep.* 13: 601-606
- Attree SM, Pomeroy MK, Fowke LC (1995)** Development of white spruce (*Picea glauca* [Moench.]. Voss.) somatic embryos during culture with abscisic acid and osmoticum, and their tolerance to drying and frozen storage. *J. Exp. Bot.* 46: 433-439
- Barranco J, Ortuño SF (2004)** Aproximación al sector del piñón en España. *Estudios Agrosociales y Pesqueros*, nº 201. pp. 165-189
- Becwar MR, Blush TD, Brown DW, Chesick EE (1991)** Multiple parental genotypes in embryogenic tissue derived from individual immature loblolly pine seeds. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26: 37-44
- Becwar MR, Nagmani R, Wann SR (1990)** Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20: 810-817
- Becwar MR, Noland TL, Wyckoff JL (1989)** Maturation, germination, and conversion of Norway spruce (*Picea abies* L) somatic embryos to plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 25: 575-580
- Becwar MR, Pullman GS (1995)** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 287-301
- Bercetche J, Pâques M (1995)** Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster*) En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 221-242
- Berlyn GP, Beck RC, Renfroe MH (1986)** Tissue culture and the propagation and genetic improvement of conifers: problems and possibilities. *Tree Physiol.* 1: 227-240
- Berlyn GP, Kohls SJ, Anoruo AO (1991)** Caribbean Pine (*Pinus caribaea* Morelet) En: Bajaj YPS (ed), *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 16, *Trees III*. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp 254-268
- Bonga JM (1996)** Frozen storage stimulates the formation of embryo-like structures and elongating shoots in explants from mature *Larix decidua* and *L. x eurolepis* trees. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46: 91-101

- Bonga JM (2004)** The effect of various culture media on the formation of embryo-like structures in cultures derived from explants taken from mature *Larix decidua*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 77: 43-48
- Bonga JM, Klimaszewska K, Lelu MA, von Aderkas P (1995)** Somatic embryogenesis in *Larix*. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 315-340.
- Boulay MP, Gupta PK, Krogstrup P, Durzan DJ (1988)** Development of somatic embryos from cell suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies* Karst.). *Plant Cell Rep.* 7: 134-137
- Bozhkov PV, Ahn IS, Park YG (1997)** Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. *Can. J. Bot.* 75: 509-512
- Bozhkov PV, von Aronld S (1998)** Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* 104: 211-224
- Breton D, Bouvet A, Favre JM, Harvengt L (2002)** Effect of cultural methods on proliferation and their after-effects on maturation of maritime pine (*Pinus pinaster*) somatic embryos. BIOFOR'02-Sustainable Forestry, Wood Products and Biotechnology. Vitoria-Gasteiz, Spain-November 11-14, Poster 9
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2005)** High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 494-503
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2006)** Long-term subculture randomly affects morphology and subsequent maturation of early somatic embryos in maritime pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 95-108
- Brown CL, Grifford EM (1958)** The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown *in vitro*. *Plant Physiol.* 33: 57-64
- Bucholz JT (1926)** Origin of cleavage polyembryony in conifers. *Bot. Gaz.* 81: 55-71
- Cabasson C, Alvard D, Dambier D, Ollitrault P, Teisson C (1997)** Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 33-37
- Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss SH (2003)** Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotech. J.* 1: 141-154

- Cañellas I, Cañadas N, Bachiller A, Montero G (2000)** Caracterización química de los piñones de *Pinus pinea* L. para el Sur y Centro de España. Actas (II) del 1^{er} Simposio del pino piñonero (*Pinus pinea* L.) Valladolid. pp. 221-226
- 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, Celestino C (2001)** Factores que influyen en la respuesta organogénica en *Pinus pinea* L. IV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. Santiago de Compostela, 17-20 Octubre, p.23
- Ceballos L, Ruiz de la Torre J (1971)** Árboles y arbustos de la España Peninsular. Ed. I.F.I.E.-E.T.S.I. Montes. Madrid
- Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D, Toribio M (2005)** La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Invest. Agrar.: Sist. Recur. For. 14(3):345-357
- Chalupa V (1985)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured immature and mature embryos of *Picea abies* (L.) Karst. Communi. Inst. For. Cech. 14:57-63
- Chandler S, Young R (1995)** Somatic embryogenesis in *Pinus radiata* Don. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 243-255
- Cheliak WM, Klimaszewska K (1991)** Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce. Theor. Appl. Genet. 82: 185-190
- Coke JE (1996)** Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pine. US Patent 6117678
- Cortizo M, Alonso P, Fernández B, Rodríguez A, Centeno ML, Ordás RJ (2004)** Micrografting of mature Stone pine (*Pinus pinea* L.) trees. Ann. For. Sci. 61: 843-845
- Cuesta C, Ordás RJ, Fernández B, Rodríguez A (2008)** Clonal micropropagation of six selected half-sibling families of *Pinus pinea* and somaclonal variation analysis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 95: 125-130
- Cyr D (1999)** Cryopreservartion of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 239-261
- Cyr D (2000)** Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. En: Engelmann F, Takagi H (eds) Cryopreservation of tropical plant

- germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Centre for Agricultural Sciences. Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute. Rome. pp 261-268
- Cyr D, Klimaszewska K (2002)** Conifer somatic embryogenesis II: Applications. *Dendrobiology* 48: 41-49
- Cyr D, Lazaroff W, Grimes S, Quan G, Bethune T, Dunstan D, Roberts D (1994)** Cryopreservation of interior spruce (*Picea glauca engelmanni* complex) embryogenic cultures. *Plant Cell Rep.* 13: 574-577
- David A, Lainé E, David H (1995)** Somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 145-181
- Deb CR, Tandon P (2002)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from mature zygotic embryos of *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.). *J. Plant Biol.* 29: 301-306
- De Verno LL, Park Y-S, Bonga JM, Barret JD (1999)** Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss.). *Plant Cell Rep.* 18: 948-953
- Diamantoglou S, Panagopoulos I, Munoz-Ferriz A, Rhizopoulou S (1990)** *In vitro* studies of embryo growth, callus formation and multiple bud induction of *Pinus pinea* L. *J Plant Physiol.* 137: 58-63
- Dong JZ, Dunstan D (1994)** Growth parameters, protein and DNA synthesis of an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). *J. Plant. Physiol.* 144: 201-208
- Dronne S, Label P, Lelu MA (1997)** Desiccation decreases abscisic acid content in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 99: 433-438
- Dunstan DI, Bock CA, Abrams GD, Abrams SR (1992)** Metabolism of (+)- and (-)-abscisic acid by somatic embryo suspension cultures of white spruce. *Phytochemistry* 31: 1451-1454
- Egertsdotter U, von Arnold S (1998)** Development of somatic embryos in Norway spruce. *J. Exp. Bot.* 49 (319): 155-162
- El-Kassaby Y (2004)** Feasibility and proposed outline of a global review of forest biotechnology. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/77E: Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. Fao, Rome

- El Meskaoui A, Tremblay FM (2001)** Involvement of ethylene in the maturation of black spruce embryogenic cell lines with different maturation capacities. *J. Exp. Bot.* 357 (52): 761-769
- Engelmann F (2004)** Plant cryopreservation: progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 427-433
- Etienne H, Lartraud M, Micahux-Ferrière N, Carron MP, Berthouly M, Teisson C (1997)** Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 81-87
- Fady B, Fineschi S, Vendramin GC (2004)** EUFORGEN Technical Guidelines for genetic conservation and use of Italian Stone pine (*Pinus pinea*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 6 pp
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003)** Transition to somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 201-228
- Feirer RP, Conkey JH, Verhagen SA (1989)** Triglycerides in embryogenic conifer calli: a comparison with zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 8: 207-209
- Fernández-Guijarro B (1997)** Embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.). Tesis Doctoral. E.T.S.Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.
- Fernández-Guijarro B, Celestino C, Toribio M (1994)** Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. En: Pardos JA, Ahuja MR, Elena-Roselló R (eds.) *Biotechnology of Trees. Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*, Fuera de serie nº4. INIA, Madrid. pp 105-110
- Filonova LH, Bozhkov PV, von Arnold S (2000a)** Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51 (343): 249-264
- Filonova LH, Bozhkov PV, Brukhin VB, Daniel G, Zhivotovsky B, von Arnold S (2000b)** Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce. *J. Cell Sci.* 113: 4399-4411
- Filonova LH, von Arnold S, Daniel G, Bozhkov PV (2002)** Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death and Differentiation* 9: 1057-1062

- Find JJ, Floto F, Krogstrup P, Moller P, Nørgaard JV, Kristensen MM (1993)** Cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis* and subsequent plant regeneration. *Scand. J. For. Res.* 8: 156-162
- Find J, Grace L, Krogstrup P (2002)** Effect of anti-auxins on maturation of embryogenic tissue cultures of Nordmanns fir (*Abies nordmanniana*). *Physiol. Plant.* 116: 231-237
- Find J, Kristensen MM, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998b)** Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway spruce and Stika spruce. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 53: 27-33
- Find J, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998a)** Growth parameters, nutrient uptake and maturation capability of two cell lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *J. Plant Physiol.* 152: 510-517
- Finer JJ, Kriebel HB, Becwar MR (1989)** Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* 8: 203-206
- Flinn BS, Roberts DR, Taylor IE (1991)** Evaluation of somatic embryos of interior spruce. Characterization and developmental regulation of storage proteins. *Physiol. Plant.* 82: 624-632
- Ford CS, Jones NB, van Staden J (2000a)** Cryopreservation and plant regeneration from somatic embryos of *Pinus patula*. *Plant Cell Rep.* 19: 610-615
- Ford CS, Jones NB, van Staden J (2000b)** Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 366-369
- Fourré JL, Berger P, Niquet L, André P (1997)** Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor. Appl. Genet.* 94: 159-169
- Fundación Nucis (Salud y Frutos Secos) (2004)** Frutos secos y salud. www.nucis.org/pdf/llobrets_esp.pdf
- García-Férriz L, Serrano L, Pardos JA (1994)** In vitro shoot organogenesis from excised immature cotyledons and microcuttings production in Stone Pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36: 135-140
- 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

- George EF (1993)** Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exegenetics, Edington, UK
- George EF (1996)** Plant propagation by tissue culture. Part 2. In practise. Exegenetics, Edington, UK
- González MV, 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
- Gorbatenko O, Hakman I (2001)** Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. Int. J. Plant. Sci. 162: 1211-1218
- Gordo J, Mutke S, Gil L (2000)** La mejora genética de *Pinus pinea* L. en Castilla y León. Actas (II) del Primer Simposio de Pino piñonero (*Pinus pinea* L.) Valladolid, pp 21-32
- Gradual L, Kjaer E, Thomden N, Larsen AB (1997)** Planning national programmes of forest genetic resources. Technical Note n°48. Danida Forest Seed Centre.
- Guevin TG, Kirby EG (1997)** Induction of embryogenesis in cultured mature zygotic embryos of *Abies fraseri* (Pursh) Poir. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 49: 219-222
- Gupta PK, Durzan DJ (1985)** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Rep. 4: 177-179
- Gupta PK, Durzan DJ (1986)** Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. Bio/Technology 4: 643-645
- Gupta PK, Durzan DJ (1987)** Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Bio/Technology 5: 147-151
- Gupta PK, Durzan DJ, Finkle BJ (1987)** Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. Can. J. For. Res. 17: 1130-1134
- Gupta PK, Timmis R (1999)** Conifer embryo production from liquid medium. En: Altman A, Ziv M, Izhar S (eds) Plant biotechnology and *in vitro* biology in the 21st century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 49-52
- Gupta PK, Timmis R (2005)** Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer, Dordrecht pp. 389-402

- Gupta PK, Timmis R, Holmstrom D (2005)** Cryopreservation of embryonal cells. En: Jain SM, Gupta PK (eds) Forestry Sciences. Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp 567-572
- Gupta PK, Timmis R, Timmis KA, Carlson WC, Welty EDE (1995)** Somatic embryogenesis in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 303-314
- Haberlandt G (1902)** Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111(1): 69-92
- Häggman H, Aronen T, Ryyänänen L (2000)** Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 707-728
- Häggman H, Ryyänänen L, Aronen T, Krajinakova J (1998)** Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 54: 45-53
- Hakman I, Fowke L (1987)** Somatic embryogenesis in *Picea glauca* (white spruce) and *Picea mariana* (black spruce). Can. J. Bot. 65: 656-659
- Hakman I, Fowke L, von Arnold S, Eriksson T (1985)** The development of somatic embryogenesis in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci. 38:53-59
- Hakman I, Stabel P, Engstrom P, Eriksson T (1990)** Storage protein accumulation during zygotic and somatic embryo development in *Picea abies* (Norway spruce). Physiol. Plant. 80: 441-445
- Hakman I, von Arnold S (1988)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension cultures of *Picea glauca* (white spruce). Physiol. Plant 72: 579-587
- Hargreaves CL, Foggo MN, Smith DR, Gordon ME (1999)** Development of protocols for the cryopreservation of zygotic embryos of *Pinus radiata* and subsequent plant regeneration. New Zealand J. For. Sci. 29(1): 54-63
- Hargreaves CL, Grace LJ, Holden DG (2002)** Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. Plant Cell Rep. 21: 40-45
- Hargreaves CL, Smith DR (1992)** Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 42: 327-333

- Harvengt L (2005)** Somatic embryogenesis in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). En: Jain S, Gupta PK (eds) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp107-119
- Hay I, Charest PJ (1999)** Somatic embryo germination and desiccation tolerance in conifers. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 61-96
- Heinze B, Schmidt J (1995)** Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryogenesis by RAPD analysis. *Euphytica* 85: 341-345
- Hohtola A (1995)** Somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 269-285
- Iraqi D, Tremblay FM (2001)** The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol. Plant.* 111: 381-388
- Jain MS, Dong N, Newton RJ (1989)** Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliottii*) from immature embryos cultured *in vitro*. *Plant Sci.* 65: 233-241
- Jalonen P, von Arnold S (1991)** Characterization of embryogenic cell lines of *Picea abies* in relation to their competence for maturation. *Plant Cell Rep.* 10: 384-387
- Jasik J, Salajova T, Kormutak A, Salaj J (1999)** Somatic embryogenesis in Hybrid firs. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 505-523
- Jones NB, van Staden J (1995)** Plantlet production from somatic embryos of *Pinus patula*. *J. Plant Physiol.* 145: 519-525
- Joy IV, Vogel HG, Thorpe TA (1991)** Development of white spruce somatic embryos: I. Storage product deposition. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 27: 32-41
- Kartha KK, Fowke LC, Leung NL, Caswell KL, Hakman I (1988)** Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of White spruce (*Picea glauca*). *J. Plant Physiol.* 132: 529-539
- Keinonen-Metälä K, Jalonen P, Euroola P, von Arnold S, von Weissenberg K (1996)** Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. For. Res.* 11: 242-250
- Kim YW, Moon HK (2007)** Regeneration of plant by somatic embryogenesis in *Pinus rigida* x *P. taeda*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 43: 335-342

- Klimaszewska K (1995)** Somatic embryogenesis in *Picea mariana* (Mill.) En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 67-79
- Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR, Sutton BC (2000)** Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36: 279-286
- Klimaszewska K, Cyr DR (2002)** Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology 48: 31-39
- Klimaszewska K, Devantier Y, Lachance D, Lelu MA, Charest PJ (1997)** *Larix laricina* (tamarack): somatic embryogenesis and genetic transformation. Can. J. For. Res. 27:538-550
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodríguez R, Lelu-Walter M. A (2009)** Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 45: 20-33
- Klimaszewska K, Park Y-S, 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, Smith D (1997)** Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. Physiol. Plantarum 100: 949-957
- Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park Y-S, Lelu-Walter MA (2007)** Recent progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. En: da Silva J, Shima K (eds). Tree and Forestry Science and Biotechnology Global Science Books 1(1): 11-25
- Klimaszewska K, Ward C, Cheliak WM (1992)** Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix x eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). J. Exp. Bot. 43: 73-79
- Konrádová H, Grigová M, Lipavská H (2003)** Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: 425-427
- Kong L, Attree SM, Evans DE, Binarova P, Yeung EC, Fowke LC (1999)** Somatic embryogenesis in white spruce: studies of embryo development and cell biology. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 1-28

- Kong L, von Aderkas P (2007)** Genotype effects on ABA consumption and somatic embryo maturation in interior spruce (*Picea glauca x engelmanni*) J. Exp. Bot. 58(6): 1525-1531
- Kong L, Yeung EC (1994)** Effects of ethylene and ethylene inhibitors on white spruce somatic embryo maturation. Plant Sci. 104: 71-80
- Krikorian AD (2000)** Historical insights into some contemporary problems in somatic embryogenesis. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 17-49
- Krogstrup P (1990)** Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. Plant Sci. 72: 115-123
- Lainé E, Bade B, David A (1992)** Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell suspensions of *Pinus caribaea*. Plant Cell Rep. 11: 295-298
- Lainé E, David A (1990)** Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. Plant Sci. 69: 215-224
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981)** Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60: 197-214
- Lelu 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. Physiol. Plant 105: 719-728
- Lelu MA, Bastien C, Klimaszewska K, Charest PJ (1994b)** An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*). Part 2. Control of germination and plantlet development. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36: 117-127
- Lelu MA, Bastien C, Klimaszewska K, Ward C, Charest PJ (1994a)** An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*). Part 1. Somatic embryo maturation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 36: 107-115
- Lelu MA, Boulay M, Arnaud Y (1987)** Obtention de cals embryogenes a partir de cotylédons de *Picea abies* (l.) Karst. Prélevés sur the jeunes plantes âgées de 3 a 7 après germination. C. R. Acad. Sci. Paris 305 (III): 105-109
- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006)** Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). Plant Cell Rep. 25: 767-776

- Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2008)** Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* L. through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult* 92: 31-45
- Levine M (1947)** Differentiation of carrot root tissue grown in culture. *Bull. Torrey Bot. Club* 74: 321
- Li X, Feng H, Huang F, Murphy JB, Gbur E (1998)** Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 22-26
- Li X, Huang F, Gbur E (1998)** Effect of basal medium, growth regulators and phytigel concentration of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Cell Rep.* 17: 298-301
- Lin X, Leung DW (2002)** Culture of isolated zygotic embryos of *Pinus radiata* D. Don. Part I: Factors influencing *in vitro* germination and growth of isolated embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 191-197
- Lipavská H, Konrádová H (2004)** Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 23-30
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985)** Influence of 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
- Lulsdorf MM, Tautorus TE, Kikcio SI, Dunstan DI (1992)** Growth parameters of embryogenic suspension cultures of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) and black spruce (*Picea mariana* Mill.) *Plant Sci.* 82: 227-234.
- Mackay JJ, Becwar MR, Park Y-S, Cordero JP, Pullman GS (2006)** Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genetics & Genomes* 2: 1-9
- Malabadi RB, Choudhury H, Tandon P (2004)** Initiation, maintenance and maturation of somatic embryos from thin apical dome sections in *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord) promoted by partial desiccation and Gellan gum. *Scientia Horticulturae* 102: 449-459
- Malabadi RB, Nataraja K (2006)** Cryopreservation and plant regeneration via somatic embryogenesis using shoot apical domes of mature *Pinus roxburghii* Sarg. trees. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42: 152-159
- Malabadi RB, van Staden J (2005a)** Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiol.* 25: 11-16

- Malabadi RB, van Staden J (2005b)** Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of *Pinus patula*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41: 181-186
- MARM (2006)** Anuario de Estadística Forestal. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/montes_politica_forestal/estadisticas_forestal/pdf/6_2006.xls
- Marum L, Estêvão C, Oliveira MM, Amâncio S, Rodrigues L, Miguel C (2004)** Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine- effect of cryoprotectant and suspension density. CryoLetters 25: 363-374
- Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2007)** Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43: 28-34
- Mathur G, Alkulkar VA, Nadgouda R (2003)** Cryopreservation of embryogenic cultures of *Pinus roxburghii*. Biologia Plantarum 46(2): 205-210
- Merkle S, Dean J (2000)** Forest tree biotechnology. Current opinion in biotechnology 11: 298-302
- Merkle SA, Montello PM, Xia X, Upchurch BL, Smith DR (2005)** Light quality treatments enhance somatic seedling production in three southern pine species. Tree Physiol. 26: 187-194
- Merkle SA, Nairn CJ (2005)** Hardwood Tree Biotechnology. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41: 602-619
- Merkle S, Parrot WA, Flinn BS (1995)** Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-203
- Merkle S, Parrot WA, Williams EG (1990)** Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. En: Bhojwani SS (ed) Plant tissue culture: applications and limitations. Elsevier Science Publishers BV. Amsterdam, pp. 67-101
- 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 Tiss. Org. Cult. 76: 121-130
- Miguel C, Tereso S, Marum L, Gonçalves S, Oliveira M (2001)** Embryogenic liquid cultures of maritime pine. En: COST843-WG 2 Meeting, 22-25 September, Thessaloniki, pp. 25-26

- Minocha R, Minocha SC, Long S (2004)** Polyamines and their biosynthetic enzymes during somatic embryo development in red spruce (*Picea rubens* Sarg.). In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 40: 572-580
- Montero G, Cañellas I (2000)** Selvicultura de *Pinus pinea* L. Estado actual de los conocimientos en España. Actas (I) del 1^{er} Simposio del pino piñonero (*Pinus pinea* L.) Valladolid. pp. 21-38
- Montoya, JM (1989)** El pino piñonero. Editorial Agrogúías Mundi-Prensa. Madrid.
- Mutke S, Sada B, Iglesias S, Gil L (2003)** Evaluación de la producción individual de piña en un banco clonal de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) en Madrid. Invest. Agrar.: Sist. Recur. For. 12(1): 149-157
- Nagmani R, Bonga JM (1985)** Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. Can. J. For. Res. 15: 1088-1091
- Nagmani R, Diner AM, Garton S, Zipf AE (1995)** Anatomical comparison of somatic and zygotic embryogeny in conifers. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds). Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 1. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 23-48
- Nagmani R, Diner AM, Sharma GC (1993)** Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). Can. J. For. Res. 23: 873-876
- Nehra NS, Becwar MR, Rottman WH, Pearson L, Chowdhury K, Ghang SJ, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang CS, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005)** Forest biotechnology: Innovative methods, emerging opportunities. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41: 701-717
- Newton RJ, Tang W, Jain SM (2005)** Slash pine (*Pinus elliottii* Engelm.). En: Jain S, Gupta PK (eds) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp1-10
- 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 Physiol. 24: 1259-1265
- Nørgaard JV (1997)** Somatic embryo maturation and plant regeneration in *Abies nordmanniana* Lk. Plant. Sci. 124: 211-221
- Nørgaard JV, Baldursson S, Krogstrup P (1992)** Establishment of embryogenic suspension cultures from embryogenic cultures of *Abies nordmanniana*, osmotic effects. En: Cost 87 Meeting-regeneration from suspension cultures, September 24-27, Drøbak, Norge, pp 67-69

- Nørgaard JV, Baldursson S, Krogstrup P (1993a)** Genotypic differences in the ability of embryogenic *Abies nordmanniana* cultures to survive cryopreservation. *Silvae Genet.* 42: 93-97
- Nørgaard JV, Duran V, Johnsen, Ø, Krogstrup P, Blaldursson S, von Aronld S (1993b)** Variations in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Can. J. For. Res.* 23: 2560-2567
- 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
- Owens JN, Molder M (1984a)** The reproductive cycle of interior spruce. Information Services Branch, B.C. Ministry of Forests. Victoria, B.C.
- Owens JN, Molder M (1984b)** The reproductive cycle of lodgepole pine. Information Services Branch, B.C. Ministry of Forests. Victoria, B.C.
- Park Y-S (2002)** Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59: 651-656
- Park Y-S, Barret JD, Bonga JM (1998)** Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34: 231-239
- Park Y-S, Bonga JM, Cameron SI, Barrett JD, Forbes K, DeVerno LL, Klimaszweska K (1999)** Somatic embryogenesis in Jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol 4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 491-504
- Park Y-S, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006)** Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 87-101
- Park Y-S, Pond SE, Bonga JM (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
- Park Y-S, Pond SE, Bonga JM (1994)** Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control in somatic embryos exposed to storage, maturation treatments, germination and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* 89: 742-750

- Percy RE, Klimaszewska K, Cyr DR (2000)** Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Can. J. For. Res.* 30: 1867-1876
- Pierik RLM (1990)** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Pond SE, von Aderkas P, Bonga JM (2002)** Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (desiccation after cold acclimation). *In vitro Cell. Dev. Biol.- Plant* 38: 334-341
- Prada MA, Gordo J, de Miguel J, Mutke S, Catalán G, Iglesias S, Gil L (1997)** Las regiones de procedencia de *Pinus pinea* L. en España. Organismo Autónomo de Parques Nacionales, MAPA, Madrid
- Prada MA, Mutke S (2008)** EUFORGEN Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino piñonero (*Pinus pinea*.) en España. Foresta. Madrid. 2 páginas
- Pullman GS, Chopra R, Chase KM (2006)** Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: Improvements in embryogenic tissue initiation by supplementation of medium with organic acids, vitamins B12 and E. *Plant Sci.* 170: 648-658
- Pullman GS, Johnson S (2002)** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Ann.For.Sci.* 59: 663-668
- Pullman GS, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N (2003a)** Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination and gene expression. *Plant Cell Rep.* 21: 747-758
- Pullman GS, Johnson S, van Tassel S, Zhang Y (2005a)** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 91-103
- Pullman GS, Mein J, Johnson S, Zhang Y (2005b)** Gibberelin inhibitors improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep.* 23: 596-605
- Pullman GS, Namjoshi K, Zhang Y (2003b)** Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): Improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate, and cytokinins adjustments. *Plant Cell Rep.* 22: 85-95
- Pullman GS, Skryabina A (2007)** Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep.* 26: 873-887
- Pullman GS, Zhang Y, Phan BH (2003c)** Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22: 96-104

- Radojevic L, Álvarez C, Fraga MF, Rodríguez R (1999)** Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. Ssp. *Salzmannii* embryos. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 35: 206-209
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M (2001a)** Influence of the embryonal-suspensor mass (ESM) sampling on development and proliferation of maritime pine somatic embryos. *Plant Sci.* 160: 473-479
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M (2001b)** Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. In *vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 29-34
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Garin E, Pâques M, Calvayrac R (1999)** Factors affecting the development of mature somatic embryos of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). En: Espinel S, Ritter E (eds) *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor' 99.* Vitoria-Gasteiz, España. pp. 271-274
- Ramarosandratana A, van Staden J (2003)** Tissue position, explant orientation and naphthaleneacetic acid (NAA) affect initiation of somatic embryos and callus proliferation in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 249-255
- Rancé IM, Tian W, Mathews H, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet C (1994)** Partial dessiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Rep.* 13: 647-651
- Reinert J (1958)** Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwiss.* 45: 344-345
- Ruud JN, Bercetche J, Pâques M (1992)** First evidence of somatic embryogenesis from needles of 1-year-old *Picea abies*. *Plant Cell Rep.* 11: 563-566
- Salaj T, Blehová A, Salaj J (2007a)** Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiol. Plant.* 29: 225-231
- Salaj T, Panis B, Swennen R, Salaj J (2007b)** Cryopreservation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. by a slow freezing method. *CryoLetters* 28(2): 69-76
- Salajová T, Salaj J (1992)** Somatic embryogenesis in European black pine (*Pinus nigra* Arn.). *Biol. Plant.* 34: 213-218
- Salajová T, Salaj J (2005)** Somatic embryogenesis in *Pinus nigra*: embryogenic tissue initiation, maturation and regeneration ability of established cell lines. *Biol. Plant.* 49: 333-339

- Salajová T, Salaj J, Jasik J, Kormutak A (1995)** Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 207-220
- Salajová T, Salaj J, Kormutak A (1999)** Initiation of embryogenic tissue and plantlet regeneration from somatic embryos of *Pinus nigra* Arn. Plant Sci. 145: 33-40
- Santanen A, Simola LK (1992)** Changes in polyamine metabolism during somatic embryogenesis in *Picea abies*. J. Plant Physiol. 140: 475-480
- Schenk RU, Hildebrandt AC (1972)** Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 100-204
- Schrijnemakers EW, van Iren FA (1995)** A two-step or equilibrium freezing procedure for the cryopreservation of plant cell suspensions. En: Day JG, McEllan MR (eds) Methods in molecular biology. Vol. 38. Totowa NJ: Humana Press, pp. 103-111
- Silveira V, dos Santos ALW, Astarita LV, Nodari RO (2000)** Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol.6. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 457-478
- Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP (2004)** Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 76: 53-60
- Singh H (1978)** Embryology of gymnosperms. Borntraeger. Berlin
- Smith DR (1999)** Successful rejuvenation of radiata pine. Proceedings 25th Biennial Southern Forest Tree Improvement Conference. New Orleans, Louisiana, USA. July 11-14, pp. 158-167
- Smith DR, Singh AP, Wilton L (1985)** Zygotic embryos of *Pinus radiata* *in vivo* and *in vitro*. En: Smith DR (ed). Proceedings International Conifer Tissue Culture Work Group. Forest Research Institute, New Zealand Forest Service, Rotoura, New Zealand, p. 21
- Smith DR, Warr A, Grace L, Walter C, Hargreaves C (1994)** Somatic embryogenesis joins the plantation forestry revolution in New Zealand. En: Proceedings of TAPPI 1994 Biological Sciences Symposium pp 19-24
- Sorensen FC (1982)** The role of polyembryony and embryo viability in the genetic system of conifers. Evolution 36: 725-733
- SPSS, Inc (2008)** SPSS 16.0 for Windows. Chicago, Illinois

- Stasolla C, Kong L, Yeung EC, Thorpe TA (2002)** Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38: 93-105
- Stasolla C, Yeung EC (2003)** Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 15-35
- StatSoft, Inc (1996)** STATISTICA for Windows. Tulsa. OK.
- Steward FC (1958)** Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *Am. J. Bot.* 45: 709
- Strasburger E (1878)** Über polyembryonie. *Jenaische Z. Naturwiss.* 12: 647
- Sutton B (2002)** Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann. For. Sci.* 59: 657-661
- Tang W, Guo Z, Ouyang F (2001)** Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37: 558-563
- Tang W, Newton RJ (2003)** Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Rep.* 22: 1-15
- Tang W, Newton RJ (2005)** Loblolly pine (*Pinus taeda*). En: Jain S, Gupta PK (eds) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp 95-106
- Tautorus TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991)** Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69: 1873-1899
- Teasdale RD, Dawson PA, Woolhouse HW (1986)** Mineral nutrient requirements of a loblolly pine (*Pinus taeda*) cell suspension culture. *Plant Physiol.* 82: 942-945
- Thompson RG, von Aderkas P (1992)** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of western larch. *Plant Cell Rep.* 11: 379-385
- Toering A, Pullman GS (2005)** Modelling available 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid in a tissue culture medium containing activated charcoal. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 179-188
- Toribio M (2001)** Application of biotechnological tools in the genetic breeding of forest species. *Melhoramento.* 37: 148-160
- Toribio M, Celestino C, Molinas M (2005)** Cork oak, *Quercus suber* L. En: Jain S, Gupta PK (eds) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp 445-458
- Touchell DH, Chiang VL, Tsai CJ (2002)** Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Rep.* 21: 118-124

- Tremblay FM (1990)** Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from embryos isolated from stored seeds of *Picea glauca*. *Can. J. Bot.* 68: 236-242
- Tremblay L, Levasseur C, Tremblay FM (1999)** Frequency of somaclonal variation in plants of black spruce (*Picea mariana*, *Pinaceae*) and white spruce (*Picea glauca*, *Pinaceae*) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability. *Am. J. Bot.* 86: 1373-1381
- Umehara M, Kamada H (2005)** Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotech.* 22: 253-260
- Vágner M, Fischerová L, Spacková J, Vondráková Z (2005)** Somatic embryogenesis in Norway spruce. En: Jain S, Gupta PK (eds) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Vol. 77, pp141-155
- Valdés AE, Ordás RJ, Fernández B, Centeno ML (2001)** Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 377-384
- van Winkle SC, Pullman GS (2005)** Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant Cell Rep.* 24: 201-208
- Vasil IK (1995)** Cellular and molecular genetic improvement of cereals. En: Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology (Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 5-18
- von Aderkas P, Bonga JM (2000)** Influencing micropropagation and somatic embryogenesis in mature trees by manipulation of phase change, stress and culture environment. *Tree Physiol.* 20: 921-928
- von Aderkas P, Label P, Lelu MA (2002)** Charcoal affects early development and hormonal concentrations of somatic embryos of hybrid larch. *Tree Physiol.* 22: 431-434
- von Arnold S, Egertsdotter U, Ekberg I, Gupta P, Mo H, Nørgaard J (1995)** Somatic embryogenesis in Norway spruce (*Picea abies*). En: Jain S, Gupta PK, Newton RJ (eds) Somatic embryogenesis in woody plants. Vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 17-36
- von Arnold S, Eriksson T (1981)** *In vitro* studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Can. J. Bot.* 59: 870-874

- von Arnold S, Hakman I (1988)** Regulation of somatic embryo development in *Picea abies* by abscisic acid (ABA). *J. Plant Physiol.* 132: 164-169
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002)** Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 69: 233-249
- Yeung EC (1995)** Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. En: Thorpe TA (ed) *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 205-249
- Yildirim T, Kaya Z, Işık K (2006)** Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* Ten. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 67-76
- Zobel BJ, Talbert JT (1984)** Applied forest tree improvement. John Wiley and sons. New York.
- Zoglauer K, Behrendt U, Rahmat A, Ross H, Taryono (2003)** Somatic embryogenesis – the gate to biotechnology in conifers. En: Laimer M, Rucker W (eds) *Plant tissue culture – 100 years since Gottlieb Haberlandt.* Springer pp 175-202

11. Anexos

Anexo 1: Composición de los medios basales DCR (Gupta y Durzan, 1985), LP (Lepoivre mod. por Aitken-Christie, 1984; macronutrientes diluidos a la mitad), 505 (Pullman y Johnson, 2002), mL_V₂ (Park y col., 2006), mL_V (Klimaszewska y col., 2001), AFC (Bonga, 2004), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y Harvengt (Harvengt, 2005). Las cantidades se expresan en mg/l, excepto los azúcares y el agente gelificante.

	DCR	LP	505	mLV ₂	mLV	AFC	SH	Harvengt	
Macronutrientes	<i>NH₄NO₃</i>	400	400	200	825	825	83	-	400
	<i>NH₄ H₂PO₄</i>	-	-	-	-	-	-	300	-
	<i>KNO₃</i>	340	1800	909,9	950	950	950	2500	340
	<i>MgSO₄ 7 H₂O</i>	370	360	246,5	925	925	308	400	37
	<i>KH₂PO₄</i>	170	270	136,1	170	170	340	-	170
	<i>MgCl₂ 6 H₂O</i>	-	-	101,7	-	-	-	-	-
	<i>Mg (NO₃)₂ 6 H₂O</i>	-	-	256,5	-	-	-	-	-
	<i>Ca (NO₃)₂ 4H₂O</i>	556	1200	236,2	-	-	-	-	55,6
	<i>CaCl₂ 2 H₂O</i>	85	-	-	11	11	-	200	85
<i>Ca (H₂PO₄)₂</i>	-	-	-	-	-	200	-	-	
Micronutrientes	<i>FeSO₄ 7 H₂O</i>	27,8	30	13,9	27,8	27,8	13,9	27,8	27,8
	<i>Na₂ EDTA 2 H₂O</i>	37,3	40	18,65	37,3	37,3	18,7	37,3	37,3
	<i>H₃BO₃</i>	6,2	6,2	15,5	31	31	15	6,2	6,2
	<i>MnSO₄ H₂O</i>	22,3	1	10,5	21	21	10	16,9	16,9
	<i>ZnSO₄ 7 H₂O</i>	8,6	8,6	14,69	43	43	21	8,6	10,6
	<i>Na₂MoO₄ 2 H₂O</i>	0,25	0,25	0,125	0,63	1,25	0,6	0,25	0,25
	<i>CuSO₄ 5 H₂O</i>	0,25	0,025	0,1725	0,25	0,5	0,25	0,025	0,025
	<i>CoCl₂ 6 H₂O</i>	0,025	0,025	0,125	0,01	0,125	0,065	0,025	0,025
	<i>KI</i>	0,83	0,08	4,15	2,1	4,15	2	0,83	0,83
<i>NiCl₂</i>	0,025	-	-	0,72	-	-	-	-	
Cofactores	<i>Ac. Nicotínico</i>	0,5	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25
	<i>Piridoxina HCl</i>	0,5	-	0,5	0,1	0,1	0,1	0,5	0,25
	<i>Tiamina HCl</i>	1	0,4	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5
	<i>Glicina</i>	2	-	2	-	-	-	2	1
	<i>Glutamina</i>	-	-	450	500	500	500	-	500
	<i>Mioinositol</i>	200	1000	Según ensayos	100	100	100	100	200
	<i>H. de caseína</i>	-	-	Según ensayos	1000	1000	1000	-	500
	<i>Sacarosa</i>	30 g/l	30 g/l	Según ensayos	10 g/l	Según ensayos	Según ensayos	Según ensayos	30 g/l
	<i>Maltosa</i>	-	-	Según ensayos	-	Según ensayos	Según ensayos	Según ensayos	-
	<i>Gerlite®</i>	2 g/l	2,5 g/l	Según ensayos	4 g/l	Según ensayos	Según ensayos	Según ensayos	-
	<i>Plantagar</i>	-	-	Según ensayos	-	Según ensayos	Según ensayos	Según ensayos	6 g/l

Anexo 2: Medios de cultivo empleados en explantos embrionarios: embriones cigóticos maduros (ECM) y embriones cigóticos inmaduros (ECI).

Componentes	Medio de cultivo										
	DCR	LP1	PJ1	PJ2	PJ3	L-mLV ₂	M-mLV ₂	H-mLV ₂	UH-mLV ₂	M-mLV	H-mLV
Medio base	DCR	LP	505	505	505	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	m LV	m LV
Mioinositol (g/l)	0,2	1	0,02	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H.Caseína (g/l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1
L-Glutamina (g/l)	0,05	0,05	0,45	0,45	0,45	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ác. Ascórbico (g/l)	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbón Activo (g/l)	-	-	0,05	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-
Sacarosa (g/l)	30	30	-	-	-	10	10	10	10	20	20
Maltosa (g/l)	-	-	15	15	15	-	-	-	-	-	-
Gerlite® (g/l)	2	2,5	2,5	2,5	2,5	4	4	4	4	4	4
2.4-D (µM)	-	-	-	-	-	2,4	9	15	20	9,5	15
ANA (µM)	10	10	-	-	10	-	-	-	-	-	-
BAP (µM)	4	4	-	-	4	2,2	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
TDZ (µM)	-	-	18	18	-	-	-	-	-	-	-
ECM	2003	2003	2003/4	2004	2004	2004	-	-	-	-	-
ECI	-	-	-	-	-	2005	2005/06	2005/06	2006	2006	2006

Anexo 3: Medios de cultivo empleados en explantos no embrionarios.

Componentes	Medio de cultivo												
	LP1	LP2	LP3	PJ1	PJ2	PJ3	PJ4	PJ5	PJ6	L-mLV ₂	H-mLV ₂	P-mLV ₂	U-mLV ₂
Macronutrientes	LP	LP	LP	505	505	505	505	505	505	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	mLV ₂
Micronutrientes	LP	LP	LP	505	505	505	505	505	505	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	mLV ₂
Cofactores	LP	LP	LP	505	505	505	505	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	m LV ₂	mLV ₂
Mioinositol (g/l)	1	1	1	0,02	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
H. Caseína (g/l)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1
L-Glutamina (g/l)	0,05	0,05	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,5	0,5	0,5	0,5
Ác. Ascórbico (g/l)	0,04	0,04	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbón Activo (g/l)	-	-	-	0,05	0,05	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-
Sacarosa (g/l)	30	30	30	-	-	-	30	10	10	10	10	10	10
Maltosa (g/l)	-	-	-	15	15	15	-	-	-	-	-	-	-
Gerlite® (g/l)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	4	4	4	4	4	4
2.4-D (µM)	-	10	-	-	-	-	-	-	-	2,4	15	20	30
ANA (µM)	10	-	-	-	-	10	-	15	30	-	-	25	-
BAP (µM)	4	4	-	-	-	4	-	4,5	4,5	2,2	4,5	9	4,5
TDZ (µM)	-	-	9	18	18	-	18	-	-	-	-	-	-
Estróbilos femeninos	2004	-	-	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estróbilos masculinos	2004	2004	-	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acículas en expansión	2004	-	2004	2005	2004	2004/05	2004	-	-	2005	-	-	-
Braquiblastos	-	-	-	2005	-	2005/08	-	2008	2008	2005	2006/08	2006	2008
Yemas	-	-	-	-	-	2008	-	2008	2008	-	2006/08	2006	2008

11. Anexos

Anexo 4: Incremento relativo de peso fresco de seis líneas embriogénicas controles (no tratadas con agentes crioprotectores), pretratadas con agentes crioprotectores, y pretratadas con agentes crioprotectores y congeladas, durante cuatro subcultivos bisemanales. Los datos son medias \pm es de 5 repeticiones por línea embriogénica y tratamiento.

Semanas en cultivo	Genotipo	Pretratamiento				Pretratamiento y congelación		
		Control	DMSO 4,5	DMSO 7,5	DMSO 15	DMSO 4,5	DMSO 7,5	DMSO 15
2 s	7F11	12,52 \pm 2,8	2,25 \pm 0,6	3,10 \pm 0,4	0,47 \pm 0,1	0,45 \pm 0,1	1,05 \pm 0,5	0,54 \pm 0,1
	5F47	17,14 \pm 2,2	1,33 \pm 0,2	2,68 \pm 0,4	0,62 \pm 0,2	0,71 \pm 0,3	0,64 \pm 0,3	1,03 \pm 0,4
	2F47	19,17 \pm 4,0	2,82 \pm 0,5	3,65 \pm 0,3	0,69 \pm 0,05	0,77 \pm 0,1	0,74 \pm 0,1	1,48 \pm 0,6
	3F58	10,80 \pm 2,1	2,57 \pm 0,7	1,90 \pm 0,4	0,49 \pm 0,05	0,86 \pm 0,2	1,04 \pm 0,2	0,94 \pm 0,2
	9F58	15,67 \pm 2,8	7,52 \pm 1,8	4,27 \pm 0,3	1,21 \pm 0,2	0,71 \pm 0,2	0,77 \pm 0,1	0,84 \pm 0,2
	6F88	3,84 \pm 1,1	0,49 \pm 0,2	1,09 \pm 0,1	0,17 \pm 0,05	0,61 \pm 0,1	0,74 \pm 0,2	0,90 \pm 0,1
		13,2\pm1,4	2,8\pm0,5	2,7\pm0,2	0,6\pm0,1	0,7\pm0,1	0,8\pm0,1	1,0\pm0,1
4 s	7F11	26,59 \pm 6,2	4,19 \pm 1,6	4,52 \pm 0,6	7,36 \pm 2,0	0,53 \pm 0,1	1,11 \pm 0,5	0,57 \pm 0,1
	5F47	44,40 \pm 4,7	1,88 \pm 0,3	14,71 \pm 2,7	19,55 \pm 3,5	0,72 \pm 0,3	0,70 \pm 0,3	1,09 \pm 0,4
	2F47	44,94 \pm 9,0	11,85 \pm 1,8	8,61 \pm 0,7	9,06 \pm 0,9	0,77 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	1,54 \pm 0,7
	3F58	26,89 \pm 5,1	6,91 \pm 1,7	4,59 \pm 1,1	4,35 \pm 0,8	0,97 \pm 0,2	1,14 \pm 0,3	1,05 \pm 0,2
	9F58	39,72 \pm 3,7	41,65 \pm 9,3	28,10 \pm 6,6	27,78 \pm 2,6	0,80 \pm 0,2	0,84 \pm 0,1	0,93 \pm 0,2
	6F88	8,81 \pm 2,7	0,92 \pm 0,3	1,37 \pm 0,2	0,88 \pm 0,3	0,72 \pm 0,1	0,85 \pm 0,2	0,95 \pm 0,1
		31,6\pm3,2	11,2\pm3,0	8,6\pm1,8	11,6\pm1,9	0,8\pm0,1	0,9\pm0,1	1,0\pm0,1
6 s	7F11	29,97 \pm 6,2	8,25 \pm 4,0	10,66 \pm 1,8	11,41 \pm 3,2	0,53 \pm 0,1	1,13 \pm 0,5	0,57 \pm 0,1
	5F47	51,91 \pm 6,2	3,72 \pm 0,6	44,92 \pm 4,1	44,72 \pm 4,6	0,73 \pm 0,3	0,81 \pm 0,3	1,12 \pm 0,4
	2F47	67,28 \pm 14,4	37,44 \pm 6,4	41,64 \pm 3,7	21,78 \pm 2,0	0,78 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	1,54 \pm 0,7
	3F58	42,62 \pm 8,5	14,29 \pm 1,4	18,95 \pm 3,0	9,73 \pm 2,0	0,97 \pm 0,2	1,15 \pm 0,2	1,93 \pm 0,4
	9F58	40,62 \pm 10,8	64,22 \pm 15,3	56,64 \pm 5,9	50,36 \pm 7,1	0,80 \pm 0,2	1,04 \pm 0,1	1,15 \pm 0,2
	6F88	16,46 \pm 4,1	2,21 \pm 0,6	1,72 \pm 0,2	0,88 \pm 0,3	0,72 \pm 0,1	1,03 \pm 0,1	0,96 \pm 0,1
		41,5\pm4,5	21,9\pm5,1	25,8\pm4,0	23,2\pm3,8	0,8\pm0,1	1,0\pm0,1	1,2\pm0,2
8 s	7F11	30,43 \pm 6,0	16,51 \pm 7,5	33,56 \pm 5,9	19,29 \pm 4,7	0,58 \pm 0,1	1,64 \pm 0,6	0,58 \pm 0,1
	5F47	54,27 \pm 5,4	14,80 \pm 2,7	52,55 \pm 2,3	57,60 \pm 6,9	0,74 \pm 0,3	0,93 \pm 0,4	1,44 \pm 0,6
	2F47	84,40 \pm 16,1	66,13 \pm 9,3	65,21 \pm 9,5	44,46 \pm 1,4	0,81 \pm 0,1	0,83 \pm 0,1	1,62 \pm 0,7
	3F58	50,89 \pm 12,3	27,83 \pm 6,6	36,58 \pm 4,7	31,93 \pm 6,5	0,97 \pm 0,2	1,26 \pm 0,3	9,22 \pm 3,7
	9F58	52,15 \pm 13,7	87,31 \pm 23,6	64,12 \pm 9,6	67,49 \pm 6,7	0,80 \pm 0,2	4,22 \pm 2,7	3,74 \pm 1,4
	6F88	33,26 \pm 7,4	5,14 \pm 2,1	2,60 \pm 0,2	0,94 \pm 0,2	0,75 \pm 0,1	1,03 \pm 0,1	1,02 \pm 0,1
		50,9\pm5,2	37,7\pm7,3	40,0\pm5,0	36,7\pm4,8	0,8\pm0,1	1,7\pm0,5	2,7\pm0,8