

## El ambiente químico en la etapa de germinación en la embriogénesis somática de *Pinus halepensis*: implicaciones en las características morfológicas de las plántulas desarrolladas

### The chemical environment at germination stage in *Pinus halepensis* somatic embryogenesis: implications in the morphological characteristics of the developed plantlets

#### Antonia Maiara Marques Do Nascimento

Departamento de Ciencias Forestales, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-BRTA), España

#### Itziar Aurora Montalbán \*

Departamento de Ciencias Forestales, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-BRTA), España

#### Paloma Moncaleán

Departamento de Ciencias Forestales, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-BRTA), España

#### Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

vol. 121, Esp., 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 08/08/2022

Aprobación: 06/10/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546001/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e099>

\*Autor de correspondencia: [imontalban@neiker.eus](mailto:imontalban@neiker.eus)



## Resumen

La embriogénesis somática es un método prometedor de propagación de coníferas, pero necesita de protocolos optimizados de acuerdo con las diferentes etapas del proceso y la especie modelo. *Pinus halepensis* Mill. (pino carrasco) es una especie utilizada ampliamente en la reforestación y se logró desarrollar el procedimiento de embriogénesis somática satisfactoriamente pero aun así, existe baja germinación y conversión de embriones somáticos en plantas. En este sentido, promover cambios en el ambiente químico en la etapa de germinación es una alternativa para aumentar las tasas de germinación y la consecuente obtención de plantas somáticas. Teniendo esto en cuenta, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbohidratos aplicadas durante la etapa de germinación de los embriones somáticos de *P. halepensis*, sobre el éxito de este proceso y la morfología de las plantas somáticas obtenidas. Se observó un aumento estadísticamente significativo en las tasas de germinación, en la longitud total de las plantas somáticas, así como en la longitud de la raíz principal cuando los embriones somáticos fueron cultivados en el medio de germinación suplementado con maltosa.

**Palabras clave:** aclimatación, coníferas, embriones somáticos, maltosa, sacarosa

## Abstract

Somatic embryogenesis is a promising method of propagation of conifers, but it requires optimized protocols according to the different stages of the process and the model species. *Pinus halepensis* Mill. (Aleppo pine) is a species widely used in reforestation and the somatic embryogenesis procedure was successfully developed, but even so, there is low germination and conversion of somatic embryos into plants. In this sense, promoting changes in the chemical environment in the germination stage is an alternative to increase germination rates and the consequent obtaining of somatic plants. Taking this into account, the objective of this work was to evaluate the influence of different carbohydrate sources applied during the germination stage of the somatic embryos of *P. halepensis*, on the success of this process and the morphology of the somatic plants obtained. A statistically significant increase in germination rates, total length of somatic plants, as well as principal root length was observed when somatic embryos were cultured in maltose-supplemented germination medium.

**Keywords:** acclimatization, conifers, somatic embryos, maltose, sucrose

## INTRODUCCION

La embriogénesis somática es un método prometedor para la propagación vegetativa de un gran número de coníferas (Gupta et al., 1993). Esta técnica se basa en la totipotencia celular produciendo una planta completamente nueva a partir de una sola célula. Sin embargo, el éxito del procedimiento depende de los genotipos, la etapa de desarrollo, los explantos iniciales, los factores de transcripción y del ambiente químico de cultivo (Fehér, 2019; Su et al., 2021).

*Pinus halepensis* Mill. (pino carrasco) es una especie de conífera utilizada ampliamente para la forestación en las zonas del noroeste de la Península Ibérica debido a su plasticidad fenotípica (Abelló, 1988; Voltas et al., 2018). No obstante, aunque se ha conseguido la regeneración de plántulas en *P. halepensis* vía embriogénesis somática (Montalbán et al. 2013; Pereira et al. 2021), es importante lograr una mayor optimización con respecto a las condiciones químicas en todas las diferentes etapas del proceso, especialmente en la etapa de germinación, y la posterior conversión en plántulas de los embriones somáticos (do Nascimento et al., 2020).

En los últimos años, los estudios realizados en nuestro grupo de investigación han tenido como objetivo buscar la optimización de las etapas de iniciación, proliferación y maduración de la embriogénesis somática en *P. halepensis* (do Nascimento et al., 2021). Recientemente, los estudios se han centrado en promover y mejorar el proceso embriogénico en términos de calidad y cantidad de embriones somáticos obtenidos por la modificación del ambiente químico de cultivo durante la maduración de los embriones somáticos en *P. halepensis* (Pereira et al., 2016, 2017; do Nascimento et al., 2021).

La presencia de diferentes fuentes de carbohidratos actúa como fuente de energía para las células (Gulzar et al., 2020). Además, alteran el ambiente químico de cultivo dado que los carbohidratos utilizados en la embriogénesis somática aumentan la osmolaridad del medio nutritivo (Kubeš et al., 2014; do Nascimento et al., 2021). La sacarosa es la fuente más común de carbohidratos en el medio de cultivo (Kaur et al., 2022); sin embargo, algunas especies de coníferas, como *P. uncinata subsp. uliginosa* G.E. Neumann Businský (pino negro), responden mejor cuando la maltosa es utilizada como fuente de carbohidratos durante la embriogénesis somática (Vlašínová et al., 2017).

Teniendo en cuenta los estudios antes mencionados, el objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes fuentes de carbohidratos aplicadas durante la etapa de germinación de los embriones somáticos de *P. halepensis* sobre el éxito de este proceso y la morfología de las plantas somáticas obtenidas.

## METODOLOGÍA

### **MATERIAL VEGETAL**

Se recolectaron conos femeninos inmaduros de *P. halepensis* en un huerto semillero establecido por Neiker-BRTA en Berantevilla (España), y se iniciaron y proliferaron las masas embriogénicas siguiendo el protocolo descrito por Montalbán et al. (2013). Las masas embriogénicas fueron maduras siguiendo el protocolo descrito por do Nascimento et al. (2021) en medio DCR (Gupta & Durzan, 1985) suplementado con 175 mM de maltosa, 9 g.L<sup>-1</sup> de Gelrite® y 75 mM de ácido abscísico y después del autoclavado, los medios fueron suplementados con una mezcla de aminoácidos según lo descrito por Walter et al. (2005). Los cultivos se mantuvieron a 23°C y en oscuridad durante 16 semanas en medio de maduración.

### **EXPERIMENTO DE GERMINACIÓN**

La germinación de los embriones somáticos en estado cotiledonar y la aclimatación de las plántulas se realizó según Montalbán & Moncaleán (2019) con modificaciones. Brevemente, los embriones somáticos germinaron durante 8 semanas en medio LP con los macronutrientes reducidos a la mitad [Quoirin & Lepoivre (1977), modificado por Aitken-Christie et al. (1988)], suplementado con 2 g.L<sup>-1</sup> de carbón activado, 9 g.L<sup>-1</sup> de Difco Agar granulado (Becton y Dickinson) y dos fuentes de carbohidratos diferentes: 175 mM de sacarosa (tratamiento control) o 175 mM de maltosa. Se utilizaron placas de Petri (90 mm x 15 mm) como contenedores de cultivo, con las raíces de los embriones somáticos apuntando hacia abajo en un ángulo de aproximadamente 60°. Después de esto, las plántulas germinadas fueron subcultivadas en el mismo medio por un mes más, pero en EcoBox® (Eco2Box/filtro verde: recipiente de polipropileno con tapa hermética "respirable", 125 mm x 65 mm x 80 mm, Duchefa). Los cultivos se mantuvieron a 23°C bajo un

fotoperíodo de 16 h a  $120 \mu\text{molm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  proporcionado por tubos fluorescentes de color blanco frío (TFL 58 W/33; Philips, Francia). Después de la germinación, las plántulas se aclimataron en macetas de  $43 \text{ cm}^3$ , que contenían turba rubia (Pindstrup, Ryomgård, Dinamarca): vermiculita (8:2, v/v) en invernadero bajo condiciones controladas.

#### **TOMA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Después de dos meses en los medios de germinación, se calculó la tasa de germinación de los embriones somáticos. Antes de la aclimatación *ex vitro*, se midió con un calibre digital la longitud total de las plántulas (mm), la longitud de la parte aérea (mm), la anchura de las acículas (mm), el diámetro del tallo (mm) y la longitud de la raíz principal (mm). Además, se contó el número de raíces secundarias en 10 plántulas por tratamiento. El porcentaje de aclimatación se calculó después de 2 meses en condiciones *ex vitro*.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la germinación y las características morfológicas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias de medias fueron evaluadas mediante las pruebas de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Todos los datos fueron analizados utilizando el software R® (R Core Team, 2021).

## **RESULTADOS**

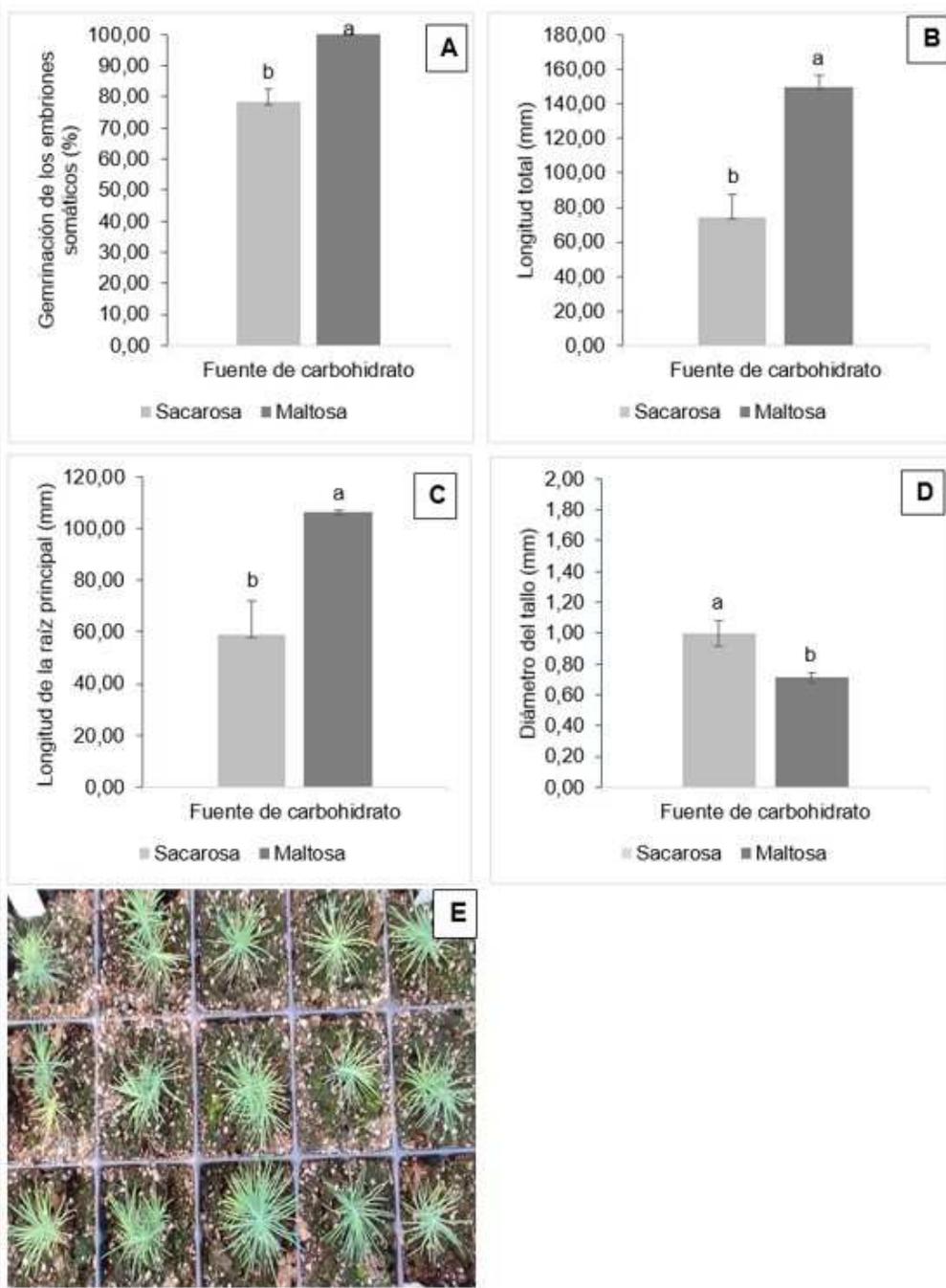
Los medios de germinación con diferentes fuentes de carbohidratos provocaron un efecto estadísticamente significativo en el porcentaje de germinación (Tabla 1). El porcentaje de embriones somáticos germinados en medio suplementado con 175 mM de maltosa fue significativamente mayor que los germinados en medio con 175 mM de sacarosa (Figura 1A).

**Tabla 1**

*Análisis de varianza para el efecto de diferentes fuentes de carbohidrato FC sobre las características morfológicas de plántulas obtenidas a partir de embriones somáticos de Pinus halepensis Mill durante la fase de la germinación de la embriogénesis somática*

<b>Características morfológicas</b>	<b>Efecto</b>	<b>gl</b>	<b>F-valor</b>	<b>p-valor</b>
Porcentaje de germinación	FC	1	25,88	$\leq 0,01$ **
Longitud total	FC	1	28,61	$\leq 0,001$ ***
Longitud del tallo	FC	1	0,04	$> 0,05$ ns
Longitud de la raíz principal	FC	1	9,62	$\leq 0,01$ **
Espesura de acícula	FC	1	3,35	$> 0,05$ ns
Diámetro del tallo	FC	1	11,5	$\leq 0,01$ **
Número de raíces secundarias	FC	1	1,48	$> 0,05$ ns

**\*\***, **\*\*\*** Diferencias significativas en  $p \leq 0,01$  o  $p \leq 0,001$  respectivamente. **ns** no significativo en  $p \leq 0,05$ .  
**gl** grados de libertad



**Figura 1**

Germinación (%) de embriones somáticos de *Pinus halepensis* Mill. (A) y las características morfológicas de las plántulas: longitud total (mm) (B), longitud de la raíz principal (mm) (C) y diámetro del tallo (mm) (D). Plántulas aclimatadas obtenidas a partir de embriones somáticos germinados en medio suplementado con  $30 \text{ gL}^{-1}$  de maltosa, barra=2 cm (E). Las barras indican errores estándar. Las diferencias significativas en  $p \leq 0,05$  se indican mediante letras diferentes.

Las diferentes fuentes de carbohidratos afectaron significativamente la longitud total, la longitud de la raíz principal y el diámetro del tallo de plántulas obtenidos (Tabla 1). Sin embargo, para las demás características (longitud del tallo, espesura de acícula y número de raíces secundarias), no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1 y Tabla 2).

Se observó una longitud significativamente mayor en las plántulas germinadas en el medio suplementado con 175 mM de maltosa, mientras que las plántulas germinadas en el medio con 175 mM de sacarosa tuvieron una longitud total significativamente menor (Figura 1B). Esa misma tendencia ha sido observada para la longitud de la raíz principal, dado que el medio de germinación suplementado con maltosa provocó un aumento significativo en la longitud de la raíz principal con relación al medio de germinación suplementado con sacarosa (Figura 1C). Por otro lado, el efecto inverso ha sido observado para el diámetro del tallo, donde el medio de germinación suplementado con sacarosa provocó un aumento significativo en esa característica con relación al medio suplementado con maltosa (Figura 1D).

Todas las plantas obtenidas (Figura 1E) se aclimataron correctamente independientemente de la fuente de carbohidrato utilizada en el medio de germinación.

## DISCUSIÓN

Los problemas como la baja germinación y la consecuente conversión de embriones somáticos en plantas viables dificultan el proceso de embriogénesis somática, especialmente en *Pinus halepensis* (do Nascimento et al., 2020). Teniendo en cuenta este hecho, en nuestro trabajo se utilizaron dos fuentes distintas de carbohidratos en el medio de germinación de embriones somáticos. Se observó un aumento estadísticamente significativo en la germinación de los embriones somáticos, en la longitud de las plántulas obtenidas y en la longitud de la raíz principal de las plántulas de *P. halepensis* obtenidas en germinación en medio suplementado con 175 mM de maltosa en relación aquellas germinadas en medio del tratamiento control (175 mM de sacarosa). En concordancia con nuestros resultados, otros autores ya han reportado el efecto beneficioso de la maltosa en el proceso de la embriogénesis somática en otras especies de coníferas (Li et al., 1998; Klimaszewska & Cyr, 2002; dos Santos et al., 2002; Ma et al., 2012; do Nascimento et al., 2021). En línea con nuestros resultados, do Nascimento et al. (2021) han reportado que cuando la sacarosa ha sido reemplazada por maltosa, pero en su caso en el medio de maduración de los embriones somáticos de *P. halepensis*, se observa un aumento estadístico significativo en el porcentaje de germinación, en el diámetro del tallo, número de raíces secundarias y en la tasa de aclimatación de las plantas somáticas. Además, similar a nuestros resultados, la presencia de maltosa en el medio de cultivo durante la embriogénesis somática en *P. nigra* Arn. (pino salgareño) fue fundamental para la formación de embriones somáticos con la consiguiente conversión de plantas (Salaj et al., 2019). La maltosa presenta una hidrólisis lenta, por lo cual el bajo aporte de hexosas puede haber sido una señal bioquímica favorable para la germinación de los embriones somáticos en *P. halepensis*, como ha sido reportado en *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. (árbol del caucho) (Blanc et al., 2002). Contrariamente a nuestros resultados, 175 mM de sacarosa ha sido el principal carbohidrato utilizado en la germinación de muchas especies vegetales siendo esencial para el aumento de la germinación de los embriones somáticos (Montalbán et al., 2010; Fang et al., 2022). Además, la sacarosa es un carbohidrato que tiene una hidrólisis rápida con un alto suministro de compuestos de almacenamiento (Blanc et al., 2002). En este trabajo, la sacarosa en el medio de germinación ha provocado un aumento significativo en el diámetro del tallo con relación a la malto

**Tabla 2**

*Características morfológicas de plántulas somáticas de Pinus halepensis Mill. desarrolladas a partir de líneas celulares embriogénicas y germinadas en un medio de cultivo suplementado con diferentes carbohidratos (M±EE).*

Características morfológicas	175 mM de sacarosa	175 mM de Maltosa
Longitud del tallo (mm)	42,30 ± 3,95	43,18 ± 2,52
Espesura de acícula (mm)	0,26 ± 0,02	0,31 ± 0,02
Número de raíces secundarias	2 ± 0,96	3 ± 0,75

**EE** error estándar

## CONCLUSIÓN

La maltosa en el medio de germinación de los embriones somáticos favorece el éxito del proceso, así como la obtención de plantas somáticas aclimatadas con mayor longitud del tallo y de la raíz principal.

## Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el proyecto MINECO (Gobierno de España) (AGL2016-76143-C4-3R), MICINN (PID2020-112627RB-C32), CYTED (P117RT0522) y MINECO (BES-2017-081249, "Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores"). MULTIFOREVER [Proyecto MULTIFOREVER es apoyado bajo el paraguas de ERA-NET cofinanciado a través de Forest Value a través de ANR (FR), FNR (DE), MINCyT (AR), MINECO-AEI (ES), MMM(FI) y VINNOVA (SE)]. Forest value ha recibido financiación de la investigación e innovación Horizon 2020 de la Unión Europea programada bajo el acuerdo No. 773324.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abelló, M.A. (1988).** Historia y evolución de las repoblaciones forestales en España. Colección Tesis Doctorales 126: 88.
- Aitken-Christie, J.; A.P Singh & H. Davies. (1988).** Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. En: Genetic Manipulation of Woody Plants. Ed. Springer. pp. 413-432.
- Blanc, G.; L. Lardet; A. Martin; J.L. Jacob & M.P Carron. (2002).** Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). Journal of Experimental Botany 53: 1453-1462.
- do Nascimento, A.M.M.; P.A. Barroso; N.F.F. do Nascimento; T. Goicoa; M.D. Ugarte; I.A. Montalbán & P. Moncaleán. (2020).** *Pinus* spp. Somatic embryo conversion under high temperature: Effect on the morphological and physiological characteristics of plantlets. Forests 11: 1-14.
- do Nascimento, A.M.M.; L.G. Polesi; F.P. Back; N. Steiner; M.P. Guerra; A. Castander-Olarieta; P. Moncaleán & I.A. Montalbán. (2021).** The chemical environment at maturation stage in *Pinus* spp. somatic embryogenesis: implications in the polyamine profile of somatic embryos and morphological characteristics of the developed plantlets. Frontiers in Plant Science 12.
- dos Santos, A.L.W.; V. Silveira; N. Steiner; M. Vidor & M.P. Guerra. (2002).** Somatic embryogenesis in Parana pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). Brazilian Archives of Biology and Technology 45: 97-106.
- Fang, H.; Y. Dong; R. Zhou; Q. Wang; Q. Duan; C. Wang; Y. Bao; S. Xu; X. Lang; S. Gai; R. Chen & K.Q. Yang. (2022).** Optimization of the induction, germination, and plant regeneration system for somatic embryos in apomictic walnut (*Juglans regia* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 150(2): 289-297
- Fehér, A. (2019).** Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? Frontiers in Plant Science 10: 536.
- Gulzar, B.; A. Mujib; M.Q. Malik; R. Sayeed; J. Mamgain & B. Ejaz. (2020).** Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 18: 31.
- Gupta, P.K. & D.J. Durzan. (1985).** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). Plant Cell Reports 4: 177-179.
- Gupta, P.K.; G. Pullman; R. Timmis; M. Kreitinger; W.C. Carlson; J. Grob & E. Welty. (1993).** Forestry in the 21st Century. Bio/Technology 11: 454-459.
- Kaur, K.; D. Dolker; S. Behera & P.K. Pati. (2022).** Critical factors influencing *in vitro* propagation and modulation of important secondary metabolites in *Withania somnifera* (L.) dunal. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 149: 41-60.
- Klimaszewska, K. & D.R. Cyr. (2002).** Conifer somatic embryogenesis: I. Development. Dendrobiology 48: 31-39.

- Kubeš, M.; N. Drážná; H. Konrádová & H. Lipavská. (2014).** Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50: 45-57.
- Li, X.Y.; F.H. Huang; J.B. Murphy & E.E. Gbur. (1998).** Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 34: 22-26.
- Ma, X.; K. Bucalo; R.O. Determann; J.M. Cruse-Sanders & G.S. Pullman. (2012).** Somatic embryogenesis, plant regeneration, and cryopreservation for *Torreya taxifolia*, a highly endangered coniferous species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 48(3): 324-334.
- Montalbán, I.A. & P. Moncaleán. (2019).** Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. *Journal of Forestry Research* 30: 65-71.
- Montalbán, I.A.; N. de Diego & P. Moncaleán. (2010).** Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees* 24: 1061-1071.
- Montalbán, I.A.; A. Setién-Olarrá; C.L. Hargreaves & P. Moncaleán. (2013).** Somatic embryogenesis in *Pinus halepensis* Mill.: An important ecological species from the Mediterranean forest. *Trees-Structure and Function* 27: 1339-1351.
- Pereira, C.; I.A. Montalbán; O. García-Mendiguren; T. Goicoa; M.D. Ugarte; S. Correia; J.M. Canhoto & P. Moncaleán. (2016).** *Pinus halepensis* somatic embryogenesis is affected by the physical and chemical conditions at the initial stages of the process. *Journal of Forest Research* 21: 143-150.
- Pereira, C.; I.A. Montalbán; T.G. Mangado; M.D.U. Martínez; S. Correia; J. Canhoto & P. Moncaleán. (2017).** The effect of changing temperature and agar concentration at proliferation stage in the final success of Aleppo pine somatic embryogenesis. *Forest Systems* 26: 9.
- Pereira, C.; A. Castander-Olarieta; E. Sales; I.A. Montalbán; J. Canhoto & P. Moncaleán. (2021).** Heat stress in *Pinus halepensis* somatic embryogenesis induction: Effect in DNA methylation and differential expression of stress-related genes. *Plants* 10.
- Quoirin, M. & P. Lepoivre. (1977).** Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae* 78: 437-442.
- Salaj, T.; K. Klubicová; R. Matusova & J. Salaj. (2019).** Somatic embryogenesis in selected conifer trees *Pinus nigra* Arn. and *Abies* hybrids. *Frontiers in Plant Science* 10: 1-13.
- Su, Y.H.; L.P. Tang; X.Y. Zhao & X.S. Zhang. (2021).** Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming. *Journal of Integrative Plant Biology* 63: 228-243.
- R Core Team. (2021).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Vlašínová, H.; V. Neděla; B. Đorđević & L. Havel. (2017).** Bottlenecks in bog pine multiplication by somatic embryogenesis and their visualization with the environmental scanning electron microscope. *Protoplasma* 254: 1487-1497.
- Voltas, J.; T.A. Shestakova; T. Patsiou; G. di Matteo & T. Klein. (2018).** Ecotypic variation and stability in growth performance of the thermophilic conifer *Pinus halepensis* across the Mediterranean basin. *Forest Ecology and Management* 424: 205-215.
- Walter, C.; J.I. Find & L.J. Grace. (2005).** Somatic embryogenesis and genetic transformation in *Pinus radiata*. En: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. S.M. Jain & P.K. Gupta (coordinadores). Ed. Dordrecht: Springer. pp. 11–24.