

VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



ERI de Biotecnologia i Biomedicina  
Estructura de Recerca Interdisciplinar de la Universitat de València

Departamento de Biología Vegetal

Facultad de Farmacia

Aplicaciones de la embriogénesis somática para la  
propagación y mejora de *Quercus ilex* L. y *Pinus* spp.

Tesis Doctoral presentada por

Miquel Blasco i Carlos

Dirigida por la Dra. Isabel Arrillaga Mateos

Valencia, 2013



Dña Isabel Arrillaga Mateos, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Valencia

CERTIFICA: que la investigación de la presente Tesis Doctoral titulada “Aplicaciones de la embriogénesis somática para la propagación y mejora de *Quercus ilex* L. y *Pinus* spp.”, presentada para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Ciencias Biológicas y en Bioquímica, Miquel Blasco Carlos, en la Unidad de Investigación “Crecimiento y Desarrollo Vegetal”

Fdo. Isabel Arrillaga Mateos



Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL2007-66345, AGL2010-22292-C01-C03 y beca de investigación FPI), la Unión Europea (FEDER) y la Generalitat Valenciana (Prometeo 2009/075).

Quiero agradecer, además, las siguientes colaboraciones

- A las Dras. Ana María Vieitez y Elena Corredoira (Instituto de Investigaciones Agrarias de Galicia, CSIC), por su ayuda en el apartado de histología
- Al Dr. Jesús Muñoz (Institut de Biologia Cel·lular i Molecular de Plantes – IBCMP- València), por la preparación de las construcciones utilizadas en el capítulo de transformación.
- Al Dr. José Juárez (Institut Valencià d'Investigacions Agràries - IVIA), por su ayuda en los análisis de citometría de flujo
- Al Dr. Mariano Toribio (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario - IMIDRA), por el envío de las líneas embriogénicas de *Pinus pinea* y el material de encina.
- Al Dr. Neal Stewart (University of Tennessee; USA), por la aportación del plásmido pABC.
- A Francisco Lario (TRAGSA, Maceda, Ourense), por el envío de conos de *Pinus pinaster* de procedencia Anllo.
- Al CIEF (Centre per a la Investigació i l'Experimentació Forestal) de la Generalitat Valenciana), por el envío de conos de *Pinus pinaster* de procedencia Sinarcas y Sierra de Calderona.
- A Enrique Sastre (DGB, Dirección General de Biodiversidad, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino), por el envío de conos de *Pinus pinaster* de procedencia Soria-Burgos, Valsaín).



## AGRAÏMENTS

La Història de la Humanitat és el que és. Hi ha períodes de fam, de guerra, de bonança, d'incultura, d'il·lustració, de democràcia, de dictadura...

En el període actual, ens trobem en una situació en què una generació sencera (l'anomenada Generació X), està condemnada a no tindre futur. Han hagut moments molt més tràgics que l'actual, però és cert que viure una Tesis Doctoral en aquest context, és molt dur. És dur, no només perquè no ens dóna cap garantia de treball i això fa que la realitzem amb la pressió de no gastar, perquè després ens espera un llarg desert, sinó perquè, a més, hi ha moltes possibilitats de què acabe en el calaix dels records i no en podem traure profit laboral, més allà de les qüestions d'aprenentatge. I és molt d'esforç per la nostra part, i molts diners gastats per l'Estat, per l'altra. Quan parlo de l'Estat no em referisc a la nostra classe política, a qui "hem d'estar agraiïts" pel "gloriós moment que vivim", sinó al Poble, l'autèntic Sobirà, i a qui realment agraisc que m'haja pagat aquest aprenentatge.

No tot, però, és negatiu. La Tesis, tal com he insinuat, és un gran aprenentatge a molts nivells. A nivell laboral, científic, humà, de treball en equip, de com treballar sota la direcció d'altra persona...

En aquesta circumstància, igual que en qualsevol projecte que desenvolupe en la meua vida, vull agrair a tots aquells que heu estat al meu costat. Les persones no som màquines, som un popurri d'emocions que governen normalment la raó, i l'ajuda, el calor i l'empenta dels altres ens fan moure i assolir fites que, d'estar sols al món, mai podríem completar.

Així doncs, i per no avorrir-vos, primer que tot vull agrair l'ajuda, insisteixo, no sols en aquest projecte, sinó en qualsevol altre d'important, de la meua família. Lluís, Marisa i Miquel. Digue'm-ho clar: sense ells, la meua vida aniria per altre camí en l'actualitat. També vull agrair a la meua Directora (Dra. Isabel Arrillaga), de qui he après, no només ciència i funcionament laboral, sinó també a relacionar-me amb el meu cap i insistir en els objectius (una de les seues grans virtuts). També al Dr. Juan Segura, una persona impecable en el món de la ciència, amb nombroses aportacions a aquesta que serviran de fonament per a futures generacions. I per suposat, a tots vosaltres: aquells que heu discorregut i discorreu al meu costat en el camí de la vida. No sols dins del laboratori (en orde alfabètic: alumnes d'fp, becaris, col·laboradors, treballadors de la neteja, professors, tècnics de manteniment, de recerca...), com fora d'ell (parella, amistats, companys d'altres escoles de la vida, d'esferes esportives, d'oci en general...). Els darrers moments de la Tesi han estat molt durs, així que és precís posar el nom d'aquella persona que m'ha acompanyat especialment en aquestos moments: la meua parella, Lupe. No he volgut posar els noms de la resta, perquè sou moltíssims i valeu tant per a mi que és massa arriscat deixar-ne algun sòl; així que vos demane disculpes i pregue comprensió si esperàveu veure el vostre nom ací. Al meu parer, que no té per què ser el vostre, l'important son els sentiments que sabeu que vos guarde, i teniu per

segur que vos estic agraït perquè, com a mínim, gràcies en gran part a vosaltres, sóc el que sóc avui en dia.

Si heu arribat fins aquí, vos done l'enhonorabona per la paciència i vos desafie a continuar amb unes petites reflexions:

De tots és conegut l'esforç que nombrosos científics han fet arreu del Planeta per tal de curar malalties, pal·liar epidèmies, ajudar persones amb discapacitat, millorar el nivell de vida dels malalts crònics, etc...Científics que no només han hagut de lluitar en el laboratori contra grans mals de la Humanitat, sinó que prèviament han establert una batalla amb el Govern per a poder subvencionar els seus experiments. Herois, al cap i a la fi, que en molts casos no han estat reconeguts i que el seu nom no perdurarà al llarg de la Història. Però la ciència no és sempre així: com en totes les esferes de la vida, hi ha herois i dolents. Recentment he llegit llibres sobre Permacultura i sobre les grans empreses d'herbicides per al camp (que col·loquialment es coneixen amb el nom relaxat de fitosanitaris...què difícil resulta lligar la paraula "sanitari" amb quelcom fabricat per matar...). Un llibre que m'ha obert molt els ulls ha estat "El Món Segons Monsanto", de Marie Monique Robin. Com que la meua Tesi està basada amb la Biotecnologia Vegetal, m'agradaria plantejar unes preocupacions que fa temps que em ronden pel cap, i que aquest i altres llibres m'han forjat: està la ciència totalment allunyada del poder econòmic i/o polític? és la ciència sempre eclèctica? aquells científics que trenquen amb les seues demostracions paradigmes establerts i/o afectant el negoci de grans indústries, troben recolzament, no sols governamental, sinó dels seus propis companys de professió?

I més allà de totes aquestes qüestions: cap on va la ciència? Tenim en compte altres sistemes d'estudi? Realment pretenem entendre el món i/o millorar el Planeta? Mengem avui en dia carn, fruita i verdura de major qualitat i tenim una alimentació més sana que fa 100 anys? Vivim avui en un planeta més nèt?

Crec que ens trobem en un punt en què hauríem de reflexionar. Pensar cap on anem i què esperem obtindre en el futur. Un futur que, no oblidem, no serà pas nostre, sinó dels nostres fills, néts i rebesnéts. Tractar al Planeta bé o mal, directament és tractar bé o mal als nostres descendents. Quin futur els desitgem?

**ÍNDICE**

---



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág</b>
<b>I. Introducción</b> .....	1
I.1. Descripción y distribución de las especies objeto de estudio .....	2
I.1.1. <i>Quercus ilex</i> L. ....	2
I.1.2. <i>Pinus pinaster</i> Aiton .....	7
I.1.3. <i>Pinus pinea</i> L. ....	9
I.2. Programas de conservación y mejora y alternativas biotecnológicas .....	11
I.3. Propagación vegetativa .....	12
I.3.1. Embriogénesis somática.....	14
I.3.1.1. Etapas de la embriogénesis somática .....	15
I.3.1.1.1. Inducción de los cultivos embriogénicos .....	15
I.3.1.1.2. Proliferación y mantenimiento de cultivos embriogénicos.....	20
I.3.1.1.3. Maduración de los embriones somáticos .....	22
I.3.1.1.4. Germinación/conversión .....	25
I.3.1.1.5. Acondicionamiento de las plantas .....	26
I.3.1.2. Embriogénesis somática en especies del género <i>Quercus</i> .....	27
I.3.1.3. Embriogénesis somática en especies del género <i>Pinus</i> .....	28
I.4. Transformación genética .....	30
I.4.1. Transformación genética mediante el cocultivo con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	31
I.4.2. Optimización de la metodología .....	33
I.4.3. Aplicaciones de la tecnología de transferencia génica .....	35
<b>II. Objetivos</b> .....	39
<b>III. Embriogénesis somática en <i>Quercus ilex</i> L.</b> .....	41
III.1. Introducción .....	41
III.2. Material y métodos .....	42
III.2.1. Material vegetal .....	42
III.2.2. Medios y condiciones de cultivo .....	45
III.2.3. Esterilización y establecimiento de los cultivos .....	47
III.2.4. Inducción de embriogénesis somática en explantos de hoja .....	48
III.2.5. Inducción de embriogénesis somática en flores femeninas.....	50
III.2.5.1. Ensayos con bellotas seccionadas .....	50
III.2.5.2. Ensayos con lóculos aislados .....	50
III.2.6. Inducción de embriogénesis somática en flores masculinas.....	51
III.2.6.1. Efecto del medio de cultivo .....	51

III.2.6.2. Efecto del estadio de desarrollo del amento .....	53
III.2.7. Maduración de los embriones somáticos .....	53
III.2.7.1. Efecto de los azúcares y del medio de cultivo.....	53
III.2.7.2. Efecto del ABA, BA y la estratificación .....	54
III.2.7.3. Efecto del fraccionamiento en medio líquido.....	54
III.2.7.4. Efecto del inositol y el período de cultivo en ABA .....	55
III.2.8. Estudio histológico de la embriogénesis en <i>Quercus ilex</i> .....	56
III.2.8.1. Procesamiento de las muestras para inclusión en parafina .....	57
III.2.8.2. Preparación de las muestras en resina .....	59
III.2.9. Determinación del nivel de ploidía.....	61
III.2.10. Análisis estadístico.....	62
III.3. Resultados .....	63
III.3.1. Embriogénesis somática en hojas.....	63
III.3.1.1. Establecimiento de los cultivos.....	64
III.3.1.2. Inducción de embriogénesis somática .....	66
III.3.2. Inducción de embriogénesis somática en flores femeninas .....	72
III.3.2.1. Ensayos con flores seccionadas .....	72
III.3.2.2. Efecto de lóculos aislados.....	73
III.3.3. Ensayos con amentos y flores masculinas aisladas.....	76
III.3.3.1. Efecto del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento .....	77
III.3.3.2. Efecto del genotipo y de las concentraciones de ANA .....	79
III.3.3.3. Efecto de la edad del amento.....	81
III.3.4. Ensayos de maduración de embriones somáticos en encina.....	86
III.3.4.1. Efecto de los azúcares y del medio de cultivo.....	86
III.3.4.2. Efecto del ABA, BA y estratificación .....	87
III.3.4.3. Efecto del fraccionamiento en medio líquido .....	89
III.3.4.4. Efecto del inositol y el período de cultivo en ABA .....	90
III.3.5. Estudio histológico de la embriogénesis en <i>Quercus ilex</i> .....	92
III.3.6. Determinación del nivel de ploidía.....	101
III.4. Discusión.....	102
<b>IV. La embriogénesis somática como herramienta para la mejora de <i>Pinus</i></b>	
<b>    <i>pinaster</i> y <i>Pinus pinea</i> .....</b>	<b>111</b>
IV.1. Introducción .....	111
IV.2. Material y métodos.....	113
IV.2.1. Ensayos de maduración en líneas embriogénicas de <i>Pinus pinaster</i> ...	113
IV.2.1.1. Material vegetal.....	113

---

IV.2.1.2. Ensayos de maduración.....	115
IV.2.1.2.1. Maduración en medio líquido .....	115
IV.2.1.2.2. Efecto de la desecación y el periodo de cultivo con ABA.....	116
IV.2.1.2.3. Efecto del período de cultivo en ABA y de la presencia de carbón activo .....	117
IV.2.1.2.4. Efecto del soporte celular utilizado.....	117
IV.2.1.3. Conversión/germinación de los embriones somáticos .....	118
IV.2.1.4. Aclimatación y transferencia al invernadero .....	118
IV.2.2. Ensayos de expresión transitoria en <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus pinea</i> .....	119
IV.2.2.1. Material biológico .....	119
IV.2.2.2. Cepas bacterianas .....	119
IV.2.2.3. Preparación de las construcciones.....	119
IV.2.2.4. Medios y condiciones de cultivo .....	120
IV.2.2.5. Ensayos de expresión transitoria .....	120
IV.2.2.6. Análisis histoquímico del gen <i>gusA</i> .....	121
IV.2.2.7. Expresión transitoria en <i>Pinus pinaster</i> .....	122
IV.2.2.7.1. Efecto del período de infección .....	122
IV.2.2.7.2. Efecto de la concentración bacteriana .....	122
IV.2.2.7.3. Efecto del método de infección .....	123
IV.2.2.7.4. Efecto de diferentes construcciones.....	123
IV.2.2.8. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos .....	123
IV.2.2.9. Expresión transitoria en <i>Pinus pinea</i> .....	124
IV.2.2.9.1. Efecto de diferentes construcciones y de la cantidad de células vegetales a infectar.....	124
IV.2.2.9.2. Efecto del período de infección .....	124
IV.2.2.9.3. Efecto de la dilución bacteriana.....	124
IV.2.2.9.4. Efecto de la concentración de acetosiringona .....	124
IV.2.2.9.5. Efecto de diferentes plásmidos en la cepa AGL1 .....	125
IV.2.2.9.6. Efecto de diferentes cepas bacterianas .....	125
IV.2.2.10. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos .....	125
IV.2.3. Análisis estadístico.....	126
IV.3. Resultados y discusión.....	127
IV.3.4. Ensayos de maduración de líneas embriogénicas de <i>Pinus pinaster</i> ...	127
IV.3.4.1. Maduración en medio líquido .....	127
IV.3.4.2. Efecto de la desecación y el periodo de cultivo con ABA.....	129

IV.3.4.3. Efecto del período de cultivo con ABA y de la presencia de CA .....	134
IV.3.4.4. Efecto del soporte celular utilizado .....	142
IV.3.4.5. Conversión/germinación de los embriones somáticos .....	147
IV.3.5. Transformación genética en <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus pinea</i> , ensayos de expresión transitoria .....	150
IV.3.5.1. Expresión transitoria del gen <i>gusA</i> en <i>Pinus pinaster</i> .....	150
IV.3.5.1.1. Efecto del período de infección .....	150
IV.3.5.1.2. Efecto de la concentración bacteriana .....	151
IV.3.5.1.3. Efecto del método de infección .....	152
IV.3.5.1.4. Efecto de diferentes construcciones .....	152
IV.3.5.1.5. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos ....	154
IV.3.5.2. Expresión transitoria del gen <i>gusA</i> en <i>Pinus pinea</i> .....	155
IV.3.5.2.1. Efecto de diferentes construcciones y de la cantidad de células vegetales a infectar .....	155
IV.3.5.2.2. Efecto del período de infección .....	156
IV.3.5.2.3. Efecto de la dilución bacteriana .....	158
IV.3.5.2.4. Efecto de la concentración de AS .....	159
IV.3.5.2.5. Efecto de diferentes plásmidos en la cepa AGL1 .....	160
IV.3.5.2.6. Efecto de diferentes cepas bacterianas .....	160
IV.3.5.2.7. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos ....	162
IV.3.5.3. Discusión .....	163
<b>V. Conclusiones</b> .....	169
V.1. Embriogénesis somática en <i>Quercus ilex</i> .....	169
V.2. Maduración en <i>Pinus pinaster</i> .....	171
V.3. Transformación genética en <i>Pinus pinaster</i> y <i>Pinus pinea</i> , ensayos de expresión transitoria .....	172
Publicaciones y comunicaciones a congresos derivadas de esta memoria .....	174
<b>VI. Bibliografía</b> .....	175

## ABREVIATURAS

2iP: 2 isopentenil adenina

2,4-D: ácido 2,4-D-diclorofenoxiacético

AIB: ácido indol-3-butírico

ANA: ácido naftalén-acético

AS: acetosiringona (4'-hidroxi-3',5'-dimetoxiacetofenona)

BA: benciladenina

CA: carbón activo

CIEF: Centre per a la Investigació i l'Experimentació Forestal

CSIC: Centro Superior de Investigaciones Científicas

DAPI: 4'6-diamidino-2-fenilidol

DGB: Dirección General de Biodiversidad, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino

DMSO: dimetil sulfóxido

DO<sub>600nm</sub>: densidad óptica a 600 nm

EBR: epibrasinólido

ES: embriogénesis somática

ES/gPF: Embriones somáticos por gramo de peso fresco

FESPB: Federation of European Societies of Plant Biology

IIAG: Instituto de Investigaciones Agrarias de Galicia

IBCMP: Institut de Biologia Cel·lular i Molecular de Plantes

IMIDRA: Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario

IVIA: Institut Valencià de Investigacions Agràries

mLV: medio Litvay modificado (Lelu-Walter y col., 2006)

mLVM: medio Litvay de maduración

MS: Murashige y Skoog (1962)

PEMs: masas proembriogénicas

PPT: fosfinotricina

RCs: reguladores de crecimiento

SH: Schenk & Hildebrandt (1972)

STS: tiosulfato de plata

TDZ: 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea

X-Gluc: 5-bromo-4-cloro-3-indol glucorónido



## **I. INTRODUCCIÓN**

---



## I. INTRODUCCIÓN

La población mundial está en constante crecimiento, y se estipula que hacia la mitad del siglo XXI habrá 10.000 millones de personas, multiplicándose por dos la población en sólo sesenta años (Laarman y Sedjo, 1992), lo que implica una gran demanda de productos naturales. De hecho, cada vez hay más demanda de recursos forestales y más necesidad de tierras arables para satisfacer las necesidades de agricultura en el mundo, lo cual lleva a una mayor presión sobre los recursos naturales del monte (Celestino y col., 2005; Boerjan, 2005; Whetten y Kellison, 2010). Esta demanda está causando un serio problema de deforestación, especialmente en bosques tropicales, donde se perdieron 17 millones de ha/año durante el siglo pasado (Sasaki y Putz 2009). Entre los diferentes ámbitos de acción para defender los ecosistemas amenazados de deforestación se consideran como más importantes tanto el reciclado de papel, como el establecimiento de plantaciones forestales intensivas, mejoradas y optimizadas para incrementar la producción por unidad de superficie, y dar así respuesta a las necesidades crecientes de madera y otros productos (Sutton, 1999). Estas plantaciones forestales forman además parte de los mecanismos de control del cambio climático del Protocolo de Kyoto, por ejercer como sumideros de dióxido de carbono (Sasaki y Putz 2009; Liao y col. 2010).

La domesticación de las especies forestales es un proceso lento debido fundamentalmente a su largo ciclo vital y a que la mayoría de las características de interés (madera, crecimiento, tolerancia a estrés biótico o abiótico) solo pueden ser ensayadas cuando la planta tiene un determinado número de años (Boerjan, 2005). Según Boerjan (2005) hay dos posibles aproximaciones para acelerar el proceso de domesticación en estas especies: por un lado la modificación genética, introduciendo nuevos genes en genotipos de élite ya seleccionados, y por otro, abordando la explotación de la diversidad genética en los programas de mejora.

El Estado español ocupa el segundo lugar de la Unión Europea en cuanto a superficie forestal, (57% de su superficie), con 26.27 millones de

hectáreas, de las cuales 14.73 millones son superficie arbolada y el resto matorral Mediterráneo (III Inventario Forestal Nacional, 2007). En estos bosques crecen 17.804 millones de árboles, de los cuales, el 39% (6.947 millones) son pies mayores (diámetro medido a 1.3 m de altura superior a los 7.5 cm).

Las coníferas son las especies con mayor proporción de existencias de madera en el conjunto del Estado (520.5 millones de m<sup>3</sup>), con un 57% del total de madera frente al 43 % de las frondosas. Según el Informe de “Situación de los Bosques y del Sector Forestal en España”, el 53% del volumen de madera se agrupa en seis especies forestales; concretamente, *Pinus sylvestris* (15,2%), *Pinus pinaster* (15,0%), *Fagus sylvatica* (7,7%), *Pinus halepensis* (7,5%), *Pinus nigra* (7,4%) y *Quercus ilex* (6,8%). *Pinus pinea*, especie objeto de este trabajo junto a *P. pinaster* y *Q. ilex*, ocupa un 2% del volumen maderable (Sociedad Española de Ciencias Forestales, 2010).

### **I.1. Descripción y distribución de las especies objeto de estudio**

#### **I.1.1. *Quercus ilex* L.**

*Quercus ilex* L. (Figura I.1) conocida como encina, carrasca, chaparra o chaparro, es una de las Fagáceas perennes más representativas del bosque Mediterráneo. Presenta una talla mediana, pudiendo llegar a alcanzar de 16 a 25 metros de altura. Es de copa ovalada al principio y después va ensanchándose hasta quedar finalmente con forma redondeado-aplastada, aunque de joven suele formar matas arbustivas y, en ocasiones, se queda en este estado por las condiciones climáticas o edáficas del lugar (González-Rodríguez y col., 2011).

Las hojas, coriáceas, están provistas de fuertes espinas en su contorno cuando la planta es joven, y en las ramas más bajas cuando es adulta, careciendo de ellas las hojas de las ramas altas. El envés está cubierto de una borra grisácea que se desprende al frotarlas. Las hojas son duras y evitan la excesiva transpiración de la planta, lo que le permite vivir en lugares secos y con gran exposición al sol, como la ribera mediterránea. La corteza es lisa y de

color verde grisáceo en los tallos y se va oscureciendo a medida que crecen. Más tarde se agrieta en todas direcciones y queda un tronco muy oscuro, prácticamente negro (Crespo, 1988).



**Figura I.1.** *Quercus ilex* L.

La encina es, como el resto de las especies del género *Quercus*, una planta monoica, pero con cierta tendencia a la dioecia (pies con preponderancia de flores masculinas o femeninas). Sus flores masculinas se agrupan en amentos, primero erectos y finalmente colgantes (Figura I.1). Las flores femeninas son pequeñas y salen aisladas o en grupos de dos sobre los brotes del año y en un pedúnculo muy corto. Entre los meses de marzo a mayo, cuando la temperatura media es de alrededor de los 20 °C y hay un fotoperiodo de 10 horas de sol, suele darse la floración. La dispersión del polen es principalmente anemófila, y en menor medida entomófila, durando entre 20 y 40 días. Se reproduce frecuentemente mediante alogamia, aunque también es posible la autogamia. Debido a la alogamia, a la separación de las flores y a las condiciones climáticas, es frecuente que se den fenómenos de hibridación (Crespo, 1988).

Sus frutos, las bellotas, son glandes de color marrón oscuro cuando maduran, brillantes y con una cúpula característica formada por brácteas muy

apretadas y densas, que cubren aproximadamente un tercio de su superficie (Figura 1C). Maduran normalmente de octubre a noviembre. La edad mínima a la que comienza a producirlos suele ser entre los 15 y los 20 años. Las encinas se reproducen normalmente sembrando las bellotas, aunque también se multiplican por brotes de raíz y de cepa (Crespo, 1988).

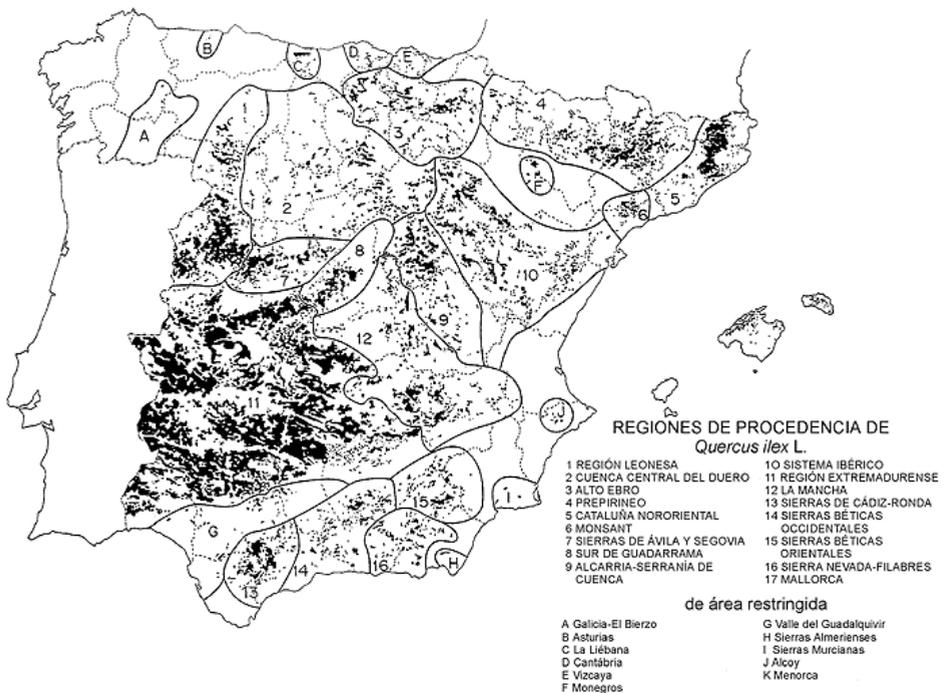
Se distribuyen naturalmente en el Mediterráneo, en todo tipo de suelos desde la costa hasta unos 1.500 metros de altitud, pero solo en zonas con clima mediterráneo ya que cuando el clima es más lluvioso y de tipo atlántico, la sustituyen otras especies de *Quercus*, como los robles, quejigos o alcornoques. En la Península Ibérica es la especie forestal que más territorio ocupa, con unos 3 millones de hectáreas repartidos por toda la península y las islas Baleares, exceptuando la franja costera cantábrica donde es mucho menos abundante. Las encinas cultivadas se mantienen generalmente en dehesas y, en estado natural, forman extensos y muy tupidos bosques junto con las demás especies típicas del bosque mediterráneo. Además, estos bosques resultan ser el mejor hábitat para la fauna mediterránea, convirtiéndolos en ideales cotos de caza e incluso en áreas de reserva naturales de mayor protección (González-Rodríguez y col., 2011).

Se han descrito dos subespecies para la encina, *Quercus ilex* subsp. *ilex* y *Quercus ilex* subsp. *ballota* (sinónimos de esta última son también *Q. rotundifolia* y *Q. ballota*). *Q. ilex* subsp. *ilex* se caracteriza por tener unas hojas más grandes y lauroides, y suele habitar en zonas más húmedas (como la cornisa cantábrica y Cataluña, fundamentalmente), mientras que *Q. ilex* subsp. *ballota* las presenta ovales y con borde más o menos espinoso (sobre todo en la base del árbol o en individuos jóvenes) y tiene una distribución menos exigente (Figura I.2). También existen individuos con caracteres intermedios, especialmente en las zonas de contacto de ambas subespecies (Isabel y Muñoz, 2009). La existencia de diferencias genéticas entre poblaciones, sobre todo las relacionadas con el crecimiento, producción y adaptación, han llevado al Ministerio de Medio Ambiente a definir grandes unidades para la comercialización de materias forestales de reproducción (MFR), que se basan fundamentalmente en divisiones en su distribución geográfica, y que en el caso

de la encina recogen alrededor de 17 procedencias (Figura I.3) ([http://www.mma.es/conserv\\_nat/acciones/mejora\\_genet/html/reg\\_procedencia.htm](http://www.mma.es/conserv_nat/acciones/mejora_genet/html/reg_procedencia.htm)).



**Figura I.2.** Hojas de *Quercus ilex* de las subespecies ilex (A) y ballota (B).



**Figura I.3.** Regiones de procedencia de la encina ([http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes\\_politica\\_forestal/quercus\\_ilex.gif](http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes_politica_forestal/quercus_ilex.gif))

La obtención de bellotas suele ser el motivo principal de su cultivo, puesto que son el principal alimento para cerdos criados para la producción de jamón ibérico (Mauri y Manzanera, 2003; Suz y col., 2008). Además, resultan comestibles para los humanos por lo que se comen a menudo tostadas como otros frutos secos, o en forma de harina para hacer pan.

La encina establece relaciones simbióticas con diversos hongos del suelo formando micorrizas, y algunas de las especies de dichos hongos, tales como las del género *Tuber* (*Tuber melanosporum*, principalmente), son muy apreciadas en gastronomía, lo que ha generado una industria en la que las encinas son inoculadas y sometidas a tratamientos culturales (tubicultura) para favorecer la formación de la trufa (ascoma) (Suz y col., 2008). También suele aprovecharse su leña, que es muy dura e imputrescible, aunque difícil de trabajar, por lo que se emplea normalmente para fabricar piezas que tengan que soportar gran rozamiento, como en carros, arados, parquets, herramientas, etc., así como en pequeñas obras hidráulicas y en la construcción (pilares o vigas). Además, es muy buena para quemar y para hacer carbón vegetal. La corteza cuenta con gran cantidad de taninos, lo que le da valor en las tenerías para curtir el cuero (especialmente utilizada en Marruecos), y machacando las hojas y bellotas se prepara un cocimiento que resulta ser astringente y útil para desinfectar heridas (Pulido y col., 2001).

En los últimos 20 años la mortalidad de la especie ha incrementado debido fundamentalmente a la acción combinada de patógenos, insectos xilófagos y condiciones climáticas adversas (González-Rodríguez, 2011). Además, algunas prácticas agroforestales como el sobrepastoreo, están contribuyendo a eliminar la regeneración natural del arbolado (Isabel y Muñoz, 2009). La pobre regeneración (Smit y col., 2009) y la alta mortalidad adulta en algunas áreas han conducido a la implementación de programas de regeneración artificial, principalmente en áreas donde la población arbórea ha disminuido o desaparecido, o en tierras que se han convertido en agrícolas (González-Rodríguez, 2011).

### I.1.2. *Pinus pinaster* Aiton

*Pinus pinaster* Ait. es una conífera conocida como pino marítimo, rubial o rodeno, aunque también como pino negral, sin que deba confundirse con el *Pinus nigra*. Su hábitat se encuentra generalmente entre el nivel del mar y 800 metros por encima, exceptuando Marruecos, donde llega a habitar a 2000 metros de altura. Es la conífera más abundante de los bosques españoles, cubriendo una superficie de 1.200.000 ha (Bravo-Oviedo y col., 2004). Su nombre deriva del antiguo uso de su madera, procedente fundamentalmente de los bosques de la Sierra de Segura, para fabricar mástiles de veleros en una sola pieza.

Se trata de un árbol de mediano tamaño, entre 20 y 35 metros, con un tronco de una envergadura media de 1.2 m de diámetro, que puede llegar a los 1.8 m. Su corteza es de coloración roja anaranjada, gruesa y profundamente agrietada, sobre todo en la base, y presenta una copa irregular y abierta. Las acículas son gruesas y largas (de 12 a 22 cm de longitud), de coloración azul verdosa a amarillo verdoso, y se disponen en pares. Sus piñas son cónicas, con una longitud comprendida entre 10 y 22 cm y una grosor de entre 4 y 6 cm de diámetro cuando se encuentran cerradas (Figura I.4). Evolucionan de color verde a marrón rojizo a los 24 meses de su apertura, ensanchándose hasta los 8 – 12 cm de diámetro, y los piñones tienen una longitud de 0.8 a 1 cm, con una ala para dispersarlos por el viento de 2 a 2.5 cm (Crespo, 1988).

El pino marítimo se encuentra dividido en 2 grupos que corresponden a dos subespecies: Atlántica (o marítima) y Mediterránea (o mesogeensis). La Atlántica presenta el área más reducida, y se encuentra en Portugal, Galicia y las Landas francesas hasta el norte del estuario del Garona. La Mediterránea es más rústica en cuanto a climas y suelos, y se encuentra extendida por el Levante, el Centro y el Sur de la Península, existiendo diferentes razas de esta última subespecie, y prolongándose por Francia, Italia, llegando a los Apeninos e introduciéndose también en Córcega (Trontin y col., 2002; Bravo-Oviedo y col., 2004).



Se encuentra también en Túnez, Argelia y Marruecos, y se ha repoblado con ella Sudáfrica, Nueva Zelanda y Australia. El Ministerio de Medio Ambiente ha definido 20 grandes unidades o procedencias para la comercialización de materias forestales de esta especie (Figura I.5).

Figura I.4. *Pinus pinaster* Ait.

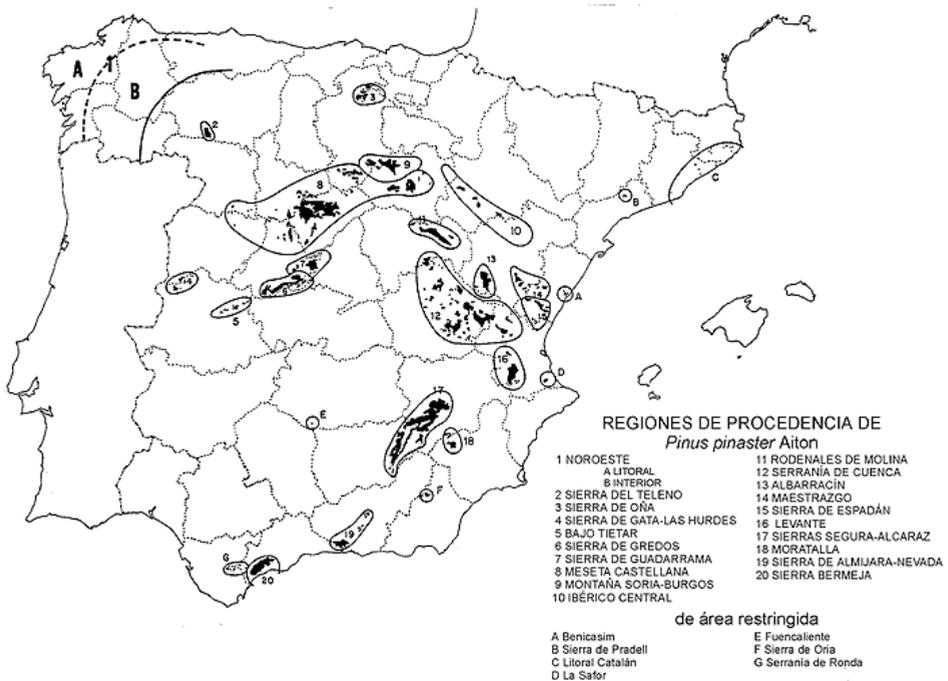


Figura I.5. Regiones de procedencia del pino marítimo ([http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes\\_politica\\_forestal/pinus\\_pinaster.gif](http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes_politica_forestal/pinus_pinaster.gif)).

Debido a su plasticidad y a su tolerancia a la sequía ha sido incluida en los programas de desarrollo rural y reforestación de tierras agrarias abandonadas, cofinanciados por la Unión Europea.

En el País Valenciano los incendios forestales han diezmando las poblaciones de esta especie, quedando limitada a rodales selectos. En la mayoría de los casos, el pino marítimo está siendo sustituido de forma natural por *Pinus halepensis*.

### I.1.3. *Pinus pinea* L.

*Pinus pinea* L. conocida como pino piñonero, manso o doncel es otra especie de la familia de las pináceas. Su nombre proviene de su producción de grandes piñones, que son consumidos desde tiempos inmemoriales por la humanidad. Presenta una copa redondeada en forma de sombrilla, con ramas de similar grosor, con una superficie de tronco que se caracteriza por disponer de placas de color grisáceo, separadas por grietas rojizas, y piñas entre ovaladas y esféricas de 10 a 15 cm de longitud, que dan unos piñones de corteza dura, de 1 cm de longitud, carnosos y sabrosos (Figura I.6).

Esta especie se distribuye en toda la franja mediterránea, sobre todo en el



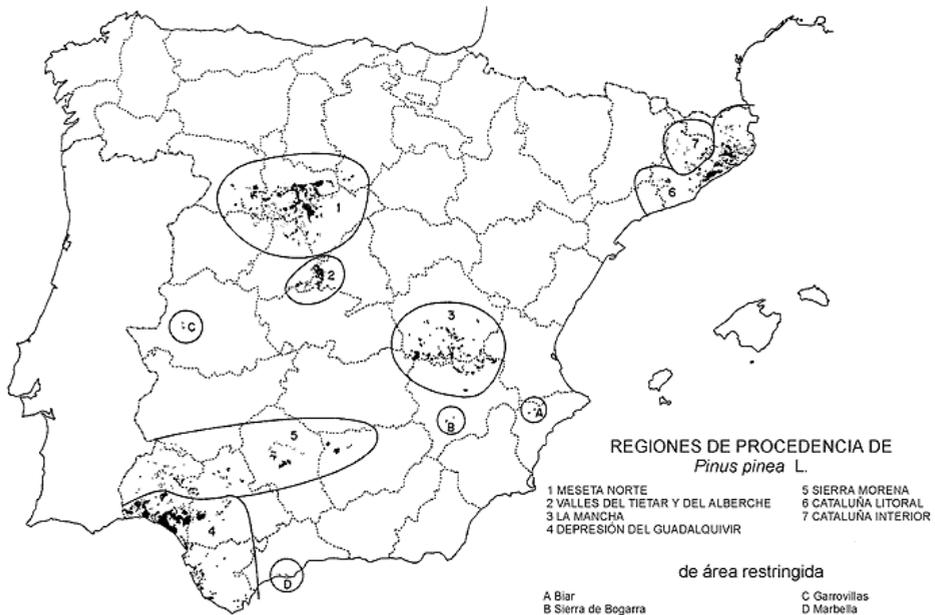
Figura I.6. *Pinus pinea* L.

Centro y Sur de la Península Ibérica, y su hábitat se encuentra desde el nivel del mar, hasta los 1000 o 1200 metros de altura, creciendo preferentemente en suelos silíceos. Resiste muy bien la sequía estival y soporta heladas no demasiado extremas.

El Ministerio de Medio Ambiente ha definido 7

grandes unidades o procedencias para la comercialización de materias forestales de esta especie (Figura I.7).

Su madera es ligera y flexible y suele utilizarse en carpintería y en estructuras, sobre todo en la construcción marítima. Además, con ella se fabrica carbón vegetal y pasta de papel, y de ella se obtiene la resina. Sus piñones se emplean en repostería, guarnición de ensaladas o platos en salsa de tipo Tayín, que mezcla salado y azucarado, y forma parte de platos mediterráneos. El Estado español es el primer productor mundial de piñones, seguido de Francia, Italia y Turquía (Carneros, 2009).



**Figura I.7.** Regiones de procedencia del pino piñonero ([http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursos-geneticos/pinus\\_pinea\\_tcm7-26026.gif](http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursos-geneticos/pinus_pinea_tcm7-26026.gif)).

La alta producción de piñón se ha logrado 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 el País Valenciano, 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).

## **I.2. Programas de conservación y mejora y alternativas biotecnológicas**

La Estrategia Española para la Conservación y Uso Sostenible de los Recursos Genéticos Forestales (2006) constituye el marco de trabajo en el que se apoyan, desarrollan y coordinan actividades de conservación y mejora genética para las especies forestales españolas, facilitando la cooperación e integración de iniciativas a cargo de las distintas administraciones y organismos de ámbito autonómico, nacional e internacional. Los avances I+D+i en materia de conservación y uso sostenible de los recursos genéticos forestales se realizan a través de organismos públicos de investigación de la Administración General del Estado y de Universidades y centros autonómicos de investigación forestal. Aproximadamente 26 especies forestales cuentan con programas específicos de mejora (destacando por número *Prunus avium*, *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris* y *Pinus pinea*) y 18 específicos de conservación, reseñando por su importancia el correspondiente al género *Ulmus* (Informe de Situación de los Bosques y del Sector Forestal en España, 2010; <http://es.scribd.com/doc/101155481/infores2010>).

Además, el Plan Forestal Español (2002 a 2035; <http://www.magrama.gob.es/ca/>) refleja la necesidad de aumentar los terrenos forestales, con el fin de paliar los procesos de desertización, y alienta al desarrollo de metodologías y técnicas de producción de plantas adecuadas para desarrollarse en ambientes sometidos a diferentes tipos de estrés, tanto biótico como abiótico. En relación a *Pinus pinaster*, la especie ha sido elegida como modelo para estudiar características adaptativas en coníferas relacionadas fundamentalmente con estrés hídrico y crecimiento, en el marco de dos proyectos Europeos en los que participa nuestro grupo (<http://www.scbi.uma.es/sustainpine>; [www.procogen.eu](http://www.procogen.eu))

Por todos estos motivos, se hace muy deseable el desarrollo de técnicas de propagación y de mejora vegetal de *Quercus ilex*, *Pinus pinaster* y *Pinus pinea* que se incluyen dentro de las especies más representativas de nuestros bosques. Todas ellas y, como se ha comentado anteriormente, no solo tienen importancia medioambiental sino también son especies con gran importancia económica.

### I.3. Propagación vegetativa

La propagación clásica, mediante el uso de semillas de progenitores seleccionados, limita el aprovechamiento del total de las cualidades genéticas de los parentales, lo que plantea un problema cuando las especies son destinadas a fines productivos. Debido a esto, los programas de mejora clásica, mediante cruces controlados y establecimiento de huertos semilleros de clones evaluados, están siendo potenciados por las nuevas técnicas de propagación vegetativa que, al aprovechar el componente no aditivo de la variación genética, transfiere a la descendencia todo el potencial genético de los individuos seleccionados y les confiere uniformidad. Esto permite la conservación de genes y genotipos (Celestino y col., 2005).

Para lograr la propagación vegetativa se ha de disponer de una vía de regeneración de plantas que sea fiable, es decir, que de resultados repetitivos aplicables a una gran variedad de genotipos, que sea altamente productiva y que proporcione elevadas tasas de multiplicación. También es necesario que el propágulo generado sea fiel al donante, con ausencia de variabilidad intraclonal.

Dentro de las técnicas de propagación vegetativa, el cultivo *in vitro* de tejidos es una herramienta muy útil, porque posibilita la captura rápida y la clonación masiva de genotipos valiosos, permite una multiplicación libre de enfermedades, elimina el efecto estacional permitiendo una producción homogénea todo el año y proporciona métodos para el almacenamiento de germoplasma a largo plazo (Sutton, 2002; Nehra y col., 2005).

El cultivo *in vitro* se basa en aislar órganos, tejidos o células vegetales (conocidos como explantos) y en ajustar las condiciones necesarias para

obtener respuestas fisiológicas o morfogénicas a partir de ellos (Höxtermann, 1997; Pijut y col., 2011). La regeneración de plantas mediante el cultivo *in vitro* puede darse por tres vías (Bonga y col., 2010): mediante el desarrollo de meristemos preexistentes (yemas apicales o axilares), mediante la diferenciación de yemas o raíces adventicias, organogénesis; y mediante la embriogénesis somática, que es el proceso de formación del embrión a partir de células somáticas y que ha sido la herramienta de propagación utilizada en este trabajo.

La capacidad de regeneración de los explantos depende de varios factores entre los que podemos destacar los determinados por las condiciones de la planta madre (genotipo, edad y estado fisiológico de la planta donadora, tipo de explanto y posición que ocupa en la planta y época de recogida del material vegetal), y los determinados por las condiciones ambientales de los cultivos (composición del medio, tipo y concentración de los reguladores de crecimiento, volumen del envase, cantidad de luz y temperatura, etc.).

En las últimas décadas ha habido un rápido avance en el desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro* para su uso en la propagación clonal. La obtención de individuos genéticamente iguales abre la posibilidad de amplificar progenies derivadas de programas de mejora genética y su comercialización forestal (Miguel y col., 2004), realizar ensayos de campo para evaluar la influencia ambiental y el genotipo, y establecer sistemas experimentales que nos permitan abordar estudios de genética funcional.

Las especies leñosas, especialmente cuando se utilizan explantos de origen adulto, son más difíciles de clonar *in vitro* que las herbáceas, ya que presentan problemas específicos tales como lixiviación de fenoles al medio de cultivo, problemas de esterilización y manipulación y capacidad de regeneración limitada de algunos genotipos (Bonga y col., 2010). De hecho, algunas de ellas son consideradas recalcitrantes ya que, a pesar de los distintos tratamientos aplicados, no ha sido posible su regeneración *in vitro* (Bonga y col., 2010). Otro problema, en particular entre especies forestales, es que la propagación suele estar limitada a la utilización como explantos de embriones zigóticos o plántulas, en lugar de individuos vegetativos adultos o en

estadio reproductivo, por lo que no se conoce la totalidad del potencial genético de las plantas regeneradas (Bonga y von Aderkas, 1992).

Los primeros árboles generados mediante técnicas de cultivo *in vitro* se obtuvieron en los años 60 del siglo pasado utilizando la vía organogénica, mediante la inducción de tallos axilares o adventicios que posteriormente debían ser enraizados. Sin embargo, durante los últimos años la industria forestal ha apostado por la vía de la embriogénesis somática ya que además de su elevado potencial de multiplicación, posibilita el crecimiento de los cultivos en bioreactores y la aplicación de técnicas de encapsulación/crioconservación para fabricar y almacenar semillas sintéticas. La capacidad de las células embriogénicas de ser criopreservadas permite mantener las características juveniles de los propágulos mientras copias de los mismos son ensayados en el campo (Park, 2001; Hernández y col., 2011). Por último, los cultivos embriogénicos pueden utilizarse como dianas en los experimentos de transformación genética, lo que hace que estos cultivos sean un elemento imprescindible en estudios de genómica funcional (Merkle y Dean, 2000).

### **I.3.1. Embriogénesis somática**

Es el proceso por el cual las células somáticas del explanto –o porción de la planta donante que se cultiva *in vitro*- cambian su patrón de expresión y producen estructuras semejantes a embriones, los cuales se llaman embriones somáticos. Es un proceso análogo a la embriogénesis zigótica donde una sola célula o un pequeño grupo de células vegetativas son las precursoras del embrión (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos adquieren bipolaridad (con un polo caulinar y otro radicular) de forma temprana, desarrollando un sistema vascular cerrado que no tiene conexión con el tejido parental (Tautorus, y col., 1991, Schumann y col., 1995). La embriogénesis somática de células vegetativas o no-gaméticas puede servir para la propagación masiva de especies seleccionadas, en peligro, híbridas o transgénicas (Pijut y col., 2011). Este proceso pone de manifiesto cómo todas las células de una planta

contienen la información genética para generar una planta completa y funcional (Merkle, 1995); capacidad denominada totipotencia.

### **I.3.1.1. Etapas de la embriogénesis somática**

El proceso de embriogénesis somática en gimnospermas, también aplicable a angiospermas, tiene lugar en cuatro etapas diferentes (von Arnold y col., 2002).

1. Inducción o iniciación del cultivo embriogénico a partir de un explanto primario, con o sin el uso de reguladores de crecimiento.
2. Proliferación y mantenimiento de los cultivos embriogénicos en medio sólido similar al medio de inducción pero generalmente con niveles reducidos de reguladores, si anteriormente estaban presentes.
3. Maduración de los embriones somáticos en un medio suplementado con ácido abscísico (ABA) y/o con el potencial osmótico reducido.
4. Germinación y desarrollo de las plantas, generalmente, en medio sin reguladores.

Cada una de estas fases presenta unas características específicas que se comentan a continuación

#### **I.3.1.1.1. Inducción de los cultivos embriogénicos**

La iniciación de la respuesta embriogénica supone que las células del explanto inicial revierten su patrón de expresión génica de ese momento a un programa de expresión embriogénica; a continuación se activa la división de las células determinadas, para la consecución del nuevo patrón de expresión. Más tarde, la nueva estructura formada desarrolla un programa autónomo, condicionado por una nutrición heterotrófica, generando así los embriones somáticos iniciales (Zoglauer y col., 2003).

La información genética requerida para la formación del embrión es retenida durante el ciclo de vida de la planta, incluso en árboles de larga vida (Bonga y col., 2010). Las huellas epigenéticas que inician y mantienen el

desarrollo post-embriogénico se borran durante la gametogénesis y, así, se reinician durante la embriogénesis (Ranganath, 2004). El aislamiento celular es el factor más importante en la reprogramación de células (Steward, 1968), las células se aíslan durante el proceso sexual cuando las células esporofíticas se reprograman a gametofíticas y, a través de la fertilización, se vuelven de nuevo esporofíticas. Durante estos cambios, la conexión del plasmodesmo entre las células vecinas se interrumpe principalmente por la formación de una capa callosa (Carr, 1976; Gunning y Robards 1976; Verdeil y col., 2001; Estrada-Luna y col., 2002). Este proceso de aislamiento celular ocurre también en las células que se vuelven embriogénicas en cultivos tisulares (Thorpe, 1980; Williams y Maheswara, 1986; Pedroso y Pais, 1992; Mathew y Philip, 2003). Sin embargo, en cultivo de tejidos el aislamiento celular no siempre es necesario para iniciar la embriogénesis somática (Thorpe, 1980; Williams y Maheswara, 1986).

Durante el desarrollo del embrión, las divisiones celulares son asimétricas, empezando por la primera división del cigoto (Goldberg y col., 1994; Sheres y Benfey 1999; ten Hove y Heidstra 2008). La auxina o señales inducidas por auxina actúan como factores extrínsecos en algunas de las divisiones asimétricas (ten Hove y Heidstra 2008). Pero que tales divisiones puedan ser inducidas experimentalmente en cultivos celulares y den como resultado embriogénesis u organogénesis, es todavía un área de investigación por explotar (Bonga y col., 2010).

La embriogénesis somática presenta dos patrones básicos: embriogénesis directa, en que las células predeterminadas embriogénicamente ya están presentes y sólo requieren unas condiciones favorables para el inicio del desarrollo embriogénico; y embriogénesis indirecta, en que se requiere la redeterminación de células diferenciadas y la adquisición del estado embriogénico previo a su desarrollo (Roca y Mroginski, 1991). La transición de célula somática a embriogénica requiere los siguientes pasos: desdiferenciación, reactivación celular, división y cambios metabólicos, así como desarrollo y reprogramación génica (Féher y col., 2003). En este cambio en la expresión génica intervienen muchos factores, algunos están

relacionados con la composición del medio de cultivo y condiciones ambientales a los que está sometido, y otros están relacionados con el material vegetal de partida (explanto inicial) y la planta donante (genotipo).

Los genotipos individuales, dentro de cada especie, varían considerablemente en su capacidad embriogénica (Parrot, 1991; Park y col., 1993; 1994), argumento que sugiere que cada genotipo individual podría tener requerimientos únicos para una óptima capacidad de regeneración. Esto se ha visto en especies como *Robinia pseudoacacia* (Arrillaga y col., 1994), *Coffea arabica* (Molina y col., 2002), varias especies del género *Pinus* (Bercetche y Pâques, 1995; Lelu y col., 1999; MacKay y col., 2006; Choudhury y col., 2008) y del género *Quercus* (Cuenca y col., 1999; von Arnold y col., 2002; Hernández, 2007). Se ha demostrado que en algunas especies la capacidad embriogénica es hereditaria, y probablemente, controlada por dos loci (Hernandez-Fernandez y Christie, 1989). En coníferas, estudios sobre el control de la inducción del proceso embriogénico han evidenciado la existencia de un efecto genético aditivo sobre el proceso, apoyando la hipótesis de que las tasas de iniciación pueden ser incrementadas en los planes de mejora genética; así, se ha visto en *P. taeda* que una gran mejora en la inducción de ES puede ser predecible si se selecciona el progenitor femenino más favorable y, en algunos casos, el progenitor masculino más favorable (MacKay y col. 2006).

La capacidad para inducir embriogénesis somática disminuye con la edad ontogénica del explanto, siendo los tejidos más próximos a las zonas donde ocurre el rejuvenecimiento provocado por el proceso de meiosis, los más aptos para la iniciación de la embriogénesis somática: polen, óvulos, filamentos, embriones zigóticos, tejidos asociados como nucela o tegumentos, megagametofitos o zonas de plántulas muy jóvenes. De hecho, en la mayoría de las especies leñosas la embriogénesis somática se obtiene a partir de embriones zigóticos inmaduros, lo que es sobre todo típico en coníferas (Klimaszewska, 1995; Klimaszewska y Cyr, 2002; Park y col., 2006; Carneros, 2009; Hargreaves y col., 2009; Lara-Chávez y col., 2011; Humánez y col. 2012; Shin y Kim, 2012; Montalbán y col., 2012, 2013). En algunas coníferas (Pullman y Bucalo, 2011) y fagáceas (Manzanera, 1992; Kim, 2000;

Klimaszewska y col., 2001; Mauri y Manzanera, 2003; Klimaszewska y col., 2007; Vengadesan y Pijut, 2009) los embriones zigóticos maduros han sido utilizados con éxito para inducir embriogénesis somática. Respecto a la ES a partir de explantos de individuos adultos, es relevante que los tejidos que se encuentran cerca de la unión de la raíz y el tallo, así como en los brotes son morfogénicamente más competentes (Bonga, 1985; Bonga y col., 2008). En los últimos años se ha conseguido inducir embriogénesis somática a partir de renuevos basales, vástagos de raíz, brotes epicórmicos y tallos apicales (Hernández y col., 2003b; Bonga y col., 2010, Vieitez y col., 2012). También ha sido posible inducir embriogénesis somática a partir de yemas de árboles de 10 años obtenidos a su vez mediante embriogénesis somática (Klimaszewska y col., 2011).

Los medios de cultivo más utilizados para la inducción de embriogénesis somática en coníferas son el MS (Murashige y Skog, 1962); mLV (Litvay y col., 1985); DCR (Gupta y Gurzan, 1985) y Westvaco WV5 (Coke, 1996). En el género *Quercus*, los medios MS, SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) y WPM (Lloyd y McCown, 1980) han sido utilizados con éxito para inducir embriogénesis somática.

Los reguladores de crecimiento son los principales responsables de la regulación de los diferentes cambios de desarrollo producidos en la inducción de embriogénesis somática. La necesidad de reguladores tipo auxina y citoquinina para la inducción de embriogénesis somática está determinada por el tipo y grado de desarrollo del explanto inicial. De hecho, en explantos zigóticos muy inmaduros de angiospermas como *Quercus suber* (Fernández-Guijarro, 1997), o en gimnospermas como *Pinus sylvestris*, *P. pinaster* (Lelu y col., 1999) y *Araucaria angustifolia* (Silveira y col., 2000) se ha inducido embriogénesis somática en ausencia de reguladores de crecimiento. En coníferas, se ha utilizado principalmente la auxina sintética 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que interactúa con la síntesis de ABA y etileno, incrementando los niveles de esta hormona del estrés (Féher y col., 2003); también se ha inducido embriogénesis somática en medios suplementados con ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB).

Combinadas con las auxinas, también se han utilizado citoquininas, que inhiben el efecto del control que ejerce el eje embrionario sobre el crecimiento coordinado de las células que constituyen el embrión, produciéndose un cambio en las divisiones celulares hacia divisiones periclinales, en oposición a las anticlinales, lo que daría lugar a la formación de embriones somáticos (Maheswaran y Williams, 1985). Las citoquininas más utilizadas en la inducción de embriogénesis somática en coníferas son la benciladenina (BA), la kinetina, la zeatina y la isopentil-adenina (iP); de las cuales, la BA es la más efectiva, aunque también se han usado derivados de la urea con actividad citoquinina, como la N-(-2-cloro-4-piridil)-N-fenilurea (CPPU) o el tidiazuron (TDZ) (Park y col., 2006). Recientemente el epibrasinolido ha sido utilizado como único regulador de crecimiento para inducir embriogénesis somática en megagametofitos de *Pinus pinaster* (Morcillo y col. 2012). En el género *Quercus*, por el contrario, la auxina más eficiente para inducir embriogénesis somática es el ANA en combinación con la citoquinina BA (Hernández y col., 2003a; Toribio y col., 2005). No obstante, en *Quercus rubra* también se ha inducido embriogénesis somática tras tratamientos con 2,4-D (Vengadesan y Pijut, 2009).

En algunas gimnospermas el cloruro de níquel y el cloruro de cobalto favorecen la embriogénesis somática. Ambos compuestos inhiben el etileno acumulado en los tejidos y, en el caso del cloruro de níquel, previene además la acumulación de urea y su efecto tóxico, reduciendo con ello el estrés metabólico (Park y col., 2006). En coníferas, el nitrógeno reducido, en forma de hidrolizado de caseína y glutamina, también ha resultado beneficioso para la inducción de embriogénesis somática (Miguel y col., 2004).

Las condiciones de iluminación también afectan las respuestas morfogénicas. En general, el proceso de embriogénesis somática en coníferas se realiza en oscuridad hasta la fase de la germinación (Humánez y col. 2012). Por el contrario en el género *Quercus* (Hernández, 2007), la inducción se realiza en oscuridad, mientras que la proliferación se ha llevado a cabo en condiciones de irradiación media ( $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) y la germinación en condiciones de irradiación más alta ( $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ).

### **I.3.1.1.2. Proliferación y mantenimiento de cultivos embriogénicos**

Una de las ventajas de la embriogénesis somática es la gran capacidad proliferativa que presenta, mediante el proceso conocido como embriogénesis secundaria. La embriogénesis secundaria es el fenómeno recurrente de multiplicación de los embriones somáticos, que garantiza la producción masiva de propágulos a lo largo del tiempo y sin limitaciones estacionales. Como esta capacidad de multiplicación clonal es generalmente muy elevada, aparentemente ilimitada en el tiempo y se puede realizar a lo largo de todo el año, presenta un potencial multiplicativo inmenso.

Clásicamente se ha dicho que la embriogénesis recurrente se desencadena debido al aislamiento celular (Smith y Krikorian, 1989), aunque algunos autores han observado la existencia simultánea o no de las vías uni y multicelular para la generación de embriones secundarios; además, han sugerido que una u otra vía puede favorecerse mediante modificaciones en las condiciones de cultivo (Michaux-Ferrière y col., 1992).

En el caso de las gimnospermas, la embriogénesis recurrente se obtiene mediante el proceso de poliembrionía de partición lo que permite amplificar los cultivos en medios semisólidos de la misma composición. No obstante, en algunas coníferas, principalmente en *Pinus pinaster*, los cultivos permanecen embriogénicos sólo durante limitados subcultivos, por lo que han de ser criopreservados (Klimaszewska y col., 2009) en un plazo de 6 meses desde la iniciación de los ensayos.

En el caso de las especies del género *Quercus*, donde las frecuencias de inducción de embriogénesis somática suelen ser bajas (Vieitez y col. 2012), la gran capacidad de estos embriones primarios de entrar en el proceso de embriogénesis recurrente asegura la producción de líneas embriogénicas clonales y con ello la posibilidad de propagación a gran escala (Toribio y col., 2004; Valladares y col., 2006, Vengadesan y Pijut, 2009). En numerosas angiospermas, la embriogénesis secundaria se suele basar en la proliferación de la caliptra del embrión somático, sobre todo cuando éste alcanza un estado de diferenciación cotiledonar, que genera, tras la aparición de meristemas en

múltiples zonas de su superficie, unos embriones secundarios de origen multicelular (Puigdejarrols y col., 1996). Esta embriogénesis recurrente también puede tener lugar a partir de masas preembriogénicas (Merkle, 1995).

Generalmente el cultivo en medio semisólido sin reguladores de crecimiento (Fernández-Guijarro y col., 1995), o con concentraciones bajas de auxinas y/o citoquininas (Chalupa, 2000; Valladares y col., 2006), se ha utilizado para proliferar las líneas embriogénicas en especies de *Quercus* tanto de origen juvenil como adulto. Estudios recientes, enfocados a la optimización de las condiciones de cultivo para incrementar la embriogénesis recurrente en líneas de roble procedentes de árboles adultos, han demostrado que la utilización de 0.44 $\mu$ M de BA en el medio de cultivo favoreció la formación de nuevos embriones (Mallón y col. 2012).

El cultivo en medio líquido es una herramienta muy interesante para propiciar la embriogénesis recurrente ya que presenta algunas ventajas respecto al medio sólido: los nutrientes se encuentran más disponibles para los tejidos y se difunden mejor los metabolitos excretados por estos. Otras ventajas que presenta son que la ausencia de agar en el medio facilita el control de las variaciones en el pH, conductividad, iones, etc., y el reemplazo del medio fresco (Celestino y col., 2005). En relación a la utilización del medio líquido para la proliferación de cultivos embriogénicos en coníferas, Pullman y Skryabina (2007) describieron inducción de embriogénesis somática de *Pinus taeda* en medio líquido aunque la fase de proliferación se estableció en medio suplementado con agar. El cultivo en medio líquido se ha utilizado para el establecimiento y crecimiento de cultivos embriogénicos de *Pinus nigra* (Salaj y col., 2007), *Pinus pinaster* (Miguel y col., 2001) y *Pinus strobus* (Finer y col., 1989). Ahora bien, el cultivo en medio líquido presenta inconvenientes tales como fenómenos de vitrificación de los tejidos y problemas de aireación (Celestino y col., 2005). Para evitarlo, se utiliza la técnica de inmersión transitoria, que, sin que aparezcan estos problemas, regula el desarrollo de los embriones somáticos y sincroniza los cultivos, debido a que el estrés ayuno-nutrición propiciado por las diferentes frecuencias de inmersión, regula procesos morfogénicos, particularmente la embriogénesis somática (Etienne y

Berthouly, 2002). La inmersión transitoria puede además estimular la maduración de los embriones (Cabasson y col., 1997; Etienne y col., 1997), por lo que hoy en día es la base del desarrollo de futuros biorreactores y se está revelando como muy útil para la promoción y el control del proceso recurrente. Estudios recientes en *Quercus robur* han comparado la proliferación en medio semisólido y en un sistema de inmersión temporal (TIS) concluyendo que, la inmersión temporal en biorreactores tipo RITA incrementa la producción de embriones somáticos y favorece la sincronización de los cultivos (Mallón y col. 2012).

Con el fin de sincronizar los cultivos, es importante tomar el material al inicio de su desarrollo embrionario e implicar la vía unicelular utilizando tratamientos que causen la necrosis y/o aislamiento celular mediante el envejecimiento de los cultivos (Féraud-Keller y Espagnac, 1989), el estrés salino con macronutrientes (Choi y col., 1998), el estrés no plasmolítico con sacarosa (Kamada y col., 1989), y la digestión enzimática de paredes celulares, basada en la tecnología desarrollada para la obtención de protoplastos (Tibok y col., 1995; Dhir y col., 1998). Posteriormente, se han de fraccionar y subcultivar las estructuras iniciales para sincronizar los cultivos (Celestino y col., 2005); el filtrado doble se ha propuesto como el método más apropiado para este fin (Arrillaga y col., 1994; Merkle y col., 1990). Recientemente se han descrito las fracciones más apropiadas para la proliferación y posterior maduración de aglomerados embriogénicos de *Quercus suber* (Jiménez y col. 2013).

### **I.3.1.1.3. Maduración de los embriones somáticos**

Hemos hablado de la embriogénesis somática como proceso de obtención de embriones clónicos del individuo del que procede (esto último en el caso de que procedan de material adulto). No obstante, para la obtención final de plantas, a partir de los cultivos de células aisladas o de pequeños agregados en suspensión, debe frenarse primero la embriogénesis secundaria y mantener un desarrollo embriogénico estable hasta completar la maduración. Durante este proceso, las semillas somáticas aumentan su capacidad de

almacenamiento de sustancias de reserva y su resistencia a la desecación (Klimaszewska y col., 2007). La maduración, por tanto, permitirá que los embriones somáticos sean capaces de convertirse en plantas, que para todos los efectos prácticos de este proceso, es el objetivo último.

Esta fase requiere normalmente un medio nutritivo de composición similar al de las fases previas, aunque en las coníferas, con las auxinas y citoquininas reemplazadas por ABA. Esta hormona es necesaria para frenar la poliembrionía de partición y conseguir que los embriones somáticos se diferencien y maduren, desde el estadio de acúmulos globulares de pocas células con un suspensor, hasta el estadio cotiledonar (Klimaszewska y Cyr, 2002). La fase de maduración representa un cuello de botella en el proceso de embriogénesis somática en especies del género *Pinus* y especialmente en *Pinus pinaster* y *Pinus pinea* y es dependiente de la línea utilizada (Carneros y col., 2009; Humánez, 2009). De hecho, hasta la fecha, los trabajos de maduración de embriones somáticos de *Pinus* spp. no han dado un buen resultado debido a que en general se utilizan protocolos desarrollados en las especies *Picea* y *Larix* (Klimaszewska y col., 2007). Es importante por ello, desarrollar protocolos optimizados para cada una de las especies.

Además de los reguladores de crecimiento hay otros factores que afectan a la maduración de los embriones somáticos entre los que destaca la disponibilidad de agua. La disponibilidad de agua se puede alterar aumentando la concentración de agar en el medio (Klimaszewska y Smith, 1997) o utilizando otras sustancias que disminuyen el potencial osmótico del medio sin ser absorbidas por las células embriogénicas (Li y col. 1998), como la maltosa (Reidiboym-Talleux y col., 1998), el sorbitol (Sánchez y col., 2003) y la fructosa (Carraway y Merkle, 1997), o con la combinación de ambos (Bercetche y Pâques 1995; Finer y col., 1989; Percy y col. 2000; Klimaszewska y col. 2001). También se ha utilizado para este fin el hidrolizado de caseína y el polietilén-glicol (PEG) de alto peso molecular (Yantcheva y col., 1998), aunque en este caso, los embriones somáticos requirieron de 3 a 4 semanas de tratamiento de frío y/o de desecación parcial antes de la germinación, mientras que no hizo falta aplicar ningún tratamiento post-maduración cuando los embriones

somáticos se han desarrollado en un medio con elevada concentración de agar (Klimaszewska y col., 2007). El carbón activo ha inducido la maduración de algunas especies, ya sea incluyéndose en el medio, como es el caso de *Pinus taeda*, o cubriendo los cultivos celulares, como en *Pinus pinaster* (Klimaszewska y col., 2007).

En especies del género *Quercus* la aplicación de ABA durante la fase de maduración no ha proporcionado resultados concluyentes (Mauri y Manzanera, 2004; Toribio y col., 2005; Vieitez y col., 2012). Este hecho podría ser debido a que el momento de su aplicación pudiera no ser el adecuado (Celestino y col., 2005) o la variación del contenido endógeno de esta hormona propiciado por otros factores (Carrier y col., 1997). En relación a otros reguladores de crecimiento, éstos parecen no ser necesarios durante la fase de maduración para las especies de este género (Féraud-Keller y Espagnac, 1989; Hernández y col., 2003a; Toribio y col., 2004).

El incremento en la concentración de azúcares, fundamentalmente sacarosa y/o sorbitol, en el medio favoreció la maduración de las masas embriogénicas de roble y su posterior germinación frente a otros tratamientos que incluían únicamente sacarosa (Sánchez y col., 2003). Por el contrario, este mismo tratamiento no fue efectivo en la conversión de los embriones somáticos derivados de robles adultos (Valladares y col., 2006). Además, la adición de sorbitol durante la maduración impidió la germinación de embriones somáticos de alcornoque (Manzanera y col., 1993). Sánchez y col. (2003) también demostraron que la concentración y la presencia de los azúcares en el medio de maduración tenían una marcada influencia en la morfología de los embriones somáticos de roble, observándose un reverdecimiento de los embriones cultivados en presencia de sorbitol. Para finalizar, en alcornoque (Hernández, 2007) la estabilidad osmótica en las primeras fases del proceso (utilizando la misma concentración de azúcar), seguida de un aumento de la concentración de azúcar, son las condiciones de cultivo más apropiadas para un desarrollo de los embriones, conteniendo la tendencia a dar embriogénesis secundaria.

Un factor limitante para dirigir la embriogénesis somática hacia aplicaciones más amplias como la propagación clonal y la ingeniería genética es la necesidad de mejorar la calidad de los embriones somáticos. Los embriones de alta calidad germinan en una elevada frecuencia y terminan por convertirse en plantas vigorosas. Se desconoce el momento óptimo para transferir los embriones al medio de germinación con el fin de alcanzar la máxima tasa de conversión. Se necesitan pues marcadores de desarrollo que pueden usarse para verificar o controlar la calidad de los embriones somáticos (Klimaszewska y col., 2007). Una aproximación es seguir la acumulación de sustancias de reserva (proteínas, lípidos y almidón) o azúcares o ácidos orgánicos y otras proteínas (como las proteínas de embriogénesis tardía) en los embriones zigóticos y compararlos con los patrones de acumulación en embriones somáticos maduros (Gupta y Durzan, 1987; Bercetche y Pâques, 1995; Finer y col., 1989). Otra aproximación es el estudio temporal y espacial de los patrones de expresión en la embriogénesis somática y zigótica, para conocer los eventos moleculares que tienen lugar durante el desarrollo, los cuales deben ayudar a explicar las posibles diferencias existentes (Gupta y Durzan, 1987; Bercetche y Pâques, 1995; Tereso y col., 2007).

#### **I.3.1.1.4. Germinación/conversión**

La germinación de los embriones somáticos maduros y el desarrollo de la parte aérea es el proceso que han de seguir necesariamente los embriones para su transferencia a suelo. La embriogénesis somática es un proceso complejo, de manera que la calidad, supervivencia y crecimiento posterior de las plantas somáticas dependerá en gran medida de las condiciones utilizadas en etapas anteriores. Aquellos embriones que presenten una morfología normal y que hayan acumulado suficientes sustancias de reserva, podrán desarrollarse en plantas normales, elongando de manera coordinada el tallo y la raíz.

Habitualmente el medio de germinación no requiere reguladores de crecimiento, aunque hay casos en que la presencia de citoquinas o de ácido giberélico han estimulado la germinación de los embriones (George, 1996).

Respecto a las plantas obtenidas de embriones somáticos, se ha visto que inicialmente son menos robustas que las obtenidas de semillas zigóticas pero una vez transferidas al campo, no se observan diferencias entre ellas (von Arnold y col., 2002, Hernández y col., 2011).

El cultivo en oscuridad o luz tenue durante los primeros 7 a 10 días antes de la exposición a la luz, ha sido muy beneficioso para la germinación de embriones somáticos de *Pinus strobus* (Finer y col., 1989) y *P. pinaster* (Bercetche y Pâques, 1995), debido a que asegura la elongación del hipocótilo, reduce la síntesis de antocianina –que es predominante en estas especies- y facilita la posterior manipulación. También ha sido beneficioso situar horizontalmente los embriones en el medio y entonces disponer las placas verticalmente o a 45 – 60°, de manera que las raíces no penetren en el medio sino que se desarrollen en su superficie (Klimaszewska y col. 2001; Lelu-Walter y col. 2006).

En *Quercus suber* (Bueno y col., 1992; Manzanera y col., 1993; González-Benito y col., 2002) y *Quercus ilex* (Mauri y Manzanera, 2004) la estratificación se ha revelado como el mejor tratamiento para la germinación coordinada y sincrónica. Es importante tener en cuenta el momento en que la planta es transferida a tierra, puesto que en algunas especies, como en *Magnolia pyramidata* (Merkle y Watson-Pauley, 1994), se ha visto que la transferencia de los embriones recién germinados favorece el posterior crecimiento de la planta *ex vitro*.

### **I.3.1.1.5. Acondicionamiento de las plantas**

Una vez que los embriones somáticos se convierten en plantas, son transferidos al mismo sustrato que se usa para las plántulas y crecen bajo condiciones controladas en un invernadero o en un vivero. Normalmente durante los 7 o 10 primeros días se mantiene una alta humedad relativa, que se reduce gradualmente durante un período de unos pocos días hasta alcanzar condiciones ambientales. La fertilización y los tratamientos de pesticidas son

los mismos que los utilizados para plántulas, exceptuando aquellas que se fertilizan inmediatamente después del trasplante (Klimaszewska y col., 2007).

### **I.3.1.2. Embriogénesis somática en especies del género *Quercus***

La gran variabilidad en la producción de bellota en las especies del género *Quercus*, los problemas de conservación de sus semillas y la recalcitrancia para su propagación vegetativa por métodos convencionales (Cornu y col., 1977; L'Hegoual y Espagnac, 1987, Isabel y Muñoz, 2009), han promovido que la propagación clonal mediante embriogénesis somática alcance en estos últimos años una especial significancia en este género (Tabla I.1). Hay numerosas referencias respecto a la propagación clonal de *Quercus*, mediante embriogénesis somática, utilizando explantos de origen juvenil, incluyendo *Q. acutissima* (Kim, 2000), *Q. bicolor* (Gingas y Lineberger 1989; Gingas, 1991); *Q. robur* (Cuenca y col., 1999; Chalupa 2000; Toribio y col., 2004; Valladares y col., 2006; San-José y col., 2010), *Q. rubra* (Rancillac y col., 1996; Vengadesan y Pijut, 2009); y *Q. suber* (Bueno y col., 1992; Hernández y col., 2001; Pinto y col., 2002, Hernández y col., 2003a). Sin embargo, aunque la inducción de embriogénesis somática de explantos juveniles no es generalmente problemática, el uso de explantos que no sean embriones zigóticos es mucho menos eficiente (Vieitez y col., 2012); de hecho, los avances significativos en la embriogénesis somática de encina adulta están restringidas a especímenes de élite de *Q. robur* y *Q. suber* (Chalupa, 2000; Wilhelm, 2000; Toribio y col., 2004; Valladares y col., 2006, Hernández y col., 2001; Pinto y col., 2002; Vieitez y col., 2012). En *Quercus suber* por ejemplo, se han propagado exitosamente genotipos superiores con el objetivo de implementar la llamada silvicultura multivarietal, donde plantas descendientes de líneas embriogénicas están siendo ensayadas en el campo mientras que copias de las mismas se mantienen criopreservadas (Kim, 2000; Hernández y col., 2011).

**Tabla I.1.** Resumen de estudios de ES realizado en especies del género *Quercus*, con especial referencia a aquellos publicados a partir del año 2000.

---

Especies	Referencias	
<i>Q. robur</i> L.	Cuenca y col., (1999)	Chalupa (2000)
	Zegzouti y col., (2001)	Sunderlikova y Wilhelm (2002)
	Sánchez y col., (2003)	Prewein y col., (2004)
	Toribio y col., (2004)	Corredoira y col., (2006)
	Valladares y col., (2006)	Martínez y col., (2008)
	Sánchez y col., (2008)	San-José y col., (2010)
<i>Q. suber</i> L.	Puigdejarrols y col., (1996, 2001)	García-Martín y col., (2001)
	Hernández y col., (2001)	González-Benito y col., (2002)
	Pinto y col., (2002)	Bueno y col., (2003)
	Hernández y col., (2003a y b)	García-Martín y col., (2005)
	Toribio y col., (2005)	Celestino y col., (2007)
	Pintos y col., (2010)	
<i>Q. rubra</i> L.	Vengadesan y Pijut (2009)	
<i>Q. ilex</i> L.	Mauri y Manzanera (2003, 2004)	
<i>Q. accutissima</i> Carruth.	Kim (2000)	

---

### I.3.1.3. Embriogénesis somática en especies del género *Pinus*

En los programas de reproducción de coníferas, la propagación mediante ES desarrollada durante las dos últimas décadas se ha convertido en la principal herramienta biotecnológica, mostrando un gran potencial para su aplicación en silvicultura (Klimaszewska y col., 2007). Después de la primera publicación sobre ES en *Pinus taeda* (Gupta y Durzan, 1987), la mayoría de los esfuerzos públicos y privados se han centrado en aquellas especies que son vitales para la industria forestal, *P. taeda*, *P. radiata*, *P. pinaster* y *P. strobus*.

La ES en pinos se ha iniciado más eficientemente a partir de embriones zigóticos (Tabla I.2), pero también se ha iniciado en semillas maduras o en árboles adultos de *P. taeda* (Gupta y Durzan 1987; Tang y col., 2001) y de *P. strobus* (Garin y col., 1998), aunque las frecuencias de iniciación fueron

demasiado bajas para la aplicación práctica. Más recientemente se ha conseguido iniciación de ES en *P. kesiya* (Malabadi y col., 2004) y *P. patula* (Malabadi y van Staden, 2005).

**Tabla I.2.** Primeras referencias sobre embriogénesis somática en especies del género *Pinus*.

Especies	Referencias
<i>P. banksiana</i> Lamb.	Park y col., 1998b
<i>P. caribaea</i> Morelet	Lainé y David, 1990
<i>P. elliotii</i> Engelm	Jain y col., 1989
<i>P. koraiensis</i> Sieb y Zucc.	Bozhkov y col., 1997
<i>P. lambertiana</i> Lamb.	Gupta y Durzan, 1986
<i>P. monticola</i> Dougl.	Percy y col., 2000
<i>P. nigra</i> Arn	Salajova y Salaj, 1992
<i>P. palustris</i>	Nagmani y col., 1993
<i>P. patula</i> Schiede y Deppe	Jones y van Staden, 1995
<i>P. pinaster</i> Ait.	Bercetche y Pâques, 1995
<i>P. radiata</i> D. Don	Smith y col., 1985
<i>P. roxburghii</i> Sarg.	Arya y col., 2000
<i>P. strobus</i> L.	Finer y col., 1989
<i>P. sylvestris</i> L.	Keinonen-Mettälä y col., 1996

La primera referencia sobre ES en *P. pinaster* fue realizado por Jarlet-Hugues (1989). En los experimentos realizados a partir de aquel momento, las mayores frecuencias de iniciación se han obtenido con embriones zigóticos en estadios tempranos de desarrollo (Bercetche y Pâques, 1995; Miguel y col., 2004, Humánez y col. 2012), aunque también se ha dado ES en estadios más avanzados como, por ejemplo, en embriones cotiledonares (Lelu y col., 1999). En este caso, se ha preferido el aislamiento y cultivo del embrión zigótico (Klimaszewska y col., 2007) al del cultivo del megagametofito intacto incluyendo el embrión (Miguel y col., 2004).

En *P. pinea*, la propagación por enraizamiento de las estacas es muy dificultosa por problemas relacionados con la ciclófisis y la topófisis (Carneros y col., 2009), y se han obtenido yemas adventicias que, posteriormente fueron

enraizadas (Capuana y Giannini, 1995; Valdés y col., 2001; Oliveira y col., 2003). No obstante hasta la fecha, hay una única referencia sobre embriogénesis somática en *P. pinea* utilizando megagametofitos con embriones zigóticos inmaduros (Carneros y col., 2009).

### I.4. Transformación genética

Una herramienta muy poderosa en biotecnología forestal es la transformación genética. La manipulación genética en coníferas se ha enfocado hacia el aumento de resistencia frente a patógenos fúngicos (Malabadi y Nataraja, 2007a), la resistencia a insectos, la modificación en el contenido de lignina y celulosa, la mejora en las tasas de crecimiento, la resistencia a herbicidas y la tolerancia a estrés abiótico (Lelu y Pilate, 2000; van Raemdonck y col., 2001; Osakabe y col., 2011).

Hay dos métodos básicos de transformación genética: el cocultivo del tejido vegetal con *Agrobacterium tumefaciens* y la biolística. La biolística o bombardeo de partículas se basa en la transferencia directa de ADN foráneo a las células vegetales, sin depender de vectores como bacterias o virus (Altpeter y col., 2005; Malabadi y Nataraja, 2007a). Además del bombardeo con partículas, hay otros métodos de transformación directa como la microinyección (Crossway y col., 1986), la transformación de protoplastos mediante PEG o fosfato de calcio (Datta y col., 1990), la electroporación (Fromm y col., 1986) y la transformación utilizando fibras de carburo de silicio (Frame y col., 1994).

Debido a la existencia de estos métodos, la transferencia del ADN en una célula vegetal no es un factor hoy en día limitante para la transformación (Birch, 1997), pero sí que lo es la orientación del ADN hacia un tejido u órgano complejo y competente para la regeneración (Herschbach y Kopriva, 2002). Además, como la intención es producir árboles transgénicos con propiedades mejoradas, esto solo puede ser evaluado en el árbol adulto, así que existe un largo lapsus de tiempo entre la realización de la transformación y la evaluación del proceso (Merkle y Dean, 2000; Pena y Seguin, 2001; Herschbach y Kopriva, 2002).

#### **I.4.1. Transformación genética mediante el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens***

Aunque el método de biolística se ha utilizado con éxito para transformar algunas coníferas (Ellis y col., 1993; Charest y col., 1996; Walter y col. 1998, 1999; Clapham y col., 2000; Nigro y col., 2004; Grace y col., 2005; Malabadi y Nataraja, 2007a), el cocultivo con *Agrobacterium* es, en la actualidad, el más extendido (Birch, 1997; de Buck y col., 2000; Tzfira y Citovsky, 2002; Dodueva y col., 2007) aplicándose a un gran número de especies (Malabadi y Nataraja, 2007a) (Tabla I.3).

El patrón de integración de los genes foráneos introducidos en las células vegetales mediante la transformación de *Agrobacterium* es notablemente diferente al patrón resultante del bombardeo de partículas (Stachel y col., 1985; Sheikholeslam y Weeks, 1987), y presenta la ventaja de que no provoca la integración de un número elevado de copias que puede causar silenciamiento génico (Hansen y Wright, 1999; Gelvin, 2003).

El mecanismo molecular de la transferencia del plásmido Ti de *Agrobacterium*, así como su integración y expresión, han sido objeto de amplio estudio (Tzfira y Citovsky, 2002, Pacurar y col. 2011). Las investigaciones que se están llevando a cabo en esa área incluyen análisis molecular y genético de la maquinaria de transferencia del ADN-T en *A. tumefaciens*, la regulación de los genes vir bacterianos que dirigen esta transferencia y el análisis molecular de la forma del ADN-T que es transferido (Tzfira y Citovsky, 2002, Pacurar y col. 2011). El proceso de transferencia de *Agrobacterium* a plantas incluye diferentes pasos (Sheng and Citovsky, 1996): 1) colonización bacteriana; 2) inducción del sistema de virulencia bacteriano; 3) procesamiento del ADN-T; 4) generación del complejo de transferencia del ADN-T; 5) transferencia del ADN-T y focalización nuclear; 6) integración del ADN-T en el genoma de planta.

**Tabla I.3.** Ensayos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* realizados en especies del género *Pinus*.

---

Especie	Referencias
<i>P. wallichiana</i> A. B. Jacks.	Malabadi y Nataraja 2007b
<i>P. pinaster</i> Ait.	Trontin y col., 2007; Milhinhos y col., 2007 Tereso y col., 2007
<i>P. strobus</i> L.	Tang y col., 2007
<i>P. radiata</i> D. Don.	Charity y col., 2005; Grant y col., 2004 Cerdeja y col., 2002; Charity y col., 2002
<i>P. taeda</i> L.	Gould y col., 2002; Tang y col., 2001 Tang, 2001; Wenck y col., 1999
<i>P. pinceana</i> Gord.	Villalobos-Amador y col., 2002
<i>P. maximartinezii</i> Rzedowski.	Villalobos-Amador y col., 2002
<i>P. contorta</i> Douglas.	Lindroth y col., 1999
<i>P. pinea</i> L.	Humara y col., 1999
<i>P. palustris</i> Mill.	Diner, 1999
<i>P. halepensis</i> Mill.	Tzfira y col., 1996
<i>P. banksiana</i> Lamb.	McAfee y col., 1993
<i>P. monticola</i> D. Don.	McAfee y col., 1993

---

El descubrimiento de que las secuencias del borde del ADN-T (llamadas LB y RB) son las únicas necesarias para que se realice la transferencia, fue crucial para la creación de vectores para la transformación genética (Garfinkel y col., 1981; Zambryski y col., 1983). El proceso se basa en eliminar alguno o todos los genes bacterianos del ADN-T generando los llamados vectores desarmados los cuales, una vez modificados, pueden transformar células vegetales, insertándoles nuevos genes, sin la formación de agallas (tumorcación producida en la planta tras la infección por *Agrobacterium*).

Se han desarrollado dos tipos de vectores para la transformación con *Agrobacterium*, los vectores co-integrados y los vectores binarios. Los vectores co-integrados llevan en el mismo plásmido los genes de virulencia y los de interés. Para su construcción se recombina un plásmido Ti desarmado que contiene el borde izquierdo y un pequeño vector que contiene un gen de interés flanqueado por el borde derecho y una región homóloga al borde izquierdo. La

recombinación se realiza entrecruzando las regiones homólogas de ambos plásmidos. Los vectores binarios son los más utilizados en la transformación de plantas. Estos vectores tienen dos plásmidos, un plásmido contiene la región vir y otro contiene la región del ADN-T con el gen de interés (Valderrama y col., 2005). Existe una gran variedad de vectores binarios, que se diferencian entre ellos por el número de sitios de restricción del ADN-T, el tamaño, la presencia de genes reporteros y los antibióticos o de genes selección en bacterias y plantas (Hellens y Mullineaux, 2000).

#### **I.4.2. Optimización de la metodología**

Los estudios de transformación genética en leñosas realizados hasta la fecha han demostrado el efecto del genotipo y de la propia línea embriogénica utilizada (Trontin y col., 2002; Tereso y col., 2006). Debido a esto, la selección de genotipos de más facilidad de transformación es muy útil cuando se define por primera vez un protocolo de transformación para nuevas especies (Nehra y col., 2005).

Hay varios factores a tener en cuenta en el abordaje de la transformación de cualquier especie:

1. La infectividad varía entre diferentes cepas y vectores de *Agrobacterium* (Hoekema y col., 1983; Koncz y Schell 1986; Hood y col., 1993).
2. La infección varía entre diferentes géneros y genotipos de coníferas (Loopstra y col., 1990; McAfee y col., 1993; Tang y col., 2001).
3. La infectividad depende del estado fisiológico y de desarrollo del tejido inoculado, así como de la temperatura, del pH y de la presencia de acetosiringona (Stachel y col., 1985, Sheikholeslam y Weeks, 1987; Godwin y col., 1991; James y col., 1993; Dillen y col., 1997).
4. La infectividad depende de los genes marcadores de selección y de los promotores usados (DeCleene y Deley, 1976; Diner y Karnosky, 1987; Ellis y col., 1989; Bergmann y Stomp 1992; Wenck y col; 1999).

Actualmente se están desarrollando protocolos para la optimización de la transformación de diferentes especies leñosas. En el abedul blanco, se ha visto que tras diferentes subcultivos se produce silenciamiento génico; esto se ha podido evitar mediante la administración de 5-azacitidina, que es un agente desmetilador de ADN (Zeng y col., 2010). Otros estudios se han centrado en el propio proceso de transformación con *Agrobacterium*. Por ejemplo, mediante la creación de heridas se han mejorado las eficiencias de transformación del fresno verde (Du y Pijut, 2009). Otros factores estudiados que afectan a la eficiencia de transformación han sido los tiempos de inoculación y de precultivo (Álvarez y Ordás, 2007; Corredoira y col., 2007; Li y col., 2007; Shen y col., 2008; Andrade y col., 2009; Du y Pijut, 2009; Liu y Pijut, 2010), la concentración bacteriana (Álvarez y Ordás, 2007; Li y col., 2007; Shen y col., 2008), y el tipo de tejido (Britton y col., 2007; Corredoira y col., 2007; Renying y col., 2007; Shen y col., 2008). También se ha visto que mediante la infiltración por vacío (Andrade y col., 2009; Du y Pijut, 2009) y la aplicación de sonicación (Zaragoza y col., 2004; Du y Pijut, 2009) se puede mejorar las eficiencias de transformación. Para finalizar, usando una suspensión embriogénica junto a la infiltración por vacío y la selección con gentamicina, se alcanzaron tasas de eficiencia de transformación cercanas al 100% en el castaño americano (Andrade y col., 2009).

Los análisis de expresión transitoria, por su parte, nos ayudan a observar si el gen se expresa en el tejido diana y donde lo hace, pero no son indicativos necesariamente de la integración del gen en el cromosoma huésped ni que se transfiera a la siguiente generación. Estos análisis son el primer paso a recorrer antes de realizar ensayos de transformación genética estable. El gen bacteriano *gusA*, que codifica una  $\beta$ -glucuronidasa, es el gen informador o reportero más utilizado para los ensayos de expresión transitoria.

Actualmente hay diferentes glucurónidos que pueden ser usados como sustratos para la beta-glucoronidasa, dependiendo del tipo de detección que se necesite (histoquímica, espectrofotométrica, fluorimétrica). El sustrato más utilizado para la tinción histoquímica GUS es el 5-bromo-4-cloro-3-indolinglucurónido (X-Gluc), que en presencia de la enzima se oxida y dimeriza

formando un precipitado de color azul distinguible a simple vista. Hay otros sustratos para medir la actividad, como el p-nitrofenil  $\beta$ -D-glucuronido para ensayos espectrofotométricos y el 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D- glucuronido (MUG) para el análisis fluorimétrico (Jefferson y col., 1987).

Existen hoy en día otros sistemas de genes informadores como los basados en luciferasa (*Luc*), la proteína GFP de *Aequoria victoria* y sus mutaciones, la proteína roja fluorescente de la anémona (Merzlyak y col., 2007),  $\beta$ -galactosidasa y cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). El uso de un sistema u otro depende del organismo de interés (Valderrama y col., 2005).

Los progresos en embriogénesis somática en coníferas ofrecen la posibilidad de producir grandes cantidades de plantas transgénicas en un amplio número de especies, que puede conducir a su aplicación en la industria forestal (Sutton, 2002). En este trabajo hemos realizado ensayos de expresión transitoria del gen *gusA* en *Pinus pinaster* y *Pinus pinea*.

### **1.4.3. Aplicaciones de la tecnología de transferencia génica**

Las aplicaciones de la ingeniería genética en el ámbito forestal incluyen la alteración de la forma y del rendimiento del árbol, la tolerancia al estrés abiótico, la resistencia a herbicidas e insectos, y la modificación del contenido y composición de lignina (Comai y col., 1985; Bowler y col., 1991; Baucher y col., 1996; Pena y Seguin 2001; Strauss y col., 2001; Herschbach y Kopriva 2002; Pijut y col., 2011).

Algunos ejemplos los encontramos en Elfstrand y col. (2001) que estudiaron los efectos de un gen endógeno relacionado con la peroxidasa *spi2* de *Picea abies*, y vieron que las células transformadas con el promotor del maíz *ubi-1* mostraban una actividad 40 veces superior que las células control, y que las plantas regeneradas que sobreexpresaban *spi-2* mostraban una actividad peroxidasa más elevada (Elfstrand y col. 2001). Esta sobreexpresión resultó en un aumento de la sensibilidad al estrés, conduciendo a una reducción de la formación del epicótilo y del crecimiento en altura que las plantas control. Por otro lado, Liu y Pijut (2010) describieron un método para

estudiar la esterilidad reproductiva del cerezo negro. Por último, Seppänen y col (2007) estudiaron, mediante sobreexpresión génica, el papel de un gen involucrado en la biosíntesis de lignina en las interacciones entre las raíces y los microorganismos del suelo en abedul.

También se han obtenido plantas transgénicas de *Larix* para el gen *Bt* de *Bacillus thuringiensis*, que promueve resistencia a lepidópteros inhibiendo su proceso de digestión (Ellis y col., 1993; Shin y col., 1994). Sobreexpresando la quitinasa IV de la remolacha azucarera en el abedul blanco, se ha aumentado la resistencia a enfermedades fúngicas (Vihervuori y col., 2008; Pasonen y col., 2009). La resistencia a herbicidas ha permitido el uso de herbicidas cada vez más eficientes que no afecten la salud de la planta o del bosque, especialmente para sistemas de plantación intensiva (Tang y col., 2003). Este tipo de resistencia es más útil en árboles jóvenes, donde la competencia con las malas hierbas es mayor (Shin y col., 1994).

Alterar la estructura química de la madera es un camino para mejorar sus propiedades (Tang y col., 2003). La investigación en este campo se ha hecho cada vez más importante ya que la madera es una fuente de energía renovable y un material industrial (Chiang 2002; Doblin y col., 2002). La pared celular de la madera consiste principalmente de polímeros de celulosa, lignina y hemi-celulosa (Doblin y col., 2002) y los grupos hidroxilo de estos polímeros son los responsables de algunas de las propiedades físicas y químicas de la misma. La lignina es el segundo componente orgánico más abundante en la Tierra, y representa sobre el 25% de la biomasa leñosa global (Leple y col., 1992). Aunque la lignina es un componente importante para el desarrollo leñoso, es también un obstáculo para la producción eficiente de pulpa y papel, ya que ha de ser eliminada para extraer la celulosa (Pilate y col., 2002). Este proceso consume energía y requiere el uso de productos químicos contaminantes. Por este motivo, es de especial interés diseñar árboles con bajas cantidades de lignina, o con una lignina fácil de eliminar, sin reducir las tasas de crecimiento del árbol y variar la forma del tronco (Baucher y col., 1996; Pilate y col., 2002). De hecho, ya se han diseñado árboles con la lignificación alterada (Pilate y col., 2002). Además, la inhibición de la biosíntesis de lignina

en árboles transgénicos aumenta la biosíntesis de celulosa y el crecimiento vegetal (Chiang 2002; Doblin y col., 2002; Li y col., 2003). En *Populus tremuloides* se han introducido en antisentido genes implicados en la biosíntesis de lignina, provocando una reducción de la síntesis de lignina y un aumento de la síntesis de celulosa (Li y col., 2003).

La fitoremediación es el uso de plantas transgénicas para eliminar contaminantes del suelo o del agua, y promete tener un impacto positivo en la polución medioambiental y, a largo plazo, en la preservación de recursos forestales (Herschbach y Kopriva, 2002). Por ejemplo, la sobreexpresión de la mercurio reductasa bacteriana en el álamo amarillo dio como resultado árboles transgénicos que eran resistentes a niveles tóxicos de iones mercurio y que eran capaces de liberar mercurio elemental (Rugh y col., 1998).

Los posibles riesgos de las plantas transgénicas sobre los ecosistemas forestales nativos pueden ser aminorados aumentando el conocimiento sobre el control del desarrollo floral en árboles lo que permitiría trazar estrategias para reducir o prevenir el daño de la transferencia génica vertical hacia especies silvestres mediante ingeniería genética de esterilidad (Strauss y col., 1995; Mathews y Campbell, 2000).

Para que los árboles modificados genéticamente sean desplegados comercialmente y se mantenga la biodiversidad, los futuros estudios en tecnología transgénica deben centrarse en la mejora de la expresión y estabilidad del transgen, tanto cuantitativa como cualitativamente, así como en la prevención de la fuga del transgen a las poblaciones nativas (Pijut y col., 2011).



## **II. OBJETIVOS**

---



## II. Objetivos

La sequía y las elevadas temperaturas, provocados por el cambio climático, unidas a una silvicultura inadecuada, están acelerando el decaimiento del bosque mediterráneo. De hecho, las especies forestales predominantes en estos bosques, fundamentalmente pertenecientes a los géneros *Quercus* y *Pinus*, presentan limitaciones en su crecimiento y son más susceptibles de ser atacadas por patógenos. En este contexto, el desarrollo de estrategias para la conservación y mejora de las especies forestales resulta evidente.

Entre las técnicas de propagación clonal, la embriogénesis somática presenta un gran potencial ya que permite la propagación de individuos de élite y su conservación *ex situ*, mediante técnicas de criopreservación. Además, las líneas embriogénicas o los embriones aislados han demostrado ser un tejido muy adecuado para abordar técnicas de transformación genética.

Los objetivos principales de este trabajo se centran en el desarrollo u optimización, en su caso, de protocolos de embriogénesis somática como proceso idóneo para la propagación de dos de las especies leñosas más abundantes en los bosques de la Península ibérica (*Pinus pinaster* Aiton y *Quercus ilex* L.). Así mismo, se pretende establecer los protocolos más adecuados para la transformación genética de *Pinus pinaster* y *P. pinea* mediante el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. La memoria comprende específicamente los siguientes apartados:

1. Elaboración de un protocolo para la propagación de individuos adultos de *Quercus ilex* mediante embriogénesis somática.
  - 1.1. Determinación de factores que promuevan la inducción de embriogénesis somática en hojas, flores masculinas y flores femeninas.
  - 1.2. Proliferación y establecimiento de líneas embriogénicas.
  - 1.3. Determinación de los factores que promuevan la maduración de los embriones obtenidos y su posterior germinación.
  - 1.4. Caracterización histológica de las líneas obtenidas.

## II. Objetivos

---

2. Optimización de protocolos para la maduración de callo embriogénico de *Pinus pinaster*.
3. Optimización los protocolos más adecuados para la transformación de *Pinus pinaster* mediante el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Se abordan midiendo la expresión transitoria del gen *gusA*.
4. Elaboración de protocolos para la transformación genética de *Pinus pinea* mediante el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Se abordan midiendo la expresión transitoria del gen *gusA*.

### **III. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Quercus ilex* L.**

---



### III. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Quercus ilex* L.

#### III.1. Introducción

*Quercus ilex* L. (encina) es una de las especies más representativas del bosque mediterráneo. En la Península ibérica es cultivada por sus bellotas, que sirven de alimento a la ganadería porcina fuente del apreciado jamón ibérico. En la mitad oriental de la Península, fundamentalmente en la zona del Maestrazgo, las raíces de la encina establecen relaciones simbióticas con hongos del género *Tuber* (como por ejemplo *Tuber melanosporum*), produciendo la llamada trufa negra o del Perigord de gran valor económico. A pesar de su indudable valor ecológico y económico, la variabilidad en la producción de semillas y sus problemas de almacenamiento (Alejano y col., 2011), junto con su recalcitrancia para ser propagada vegetativamente, impiden el abordaje de programas de mejora para la especie.

La propagación clonal mediante embriogénesis somática (ES) es la herramienta más adecuada para la propagación de genotipos de élite y para la implementación de la llamada silvicultura multivarietal (Kim, 2000; Hernández y col., 2011). Para esta especie y hasta la fecha, se han descrito únicamente protocolos de embriogénesis somática a partir de material juvenil (Mauri y Manzanera, 2003). Los ensayos descritos por Féraud-Keller and Espagnac (1989), a partir de material adulto, son incompletos y no llevaron a la obtención de plantas.

Por todo ello, el objetivo de este apartado es el desarrollo de protocolos efectivos y reproducibles que permitan la clonación de individuos adultos de *Quercus ilex* mediante embriogénesis somática.

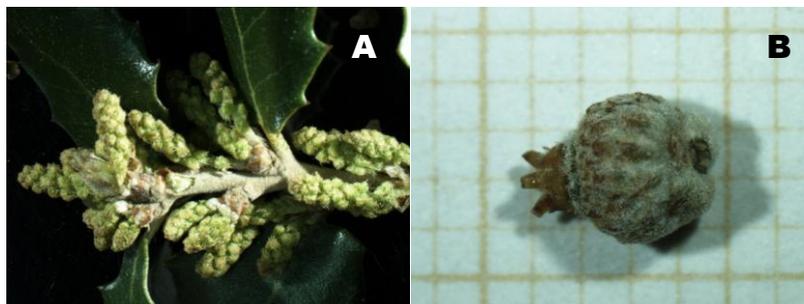
## III.2. Material y métodos

### III.2.1. Material vegetal

En los ensayos de embriogénesis somática se utilizaron estacas (Figura III.1) y flores masculinas y femeninas (Figura III.2) recogidas de encinas adultas (30-100 años) en diferentes zonas geográficas de la Península Ibérica: a) de un árbol procedente de Alcalá de Henares (Madrid) (muestra enviada por el grupo del IMIDRA, genotipo AL); b) de 5 árboles de 5 zonas de la provincia de Valencia; concretamente, Ayora, Hunde, Portera, Remedio y Villar del Arzobispo (denominados genotipos AY, HU, PO, RE, VA, respectivamente); y c) de un árbol del Toro (Castellón, genotipo TO) (Figura III.3).



**Figura III.1.** Ramas de encina de donde se extrajeron las estacas utilizadas en este trabajo



**Figura III.2.** A) amentos , B) flores femeninas, utilizadas en este trabajo

Las estacas de encina (<3 cm de diámetro) se recolectaron, en mayo y octubre del 2008 y en marzo del 2009, de los genotipos AL, AY, HU, RE y TO. De cada árbol se cortaron 30 segmentos de entre 15 y 20 cm de longitud, la mitad de ellos de menos de 1.5 cm de diámetro, y la otra mitad, de 1.5 a 3 cm. Los segmentos de estacas, desprovistos de ramificaciones laterales y hojas, se

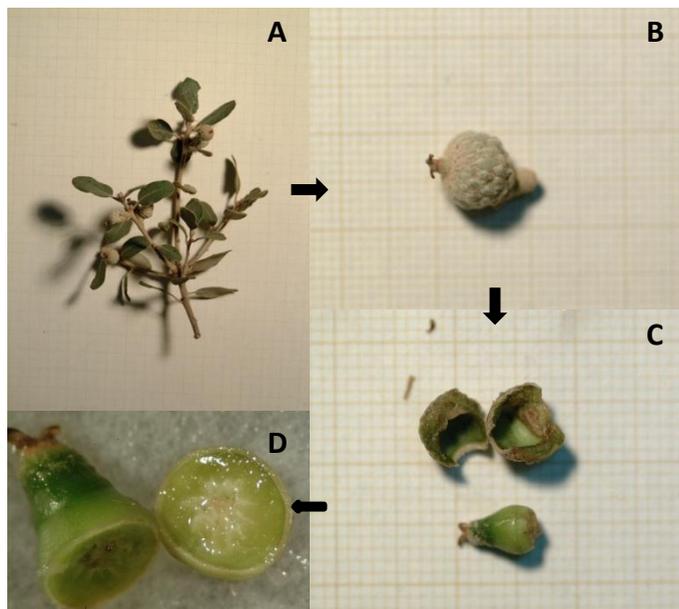
lavaron bajo el grifo con un cepillo fuerte y se sumergieron en 1 ml/l de Beltanol líquido (quinosol 50%), durante 15 minutos.



**Figura III.3.** Localización geográfica de los genotipos utilizados. El Toro (genotipo TO); Villar del Arzobispo (genotipo VA); Remedio (genotipo RE); Portera (genotipo PO); Ayora (genotipo AY); monte de Hunde (genotipo HU), Ayora. No está incluida en el mapa la procedencia Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid (genotipo AL).

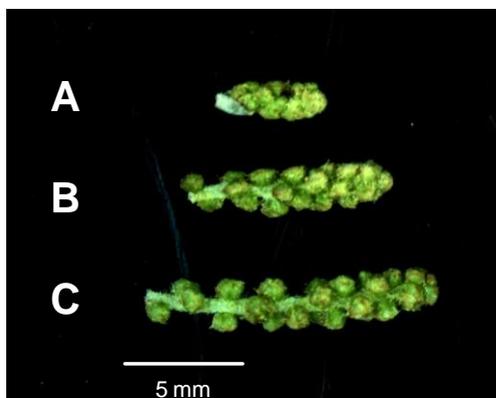
Para favorecer la brotación de las yemas, las estacas se dispusieron verticalmente en bandejas con perlita húmeda y se colocaron en una cámara a  $25\pm 5^{\circ}\text{C}$  de temperatura, 80-95% de humedad, y fotoperiodo de 16h. Se regaron diariamente con agua desionizada y se rociaron semanalmente con uno de los de fungicidas siguientes, siguiendo el orden que se describe: Previcur N [Propamocarb 60.5% (clorhidrato)], 2.5ml/l, Beltanol líquido, 1 ml/l; Captazel, [Captan 50%], 1g/l y Antracol 70 Pm [Propineb 70%], 2.5g/l. Al cabo de 2 semanas aparecieron los primeros brotes epicórmicos, y se recolectaron todas aquellas hojas con tamaños comprendidos entre 0.5 y 1.5 cm, anotándose cuantas se recogieron según genotipo y diámetro de estaca (mayor o menor de 1.5 cm). Para los ensayos con flores femeninas se recogieron flores (5-6 mm de longitud; Figura III.4) de los genotipos HU, RE y VA en dos años consecutivos (finales de junio del 2010 y del 2011), y del genotipo PO, sólo en el 2011. Las flores, todavía receptivas, se encontraban en el estadio en el que el estigma

empieza a oxidarse (Gómez-Casero y col., 2007).



**Figura III.4.** A) ramillete de encina con flores femeninas. B) detalle de las flores. C) flor desprovista de brácteas. D) sección transversal de la flor.

Los ramillos con flores masculinas (amentos), de 1 a 2 cm de longitud y con las flores cerradas, se recogieron durante dos años consecutivos: en abril de 2009, del genotipo VA, y en mayo del 2010, de los genotipos RE y HU.



**Figura III.5.** Clasificación de amentos de encina según tamaño utilizados en los experimentos del año 2011. A <5 mm, B 5-10 mm, C >10 mm.

En un tercer año, se recolectaron amentos (mayo y junio del 2011) de los genotipos VA, RE, HU, AY y PO, en 3 estadios de desarrollo diferentes: Estadio A, yemas florales de 2 a 4 mm con un variado número de estructuras meristemáticas desarrollándose al mismo tiempo; Estadio B, amentos empezando a desarrollarse con un pedúnculo corto, al descubierto, con flores distinguibles y longitud

no mayor de 1 cm; y Estadio C, amentos erectos (de más de 1 cm de longitud) con flores cerradas distinguibles alrededor del eje (Figura III.5).

Los lugares de recogida, las provincias de procedencia del material, así como el tipo de muestra tomado se presentan en la Tabla III.1.

Todas las muestras se guardaron en bolsas cerradas a 4°C y en oscuridad, hasta su utilización.

**Tabla III.1.** Descripción de la procedencia de los genotipos de encina empleados en la realización de diferentes ensayos, su localización y tipo de muestra recogida.

Genotipo	Lugar de recogida	Provincia	Tipo de muestra
AL	Alcalá de Henares	Madrid	Estacas
AY	Ayora	Valencia	Estacas Amentos
HU	Ayora	Valencia	Estacas Amentos Flores femeninas
PO	Portera (Requena)	Valencia	Flores femeninas
RE	Utiel	Valencia	Estacas Amentos Flores femeninas
TO	El Toro	Castellón	Estacas
VA	Villar del Arzobispo	Valencia	Amentos Flores femeninas

### III.2.2. Medios y condiciones de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este apartado se exponen en la Tabla III.2. Los citados medios contenían los macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1972), o B5 (Gamborg, 1966) diluidos a la mitad de su concentración original. Todos los medios contenían los micronutrientes y vitaminas MS y, si no se especifica lo contrario, 30 g/l de sacarosa.

**Tabla III.2.** Composición de los medios utilizados en los ensayos de embriogénesis somática de encina (mg/l). Todos los medios contenían microelementos y vitaminas MS.

	MEDIOS NUTRITIVOS		
	MS	SH	B5
<b>Macroelementos</b>			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	500
MgSO <sub>4</sub>	370	400	125
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	300	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	330	165	75
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·SO <sub>4</sub>			100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O			37.81
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O			50.87
KCl			150
<b>Microelementos</b>			
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025		
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025		
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20		
KI	0.83		
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	22.30		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.60		
SO <sub>4</sub> FE·7H <sub>2</sub> O	27.84		
<b>Vitaminas</b>			
Mioinositol	100.00		
Ácido nicotínico	0.50		
Piridoxina	0.50		
Tiamina	0.10		
Glicina	2.00		
<b>Azúcar</b>			
Sacarosa	30000		

Los reguladores de crecimiento benciladenina (BA), kinetina, 2-isopentenil adenina (2iP), ácido 2,4D-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indol-

butírico (AIB), 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea (TDZ) y ácido naftalén-acético (ANA), se adicionaron a los medios de cultivo antes de proceder a su esterilización, mientras que la citoquinina zeatina y el ácido abscísico (ABA) se esterilizaron previamente (filtro milipore de 22  $\mu\text{m}$  de diámetro) y se añadieron al medio ya estéril. Los agares utilizados fueron agar Phytigel [SIGMA-ALDRICH, EEUU], 2.5 g/l y Plantagar S1000 [B&V, Italia] 6 g/l. El pH de los medios se ajustó a 5.8 con HCl y KOH, antes de proceder a su esterilización en autoclave ( $10^5$  Pa a  $120^\circ\text{C}$ , 20 min).

Los recipientes de cultivo utilizados fueron placas petri de plástico de 60 x 15 mm (sólo para medios de precondicionamiento) y 90 x 15 mm, con 15 y 25 ml de volumen, respectivamente. Las placas se sellaron con Parafilm®. Los cultivos se mantuvieron en cámaras de crecimiento a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  en oscuridad o fotoperiodo de 16 h (tubos fluorescentes SYLVANA GRO-LUX® y Philips cool-white,  $120\text{-}180 \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ).

### III.2.3. Esterilización y establecimiento de los cultivos

Tanto las hojas como los amentos, separados de las estacas, se esterilizaron sumergiéndolos en etanol (70%) durante 30 segundos con agitación intensa, y a continuación en lejía comercial diluida al 10% (3.5% de cloro activo) y 2 ó 3 gotas de Tween 20 durante 10 min. Por último, se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril. Debido a la existencia de una cáscara que confiere protección al explanto, pero también resguardo a los microorganismos, el protocolo de esterilización de las flores femeninas fue un poco más agresivo que el de hojas y amentos. Así, se aislaron las flores femeninas y se sumergieron en etanol (70%) durante 1 minuto con agitación intensa y después se pasaron a lejía comercial (15%) y 2 gotas de Tween 20, durante 15 minutos, para finalizar de nuevo con 3 lavados con agua destilada estéril.

Después de la esterilización, las hojas, los amentos enteros o sus flores aisladas y las flores femeninas seccionadas o sus lóculos aislados, se sembraron en medio de precondicionamiento que contenía los macronutrientes B5, diluidos a la mitad, los micronutrientes y vitaminas de MS, 20 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo

a  $25\pm 2$  °C y en oscuridad. Transcurridos 10 días, los explantos necrosados y/o contaminados se eliminaron y el resto se transfirieron a medio primario de inducción.

#### III.2.4. Inducción de embriogénesis somática en explantos de hoja

Estos ensayos se realizaron durante dos años consecutivos utilizando 5 protocolos multifase (preacondicionamiento, primaria y secundaria de inducción, y manifestación). El primer año (con hojas procedentes de estacas recogidas en mayo y octubre del 2008) se utilizaron 3 protocolos que habían sido eficaces para inducir embrogénesis somática en otras especies del género *Quercus*; concretamente en *Q. suber* (Hernández y col., 2003; PI), en *Q. robur* (Toribio y col., 2004; PII) y *Q. ilex* (Féraud-Keller y Espagnac, 1989; PIII) (Tabla III.3). El segundo año (hojas procedentes de estacas recogidas en marzo del 2009), se ensayaron otros 2 protocolos multifase: uno que permite propagar industrialmente plantas de café a partir de secciones de hojas (Etienne, 2005; protocolo CAF), y otro no publicado que incluía modificaciones en los reguladores de crecimiento, concretamente contenía diferentes citoquininas (protocolo CIT). Se sembraron al menos 30 placas por tratamiento, con entre 2 y 6 explantos por placa, con el envés en contacto con el medio (excepto en el protocolo CAF, donde el haz se dispuso en contacto con el medio). La composición y características de cada protocolo se exponen en la Tabla III.3. Los cultivos se mantuvieron durante 1 mes en cada uno de los medios.

Después de cada fase, se determinó el porcentaje de explantos con callo y con embriones somáticos.

Los callos obtenidos en el ensayo del 2009 se clasificaron según su apariencia, nodular, mucosos o espumosos y se transfirieron a matraces de 125 ml con aspas con 25 ml de los respectivos medios de manifestación CIT o CAF líquido. En cada matraz se inocularon 0.5 g de callo y se prepararon 3 matraces por tipo de callo. Los matraces se mantuvieron en agitación a 100 rpm, oscuridad y a  $25\pm 2$ °C durante 5 meses, con subcultivos al mismo medio cada 2 semanas. Transcurrido este periodo se determinó la respuesta embriogénica del callo.

### III. Material y métodos: ES en *Quercus ilex*

**Tabla III.3.** Protocolos usados para la embriogénesis somática en hojas de encina. RCs (reguladores de crecimiento); MS 1/2 (macronutrientes MS a la mitad de concentración).

Protocolo		Medio		
		Primario de inducción	Secundario de inducción	Manifestación
PI ( <i>Q. suber</i> )	Macronutrientes	SH	SH	SH
	Vitaminas	MS	MS	MS
	RCs ( $\mu$ M)	ANA/BA (50/10)	ANA/BA (0.5/0.5)	.
	Condiciones de cultivo	Oscuridad	Fotoperiodo 16h	Fotoperiodo 16h
PII ( <i>Q. robur</i> )	Macronutrientes	MS	MS	MS
	Vitaminas	MS	MS	MS
	RCs ( $\mu$ M)	ANA/BA (20/2.5)	ANA/BA (0.5/0.5)	.
	Hidrolizado de caseína	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l
PIII ( <i>Q. ilex</i> )	Macronutrientes	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /2)	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /2)	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /2)
	Vitaminas	MS	MS	MS
	RCs ( $\mu$ M)	ANA/BA (2.5/20)	ANA/BA (2.5/20)	.
	Condiciones de cultivo	Oscuridad	Fotoperiodo 16h	Oscuridad
P. CAF	Macronutrientes	MS 1/2	MS 1/2	MS 1/2
	Vitaminas	Tiamina 10 mg/l	Tiamina 20 mg/l	Tiamina: 5 mg/l
		Ác. nicotínico 1 mg/l	.	Ác. nicotínico 0.5 mg/l
		Piridoxina: 1 mg/l	.	Piridoxina 0.5 mg/l
	Myo-inositol	100 mg/l	200 mg/l	50 mg/l
	Glicina	1 mg/l	20 mg/l	.
	Cisteína	.	40 mg/l	20 mg/l
	Sulfato de adenina	.	60 mg/l	.
	Extracto de malta	0.4 g/l	0.8 g/l	0.2 g/l
	Hidrolizado de caseína	0.1 g/l	0.1 g/l	0.1 g/l
	RCs ( $\mu$ M)	2,4-D/2iP/BA (2.3/9.8/4.9)	2,4-D/BA (4.52/17.76)	2,4-D/kinetina (4.52/4.65)
	Condiciones de cultivo	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad
	P. CIT	Macronutrientes	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /2)	MS (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> /2)
Vitaminas		MS	MS	MS
RCs ( $\mu$ M)		2,4-D/BAP (5/2)	ANA/ V1,V2,V3* (0.5/0.5)	.
Hidrolizado de caseína		0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l
Condiciones de cultivo	Oscuridad	Fotoperiodo 16h	Fotoperiodo 16h	

Todos los medios contienen micronutrientes MS y 30 g/l de sacarosa. El protocolo CAF fue solidificado con 2.5 g/l de Phytigel, y los otros se solidificaron con 6 g/l de Plantagar. Los subcultivos se realizaron cada 30 días. V1,V2,V3\*: 3 medios diferentes que incluyen ANA y una de las citoquininas 2iP, zeatina o kinetina, respectivamente.

### **III.2.5. Inducción de embriogénesis somática en flores femeninas**

Estos ensayos se llevaron a cabo durante dos años consecutivos (2010 y 2011). En el primer año se ensayó el efecto de la aplicación o no de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, y en el segundo año, el efecto de dos combinaciones de macronutrientes sobre la inducción de ES.

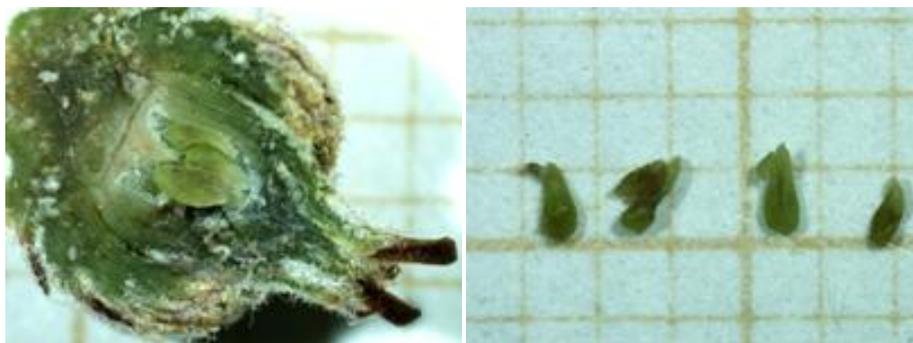
#### **III.2.5.1. Ensayos con flores femeninas seccionadas**

En el primer ensayo, las flores femeninas se sembraron, partidas transversalmente por la mitad, en medio de preacondicionamiento, y posteriormente se transfirieron a placas petri con 25 ml de medio de cultivo que incluía los macronutrientes B5, los micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/l de sacarosa y 6g/l de Plantagar. El citado medio, sin reguladores de crecimiento o suplementando con 10  $\mu\text{M}$  de ANA y 10  $\mu\text{M}$  de BA, se denominó medio primario de inducción. Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a  $25\pm 2^\circ\text{C}$  y en oscuridad, durante 30 días y se transfirieron a sus respectivos medios de cultivo, pero con las dos hormonas reducidas a 0.5  $\mu\text{M}$ , en aquellos cultivos que contenían reguladores de crecimiento (medio secundario de inducción). Se cultivaron 30 explantos por genotipo (3 por placa; 10 placas en total). Los cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones, bajo fotoperiodo de 16 h durante 30 días, y posteriormente todos los cultivos se transfirieron a medio sin reguladores de crecimiento (medio de manifestación).

#### **III.2.5.2. Ensayos con lóculos aislados**

En los experimentos del 2011, las flores femeninas se diseccionaron longitudinalmente, se aislaron los lóculos (Figura III.6), y se sembraron directamente sobre el medio de preacondicionamiento. En la fase de inducción se ensayó el efecto de dos formulaciones de macronutrientes (B5 y MS). Los medios se suplementaron o no con 10  $\mu\text{M}$  de ANA y 10  $\mu\text{M}$  de BA. Se sembraron 400 lóculos por genotipo (10 lóculos por placa; 40 placas en total). Se utilizaron los mismos medios secundario de inducción y manifestación y las mismas con-

diciones de cultivo que en el ensayo anterior, manteniendo las mismas formulaciones de macronutrientes. Un mes después del cultivo en el medio de manifestación, se determinó el porcentaje de explantos con callo y con embriones somáticos. Los embriones somáticos obtenidos se mantuvieron en medio de manifestación.



**Figura III.6.** Flor femenina de encina partida por la mitad (izquierda), donde pueden verse los lóculos que posteriormente fueron extraídos (derecha) para su cultivo.

### III.2.6. Inducción de embriogénesis somática en flores masculinas

Se han realizado una serie de ensayos para determinar el efecto del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, el genotipo y el estado de desarrollo de las flores sobre la inducción de embriogénesis somática en flores masculinas de *Q. ilex*.

#### III.2.6.1. Efecto del medio de cultivo

En un primer experimento se utilizaron flores aisladas de amentos del genotipo VA y se ensayó el efecto de dos formulaciones de macronutrientes sobre la inducción de embriogénesis somática.

Tras el preacondicionamiento, los explantos se transfirieron a medios primarios de inducción con macronutrientes MS o SH diluidos a la mitad. Cada medio fue suplementado con 10  $\mu\text{M}$  de BA y 10 ó 50  $\mu\text{M}$  de ANA, dando como

resultado 4 medios primarios de inducción denominados 10MS, 50MS, 10SH y 50SH. Los explantos se mantuvieron durante 30 días en fotoperiodo de 16 h y posteriormente, se subcultivaron a medio secundario de inducción, con macronutrientes SH a la mitad de su concentración y con las hormonas reducidas (0.5  $\mu\text{M}$  de ambos reguladores). Tras 30 días, se transfirieron a medio de manifestación, ensayándose 2 variantes de este medio: a) Medio A-m, con macronutrientes SH sin reguladores de crecimiento; y b) Medio MS-a, con macronutrientes MS con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a la mitad de su concentración original y con 0.5  $\mu\text{M}$  de BA y 0.5  $\mu\text{M}$  de NAA. La mitad de los explantos de cada medio de inducción se transfirieron al medio A-m y la otra mitad al medio MS-a. Todos los medios incluían micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Se sembró un total de 1272 flores (12 a 16 flores individuales por placa) en 87 placas; todos los cultivos se mantuvieron bajo fotoperiodo de 16h y se transfirieron a medio fresco cada 30 días durante 60 días. Los datos de la frecuencia de formación de callo y de inducción de embriogénesis somática se tomaron al final de los períodos de inducción y manifestación.

Los embriones obtenidos en el primer ensayo fueron subcultivados en tubos de vidrio con medio A-m, con la intención de favorecer su germinación. Al observarse embriogénesis secundaria en uno de los tubos, los embriones obtenidos se amplificaron en medio MS-a, en las mismas condiciones que las anteriores, para tener suficiente material para experimentos de maduración y germinación.

En base a la respuesta obtenida en este primer ensayo, en el segundo año, donde se estudió la capacidad embriogénica de los genotipos RE y HU, se utilizó únicamente los medios MS en la fase primaria de inducción (medios 10MS y 50MS) y se mantuvieron con la misma composición los medios secundario de inducción y manifestación. Se sembraron 500 flores por genotipo (de 12 a 16 flores individuales por placa), en un total de 35 placas. Los datos de la frecuencia de formación de callo y de inducción de embriogénesis somática se tomaron al final de los períodos de inducción y manifestación.

### **III.2.6.2. Efecto del estadio de desarrollo del amento**

En el tercer año se estudió el efecto del genotipo y del estadio de desarrollo del amento (estadios A, B y C). Tras la fase de precondicionamiento, los explantos, consistentes en flores aisladas o amentos completos, se transfirieron secuencialmente a medio primario de inducción (medio 50MS), medio secundario de inducción (SH con las hormonas reducidas) y medio A-m de manifestación. Los amentos en estadio A se sembraron enteros, debido a que las flores no eran todavía distinguibles; mientras que los amentos de estadios B y C se sembraron tanto enteros como separándolos en flores individuales. Se cultivaron 400 flores individuales (40 por placa; 40 placas en total) y 30 amentos enteros (6 por placa; 5 placas en total) por cada tamaño y genotipo. Los datos de la frecuencia de formación de callo y de inducción de embriogénesis somática se tomaron al final del período de manifestación.

### **III.2.7. Maduración de los embriones somáticos**

En los ensayos de maduración se utilizaron los embriones obtenidos de diferentes líneas embriogénicas de amentos procedentes de los experimentos de los dos primeros años.

#### **III.2.7.1. Efecto de los azúcares y del medio de cultivo**

El callo embriogénico, con algunos embriones globulares y cotiledonares tempranos, procedente de la línea recurrente del primer ensayo (VA1), se cultivó en medios con macronutrientes MS o SH (reducidos ambos a la mitad de su concentración), complementado (MSI, SHI) o no (MSII, SHII) con 60 g/l de sorbitol. Todos los medios contenían micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Se cultivaron 10 placas con una media de 19 aglomerados embriogénicos por placa. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 h a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  y los datos de maduración se tomaron a los 30 días de cultivo.

### III.2.7.2. Efecto del ABA, la BA y la estratificación

Se realizó un segundo experimento en el que se estudió el efecto del ABA sobre la maduración y de la posterior estratificación en presencia de BA (Mauri y Manzanera, 2004) sobre la germinación. Los embriones globulares procedentes del anterior ensayo se sembraron, a razón de 3 explantos por placa, en medio MSII con y sin 2  $\mu\text{M}$  de ABA, donde se mantuvieron durante un mes, para después subcultivarlos a medio MSII sin ABA y con o sin 0.44  $\mu\text{M}$  de BA, donde permanecieron un mes más. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 h a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se subcultivaron al mismo medio sin reguladores de crecimiento; la mitad de las placas de cada variante se mantuvo en las mismas condiciones y la otra se estratificó durante 30 días a  $4^\circ\text{C}$  y oscuridad. Todos los medios contenían micronutrientes y vitaminas MS, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. En total se sembraron 8 placas por tratamiento y se tomaron los datos un mes después del último subcultivo.

### III.2.7.3. Efecto del fraccionamiento en medio líquido

Con la finalidad de homogeneizar el material embriogénico, se realizó un ensayo en medio líquido previo a la maduración. Como material vegetal se utilizó la línea establecida el primer año (línea VA1) y 3 líneas del segundo (líneas HU3, HU5 y HU7). Se pesaron 0.25 g de callo y se resuspendieron en matraces con aspas de 125 ml con 30 ml de medio líquido MSI, realizando dos repeticiones por línea. Los matraces se mantuvieron en agitación (100 rpm) y oscuridad ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ). Al cabo de un mes, con un subcultivo a las dos semanas, se fraccionaron los cultivos utilizando tamices de 0.25, 0.42 y 1 mm de diámetro de poro, estableciendo así cuatro tamaños celulares para cada una de las líneas (A > 1.00 mm; B: 0.42 – 1.00 mm; C: 0.25 – 0.42 mm; D < 0.25 mm). Las distintas fracciones obtenidas de cada línea se mantuvieron en agitación y se determinó la velocidad del crecimiento anotando las variaciones en el volumen celular, tras una centrifugación suave en un matraz de base cónica graduada, a los 0, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 20, 27 y 34 días.

Después de 34 días en agitación, se recogieron los callos de las fracciones A y B sobre un soporte de nylon (47 mm  $\varnothing$  y 1.0  $\mu\text{m}$  de poro) o papel Whatman 55 mm de celulosa, que se colocó en placas petri que contenían 25 ml de medio MS sólido con macronutrientes a la mitad de concentración y con 60 g/l de sorbitol o de manitol. Se realizó un diseño factorial con todas las líneas y como control se utilizó la línea VA1 sin fraccionar. Se sembraron 4 placas por tratamiento, con 5 aglomerados embriogénicos por placa, excepto del callo sin fraccionar, en que se sembraron 7 placas. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 h a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Se realizaron subcultivos mensuales al mismo medio y se tomaron los datos de maduración a los 3 meses de iniciado el experimento.

#### **III.2.7.4. Efecto del inositol y el período de cultivo en ABA**

Se ensayó el efecto del inositol (0, 0.5 y 1 g/l) sobre la maduración de callo embriogénico procedente de la línea VA1, generado en el ensayo del efecto de los azúcares y los macronutrientes sobre la maduración. Se seleccionó el callo mantenido en los medios MSI y MSII, y se cultivó en el mismo medio de cultivo durante 30 días, suplementado con las diferentes concentraciones de inositol. Se realizaron 7 repeticiones por tratamiento con 8 callos embriogénicos por placa. Después, se cortaron los aglomerados de callos por la mitad y se transfirieron a su medio correspondiente suplementado o no con 2  $\mu\text{M}$  de ABA, donde se mantuvieron un mes. Posteriormente, de los callos sembrados con ABA, la mitad se mantuvieron en el mismo medio, y la otra mitad se transfirió a medio sin ABA (4 aglomerados/placa). Los que no se sembraron inicialmente con ABA, continuaron en el mismo medio (8 aglomerados/placa), subcultivándolos a medio fresco tras 30 días. En todos los casos, los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 16 h a  $25\pm 2^\circ\text{C}$ . Los datos de frecuencia de embriogénesis secundaria y de maduración se tomaron 30 días después del último subcultivo.

Los embriones obtenidos fueron sembrados en el mismo medio donde se encontraban pero sin ABA y con 0.45  $\mu\text{M}$  de TDZ y 1  $\mu\text{M}$  de AIB, con subcultivos mensuales, con la intención de favorecer su germinación. Se observó

la evolución de estos en cada subcultivo.

Parte del material obtenido en estos experimentos (callos embriogénicos y embriones cotiledonares) se utilizó para los análisis histológicos. Además, una porción de estos callos se sembró en placas de 90 mm de diámetro (una placa por tratamiento) con medio MS con 6% sacarosa, 6  $\mu$ M de tiosulfato de plata (STS), 4g/l de carbon activo (CA) y 7g/l de Phytigel. El cultivo se mantuvo durante 1 mes en fotoperiodo de 16 horas y a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y, pasado este período de tiempo, se realizó el análisis histológico para observar cambios debidos a este tratamiento.

#### III.2.8. Estudio histológico de la embriogénesis en *Quercus ilex*

Para el estudio histológico se utilizó callo embriogénico de la línea VA1 procedente del ensayo del efecto del inositol y el período de cultivo con ABA, sometido, por tanto, a diferentes tratamientos de maduración y que por ello presentaba diferentes características fenotípicas, fundamentalmente referidas a su coloración y presencia o no de embriones somáticos en etapa cotiledonar. Los tratamientos de maduración aplicados a cada sublínea se especifican en la Tabla III.4.

**Tabla III.4.** Sublíneas de encina seleccionadas del ensayo del efecto del inositol y del período de cultivo en ABA sobre la maduración. Estas fueron sembradas en medio MSII y con las variantes especificadas en esta Tabla.

Sublínea	Composición del medio de maduración
VA1-12	0.0 g/l inositol 0 + 2 meses en 2 $\mu$ M de ABA
VA1-13	0.5 g/l de inositol y sin ABA
VA1-15	0.5 g/l inositol + 2 meses en 2 $\mu$ M de ABA
VA1-16	1.0 g/l inositol y sin ABA

También se seleccionaron para el análisis histológico embriones cotiledonares, procedentes del mismo ensayo anterior y cultivados en medio MSI y sembrados con 0.5 mg/l de ABA aplicado durante 0, 1 y 2 meses (sublíneas VA1-20A, B y C, respectivamente; Tabla III.5).

**Tabla III.5.** Sublíneas de embriones obtenidos de diferentes tratamientos de maduración en callo embriogénico de encina, procedentes todas ellas del tratamiento 20 (medio MSI y 0.5 mg/l ABA)

Sublínea	Meses de aplicación de ABA
VA1-20A	0
VA1-20B	1
VA1-20C	2

### III.2.8.1. Procesamiento de las muestras para inclusión en parafina

Las muestras de tejido vegetal se fijaron durante 24 horas en una solución 5:5:90 (v/v/v) de formol: ácido acético glacial: etanol 50° (FAA) (Tabla III.6). Seguidamente el material fue lavado en un baño de etanol 50° durante 2 horas para eliminar la solución fijadora.

Para la deshidratación del material vegetal, se emplearon baños en series de alcohol butírico. Las series son mezclas de butanol con etanol y agua, donde el etanol y el agua van siendo progresivamente reemplazados por el butanol para conseguir una deshidratación gradual en la que el tejido se va impregnando en un solvente de la parafina como es el butanol. Las muestras permanecieron 24 horas en cada serie.

Después, se realizaron 3 baños de 24 horas cada uno en 100 ml de butanol. Al último de los baños en butanol se le añadió unas gotas de safranina para que el explanto fuera visible y facilitar así el corte. El tejido, totalmente infiltrado en este momento por el butanol, se sometió a un baño de parafina y butanol (1:1) de 24 horas en estufa a 60°C, seguido por otros 2 baños de 24 horas en parafina pura, con el fin de eliminar el butanol del tejido, quedando este infiltrado totalmente en parafina. Tras el último baño, cada muestra se incluyó en un bloque de parafina utilizando piezas de plástico como molde, cuidando de orientar adecuadamente cada muestra (Tabla III.6). Los embriones somáticos se orientaron de modo que el eje longitudinal fuese paralelo a la superficie de corte (secciones longitudinales). Para facilitar la solidificación de

### III. Material y métodos: ES en *Quercus ilex*

los bloques de parafina, éstos se sumergieron en agua fría durante 10 minutos. Por último, el bloque se colocó en hielo durante media hora.

**Tabla III.6.** Protocolo para inclusión de las muestras en parafina.

Etapas	Soluciones	Tiempo	Temperatura
Fijación	FAA:formaldehido:ácido acético:etanol 50 (5:5:90 (v / v / v))	24-48h	4°C
Lavado	Etanol 50%	2x1h	TA <sup>1</sup>
Deshidratación	Serie 50: 50 ml H <sub>2</sub> O, 40 ml Etanol 96%, 10 ml n-butanol	24h	TA
	Serie 70: 30 ml H <sub>2</sub> O, 50 ml Etanol 96%, 20 ml n-butanol	24h	TA
	Serie 85: 15 ml H <sub>2</sub> O, 50 ml Etanol 96%, 35 ml n-butanol	24h	TA
	Serie 96: 45 ml Etanol 96%, 55 ml n-butanol	24h	TA
	Serie 100: 25 ml Etanol 100%, 75 ml n-butanol	24h	TA
	n-butanol 100%	3x24h	TA
Infiltración	Parafina:n-butanol (1:1(v/v))	24h	58°C
	Parafina pura	24h	58°C
	Parafina pura	24h	58°C
Inclusión	Parafina pura		

<sup>1</sup>TA: temperatura ambiente

Las secciones (8 µM) se obtuvieron con un micrótopo rotatorio Reichert-Jung Modelo 1130/Biocut. Los cortes seriados se colocaron en portaobjetos (76 x 26 mm), previamente cubiertos con adhesivo de Haupt, y sobre unas gotas de formalina (formol 4%) que facilita el estiramiento de los cortes. Los portaobjetos con las secciones del tejido se dejaron secar posteriormente sobre una placa a 37°C durante 24 horas. Una vez secos, quedaron preparados para ser teñidos.

Para su tinción, las secciones se desparafinaron en citrosol, se rehidrataron en series decrecientes de etanol (100, 96, 70, 50 %) y se tiñeron con la tinción PAS-Azul de Naftol (O'Brien y McCully, 1981) o con tinción safranina-verde rápido (Jensen, 1962). El PAS tiñe de rosa-fucsia los acúmulos polisacáridicos en forma de almidón y las paredes celulares no lignificadas, mientras que con azul naftol se detecta la presencia de proteínas que aparecen teñidas de azul, y además se tiñe en ese mismo color el núcleo celular. La tinción de safranina-verde rápido se utiliza para un examen general de la estructura

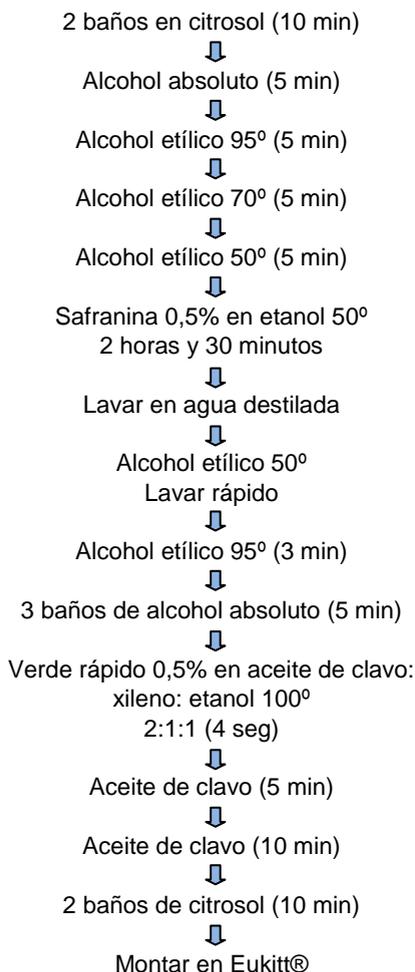
anatómica del tejido. La safranina tiñe de rojo las paredes lignificadas y los núcleos celulares y el verde rápido tiñe de verde las paredes celulares no lignificadas. En la Figura III.7 se refleja el procedimiento empleado para la realización de estas tinciones partiendo de cortes previamente hidratados según lo descrito anteriormente.

### III.2.8.2. Preparación de las muestras en resina

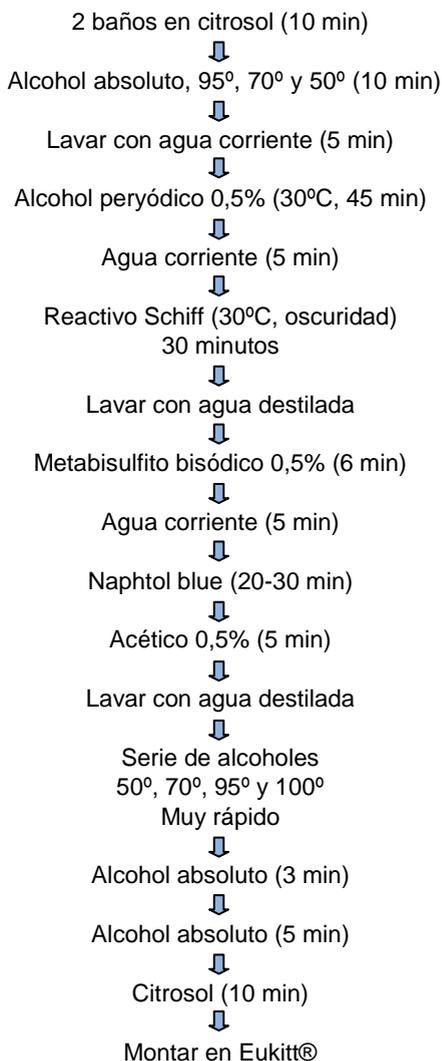
Las muestras vegetales se fijaron durante 24 horas a 4°C en una solución de 2% de glutaraldehído y 2% de paraformaldehído, en 0.05 M de tampón fosfato a pH 6,8. Una vez fijado el material, se realizaron 3 lavados en 0.05 M de tampón fosfato de 20 min cada uno. La deshidratación del material se realizó mediante baños de etanol de concentración creciente, de 50 a 100°C, de 1 hora cada uno. Posteriormente, el material se pasó por 2 baños de alcohol absoluto de 12 horas cada uno, antes de la infiltración en la resina.

Se empleó la resina LR White (Newman y col., 1982) como agente de infiltración (Tabla III.7). Para la inclusión del tejido, éste se sometió a un baño de resina:etanol 100°, 1:3, durante 4 horas, seguido de otro baño de igual duración en resina:etanol 100°, 3:1, y posterior inclusión en resina pura. Para ello, el tejido se colocó en cápsula de gelatina llena de resina y el conjunto se dejó polimerizar en estufa a 60°C durante 24 horas. Para el seccionado de los bloques de resina, se empleó el ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E, en el que se realizaron manualmente cortes semifinos (2 µm) que se recogieron en agua y se colocaron sobre el portaobjetos. Los portaobjetos habían sido previamente tratados con un adhesivo, preparado disolviendo 2.5 g de gelatina y 0.25 g de sulfato potásico crómico por litro de agua. Cada corte se colocó sobre una gotita de agua y, a continuación, los portaobjetos se dejaron secar sobre una placa a 60°C durante 5 minutos. Los cortes fueron sometidos a un procedimiento de tinción, basado en el método de Gutmann (1995) modificado. El resultado fue una fuerte coloración azul verdosa en los depósitos fenólicos y la obtención de núcleos coloreados en azul.

### SAFRANINA – VERDE RÁPIDO



### PAS-AZUL NAFTOL



**Figura III.7.** Pasos seguidos para las tinciones con safranina-verde rápido y PAS-azul naftol.

La tinción se realizó añadiendo unas gotas de toulidina TBO sobre el corte, que se preparó disolviendo 0.1 g de azul de toulidina O en 100 ml de 0.1 M de tampón benzoato a pH 4.4 (0.25 g de ácido benzoico + 0.29 g de benzoato sódico, en 200 ml de agua). El portaobjetos se calentó en una placa a 60°C hasta que se secó el colorante, y su exceso se limpió con un chorro continuo de agua corriente aplicada directamente sobre el porta. Después se dejó secar

durante 5 minutos sobre la placa a 60°C.

**Tabla III.7.** Protocolo para la inclusión de las muestras en la resina LR White.

<b>Etapas</b>	<b>Soluciones</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Temperatura</b>
Fijación	Paraformaldehido 2% (p/v) y glutaraldehido 2% (v/v) en Tampón fosfato sódico 0,05M pH 6,8	24-72h	4°C
Lavado	Tampón fosfato sódico 0,05M pH 6,8		
Deshidratación	Etanol 30%	24h	4°C
	Etanol 50%	24h	4°C
	Etanol 70%	24h	4°C
	Etanol 96%	24h	4°C
	Etanol absoluto	2x24h	4°C
Infiltración	Resina : etanol absoluto (3:1)	24h	4°C
	Resina : etanol absoluto (1:3)	24h	4°C
	Resina pura	24h	4°C
Inclusión	Resina pura	24h	60°C

Las preparaciones de resina y parafina se montaron con resina sintética Eukitt®. Una vez montadas, estas se dejaron secar durante 48 horas sobre una placa a 37°C, bajo pesas metálicas para evitar la formación de burbujas de aire (Figura III.8). La observación y fotografía de las secciones se realizó empleando un microscopio Nikon Microphot-FXA equipado con una cámara digital Olympus DP71.

### III.2.9. Determinación del nivel de ploidía

El nivel de ploidía de las líneas embriogénicas se determinó mediante citometría de flujo, tal y como se describe en Aleza y col., (2010) con pequeñas modificaciones. Se analizaron núcleos aislados de hojas de encina solos (como control diploide), y junto a muestras nucleares aisladas de callo procedentes de flores femeninas, callo embriogénico de amentos y embriones somáticos obtenidos a partir de éstos. Para el análisis por citometría de flujo, las células deben encontrarse individualmente en suspensión en un fluido.



**Figura III.8.** En la fotografía se observan las preparaciones histológicas cubiertas con pesas para evitar la formación de burbujas de aire.

Para ello, los explantos se trituraron a 4°C con una hoja de afeitar sobre una placa petri, con unas gotas de tampón PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) con 0.25% tritón, 1.25 mM ditioneitol y pH 7.4. Las muestras trituradas se filtraron

en un filtro de 30 µm incorporado en un tapón de plástico situado sobre un tubo de plástico, para eliminar residuos de células, y a la solución filtrada se le añaden

unas gotas del colorante 4'6-diamidino-2-fenilidol (DAPI) (High Resolution DNA Kit Type P, solution B; Partec®). Después de 5 minutos de incubación, la mezcla se analizó en un Analizador de Ploidía (CyFlow® Counter, Partec), una bombilla de alta presión de mercurio HBO 100-W y conjuntos de filtros KG1 y BG38. Los histogramas fueron analizados usando el software dpac v2.0 (Partec®), que determina la posición de los picos y el coeficiente de variación de las muestras.

El ensayo del efecto del STS y del CA sobre la ES y el análisis histológico se realizó en el Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG), bajo la dirección de la Dra. Ana María Viéitez, y con la ayuda de la Dra. Elena Corredoira.

#### III.2.10. Análisis estadístico

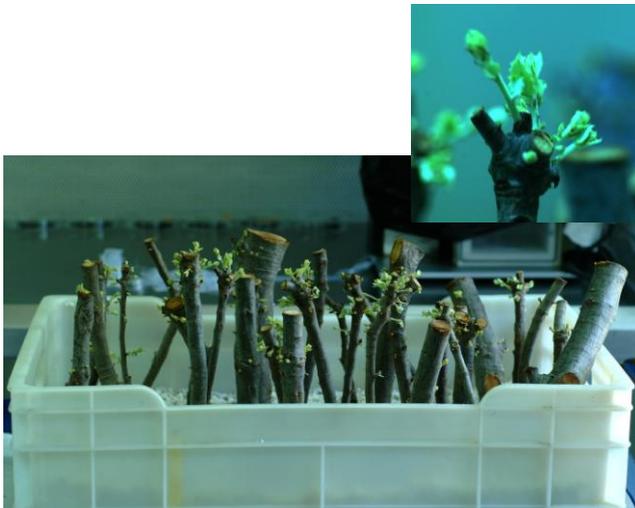
Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) usando diseños completamente aleatorios. Los datos de los porcentajes fueron transformados a su arcoseno antes del análisis estadístico. Cuando era apropiado, se analizaron las medias de variación entre tratamientos usando el test de Tukey HSD (Diferencias Honestamente Significantes) (Tukey, 1953). Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS Statistics 20.0.0. Este tratamiento estadístico se aplicó en todos los experimentos de esta memoria.

### III.3. Resultados

En estos ensayos se han utilizado protocolos multifase que han resultado adecuados para inducir embriogénesis somática a partir de material adulto de varias especies del género *Quercus* (Hernández y col., 2003; Toribio y col., 2004; Féraud-Keller y Espagnac, 1989; Vieitez y col., 2012). En todos los protocolos descritos hasta la fecha, la inducción de embriogénesis somática en *Quercus* requiere 4 fases que se denominan: fase de preacondicionamiento, fase primaria de inducción, fase secundaria de inducción y fase de manifestación. Subsecuentemente, los embriones obtenidos han de madurar y germinar.

#### III.3.1. Embriogénesis somática en hojas

Las yemas empezaron a brotar a los 15 días de la siembra de las estacas en perlita húmeda, y se recogieron aquellas hojas que tenían un tamaño entre 0.5 y 1.5 cm (Figura III.9). La capacidad de brotación de las yemas dependió de la época de recolección, del diámetro de la estaca y del genotipo. El genotipo AL fue el que más hojas produjo (1961 hojas).



**Figura III.9.** Estacas de encina sembradas en perlita con los primeros brotes después de 15 días. Arriba: imagen ampliada de las yemas en brotación.

Las estacas recogidas en primavera (marzo y mayo) fueron a su vez las que produjeron un mayor número de hojas (2788 y 1407 hojas, respectivamente), y la brotación disminuyó en octubre, recogándose un total de 254 hojas. Para los meses de recolección de marzo y octubre (datos no determinados en mayo), el mayor porcentaje de hojas (56.60% del total en la recolección de marzo y un 85.04% en la de octubre) se obtuvo en estacas de diámetro superior a 1.5 cm (Tabla III.8). Se recogieron suficientes hojas para iniciar los cultivos, excepto en el genotipo AY cuyas estacas produjeron pocas hojas (recogida de mayo) o no brotaron (recogida de octubre).

**Tabla III.8.** No. de hojas totales obtenidas de las estacas y porcentaje de hojas respecto al diámetro de las estacas.

Genotipo	Fecha de recogida	No. hojas	Hojas según diámetro de la estaca(%)	
			Diámetro < 1.50 cm	Diámetro > 1.50 cm
AL	Mayo-08	379	n.d.	n.d.
	Octubre-08	167	2.60	10.27
	Marzo-09	1415	39.10	55.30
AY	Mayo-08	14	n.d.	n.d.
	Octubre-08	0	0.00	0.00
	Marzo-09	225	9.90	5.10
HU	Mayo-08	561	n.d.	n.d.
	Octubre-08	33	0.73	1.47
	Marzo-09	383	14.50	11.00
RE	Mayo-08	13	n.d.	n.d.
	Octubre-08	35	0.67	2.26
	Marzo-09	451	10.80	19.30
TO	Mayo-08	440	n.d.	n.d.
	Octubre-08	19	0.87	0.40
	Marzo-09	314	6.30	14.60

n.d.: no determinado

### III.3.1.1. Establecimiento de los cultivos

Las hojas esterilizadas se sembraron en el medio de precondiciona-

miento. Esta fase permite desechar las hojas contaminadas, y eliminar el posible efecto tóxico que ejercen los fenoles lixiviados por las hojas, que pueden afectar negativamente la respuesta de los genotipos sensibles, debido a la disminución en la disponibilidad de los nutrientes (von Aderkas y Bonga, 2000; Fehér y col., 2003). En todos los meses de recolección, tras los 10 días en el medio de preacondicionamiento, el porcentaje de contaminación de las hojas fue bajo (3.73% en marzo, 0.21% en mayo y 0.39% en octubre). En los ensayos del segundo año (marzo del 2009) se estudió además la contaminación a largo plazo después de 30 días de cultivo en la fase secundaria de inducción (Tabla III.9).

**Tabla III.9.** Efecto del genotipo sobre el porcentaje de contaminación a largo plazo de los explantos, procedentes de estacas de encina recogidas en marzo, después de 30 días de cultivo en la fase secundaria de inducción (2CIT). Los datos son media de 37 a 191 repeticiones, con un promedio de 2 a 6 explantos por placa.

Genotipo	Contaminación (%)	
AL	5.56bc	
AY	2.22c	
HU	0.00c	
RE	20.07a	
TO	10.71b	
<b>Análisis de la varianza</b>		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Genotipo	4	17408.35**
Error	1696	661.87

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

Los porcentajes de contaminación no difirieron sustancialmente de los obtenidos tras el período de preacondicionamiento, excepto en el genotipo RE, donde al cabo de 2 meses de cultivo, un 20% de los explantos presentaron contaminación. El porcentaje promedio de explantos contaminados, fue de 7.58%, aunque hubo un claro efecto del genotipo sobre la contaminación ( $p \leq 0.05$ ). Así, el genotipo HU fue el menos contaminado (0.00%), seguido de AY y AL (2.22 y 5.56%, respectivamente), y con diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ )

respecto a TO y RE (10.21 y 20.07%) (Tabla III.9). Los porcentajes de supervivencia de las hojas después del preacondicionamiento, fueron 49% en marzo, 53% en mayo y 64% en octubre. En octubre se analizó, además, el efecto del genotipo sobre el índice de supervivencia y se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Así, los genotipos TO, HU y AL mostraron los mayores índices de supervivencia (76.67, 72.62 y 60.29%, respectivamente), mientras que el de RE fue el más bajo (18.33%) (Tabla III.10).

**Tabla III.10.** Efecto del genotipo sobre el porcentaje de supervivencia de las hojas, procedentes de estacas de encina recogidas en octubre, después de 10 días de cultivo en la fase de preacondicionamiento. Los datos son media de 6 a 34 repeticiones, con un promedio de 2 a 6 explantos por placa.

Genotipo	Supervivencia (%)	
AL	60.29ab	
HU	72.62a	
RE	18.33b	
TO	76.67a	
Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	
Genotipo	3	6466.71**
Error	59	1361.60

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

#### III.3.1.2. Inducción de embriogénesis somática

En estos ensayos la única respuesta morfogénica observada fue la proliferación celular. No se obtuvo ningún embrión somático en ninguno de los tratamientos.

En el primer ensayo (año 2008), todos los tratamientos utilizados (Protocolos PI, PII y PIII; Tabla III.3), indujeron proliferación celular en todos los genotipos ensayados después de un mes en la fase primaria de inducción. El callo apareció a lo largo de toda la superficie de la hoja (haz, envés y peciolo). En general, las hojas de las estacas recogidas en octubre presentaron mayor capacidad de proliferación que las recogidas en mayo (porcentajes medios de

explantos con callo de 69.73 vs. 41.12 %, respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). El efecto del período de recogida sobre la proliferación celular también dependió del genotipo (Tabla III.11). Así, en las hojas procedentes de los genotipos HU y TO de la recogida de octubre, la proliferación celular fue significativamente mayor que la correspondiente a mayo (porcentajes de 83.33 vs. 22.96 y 85.00 vs. 43.32 en los genotipos HU y TO, para octubre y mayo, respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). Para el genotipo RE, los mejores resultados se obtuvieron en las hojas procedentes de las estacas recogidas en mayo (porcentajes medios de inducción de callo de 84.72 vs. 48.33 para mayo y octubre, respectivamente  $p \leq 0.05$ ) (Tabla III.11).

**Tabla III.11.** Efecto de la fecha de recogida, el protocolo utilizado y el genotipo sobre el porcentaje de explantos (hojas de encina) con callo después de un mes en fase primaria de inducción. Los datos son media de 4 a 122 repeticiones, con un promedio de 2 a 6 explantos por placa.

Genotipo	Fecha de recogida	Explantos con callo (%)			
		Protocolo			Media <sup>z</sup>
		PI	PII	PIII	
AL	Mayo	59.58	66.00	58.97	61.52bcd
	Octubre	65.15	83.89	56.82	68.62abc
HU	Mayo	26.81	20.56	21.53	22.96e
	Octubre	50.00	100.00	100.00	83.33ab
RE	Mayo	87.50	100.00	66.67	84.72a
	Octubre	50.00	41.67	53.33	48.33cd
TO	Mayo	47.24	36.17	46.54	43.32de
	Octubre	87.50	80.00	87.50	85.00ab

Análisis de la varianza

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Fecha de recogida (A)	1	7080.64**
Genotipo (B)	3	989.34NS
Protocolo (C)	2	556.87NS
A x B	3	9277.29**
A x C	2	568.55NS
B x C	6	823.77NS
A x B x C	6	1111.92NS
Error	308	964.73

NS,\*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto de la interacción del genotipo y del mes de recolección sobre el porcentaje de explantos con callo. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

### III. Resultados y discusión: ES en *Quercus ilex*

Los porcentajes de inducción de callo no variaron tras la transferencia a los medios secundario de inducción y manifestación (datos no mostrados).

El tamaño de los callos formados en el experimento del año 2008 varió significativamente ( $p \leq 0.05$ ) con el genotipo y los protocolos utilizados (PI, PII y PIII). El genotipo TO fue el que mayor tamaño de callo produjo en las fases primaria y secundaria de inducción (media de 1.99 y 2.82 cm, respectivamente;  $p \leq 0.05$ ), mientras que el protocolo PII fue el que mayor tamaño de callo produjo en la fase primaria (media de 1.81 cm), y el PI en la secundaria (media de 2.18 cm). Además, en la fase primaria de inducción, el genotipo TO, con el protocolo PII, produjo el mayor tamaño de callo (2.33 cm;  $p \leq 0.05$ ) (Tabla III.12). En la fase de manifestación, el tamaño medio del callo fue de 2.13 cm, no obteniéndose diferencias entre genotipos y protocolos utilizados (datos no mostrados).

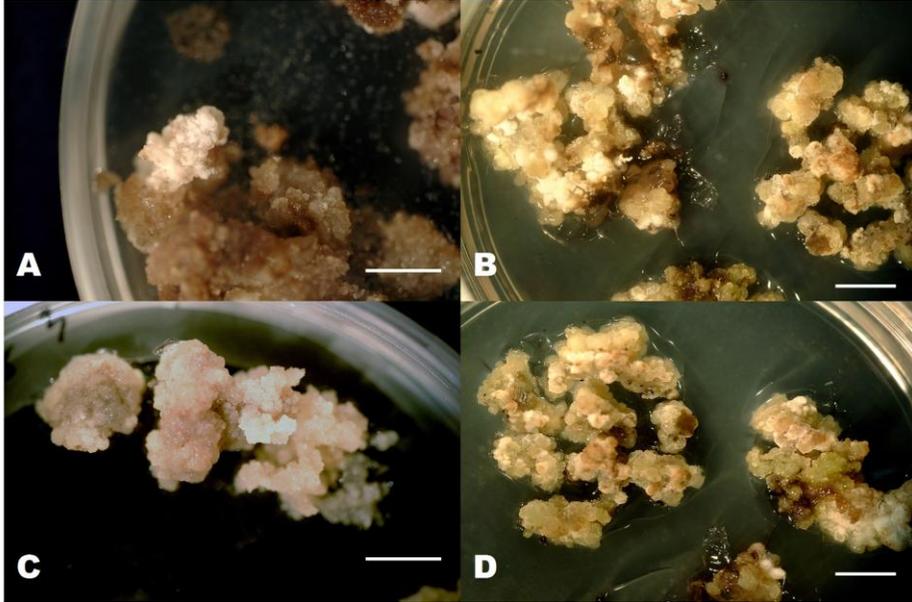
**Tabla III.12.** Efecto del genotipo y el protocolo utilizado sobre el tamaño del callo obtenido del cultivo de hojas de encina del ensayo de 2008. Los datos se tomaron después de un mes de cultivo en la fase primaria y secundaria de inducción y son media de 4 a 122 repeticiones, con un promedio de 2 a 6 explantos por placa.

Genotipo	Tamaño medio (cm)						
	Final de fase primaria			Final de fase secundaria			
	PI	PII	PIII	PI	PII	PIII	Media <sup>z</sup>
AL	1.80abcd	1.24d	1.20d	2.02	1.54	1.56	1.70b
HU	1.60bcd	1.67abcd	1.12d	2.33	2.12	1.22	1.92b
RE	1.17d	2.00abc	1.58bcd	2.33	3.25	1.75	2.43ab
TO	2.25ab	2.33a	1.40cd	3.00	3.25	2.30	2.82a
			Media <sup>y</sup>	2.18a	2.00ab	1.61b	
Análisis de la varianza				Cuadrados medios			
Fuente de variación			g.l.	Final fase prima- ria		Final fase secun- daria	
Genotipo (A)			3	0.58**		2.37**	
Protocolo (B)			2	0.77**		2.25**	
A x B			6	0.48**		0.60NS	
Error			42	0.11		0.33	

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z,y</sup>: efecto del genotipo y del protocolo, respectivamente, sobre el tamaño medio del callo obtenido en el final de la fase secundaria. Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

Los callos no presentaban aspecto embriogénico, observándose variaciones en la coloración dependientes del genotipo y no de los protocolos utilizados ni de la fecha de recogida. Se obtuvieron callos de coloración blanca,

amarilla y verde en el genotipo RE y AL, marrones de diferentes tonalidades en el genotipo HU y grisáceos y verdosos en el genotipo TO (Figura III.10).

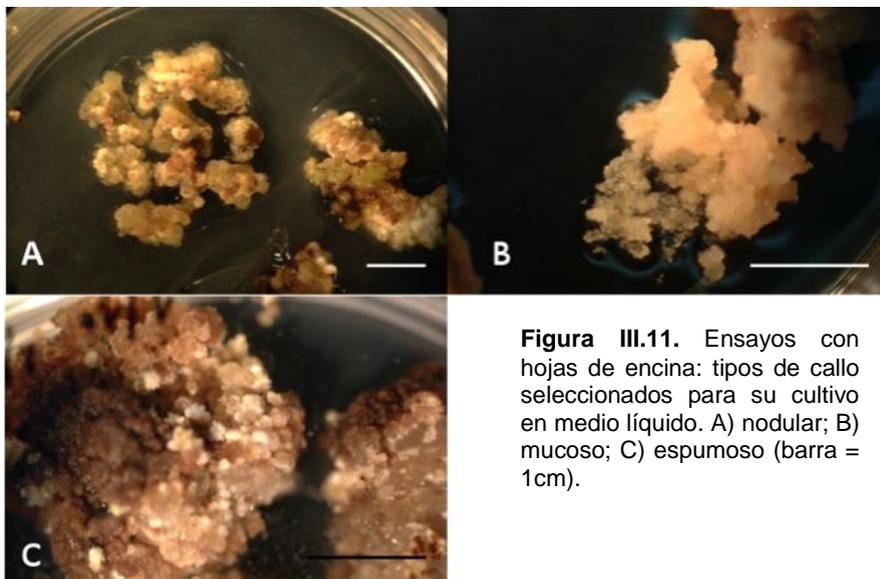


**Figura III.10.** Diferentes clases de callo obtenidos del cultivo de hojas de encina en el experimento de 2008. A y B) callo friable de coloración marrón, blanca, amarilla y verde (genotipo RE); C) callo marrón de diferentes tonalidades y más mucoso (genotipo HU); D) callo grisáceo y verdoso, lobuloso (genotipo TO) (barra = 1cm).

En los explantos del segundo año (2009), se estudió el efecto de los protocolos CIT y CAF sobre los explantos foliares de los genotipos AL, AY, HU, RE y TO. Al contrario que en los experimentos de 2008, la formación de callo (presente en el 58% de los explantos) no se observó hasta la transferencia de los explantos a la fase secundaria de inducción. Posiblemente, esta diferencia se deba a la diferente composición de los medios nutritivos en cuanto a sales minerales y reguladores de crecimiento. Para cada genotipo, el porcentaje de hojas con callo dependió de las citoquininas presentes en el medio de cultivo, siendo óptima la zeatina para el genotipo TO, el 2iP para HU, y la kinetina y zeatina para RE (Tabla III.13). Además, se observaron efectos significativos del genotipo y su interacción con el tratamiento empleado sobre el porcentaje de

explantos con callo ( $p \leq 0.05$ ), siendo en el genotipo TO en el que se obtuvo un mayor porcentaje (71.73%), seguido de AL, HU, RE y AY (59.04, 58.72, 42.15 y 32.00%, respectivamente). Los mayores porcentajes de inducción de callo se obtuvieron con el genotipo HU y el Protocolo CIT con la citoquinina 2iP (83.12 %). El tratamiento CAF no indujo proliferación alguna en las hojas del genotipo AY (Tabla III.13). Respecto al tamaño del callo durante esta fase, dependió del genotipo, del tratamiento y de la interacción de ambos factores ( $p \leq 0.05$ ), siendo mayor en los explantos de origen RE cultivados en el medio CIT suplementado con kinetina (media de 2.0 cm por callo; Tabla III.13). La coloración de los callos apenas difirió entre los genotipos; todos ellos presentaban color marrón, con el único matiz de que aparecían tonalidades blanquecinas en los protocolos que incluían citoquininas. También es destacable la aparición de pequeñas bolas parecidas a proembriones en el protocolo CIT y genotipo AL.

Con la finalidad de inducir respuesta embriogénica, los callos obtenidos, separados según su aspecto (mucoso, nodular y espumoso), se sembraron en medio líquido (Figura III.11). Estas condiciones indujeron proliferación celular pero no se observó respuesta embriogénica.



**Figura III.11.** Ensayos con hojas de encina: tipos de callo seleccionados para su cultivo en medio líquido. A) nodular; B) mucoso; C) espumoso (barra = 1cm).

**Tabla III.13.** Efecto del genotipo y el protocolo utilizado sobre el porcentaje de callo obtenido de hojas de encina y su tamaño, en el ensayo de 2009. Los datos se tomaron después de 30 días en la fase secundaria de inducción y son media de 6 a 69 repeticiones, con un promedio de 2 a 6 explantos por placa.

Genotipo	Protocolo	Hojas con callo (%)	Tamaño del callo (cm)
AL	CIT + 2iP	44.58fg	1.24cdef
	CIT + zeatina	70.77bc	1.24cdef
	CIT + kinetina	57.07cdef	1.25cdef
	CAF	63.77cd	1.61b
AY	CIT + 2iP	48.81def	1.39c
	CIT + zeatina	50.00ef	1.15ef
	CIT + kinetina	29.17gh	1.23cdef
	CAF	0.00i	d.n.t.
HU	CIT + 2iP	83.12ab	1.16ef
	CIT + zeatina	45.83ef	1.37cd
	CIT + kinetina	47.62def	1.26cde
	CAF	58.33cdef	1.25cdef
RE	CIT + 2iP	27.78h	1.25cdef
	CIT + zeatina	68.72bc	1.74b
	CIT + kinetina	80.39ab	2.04a
	CAF	63.72cd	1.76b
TO	CIT + 2iP	71.88bc	1.13ef
	CIT + zeatina	88.54a	1.20def
	CIT + kinetina	58.73cdef	1.09ef
	CAF	61.67cde	1.08f

**Análisis de la varianza**

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	g.l.	C. medios
Origen (A)	4	7477.74**	4	1.23**
Protocolo (B)	3	2122.14NS	3	0.17NS
A x B	12	4607.64**	11	0.42**
Error	369	761.27	333	0.08

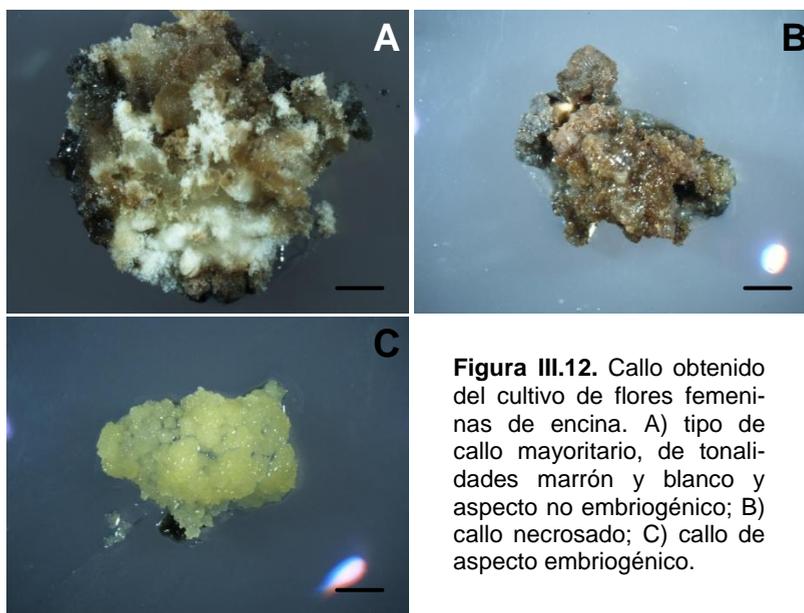
NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. d.n.t. datos no tomados por falta de callo

### III.3.2. Inducción de ES en flores femeninas

#### III.3.2.1. Ensayos con flores seccionadas

En las flores sembradas el primer año, el porcentaje de contaminación, tras 10 días en el medio de preacondicionamiento, fue muy elevado (58.33%), posiblemente debido a que la cubierta rugosa de la bellota es muy propicia a resguardar a los microorganismos del proceso de esterilización.

Se estudió el efecto de la presencia de ANA y BA en los medios primario y secundario de inducción sobre la embriogénesis somática en estos explantos. Independientemente del genotipo, se observó la formación de callo en la mayoría de los explantos cultivados en medio con reguladores de crecimiento (Tabla III.14), especialmente en los explantos de los genotipos RE y VA (100% de explantos con callo). La mayoría de este callo presentaba tonalidades marrones y blancas, con zonas necrosadas y se observó una gran diferencia de crecimiento entre los tratamientos con y sin reguladores, puesto que de manera muy significativa ( $p \leq 0.05$ ), se obtuvo un mayor porcentaje de callo y de callo con aspecto embriogénico en los explantos cultivados en presencia de  $10 \mu\text{M}$  de ANA y BA (Figura III.12; Tabla III.14).



**Figura III.12.** Callo obtenido del cultivo de flores femeninas de encina. A) tipo de callo mayoritario, de tonalidades marrón y blanco y aspecto no embriogénico; B) callo necrosado; C) callo de aspecto embriogénico.

**Tabla III.14.** Efecto del tratamiento y el genotipo del explanto sobre la inducción de callo en flores femeninas de encina. Los datos son media de 4 placas con 3 flores por placa y fueron tomados 1 mes después de su cultivo en los respectivos medios.

Tratamiento	Genotipo	Explantos con callo (%)	Callo de aspecto embriogénico (%)
Sin reguladores	HU	0.00c	0.00
	RE	6.67c	0.00
	VA	0.00c	0.00
			Media <sup>z</sup> 0.00b
ANA + BA 10 µM	HU	71.67b	48.33
	RE	100.00a	46.11
	VA	100.00a	0.00
			Media <sup>z</sup> 36.15a
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Genotipo (A)	2	776.66**	725.73NS
Tratamiento (B)	1	32662.79**	4148.72**
A x B	2	374.95*	725.73NS
Error	18	79.63	456.69

NS, \*\*, \*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$  o  $P \leq 0.05$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto del tratamiento sobre el porcentaje de callo embriogénico. Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

La formación de callo con aspecto embriogénico no fue influenciada significativamente por el genotipo, no obstante, el porcentaje de flores que formaron callo varió significativamente con el genotipo, siendo además significativa la interacción entre este factor y el tratamiento. Así, como se muestra en la Tabla III.14, los porcentajes más elevados de explantos con callo se obtuvieron en los genotipos HU y RE cultivados en presencia de ANA y BA.

### III.3.2.2. Ensayos con lóculos aislados

En el experimento del segundo año, se utilizaron lóculos aislados de flores de los genotipos AY, HU, PO y VA. El porcentaje medio de explantos contaminados fue 17.88%. Los porcentajes de contaminación dependieron del genotipo, siendo de 9.15, 18.50, 21.25 y 21.75 ( $p \leq 0.05$ ) para los genotipos HU, AY, PO y VA, respectivamente (Tabla III.15).

**Tabla III.15.** Efecto del genotipo sobre la contaminación de los lóculos de flores femeninas de encina después de 10 días en precondicionamiento. Los datos son media de 40 a 76 repeticiones, con 10 explantos por placa.

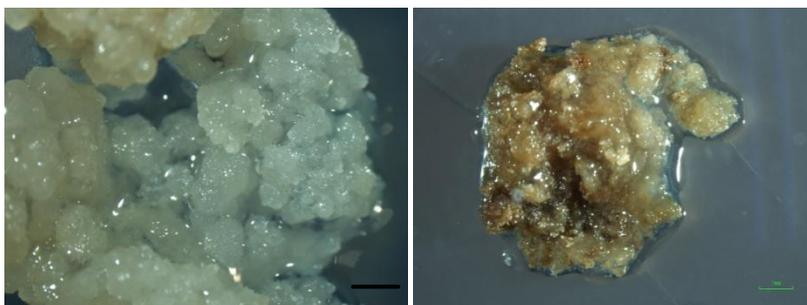
Genotipo	Explantos contaminados (%)	
AY	18.50ab	
HU	9.15b	
PO	21.25a	
VA	21.75a	

Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Genotipo	3	1227.12**
Error	152	254.16

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey

Después de 30 días de cultivo en el medio de manifestación, se observó la formación de callo en el 53.48% de los explantos. El callo fue abundante y de coloración amarilla-blanca, de relieve lobuloso y aspecto embriogénico cuando los explantos se cultivaron en presencia de ANA y BA, pero muy escaso, marrón, sin aspecto embriogénico y de pequeño tamaño en los crecidos sin reguladores de crecimiento (Figura III.13).



**Figura III.13.** Formación de callo en cultivos de lóculos aislados de flores femeninas de encina. Callo blanco, lobuloso, abundante y de aspecto embriogénico obtenido mayoritariamente en medios con ANA/BA (izqda.) y callo escaso, marrón y de aspecto no embriogénico obtenido mayoritariamente en medio sin reguladores de crecimiento (dcha.). Las flechas indican posibles embriones globulares (barra = 1 mm).

El porcentaje de callo obtenido dependió de la presencia de ANA y BA en el medio, ya que con ellos se obtuvo un 90.29% de explantos con callo, frente al 15.29% obtenido en los medios sin reguladores de crecimiento

( $p \leq 0.05$ ). El callo de aspecto embriogénico se observó fundamentalmente en los genotipos VA y PO cultivados en medio con los macronutrientes B5 suplementado con ANA y BA. Por el contrario, el medio con los macronutrientes MS y reguladores de crecimiento fue más adecuado para inducir este tipo de callo en los lóculos del genotipo HU (porcentajes del 41.11 vs 14.3% para los medios MS y B5, respectivamente,  $p \leq 0.05$ ). Los dos medios fueron igualmente eficaces para inducir callo con apariencia embriogénica en los explantos de origen AY (Tabla III.16).

**Tabla III.16.** Efecto del genotipo y la composición del medio de cultivo (macronutrientes y reguladores de crecimiento) sobre la inducción de callo de aspecto embriogénico en lóculos de flores femeninas de encina. Los explantos fueron subcultivados durante un mes en estos medios. Los datos son valores medios de 10 repeticiones con 10 explantos en cada una.

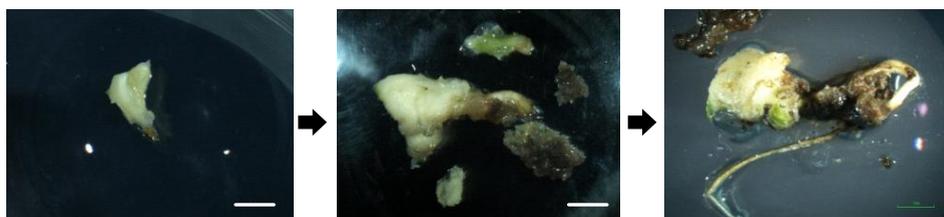
Genotipo	Macronutrientes	Callo con aspecto embriogénico (%)	
		Sin reguladores de crecimiento	ANA + BA
AY	B5	0.00d	31.00b
	MS	0.00d	24.00bc
HU	B5	0.00d	14.43c
	MS	0.00d	41.11a
PO	B5	0.00d	45.00a
	MS	0.00d	20.00bc
VA	B5	0.00d	42.00a
	MS	0.00d	0.00d

Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Genotipo (A)	3	353.43**
Macronutrientes (B)	1	1160.88**
Reguladores de crecimiento (C)	1	32297.25**
A x B	3	1400.87*
A x C	3	353.43**
B x C	1	1160.88**
A x B x C	3	1400.87**
Error	140	35.27

\*\* \*: Significativo para  $P \leq 0.01$  ó  $P \leq 0.05$ , respectivamente. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

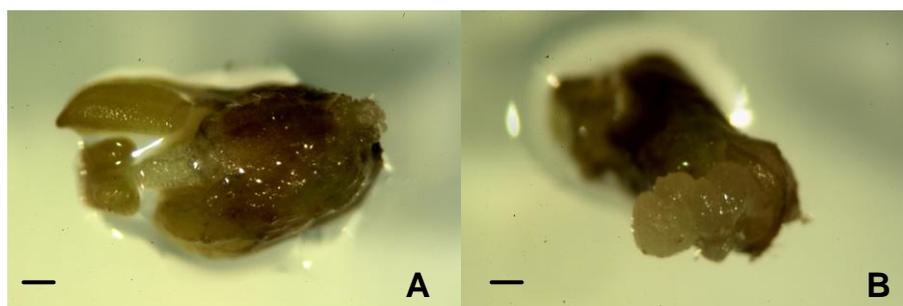
Únicamente uno de los callos del genotipo VA, procedente del cultivo en medio con macronutrientes B5 y reguladores de crecimiento, generó un embrión cotiledonar al cabo de 2 meses en la fase de manifestación (Figura III.14). Tras dos meses más de cultivo en el mismo medio, se observó desarrollo de la raíz pero finalmente se necrosó.



**Figura III.14.** Embrión cotiledonar obtenido de una flor femenina de encina de genotipo VA y su evolución a lo largo de 4 meses de cultivo, en que terminó por degenerar (barra = 1 cm).

### III.3.3. Ensayos con amentos y flores masculinas aisladas

Se realizaron 3 ensayos diferentes con el fin de obtener embriones somáticos a partir de amentos de encina. En general, después de 10 días en el medio de precondicionamiento, las tasas de contaminación fueron inferiores al 1% (datos no mostrados). En los ensayos con flores aisladas, algunas se abrieron y comenzó la proliferación celular en la zona basal cerca del pedúnculo (Figura III.15).



**Figura III.15.** Cultivo de flores masculinas de encina aisladas. Después del precondicionamiento algunas flores se abrieron mostrando las anteras (A); también se observó proliferación celular en la zona del pedúnculo(B) (barra = 0.1 mm).

### III.3.3.1. Efecto del medio de cultivo y de los reguladores de crecimiento

En el primer ensayo, realizado con flores aisladas de amentos del genotipo VA, se observó proliferación celular al mes del cultivo en el medio de manifestación. La frecuencia de flores que produjeron callo osciló entre el 50.2 y 80.1%. Los callos con un tamaño comprendido entre 1.7 y 3.5 cm, fueron de coloración predominantemente marrón, con tonalidades amarillentas y lóbulos blancos (Figura III.16).



**Figura III.16.** Callo representativo de los amentos de encina del primer ensayo, con coloraciones predominantemente marrones y amarillentas (barra = 1mm).

El porcentaje de callo obtenido después de un mes en la fase de manifestación dependió fundamentalmente del medio de inducción. Los medios que incluían los macronutrientes MS favorecieron la proliferación celular, aunque solo se observaron diferencias significativas

( $p \leq 0.05$ ) entre los porcentajes obtenidos en los tratamientos 10MS (80.20%) y 50SH (55.2%) (Tabla III.17). El medio de manifestación no afectó significativamente a la formación de callo.

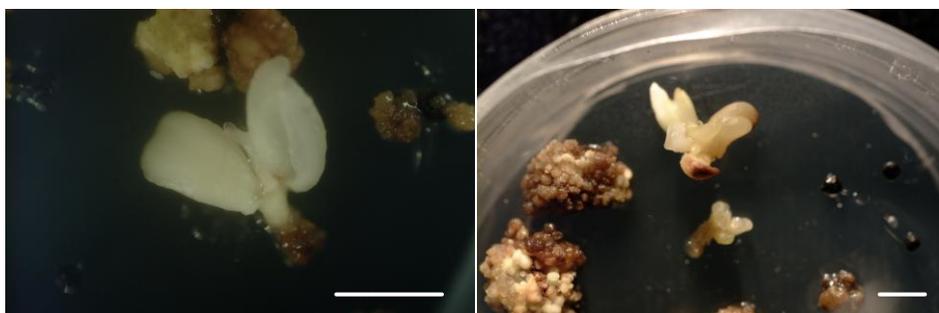
El 1.79% del total de callos obtenidos presentaba un aspecto embriogénico (color blanco y relieve nodular), pero únicamente el 0.24% generaron embriones somáticos. Estos embriones se originaron en algunos de los callos cultivados inicialmente en medio con macronutrientes MS; concretamente, se obtuvieron embriones bien desarrollados en explantos cultivados secuencialmente en los medios 50MS de inducción y A-m de manifestación (0.58% de frecuencia de inducción) o en medios 10MS de inducción y MS-a de manifestación (0.32% de frecuencia; datos no mostrados).

**Tabla III.17.** Efecto del medio primario de inducción y de manifestación sobre el porcentaje de explantos con callo en cultivos de flores masculinas aisladas de encina. Los datos se tomaron después de un mes en medio de manifestación y son media de 22 repeticiones con 9-16 explantos por repetición.

Medio de inducción	Porcentaje de callo		
	Medio de manifestación		Media <sup>z</sup>
	A-m	MSa	
10SH	56.64	76.01	66.33ab
50SH	50.18	60.76	55.22b
10MS	83.33	76.03	80.20a
50MS	73.01	75.76	74.32ab
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
M. inducción (A)	3	2335.39**	
M. manifestación (B)	1	870.35NS	
A x B	3	686.05NS	
Error	79	589.99	

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto del medio de inducción sobre la frecuencia de formación de callo. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

En total, se obtuvieron 3 embriones (Figura III.17), 2 procedentes de medio 50MS y sembrados en A-m, y 1 procedente de 10MS y sembrado en MS-a.



**Figura III.17.** Embriones cotiledonares obtenidos en amentos de encina (ensayo del 2009) en la fase de manifestación (barra = 1cm).

Estos 3 embriones se transfirieron a tubos con medio A-m, previamente utilizado con éxito para la germinación de embriones somáticos de alcornoque (Hernández y col., 2003a). Aunque no hubo germinación, sí que se observó, en uno de los explantos (Figura III.18), proliferación de callo embriogénico y for-

mación de embriones somáticos globulares, que se diferenciaron, tanto del callo embriogénico, como directamente de la superficie del embrión somático cotiledonar.



**Figura III.18.** Embriogénesis secundaria de flores masculinas aisladas de amentos de encina en los ensayos del 2009 (barra = 1mm).

El subcultivo continuo de estos embriones somáticos secundarios y del callo en medio MS-a permitió el establecimiento y mantenimiento de una primera línea embriogénica (VA1) que se utilizó en experimentos de maduración.

### III.3.3.2. Efecto del genotipo y de las concentraciones de ANA

Basándonos en los resultados descritos anteriormente, el siguiente año (2010) se seleccionaron los medios primarios de inducción 10MS y 50MS para determinar si el protocolo descrito podría extenderse para iniciar embriogénesis somática en otros genotipos de encina. La frecuencia de formación de callo dependió significativamente ( $p \leq 0.05$ ) del genotipo, donde las flores del genotipo HU proliferaron mejor que las del genotipo RE (porcentaje de explantos con callo de 93.40 y 39.70% para HU y RE, respectivamente;  $p \leq 0.05$ ). Corroborando esta dependencia del genotipo, el callo procedente de explantos del genotipo HU formó embriones somáticos con mayor frecuencia que el procedente del genotipo RE (2.2 y 0.2% de explantos con embriones para HU y RE, respectivamente;  $p \leq 0.05$ ) (Tabla III.18). Estos embriones somáticos se diferenciaron durante el cultivo en medio secundario de inducción. La concentración de ANA en el medio de inducción (10MS o 50MS) no afectó significativamente la frecuencia de embriogénesis (1.4 y 1.0 %, respectivamente) (Tabla III.18).

### III. Resultados y discusión: ES en *Quercus ilex*

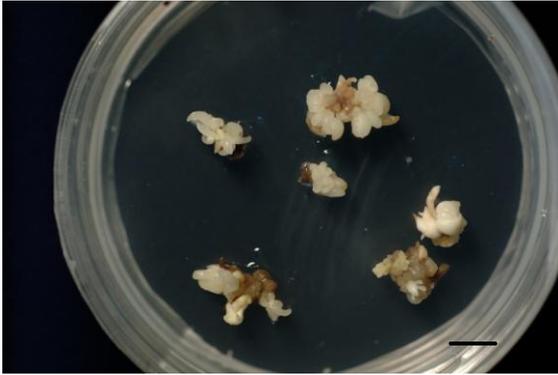
**Tabla III.18.** Efecto del genotipo y el medio primario de inducción sobre la obtención de callo y embriones en flores masculinas aisladas de encina. Los datos son valores medios de 22 repeticiones, con 12-16 flores aisladas por repetición. Los datos fueron tomados después de 30 días en medio secundario de inducción.

Genotipo	Medio de inducción	Explantos con callo (%)	Explantos con embriones (%)
RE	10MS	44.32	0.38
	50MS	35.08	0.00
	Media <sup>z</sup>	39.70b	0.19b
HU	10MS	96.25	2.50
	50MS	90.81	2.00
	Media <sup>z</sup>	93.40a	2.25a
Análisis de varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Genotipo (A)	1	41216.99**	276.70**
Medio de inducción (B)	1	886.92NS	20.19NS
A x B	1	0.05NS	0.92NS
Error	82	237.05	33.33

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto del genotipo sobre la frecuencia de formación de callo y de callo con embriones somáticos. Para cada variable, medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

La frecuencia de inducción embriogénica no se incrementó tras 60 días en los medios de manifestación (A-m o MS-a); además, durante este tiempo, los embriones somáticos del genotipo RE se necrosaron. El subcultivo de los callos embriogénicos y embriones somáticos aislados del genotipo HU, al medio correspondiente de manifestación, indujo proliferación de callo y embriogénesis somática secundaria directa en todas sus superficies (Figura III.19).

El subcultivo continuo del callo y de los embriones somáticos permitió el establecimiento de 5 líneas embriogénicas que están siendo utilizadas para experimentos de maduración/conversión.

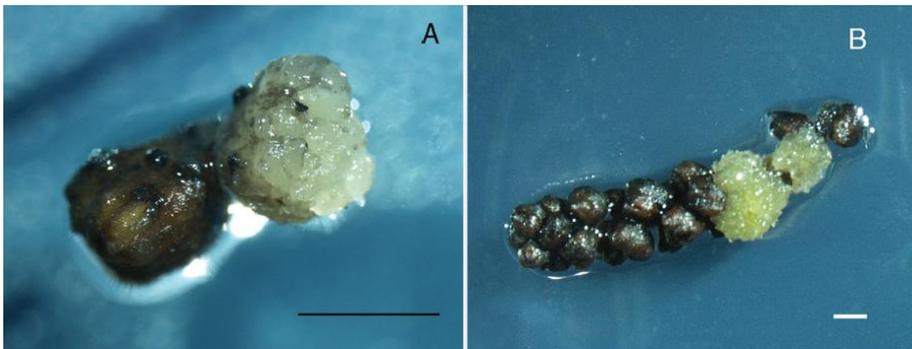


**Figura III.19.** Embriogénesis secundaria obtenida en medio de manifestación de flores aisladas de amentos de encina del ensayo del 2010 (barra =1cm).

### III.3.3.3. Efecto de la edad del amento

En este ensayo se determinó si el estadio de desarrollo del amento podría afectar la competencia embriogénica de los genotipos AY, HU, PO, RE y VA. Como explantos se utilizaron amentos enteros y flores aisladas de los mismos.

Después del primer mes en la fase primaria de inducción, e independientemente del estadio de desarrollo del amento, se observó formación de callo en la zona del perianto en ambos tipos de explanto y en los 5 genotipos muestreados (Figura III.20).



**Figura III.20.** Callo formado en flores aisladas (A) y amentos enteros (B) de encina después de 20 días de cultivo en medio de inducción (barra = 1mm).

En los ensayos con flores aisladas se observó un efecto significativo del genotipo y del estadio de desarrollo de los explantos; así como una interacción significativa entre ambos factores, sobre la inducción de callo tras 60 días de cultivo. El estadio C de desarrollo produjo el mayor porcentaje de callo en todos los genotipos, exceptuando el genotipo AY, donde se obtuvo en el B. Cabe destacar que el 62.4% de las flores en estadio C del genotipo HU, formaron callo frente al 1.0% obtenido en las del estadio B (Tabla III.19). Solamente las flores del genotipo HU, en el estadio C de desarrollo, indujeron embriogénesis somática (1.5% de callos con embriones).

**Tabla III.19.** Efecto del genotipo y el estadio de desarrollo del amento sobre la frecuencia de formación de callo y sobre la inducción de embriogénesis somática en flores masculinas aisladas de encina. Los datos fueron tomados después de 30 días en medio de manifestación y son media de 10 repeticiones, con 40 flores por repetición.

Genotipo	Estadio de desarrollo del amento			
	B		C	
	Explantos con callo (%)	Callos con embriones (%)	Explantos con callo (%)	Callos con embriones (%)
AY	6.3def	0.0	0.5f	0.0
HU	1.0ef	0.0	62.4a	1.5
PO	11.0de	0.0	31.1bc	0.0
RE	41.3b	0.0	39.9bc	0.0
VA	13.3d	0.0	14.8cd	0.0
Análisis de varianza				
Fuente de variación	g.l.		Cuadrados medios	
Genotipo (A)	4		2933.70**	
Estadio de desarrollo (B)	1		3163.21**	
A x B	4		2665.83**	
Error	91		115.24	

\*\* : Significativo para  $p \leq 0.01$ . Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

En amentos enteros se observó efecto significativo del genotipo, el estadio de desarrollo y la interacción entre ambos sobre la inducción de callo ( $p \leq 0.05$ ). De nuevo, el estadio C fue el más adecuado para inducir proliferación celular en todos los genotipos y las frecuencias más elevadas se obtuvieron en los genotipos HU y RE (91.7 y 96.0%, respectivamente; Tabla III.20). Solamente se obtuvo embriogénesis somática en el genotipo HU en estadio C de desarrollo (3.3% de callos con embriones).

### III. Resultados y discusión: ES en *Quercus ilex*

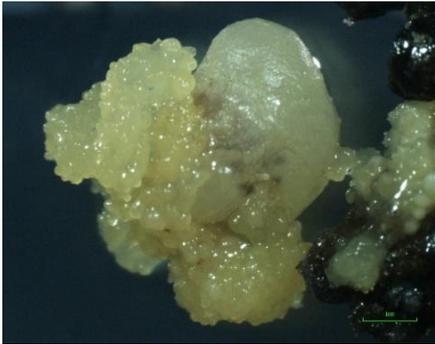
**Tabla III.20.** Efecto del genotipo y del estadio de desarrollo del amento sobre la frecuencia de inducción del callo y sobre la inducción de embriogénesis somática en amentos enteros de encina. Los datos fueron tomados tras 30 días en el medio de manifestación y son valores medios de 4 a 10 repeticiones, con 6 amentos por repetición.

Genotipo	Estadio de desarrollo del amento					
	A		B		C	
	Explantos con callo (%)	Callos con embriones (%)	Explantos con callo (%)	Callos con embriones (%)	Explantos con callo (%)	Callos con embriones (%)
AY	0.0c	0.0	6.7c	0.0	8.3c	0.0
HU	0.0c	0.0	0.0c	0.0	96.0a	3.3
PO	2.0c	0.0	3.3c	0.0	13.3bc	0.0
RE	29.0b	0.0	11.3bc	0.0	91.7a	0.0
VA	3.0c	0.0	0.0c	0.0	10.0c	0.0

Análisis de varianza para el porcentaje de explantos con callo

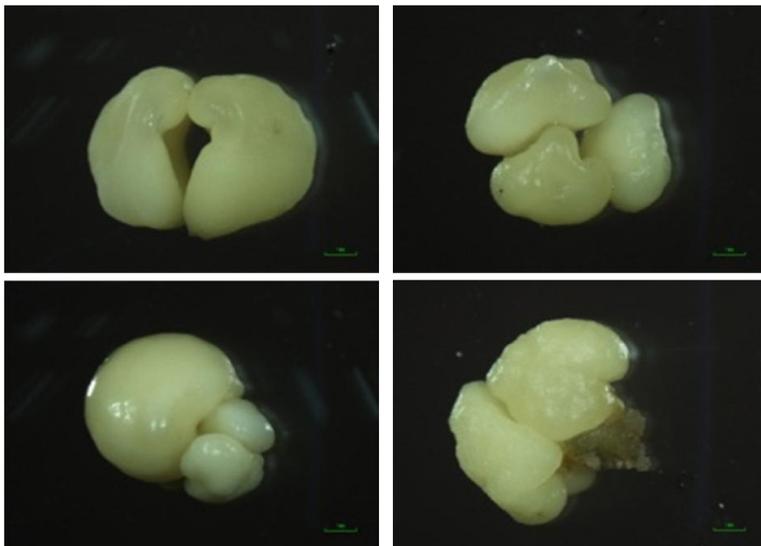
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Genotipo (A)	4	4446.65**
Estadio de desarrollo (B)	2	9198.87**
A x B	8	2398.27**
Error	83	116.84

\*\* : Significativo para  $p \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.



**Figura III.21.** Estructuras globulares parecidas a embriones somáticos creciendo de un callo procedente de amento de encina sembrado entero (barra = 1mm).

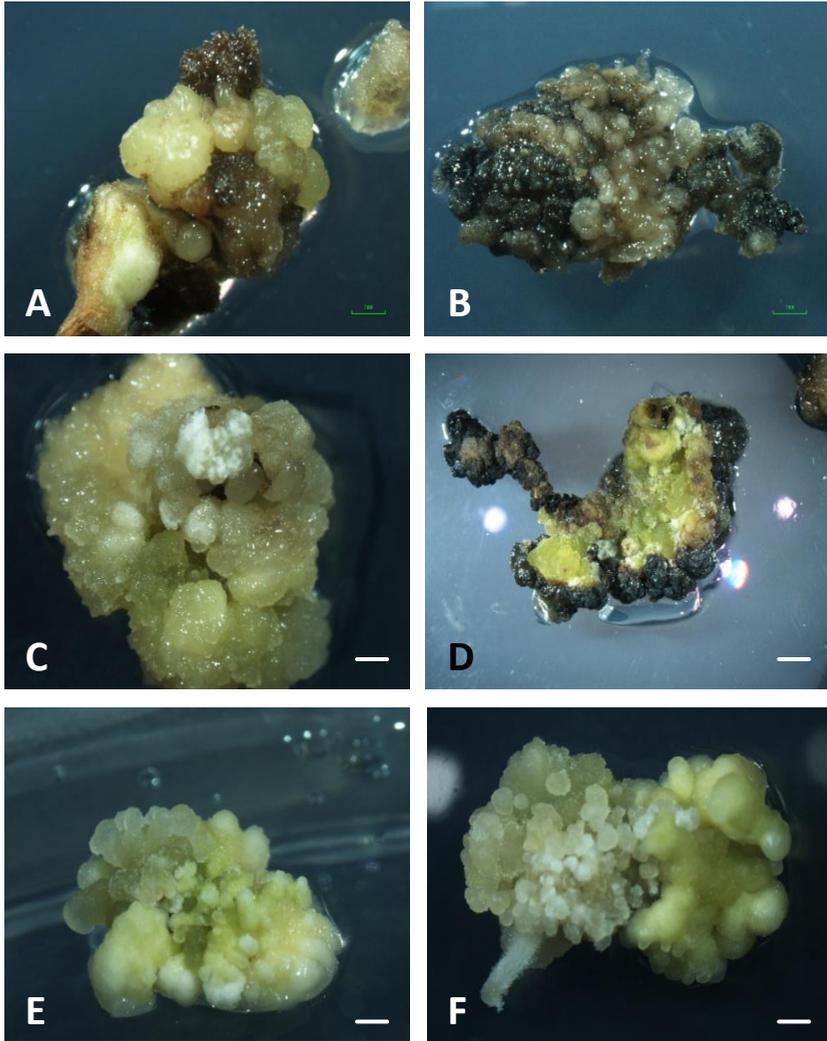
En estos ensayos también se obtuvieron estructuras globulares similares a embriones somáticos en amentos y flores aisladas de todos los genotipos tras su transferencia al medio secundario de inducción (Figura III.21). Sin embargo, tal como hemos dicho, únicamente las estructuras del genotipo HU dieron lugar a embriones somáticos cotiledonares (Figura III.22).



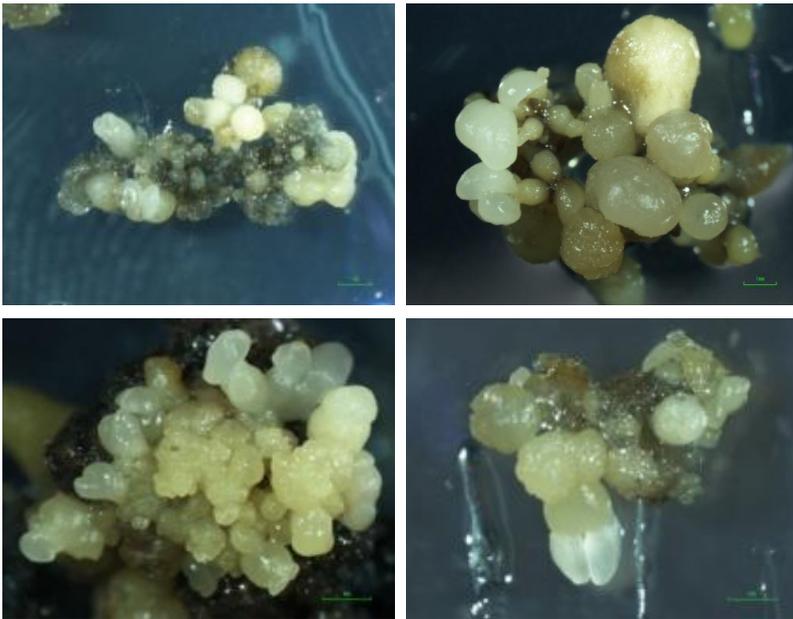
**Figura III.22.** Embriones individuales obtenidos en flores individuales y amentos enteros de encina procedentes de amentos de tamaño C y genotipo HU (barra = 1mm).

La morfología del callo parece estar relacionada con su capacidad embriogénica, puesto que solo el callo marrón con o sin nódulos blanco-amarillentos (principalmente encontrados en genotipo HU; Figura III.23A) desarrolló embriones somáticos. Las otras morfologías no dieron embriones somáticos, pero podemos observar diferencias entre ellas según genotipos: callo marrón claro y oscuro sin aspecto embriogénico (Figura III.23B; principalmente de AY); callo nodular amarillo y verde (Figura III.23C; principalmente de PO); callo nodular pronunciado con zonas necróticas (Figura III.23D; principalmente de RE); callo verde y amarillo con muchos nódulos (Figura III.23E; principalmente de RE); y callo marrón verdoso con nódulos resecos (Figura III.23F; principalmente de VA).

Al igual que en los dos experimentos anteriores, los embriones cotiledonares originaron embriogénesis secundaria que permitió el establecimiento y mantenimiento de 8 líneas embriogénicas (6 de flores aisladas y 2 de amentos) (Figura III.24).



**Figura III.23.** Tipos de callos formados en amentos enteros o flores individuales de encina. El principal genotipo que originó cada tipo de callo está mostrado entre paréntesis. A) callo marrón con nódulos blancos amarillentos, similares a embriones globulares (HU); B) callo marrón claro y oscuro sin aspecto embriogénico (AY); C) callo nodular amarillo y verde (PO); D) callo nodular pronunciado con zonas necróticas (RE); E) callo verde y amarillo con muchos nódulos (RE); y F) callo marrón verdoso con nódulos resecos (VA) (barra = 1mm).



**Figura III.24.** Líneas embriogénicas establecidas procedentes de amantos (izqda.) y flores aisladas (dcha.) de encina de genotipo HU y estadio C de desarrollo (barra = 1mm).

#### III.3.4. Ensayos de maduración de embriones somáticos en encina

Nuestro propósito fue el de desarrollar protocolos de maduración eficientes para controlar la embriogénesis recurrente y comenzar la fase de acumulación de sustancias de reserva y dirigir los embriones hacia su germinación.

##### III.3.4.1. Efecto de los azúcares y del medio de cultivo

El callo embriogénico de la línea VA1 se transfirió a dos medios diferentes (MS y SH con macronutrientes reducidos a la mitad) con y sin 60 g/l de sorbitol. Estos tratamientos promovieron una proliferación adicional de callo embriogénico y la formación de nuevos embriones somáticos, tanto individuales como en grupos de hasta 10 embriones (Figura III.25).



**Figura III.25.** Embriones somáticos individualizables (A) y grupos de embriones en diferentes estadios de desarrollo (B) observados después del ensayo de maduración callo embriogénico de encina (genotipo VA1) con diferentes azúcares y medios de cultivo (barra = 1mm).

Como se muestra en la Tabla III.21, los cuatro medios de maduración ensayados indujeron frecuencias similares de embriogénesis secundaria (80.0-87.0;  $p > 0.05$ ). Sin embargo, el medio MS con sorbitol (MSII) aumentó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) la formación de nuevos embriones globulares y favoreció la maduración (embriones cotiledonares individualizables), aunque la mayoría de ellos presentarían formas anormales. Independientemente del azúcar presente en el medio de cultivo, con el medio MS se obtuvo una media de 7.4% de explantos con embriones cotiledonares aislados y bien formados, frente a la media de 4.7% obtenida en el medio SH. El medio MS suplementado con sorbitol (medio MSII) favoreció la diferenciación de los embriones, obteniéndose los mayores porcentajes de embriones cotiledonares anormales y aislados (41.04%), de embriones globulares (57.21%), y de ambos grupos de embriones: de 0 a 4 embriones (46.78%), y de 5 a 10 embriones (30.10%) (Tabla III.21).

#### III.3.4.2. Efecto del ABA, BA y estratificación

En un segundo experimento se ensayó el efecto del ABA sobre la maduración de embriones globulares y posteriormente se abordó la germinación mediante tratamientos con BA y estratificación de los cultivos. La presencia de ABA no favoreció la maduración y no se obtuvo germinación tras los posteriores tratamientos (Tabla III.22, Figura III.26).

### III. Resultados y discusión: ES en *Quercus ilex*

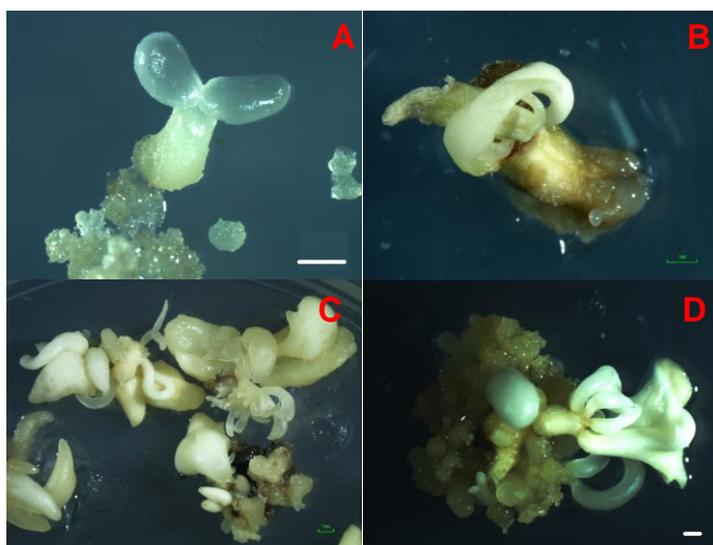
**Tabla III.21.** Efecto del medio de cultivo (MS y SH) y de la presencia o ausencia de sorbitol (60 g/l) sobre la maduración de embriones somáticos de encina de la línea VA1. Los datos son valores medios de 20 repeticiones, con 10 aglomerados de callo embriogénico por repetición, y fueron tomados después de 30 días en sus respectivos medios.

Medio	Sorbitol	Explantos con ES aislados (%)				Grupos de embriones	
		Embriogénesis secundaria (%)	Globulares	ES cotiledonares		0 a 4	5 a 10
				Normales	Anormales		
SHI	No	87.1	4.2b	3.9	22.5b	34.7	25.2
SHII	Si	83.1	3.0b	5.5	19.1b	37.9	16.9
MS	No	80.2	1.1b	6.0	11.7b	34.6	22.1
MSII	Si	86.9	57.2a	8.8	41.0a	46.7	30.1

#### Análisis de la varianza

F. de variación	g.l.	Cuadrados medios					
Medio (A)	1	29.5NS	3789.0**	66.8NS	59.9NS	51.5NS	174.5NS
Azúcar (B)	1	1.1NS	4939.5**	150.6NS	921.4*	198.3NS	27.0NS
A x B	1	203.2NS	5200.5**	3.8NS	1231.0**	67.4NS	264.4NS
Error	36	8027.7	9448.7	3436.2	5206.2	3737.4	4620.9

NS,\*\*,\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$  o  $P \leq 0.05$ , respectivamente. Para cada variable factorial, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. ES: embriones somáticos.



**Figura III.26.** Diferentes tipos de embriones de encina encontrados después de dos meses de siembra en el ensayo con ABA, BA y estratificación. A) embrión cotiledonar aislado; B) embrión anómalo aislado; C) poliembriones; D) poliembriones con callo embriogénico.

**Tabla III.22.** Efecto del ABA, la BA y la estratificación sobre la maduración de callo embriogénico de encina de la línea VA1. Los datos son valores medios de 12 repeticiones, con 3 explantos por placa y se obtuvieron después de un mes con BA con y sin estratificación.

ABA	BA	Estratificación	Embriones aislados		
			Normales	Malformados	Poliembriones
No	No	No	0.24	1.13	1.66
No	No	Si	0.11	0.85	0.53
No	Si	No	0.18	0.88	1.35
No	Si	Si	0.03	1.11	0.95
Si	No	No	0.12	1.88	0.98
Si	No	Si	0.14	1.06	0.78
Si	Si	No	0.04	1.11	0.80
Si	Si	Si	0.08	0.71	0.80

**Análisis de varianza**

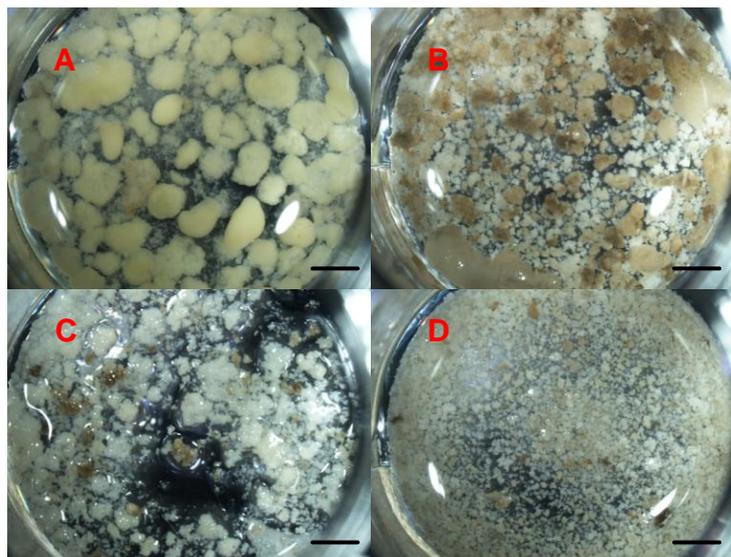
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios		
ABA (A)	1	0.01NS	0.32NS	0.64NS
BA (B)	1	0.04NS	0.62NS	0.00NS
Estratificación (C)	1	0.02NS	0.80NS	1.49NS
AxB	1	0.00NS	0.64NS	0.04NS
AxC	1	0.06NS	0.69NS	0.88NS
B x C	1	0.00NS	0.42NS	0.44NS
A x B x C	1	0.00NS	0.01NS	0.15NS
Error	24	0.03	0.64	0.36

NS: No significativo para  $p \leq 0.05$ .

**III.3.4.3. Efecto del fraccionamiento en medio líquido**

Se fraccionaron cuatro líneas embriogénicas (VA1, HU3, HU5 y HU7) en diferentes tamaños (A: >1.00 mm, B: 0.42 - 1.00 mm, C: 0.25 - 0.42 mm, D: <0.25 mm). Posteriormente las fracciones se cultivaron en medio líquido (Figura III.27), con la intención de homogeneizar el callo embriogénico en cuanto a tamaño y favorecer, quizás, la maduración.

Tras 34 días de cultivo, se observó que el crecimiento de las distintas fracciones dependió de la línea embriogénica, pero en todos los casos la fracción C fue la de mayor crecimiento ( $V_f/V_i = 2.38$ ), seguido de las fracciones B, A y D ( $V_f/V_i = 2.02, 1.68$  y  $1.32$ , respectivamente) (Figura III.28).



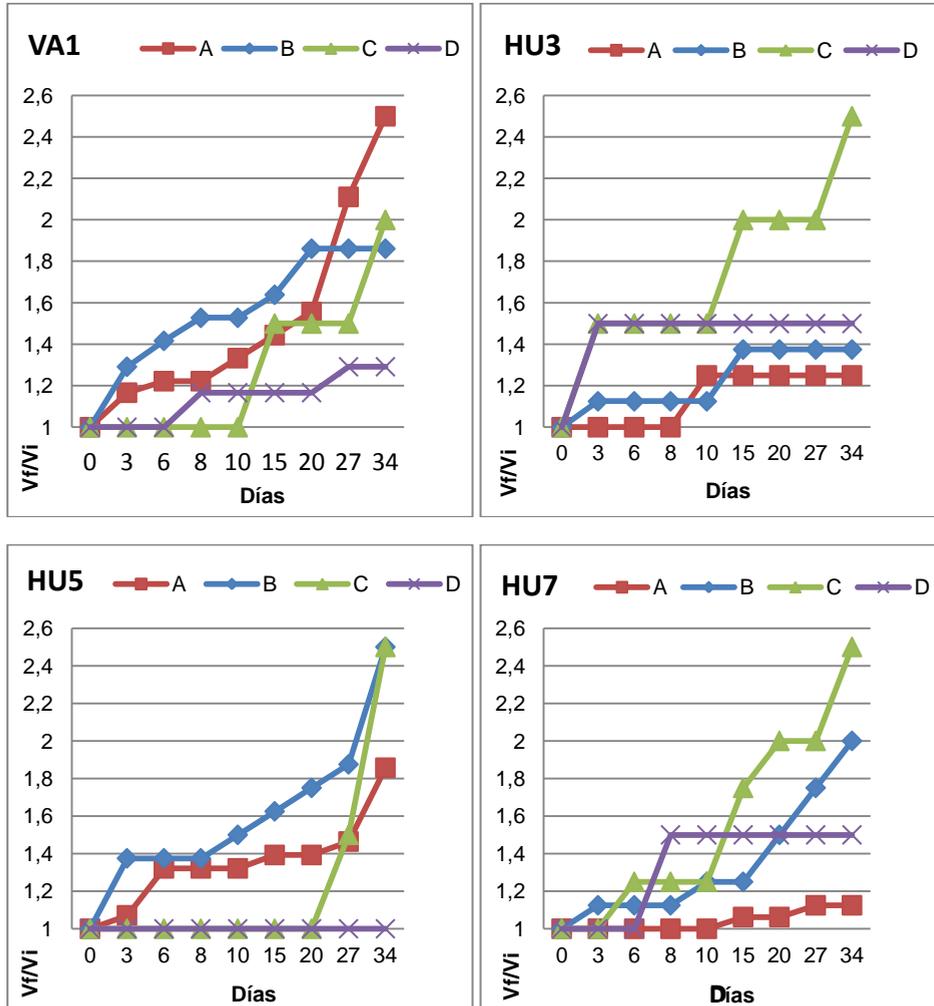
**Figura III.27.** Callo embriogénico de encina fraccionado y cultivado en medio líquido y tamizado por tamaños (A: >1.00 mm, B: 0.42 - 1.00 mm, C: 0.25 - 0.42 mm, D: <0.25 mm) (barra = 1cm).

Callos de las fracciones A y B se utilizaron para estudiar el efecto del soporte (nylon o papel Whatman no. 2) y del sorbitol o manitol sobre la maduración de los embriones. Para ello, estos soportes se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo, suplementado con 60 g/l de sorbitol o manitol. No hubo maduración, y se obtuvo únicamente embriogénesis secundaria.

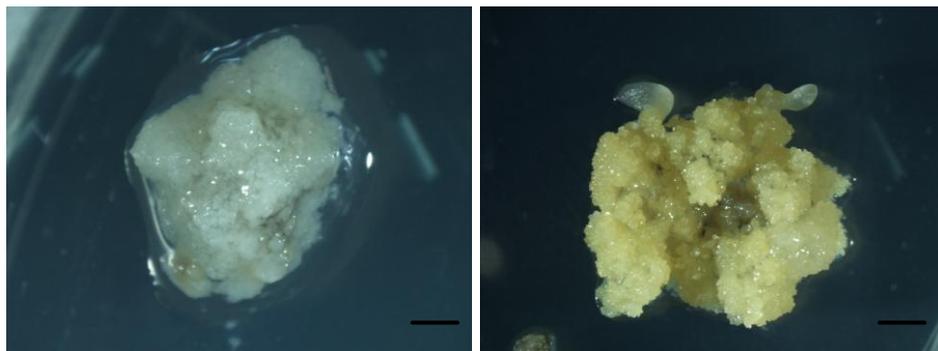
#### III.3.4.4. Efecto del inositol y el período de cultivo en ABA

En un último ensayo, se estudió el efecto del inositol (0, 0.5 y 1 g/l) y del tratamiento con 2  $\mu$ M de ABA (0, 1 y 2 meses) sobre la maduración de los callos embriogénicos procedentes de la línea VA1 y obtenidos del ensayo con los medios MSI, MSII. Los medios de cultivo se suplementaron, o no, con sorbitol. Aunque se obtuvieron algunos embriones maduros (Tabla III.23), ni la aplicación de inositol, ni el posterior tratamiento con ABA favorecieron el desarrollo de los embriones. Cabe destacar que con sorbitol se mantuvo la capacidad embriogénica (61.70% de los callos de apariencia embriogénica) mientras que esta se redujo drásticamente en los medios sin sorbitol (4.90%). Así, sin sorbitol los callos tomaron mayoritariamente un aspecto blanco/amarillento, sin as-

pecto embriogénico, mientras que con sorbitol el callo presentaba coloración marrón y aspecto embriogénico (Figura III.29; Tabla III.23).



**Figura III.28.** Efecto del tiempo de cultivo (34 días) sobre el incremento de volumen celular en el tiempo de callo embriogénico de encina sembrado en medio líquido y tamizado por tamaños. A (azul) >1.00 mm, B (rojo) 0.42 – 1.00 mm, C (verde) 0.25 - 0.42 mm, D (lila) <0.25 mm. Las líneas utilizadas fueron VA1, HU3, HU5 y HU7.



**Figura III.29.** Efecto de los azúcares en el desarrollo de callos embriogénicos procedentes de la línea VA1 de encina. Sin sorbitol se obtuvo mayoritariamente callo mucoso blanquecino sin apenas embriogénesis (izqda.), mientras que con sorbitol se obtuvo mayoritariamente un callo amarillo o marrón más duro, embriogénico y con algunos embriones cotiledonares (dcha.) (barra = 1mm).

Tras diferentes subcultivos en el mismo medio de cultivo, se obtuvieron embriones, que Los embriones obtenidos fueron sembrados en su medio de procedencia, pero sin ABA, en caso en que estuviera presente, y con TDZ y AIB, para inducir su germinación. Después de varios subcultivos, los embriones se malformaron y no germinaron, aunque produjeron más embriogénesis secundaria.

### III.3.5. Estudio histológico de la embriogénesis en *Quercus ilex* L.

Se seleccionaron 4 sublíneas embriogénicas procedentes del anterior ensayo (ver Tabla III.4). De ellas, solo la sublínea VA1-16 presentaba embriones somáticos en su superficie. El estudio anatomo-histológico demostró la presencia, en todas las líneas, de callo de carácter embriogénico constituido por células parenquimáticas de gran tamaño, muy vacuoladas y en proceso de disgregación celular, del que emergen masas de tipo proembriogénico (PEMs) y embriones somáticos generalmente globulares (Figura III.30). Las PEMs están formadas por células de carácter embriogénico localizadas preferentemente en las zonas más externas de la estructura, mientras que en su zona más interna las células se vacuolan y su núcleo se condensa, lo que origina que éstos aparezcan poco teñidos con azul naftol.

### III. Resultados y discusión: ES en *Quercus ilex*

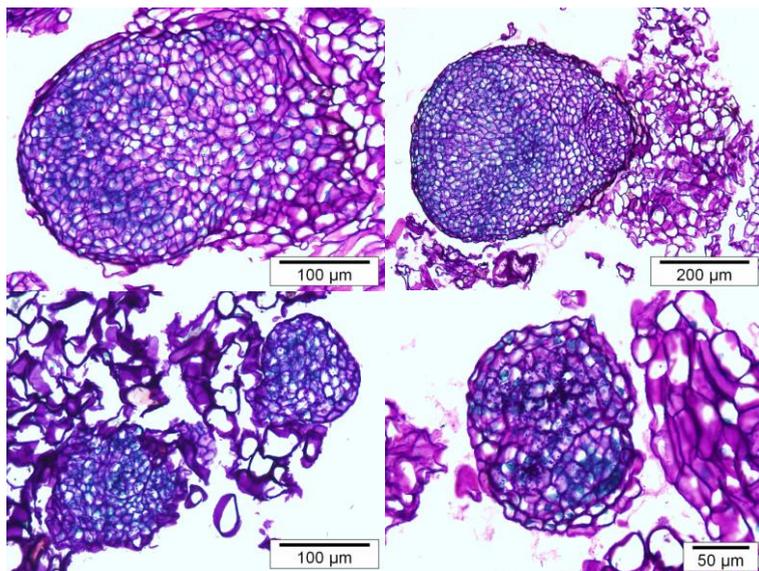
**Tabla III.23.** Efecto de los azúcares utilizados (sacarosa, sorbitol e inositol), de las distintas concentraciones de azúcar y del período de cultivo en ABA sobre la maduración de callo embriogénico de la línea VA1 de encina, procedente del ensayo con los medios MSI y MSII, manteniendo en este ensayo los mismos macronutrientes y azúcares. Los resultados son valores medios de 7 repeticiones con 4-8 aglomeraciones por placa.

Azúcar	Inositol (g/l)	Meses en		Embriogénesis secundaria (%)	Embriones cotiledonares	
		ABA				
Sacarosa	0	0		7.14	2	
		1		10.71	3	
		2		3.57	2	
	0.5	0		1.79	1	
		1		14.29	0	
		2		0.00	0	
	1	0		3.57	1	
		1		3.57	0	
		2		0.00	0	
			Media <sup>z</sup>		4.96b	
	Sacarosa + sorbitol	0	0		69.64	0
			1		71.43	0
2				53.57	0	
0.5		0		58.93	2	
		1		50.00	4	
		2		67.86	5	
1		0		55.36	0	
		1		64.29	0	
		2		64.29	0	
			Media <sup>z</sup>		61.71a	

#### Análisis de varianza

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Azúcar (A)	1	73934.97**
Inositol (B)	2	193.62NS
Periodo de ABA (C)	2	239.74NS
A x B	2	72.35NS
A x C	2	233.64NS
B x C	4	128.30NS
A x B x C	4	338.91NS
Error	108	257.03

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup> efecto del azúcar sobre la maduración. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.



**Figura III.30.** Proembriones de encina rodeados de callo con células vacuoladas en proceso de disgregación, con el objetivo de aislarlo y que pueda desarrollarse. Líneas VA1-12 (arriba) y VA1-16 (abajo). Tinción: azul-naftol.

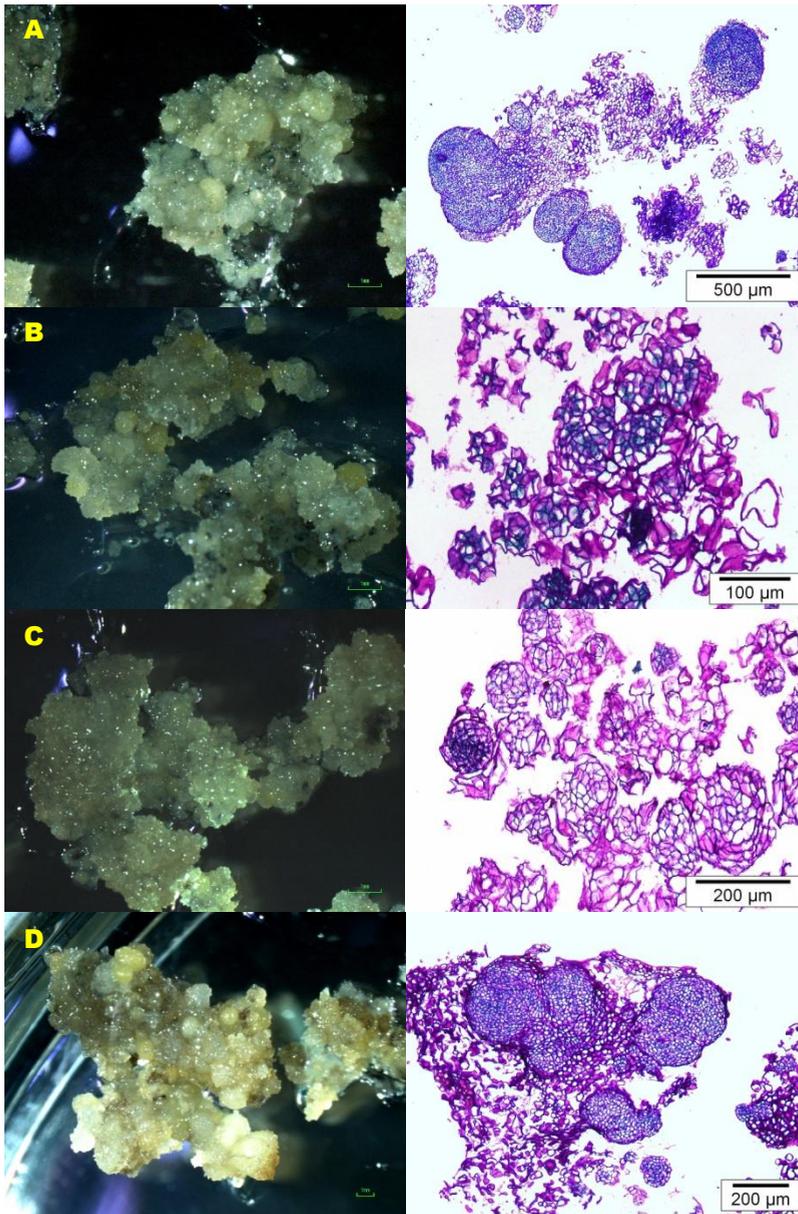
Las células embriogénicas tienen las características propias de su condición; esto es, núcleos prominentes de gran tamaño con nucleolos visibles, citoplasma denso con microvacuolas y una relación núcleo/citoplasma elevada; además, se hace patente la presencia de granos de almidón con la reacción de PAS, característica que desaparece en aquellas células de las estructuras que se están vacuolando o degenerando. En las PEMs, las células de la capa externa o epidérmica generalmente tienen una orientación distinta a las células del interior debido al predominio de divisiones anticlinales, típico de la protodermis. Esta protodermis aparece continua y bien diferenciada en el caso de que las estructuras embriogénicas evolucionen en la formación de embriones globulares normales.

Las diferencias más relevantes entre las 4 líneas seleccionadas se refieren tanto a la formación, en mayor o menor proporción, de estructuras embriogénicas que evolucionan a embriones globulares y etapas sucesivas del proceso embriogénico, como a que dichas estructuras degeneren, pierdan el

carácter embriogénico y terminen por disgregarse. Seguidamente se ilustran las características de las cuatro sublíneas:

Las sublíneas VA1-12, VA1-13 y VA1-15 (cultivadas con o sin 0.5 g/l de inositol) presentaban un aspecto más degradado y menos meristemático (con células más vacuoladas) que la sublínea VA1-16. De las 3 líneas más degradadas, la VA1-12 (cultivada durante 2 meses en 0.5 mg/l de ABA, sin inositol) era la que presentaba las células menos vacuoladas y degradadas y más estructuras proembriogénicas y embriones globulares (Figura III.31A), mientras que la VA1-13 (cultivada en presencia de 0.5 g/l de inositol y sin ABA) el callo presentaba un aspecto más envejecido, con células muy vacuoladas, como si se iniciase la proliferación de células embriogénicas pero se bloqueara su posterior desarrollo (Figura III.31B). La sublínea VA1-15 (cultivada 2 meses en presencia de 0.5 g/l de inositol y 0.5 mg/l de ABA), presentaba el callo en peor estado, observándose una importante disgregación del mismo con procesos de lisis celular. Las estructuras embriogénicas habían perdido el carácter meristemático de sus células que, progresivamente se vacuolaron e incluso se produjo disgregación celular (Figura III.31C). La sublínea VA1-16 (cultivada con 1g/l inositol y sin ABA) es la que presentaba mayor capacidad embriogénica y menor disgregación celular con respecto a las otras líneas, cultivadas o no con 0.5 g/l de inositol. (Figura III.31D).

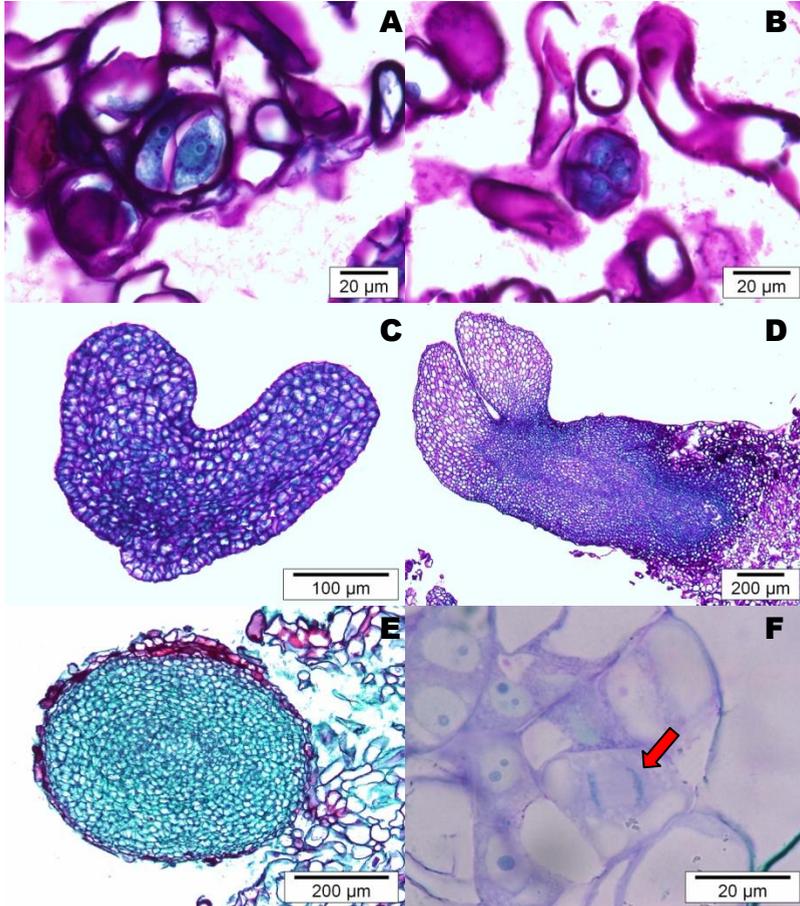
La alta capacidad de embriogénesis secundaria de la línea VA1-16 ha permitido observar las primeras fases de desarrollo embriogénico, desde la división inicial (Figura III.32A), hasta la formación de las primeras estructuras embriogénicas, con 8 a 10 células (Figura III.32B), que continúan su desarrollo a través de las fases de corazón (Figura III.32C) y cotiledonar (Figura III.32D). Este callo fue teñido también con safranina-verde rápido, pudiéndose observar, entre otras estructuras, un embrión globular con protodermis, en el que se aprecian las paredes celulósicas fuertemente teñidas de verde y los núcleos en rojo, diferenciado en una zona superficial de tejido de callo que presenta células disgregadas y muy elongadas (Figura III.32E).



**Figura III.31.** Sublíneas VA1-12 (A), VA1-13 (B), VA1-15 (C) y VA1-16 (D) de encina. A la derecha se muestran sus análisis histológicos. Tinción: azul-naftol.

Además, en este tejido se utilizó la inclusión en plástico que, tal como apuntamos, tiene como ventaja la obtención de cortes semifinos con los que podemos alcanzar una mayor resolución y más detallada al utilizar objetivos de 96

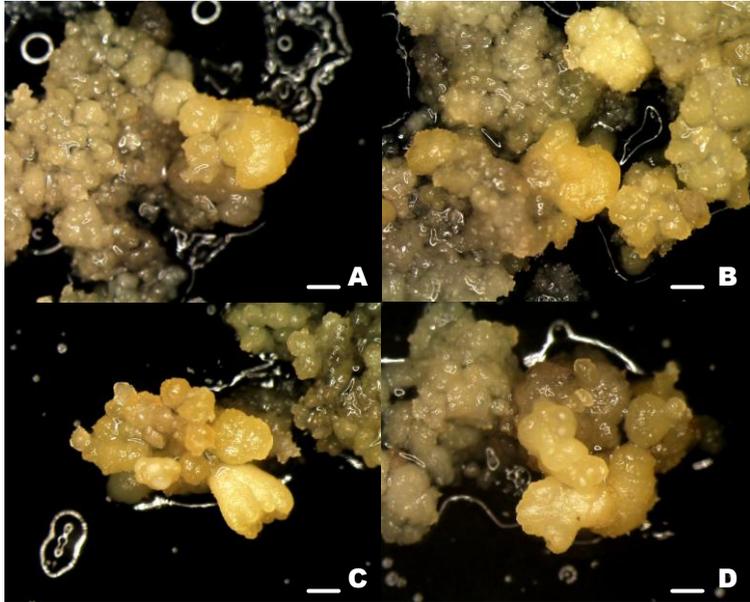
mayor aumento en el microscopio. Así, en la Figura III.32F podemos observar una célula en mitosis en una estructura proembriogénica, mientras que otras se vacuolan, el núcleo se condensa e incluso degenera.



**Figura III.32.** Sublínea VA1-16 de encina. A) primera división del proceso de embriogénesis; B) estadio de desarrollo embriogénico de 8 a 10 células; C) embrión corazón; D) embrión cotiledonar. Todas en tinción azul-naftol. E) embrión globular en alargamiento, teñido con safranina-verde rápido; F) estructura teñidas con toulidina TBO, donde se observan células vacuoladas y, señalada con una flecha, una célula en plena mitosis.

Parte del callo embriogénico de las 4 sublíneas se cultivó durante 3 semanas en medio con STS (20µM) y CA (0.4%), con la intención de promover la diferenciación y maduración de los embriones. Pasado este tiempo, se ob-

servó la aparición de numerosas estructuras embriogénicas, sobre todo en los callos que ya contenían PEMs (Figura III.33).

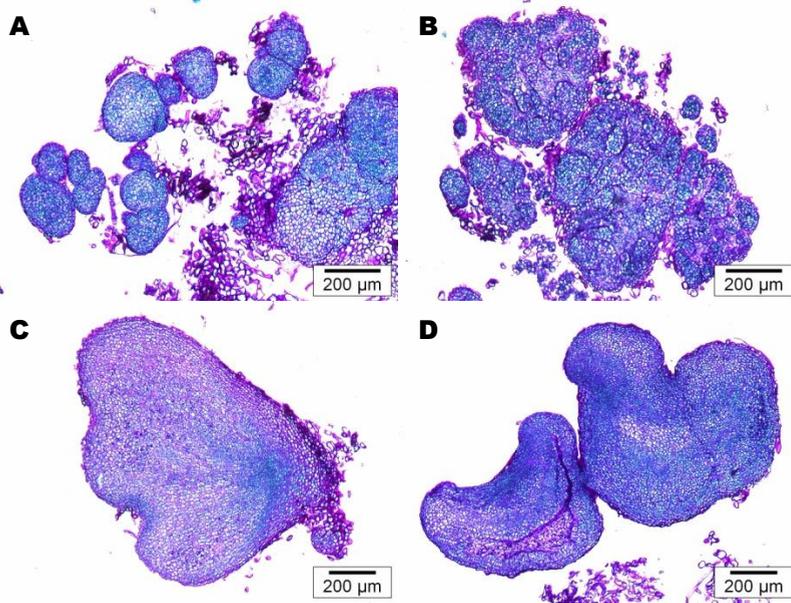


**Figura III.33.** Callo de aspecto embriogénico de las sublíneas VA1-12 (A), VA1-13 (B), VA1-15 (C) y VA1-16 (D) de encina, después de su cultivo, durante 3 semanas, en presencia de 20  $\mu$ M de STS y 0.4% de CA. Nótese la mayor presencia de PEMs y embriones en diferentes etapas del desarrollo (barra = 1mm).

El análisis histológico del callo, crecido en presencia de STS y CA, y su comparación con el callo del que procedía, reveló que favorecieron la diferenciación de estructuras embriogénicas nuevas, independientemente de que el callo inicial tuviese proembriones visibles. Además, las células embriogénicas mostraban una activa división celular, observándose muchas figuras mitóticas y un gran número de embriones globulares y algunos en las fases corazón y torpedo. Estos últimos, de nuevo, abundaban más en el callo procedente de la sublínea VA1-16 (Figura III.34).

En la sublínea VA1-12 también se observaron muchos proembriones y embriones globulares, con células mucho menos vacuoladas y de mayor as-

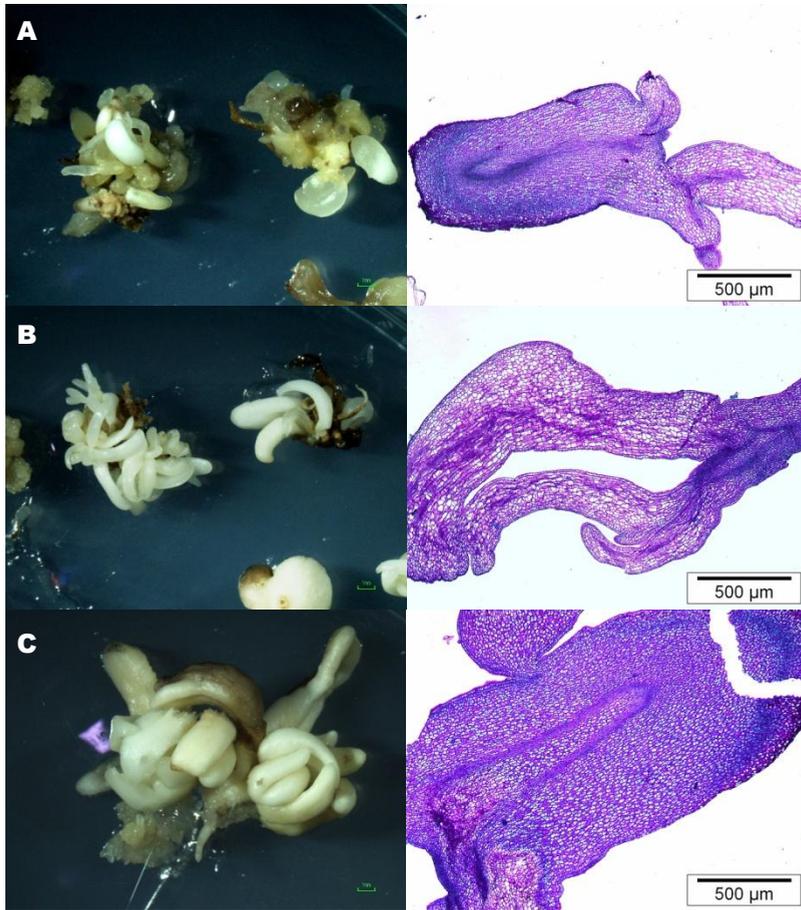
pecto embriogénico que antes del tratamiento con STS y CA (Figura III.34A). En el material de VA1-13 se observaron megaestructuras originadas por la proliferación sucesiva de agregados embriogénicos derivados de una gran actividad del proceso de embriogénesis secundaria (Figura III.34B). En la sublínea VA1-15, que es la de menor capacidad embriogénica, después del tratamiento con CA también se obtuvieron más estructuras embriogénicas, las cuales, aun presentando ciertas anomalías, mostraban bipolaridad con diferenciación de tejido procambial y polos meristemáticos (Figura III.34C). Por último, en la línea VA1-16, se obtuvo un mayor número de masas proembriogénicas y embriones en sucesivas etapas del desarrollo, con los dos polos meristemáticos y procámbium bien definidos, aunque también se identificaron estructuras de carácter anómalo (Figura III.34D).



**Figura III.34.** Análisis histológico de las sublíneas VA1-12 (A), VA1-13 (B), VA1-15 (C) y VA1-16 (D) de encina después de de cultivo en presencia de STS y CA. Tinción: azul-naftol.

También se realizó el análisis histológico de los embriones diferenciados en callos cultivados en medio MS1/2 con 0.5 mg/l ABA y sin sorbitol. Este

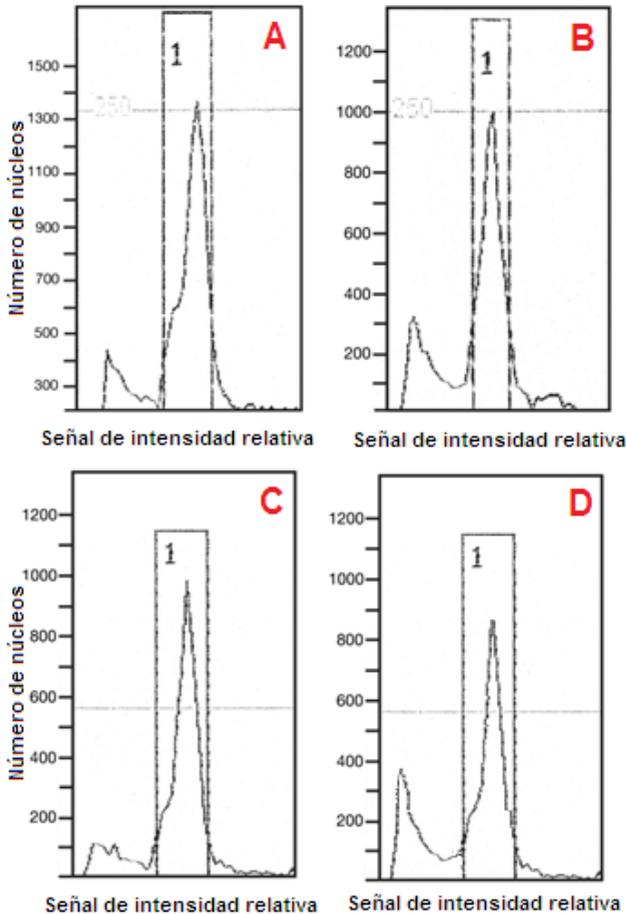
estudio mostró la bipolaridad de los embriones (presencia de los meristemos apicales del tallo y raíz) y la presencia de tejido procambial cerrado, sin conexión vascular alguna con el tejido subyacente (Figura III.35).



**Figura III.35.** Poliembriones de las sublíneas VA1-20A (A), VA1-20B (B) y VA1-20C (C) de encina, donde se pueden apreciar en sus análisis histológicos (derecha) los meristemos apical y radicular y el procámbium. Tinción: azul-naftol (barras izqda. = 1mm).

### III.3.6. Determinación del nivel de ploidía

La observación visual de los cultivos de flores aisladas y amentos enteros indicó que el callo embriogénico se inició en el periantio y nunca de tejido gametofítico (Figura III.21). También se observó que el callo procedente de flores femeninas se inició en su superficie (Figura III.13). El análisis por citometría de flujo mostró intensidades de fluorescencia relativa similares en núcleos aislados de hojas diploides y en una mezcla de estos núcleos con los de callo embriogénico de amento, de embriones cotiledonares procedentes de este callo y de callo procedente de flores femeninas (Figura III.36), confirmando el origen esporofítico de estos callos y embriones.



**Figura III.36.** Análisis por citometría de flujo de hojas de encina (A); mezcla de hojas y callo embriogénico de amentos (B); mezcla de hojas y embriones cotiledonares diferenciados en callos de amentos (C); y mezcla de hojas y callo embriogénico de flores femeninas (D).

### III.4. Discusión

El objetivo de esta investigación es el desarrollo de protocolos para la propagación de individuos de élite de encina mediante ES. Para ello se han utilizado tanto hojas procedentes de árboles adultos como flores masculinas y femeninas.

Las estacas de mayor diámetro (>1.5 cm), produjeron los índices más elevados de brotación de yemas. Estos resultados también se obtuvieron en *Quercus robur* (Valladares y col., 2006), donde las estacas con un diámetro superior a 2 cm produjeron un mayor número de brotes. Las hojas con un tamaño comprendido entre 0.5 y 1.5 cm contienen células en división activa y son más proclives a redirigir su expresión genética hacia la embriogénesis, tal como se ha demostrado en *Quercus suber* (Hernández, 2007), donde esta fue la única fracción de tamaño foliar que presentó competencia embriogénica.

Nuestros ensayos también demuestran que la brotación de las yemas depende de la época de recogida y el genotipo, obteniéndose los mayores índices de rebrote en marzo y mayo. La influencia de la fecha de recogida sobre la brotación se ha descrito en alcornoque (Hernández, 2007) y roble (Valladares y col., 2006), donde se ha visto que los meses de febrero y marzo, respectivamente, fueron los más adecuados; posiblemente esto se deba a la reactivación del transporte por el floema, que activa la movilización de hormonas y nutrientes (Hernández, 2007). En alcornoque (Hernández y col., 2003b), la influencia de la época de recogida sobre la brotación también dependió del genotipo, puesto que se observó que había algunos genotipos que tenían la misma brotación para diferentes momentos de recogida.

Las hojas fueron desinfectadas antes de su cultivo *in vitro*. Las contaminaciones pueden ser debidas a una gran variedad de microorganismos; así, se han realizado experimentos donde se aislaron contaminantes microbianos diferentes de cultivos *in vitro* de banana, con la intención de identificarlos y probar la eficacia de diferentes métodos de esterilización utilizando antibióticos y agentes antifúngicos (Msogoya y col., 2012). Según George (1993), los tipos de microorganismos causantes de las contaminaciones varían según el proce-

so de su detección. Así, a corto plazo, la contaminación se podría deber a microorganismos epifíticos no eliminados durante la desinfección de las hojas, mientras que a largo plazo se podría deber a microorganismos endofíticos. En papaya (Winnaar, 1988) y en alcornoque (Hernández y col., 2003b) la contaminación epifítica depende de la estación en que se recogen los explantos, aunque en nuestro caso las diferencias entre los meses de recogida no son estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). Respecto a las contaminaciones endofíticas, en alcornoque (Hernández, 2007) se vio que en el material procedente de zonas expuestas a una mayor polución aparecía una mayor contaminación endofítica, siendo por tanto deseables aquellos árboles localizados en áreas naturales o agroforestales. En nuestro caso, los árboles seleccionados se encuentran en áreas agroforestales, por lo que no podemos establecer esta correspondencia.

Los beneficios potenciales de la ES en los programas de mejora de la encina dependen de la inducción de esta respuesta morfogénica en los explantos de árboles adultos. A pesar de los esfuerzos dirigidos hacia ese fin, solo se han obtenido plantas derivadas de ES en árboles adultos de *Q. suber* y *Q. robur* (Vieitez y col., 2012 y referencias citadas). En la encina, Féraud-Keller y Espagnac (1989) indujeron ES en callo procedente de hojas cultivado, durante 7 meses, en medio MS modificado con BA y ANA. Sin embargo, la respuesta embriogénica sólo se obtuvo en el material recogido en octubre y no se describe conversión de los embriones somáticos en plantas. En nuestros experimentos, no fuimos capaces de inducir embriones somáticos en hojas de árboles de varias procedencias usando el protocolo utilizada para la encina (Féraud-Keller y Espagnac, 1989), o los empleados con éxito en alcornoque o roble (Vieitez y col., 2012 y referencias citadas). En roble (Cuenca y col., 1999), se indujo embriogénesis somática en hojas y entrenudos cultivados en presencia de 17  $\mu\text{M}$  de ANA y diferentes concentraciones de BA. En alcornoque (Hernández y col., 2003b; Toribio y col., 2005), se obtuvo embriogénesis somática en explantos de hoja cultivados en medio primario de inducción con 10  $\mu\text{M}$  de BA y 50  $\mu\text{M}$  de ANA, y medio secundario de inducción con ambos reguladores reducidos a 0.5  $\mu\text{M}$ . En encina (Féraud-Keller y Espagnac, 1989), con las concentraciones de

reguladores de 10  $\mu\text{M}$  de BA y 50  $\mu\text{M}$  de ANA se obtuvo mayor respuesta de inducción embriogénica en hojas que con las concentraciones 10  $\mu\text{M}$  de BA y 10  $\mu\text{M}$  de ANA. En los ensayos con café (Etienne, 2005), después de 4 semanas de cultivo de las hojas en el medio secundario de inducción, se obtuvo un callo marrón que, al ser cultivado en medio con BA, producía numerosos embriones somáticos. En nuestro caso ninguna de estas combinaciones de reguladores de crecimiento favoreció la inducción de embriones somáticos.

La falta de respuesta embriogénica en las hojas nos llevó al cultivo de flores masculinas y femeninas. En el caso de las flores femeninas, se logró inducir la formación de un único embrión somático en el ensayo en que se cultivaron lóculos aislados. Además, en este ensayo obtuvimos una tasa de contaminación más reducida y, por estos motivos, se hace preferible el cultivo de este tipo de explanto al de flores partidas por la mitad. En *Quercus robur* (Endemann y Wilhem, 1999), se logró embriogénesis somática en flores partidas por la mitad, y cultivadas en medios de inducción con o sin reguladores de crecimiento (5  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.5  $\mu\text{M}$  de BAP) durante 4 semanas, y posterior transferencia a medio con 0.9  $\mu\text{M}$  de BA. En *Quercus faginea* (Fernández-Galiano, 1996) se logró la embriogénesis somática a partir de embriones zigóticos cultivados en medios con diferentes concentraciones de ANA, BA y 2,4-D durante 30 días, y después en medio con BA y ANA. En *Quercus ilex* (Barra y col., 2012), se ha obtenido ES a partir de tegumentos de óvulos sembrados durante un mes en medio SH con 10  $\mu\text{M}$  de ANA y 10  $\mu\text{M}$  de BA y posterior transferencia, durante 30 días, al mismo medio con 0.5  $\mu\text{M}$  de estos reguladores de crecimiento, y subcultivo final al mismo medio sin reguladores de crecimiento.

En contraste con las hojas, los amentos y sus flores aisladas son explantos apropiados para establecer cultivos embriogénicos de *Quercus ilex*, confirmando observaciones preliminares (Toribio y col., 2000). Hasta el presente, solo hay un estudio preliminar de ES en encina usando tejidos florales (Gingas, 1991), en el que se describe la formación de plantas derivadas de embriones somáticos a partir del cultivo de amentos de *Q. bicolor*, pero de *Q. rubra*;

en este trabajo, sin embargo, no se cuantificó la respuesta embriogénica y no se establecieron líneas embriogénicas.

En las condiciones de cultivo ensayadas, la inducción y establecimiento de ES se consiguió en 2 (VA y HU) de los 5 genotipos testados. El genotipo también fue determinante en la inducción de ES en sistemas embriogénicos derivados de árboles adultos de *Q. suber* y *Q. robur* (Hernández y col., 2003b; Toribio y col., 2004; San-José y col., 2010). Además, existen estudios sobre el control genético de la embriogénesis somática tanto en tejidos no embriogénicos (Barro y col., 1999), como en embriones zigóticos (Cheliak y Klimaszewska, 1991; Park y col., 1993; Kim y col., 1997; Fernández-Guijarro, 1997). La captura de cerca de la mitad de los genotipos probados es relativamente buena para programas de fitomejora. Cuantos más genotipos puedan ser preparados, menor es el riesgo de erosión genética (Cheliak y Klimaszewska, 1991).

Nuestros resultados han demostrado que la combinación en la aplicación de ANA y BA, primero a una alta y después a una baja concentración, fue esencial para inducir ES en tejidos florales de encina. En contraste, en el roble rojo del norte, la ES fue inducida en respuesta a tratamientos con 2,4-D (Vengadesan y col., 2009). Un método de inducción en 3 estadios también promovió respuestas embriogénicas en tejidos de hoja de alcornoque y roble común (Hernández y col., 2003a; Toribio y col., 2004).

La frecuencia de iniciación de ES fue baja (hasta 3.3%). Sin embargo, los embriones somáticos formados mostraron una elevada capacidad de producir embriogénesis secundaria, principalmente en medio con sorbitol. La capacidad de los embriones somáticos de encina de producir embriogénesis secundaria fue demostrada en cultivos derivados de embriones zigóticos (Mauri y Manzanera, 2003). Este hecho permite el establecimiento de un proceso recurrente que garantice el elevado potencial multiplicador de la técnica, independientemente de que haya bajas frecuencias de iniciación. Las líneas embriogénicas establecidas serán usadas para más investigaciones encaminadas a obtener embriones somáticos bien formados y maduros y más germinación.

En nuestro estudio, también se abordaron diferentes ensayos de maduración y germinación a partir de las líneas embriogénicas obtenidas. En el en-

sayo sobre el efecto del sorbitol y los macronutrientes, no hubo maduración. Sin embargo, se obtuvo, indirectamente, un protocolo mejorado para la embriogénesis recurrente, mediante la combinación de 6% de sorbitol y 3% de sacarosa, y el uso de macronutrientes MS en el medio de cultivo. Esta misma proporción de sorbitol y sacarosa produjo la mayor tasa de maduración de embriones cotiledonares de *Quercus robur* (Sánchez y col., 2003), mientras que los macronutrientes MS a la mitad de concentración dieron como resultado embriogénesis recurrente en embriones de *Q. bicolor* (Gingas, 1991).

Los experimentos en los que se ensayó el efecto del ABA sobre la maduración y de la BA y estratificación sobre la germinación de los embriones, no dieron resultados satisfactorios, a diferencia de los resultados obtenidos en roble (Sánchez y col., 2003), donde la presencia de BA en el medio de germinación aumentaba la conversión a plantas de los embriones. No obstante, estos tratamientos pudieron limitar la embriogénesis recurrente, ya que en el tratamiento control se obtuvo el porcentaje más elevado de embriones cotiledonares normales aislados y de poliembriones. En embriones maduros de *Quercus ilex* (Mauri y Manzanera, 2004), el ABA redujo la embriogénesis secundaria y aumentó la tasa de germinación, disminuyendo el tiempo en que esta tarda a llevarse a cabo, alcanzando la máxima tasa con una concentración 40  $\mu\text{M}$  de ABA en el medio, combinada con estratificación. Respecto a la estratificación, en otros ensayos se ha visto que su aplicación, junto con un bajo nivel de radiación, favoreció la germinación en embriones somáticos de muchas especies de plantas, como *Rosa* (Marchant y col., 1996), *Juglans regia* (Deng y Cornu, 1992) y alcornoque (Fernández-Guijarro y col., 1995).

El ensayo del fraccionamiento de los callos y su posterior cultivo en medio líquido tampoco favoreció la maduración de los embriones. Además, el crecimiento diferenciado de las fracciones dependió del genotipo. La siembra de las dos fracciones más grandes de callo de este tratamiento (fracciones A y B) sobre nylon o papel Whatman, y la presencia de sorbitol y manitol en el medio, tampoco indujeron maduración. Además, el fraccionamiento del callo tuvo influencia negativa sobre la proliferación posterior en medio sólido; quizás esto sea debido a que este tipo de cultivo propicia la inducción de fenómenos de

vitrificación en tejidos y problemas de aireación (Celestino y col., 2005). De hecho, en alcornoque, el cultivo en medio líquido de callo embriogénico dio como resultado la necrosis del tejido a los 6 días de cultivo, debido a la liberación de compuestos fenólicos en el medio; por ello, se optó por tamizar el callo en distintos tamaños, dando como resultado un gran crecimiento y aparición de numerosas estructuras embriogénicas cuando se usaron tamaños de 41 a 800  $\mu\text{M}$  (Jiménez y col., 2013). La aplicación de inositol al medio de cultivo y las variaciones en el período de cultivo en presencia de ABA no tuvieron efecto sobre la maduración.

Aunque no ha sido posible establecer un protocolo para la maduración y germinación de embriones somáticos de encina, se ha obtenido una valiosa información respecto al mantenimiento y proliferación de callo embriogénico, proceso necesario para la producción industrial de genotipos de interés.

Uno de los mayores problemas encontrados en este trabajo ha sido la dificultad de obtener embriones cotiledonares maduros y bien formados, necesarios para la germinación y regeneración de plantas. Los estudios histológicos realizados, han demostrado que una gran parte de los embriones, así como el callo embriogénico adyacente, presentan células vacuoladas con el núcleo condensado poco teñido de azul. La vacuolización es indicativa de que las células están perdiendo su carácter embriogénico y se diferencian al tipo parenquimático. Las células meristemáticas son células pequeñas, con un nucleolo muy evidente y cromosomas descondensados que agranda el núcleo. La relación núcleo/citoplasma de estas células es alta; además, como el citoplasma se enriquece de proteínas, queda muy teñido con azul naftol.

Independientemente de la presencia de sorbitol en el medio de cultivo, 1 g/l de inositol favoreció la diferenciación de estructuras embriogénicas mediante embriogénesis secundaria, aunque este efecto no fue significativo. El mayor número de estructuras embriogénicas y de células mitóticamente activas se obtuvo con la sublínea VA1-16, cultivada en medio desprovisto de ABA y suplementado con 1g/l de inositol. El inositol está involucrado en la síntesis de fosfolípidos, de pectinas de pared celular y de sistemas de membrana en el citoplasma celular, necesarias para la mitosis (Pullman y col., 2008); por lo

tanto, la presencia de la mayor concentración de inositol, ha debido facilitar la obtención de más embriogénesis secundaria.

Hemos observado que las estructuras embriogénicas se encontraban mayoritariamente rodeadas de callo en disgregación; la misma disposición se observa en explantos de hoja de roble (Corredoira y col., 2006), sugiriéndose que esto es debido a que la inducción de estructuras embriogénicas requiere la disociación y necrosis parcial del tejido circundante. También es interesante señalar que en algunos casos la producción de callo friable se asoció con el proceso de embriogénesis somática, afirmándose que los embriones tienen un origen unicelular debido al aislamiento de las células embriogénicas (Michaux-Ferrière y Carron, 1989; Carron y col., 1995). El embrión somático de origen unicelular proviene de las divisiones de una única célula, mientras que el origen multicelular resulta de la asociación de células embriogénicas o de agregados celulares (Yeung, 1995). Además, hemos obtenido en algunos casos, pequeños agregados celulares embriogénicos con una pared común; en roble, castaño (Corredoira y col., 2006) y alcornoque (El Maâtaoui y col., 1990) se ha sugerido que esto es indicativo de un origen unicelular. No obstante, en embriones secundarios de *Q. robur* (Zegzouti y col., 2001) y *Q. suber* (Puigdejarrols y col., 1996, 2001) se asumió un origen multicelular. En nuestras muestras también se observan grandes estructuras compuestas por varias figuras mitóticas que dan cuenta de un origen pluricelular. Este posible doble origen, uni y pluricelular, de los proembriones, obtenido en los diferentes callos, se ha visto en otras especies, como *Feijoa sellowiana* (Canhoto y Cruz, 1996; Cangahuala-Inocente y col., 2004) y *H. brasiliensis* (Carron y col., 1995), mientras que en olivo, Benelli y col., (2001) concluyeron que desde una perspectiva anatómica no era posible tener claro cuál era el tipo de origen, debido a la posible fusión de diferentes agregados embriogénicos celulares.

La incorporación de 20  $\mu\text{M}$  de STS y CA (0.4%) al medio de cultivo, tal como corrobora el análisis histológico, aumentó la capacidad de histodiferenciación de las estructuras embriogénesis, y por tanto la proporción de las que alcanzan la etapa cotiledonar. Esto puede ser debido a que el STS es un in-

hibidor del etileno que, a diferencia del nitrato de plata, no es tóxico. Se ha señalado que la adición de STS favorece la inducción de raíces y el crecimiento del tallo (Steinitz y col., 2010). El CA tiene propiedades higroscópicas que provocan la disminución de la disponibilidad de agua, siendo un factor crítico en la maduración de embriones somáticos (Klimaszwska y col., 2000). Los efectos del CA en la morfogénesis están principalmente ligados a la adsorción de componentes inhibitorios del medio de cultivo y al sustancial decrecimiento de metabolitos tóxicos y exudados fenólicos en el medio (Thomas, 2008). Además, el CA está involucrado en diferentes actividades estimuladoras y inhibitoras, incluyendo la liberación de sustancias naturalmente presentes en el CA que promueven el crecimiento, la alteración y el ennegrecimiento del medio de cultivo, la absorción de vitaminas, de iones metálicos y de reguladores de crecimiento de plantas, incluyendo el ácido abscísico y etileno (Thomas, 2008). Debido al papel del CA en la morfogénesis, en *Quercus suber* (Pintos y col., 2010), su adición al medio de cultivo promovió la maduración de embriones somáticos.

Así pues, el análisis histológico nos ha servido de herramienta para detectar la calidad embriogénica del callo, puesto que nos ha mostrado el estado mitótico celular y nos ha permitido ver estructuras embriogénicas que no se podrían ver de visu. Este tipo de análisis también sirve para determinar el origen somático de los embriones, que es esencial para la uniformidad genética de las plantas regeneradas (Corredoira y col., 2006), lo cual es especialmente relevante para la transformación genética. Por último, el estudio histológico nos ha ofrecido una importante información acerca del proceso general implicado en la evolución de los embriones somáticos desde la célula original hasta su maduración.

Una de las cuestiones más importantes que se plantean cuando se cultivan tejidos florales es el nivel de ploidía de los regenerantes. Se han obtenido embriones haploides y homocigotos haploides duplicados en algunas especies por androgénesis y ginogénesis (Bueno y col., 1997). Por motivos prácticos, la obtención de embriones somáticos es más fácil mediante el cultivo *in vitro* de flores enteras o de inflorescencias, que el cultivo de anteras aisladas, ovarios o microesporas. En este estudio, una observación cuidadosa confirmó que el

callo embriogénico se inició sobre el perianto de la flor masculina y la superficie de la flor femenina, y nunca de tejidos gametofíticos; de hecho, la citometría de flujo verificó que los embriones eran diploides.

Las líneas embriogénicas establecidas serán utilizadas para investigaciones encaminadas a obtener embriones maduros y bien formados, favoreciendo con ello su germinación.

**IV. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO HERRAMIENTA  
PARA LA MEJORA DE *Pinus pinaster* y *Pinus pinea***

---



## **IV. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO HERRAMIENTA PARA LA MEJORA DE *Pinus pinaster* y *Pinus pinea***

### **IV.1. Introducción**

*Pinus pinaster* (pino marítimo) y *Pinus pinea* (pino piñonero) son dos de las coníferas más representativas del bosque Mediterráneo. No obstante, los programas de mejora no han sido abordados con la misma profundidad en ambas especies. *Pinus pinaster* es, en la actualidad, la conífera más empleada en las repoblaciones artificiales de la península ibérica. En Europa, el pino marítimo fue incluida en los programas de mejora genética relacionados con la provisión de pulpa de madera, crecimiento, forma del tronco, tolerancia a sequía y enfermedades que comenzaron en Francia y Portugal en los años 60 del pasado siglo (Lelu y col., 2006). En ambos países, la embriogénesis somática se ha utilizado como protocolo para la propagación clonal de familias seleccionadas (Féraud-Keller y Espagnac, 1989; Bercetche y Pâques, 1995; Fernández-Galiano, 1996; Fernández-Guijarro, 1997; Toribio y col., 2000, 2004, 2005; Hernández y col., 2001, 2003a, 2003b; Corredoira y col., 2006; Hernández, 2007). En el Estado Español, la elevada diversidad genética encontrada entre las distintas procedencias descritas, sugiere que la especie presenta un gran potencial de adaptación y por ello ha sido elegida como modelo para el estudio de la respuesta adaptativa de las coníferas al estrés hídrico (proyectos co-financiados por la UE). En los últimos años, la investigación de nuestro grupo se ha enfocado en contribuir al desarrollo de herramientas que permitan la propagación de clones seleccionados utilizando las técnicas de cultivo in vitro (Humánez, 2009; Humánez y col., 2011; 2012). La inducción de ES en la especie no presenta problemas (porcentajes de inducción de hasta el 70%) (Klimaszewska y col., 2007). No obstante, e independientemente de las diferentes procedencias y familias utilizadas para este fin, la baja tasa de embriones maduros obtenidos sigue siendo el mayor hándicap para la aplicación de esta técnica a gran escala.

Además de la selección de genotipos, los estudios anteriormente citados han permitido la identificación de genes posibles candidatos a regular características relacionadas con respuestas adaptativas a estrés hídrico y crecimiento.

to. La validación de esos genes requiere de la disponibilidad de protocolos eficaces de transformación genética para la especie.

*Pinus pinea* es cultivada para la producción de piñones. En los últimos años, el grupo del IMIDRA, ha desarrollado un protocolo para la propagación de la especie mediante embriogénesis somática (Carneros, 2009; Carneros y col., 2009). La disponibilidad de un protocolo de transformación genética para la especie, permitiría abordar estrategias de mejora genética, así como de genómica funcional.

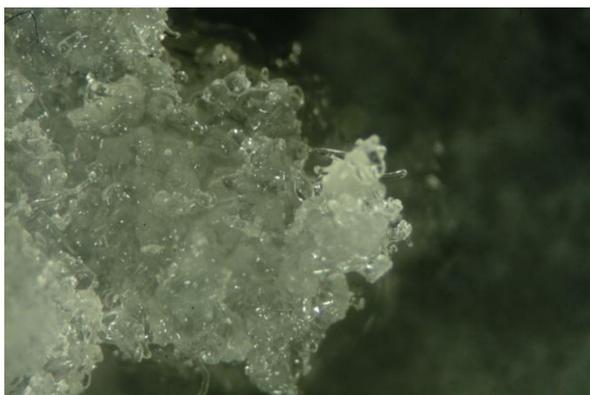
Por todo lo expuesto, en este trabajo se pretende optimizar la fase de maduración de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster* y abordar ensayos de expresión transitoria, como paso previo a la transformación genética, en ambas especies de pino utilizando como material vegetal líneas embriogénicas.

## IV.2. Material y métodos

### IV.2.1. Ensayos de maduración en líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*

#### IV.2.1.1. Material vegetal

Los ensayos de maduración se realizaron con líneas embriogénicas previamente obtenidas en nuestro laboratorio (Humánez y col., 2012; Morcillo y col., 2012) (Figura IV.1).



**Figura IV.1.** Callo embriogénico de *Pinus pinaster* utilizado en los ensayos de maduración.

Para la obtención de las líneas embriogénicas se recolectaron conos generados por polinización abierta de árboles selectos, pertenecientes a 4 de las procedencias descritas para la especie: Procedencia Noroeste interior, conos recogidos en Anllo, Lugo; Procedencia Soria-Burgos, recogidos en Valsain, Segovia; Procedencia Serranía de Cuenca, recogidos en Sinarcas, Valencia y la Procedencia Levante, recogidos en la Sierra Calderona, Valencia.

Tras la esterilización, los megagametofitos aislados, conteniendo en su interior embriones zigóticos en estado precotiledonar, se cultivaron en medio de Litvay modificado según Lelu-Walter y col., (2006) (medio mL<sub>V</sub>; Tabla 1) suplementado con 9.0  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.5  $\mu\text{M}$  de benciladenina (BA) o con 0.1  $\mu\text{M}$  de EBR (epibrasinólido; medio mL<sub>V</sub> + EBR). Los reguladores de crecimiento BA y 2,4-D se adicionaron al medio de cultivo antes de proceder a su esterilización, mientras que la glutamina y el EBR se esterilizaron por filtración (filtro milipore de 22  $\mu\text{m}$  de diámetro) y se añadieron al medio ya estéril. El medio se solidificó con 4 g/l de agar Gelrite®. El pH se

ajustó a 5.8 antes de proceder a su esterilización en autoclave ( $10^5$  Pa a 120°C, 20 min).

Las líneas embriogénicas (Figura IV.1) obtenidas en los tratamientos arriba indicados se mantuvieron mediante subcultivos quincenales en sus respectivos medios, en condiciones de oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Cada línea se identificó según procedencia (V, Valsain; C, Calderona; S, Sinarcas; A, Anllo); árbol madre dentro de la procedencia (primer número); placa o repetición del explanto inicial (segundo número), y una letra que designa al megagametofito dentro de la placa. Así, V5-2c correspondería a Procedencia Valsain, árbol 5, placa 2, megagametofito c.

**Tabla IV.1.** Composición del medio nutritivo Litvay basal (mg/l)

<b>Macroelementos</b>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340
KNO <sub>3</sub>	1900
MgSO <sub>4</sub>	903.38
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	16.61
<b>Microelementos</b>	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.50
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31.00
KI	4.15
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	21.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.25
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	43.00
SO <sub>4</sub> FE·7H <sub>2</sub> O	27.84
<b>Suplementos orgánicos</b>	
myo-Inositol	100.00
Nicotinic Acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.10
Thiamine HCl	0.10
Glutamina	500
Hidrolizado Caseína	1000
Sacarosa	20000

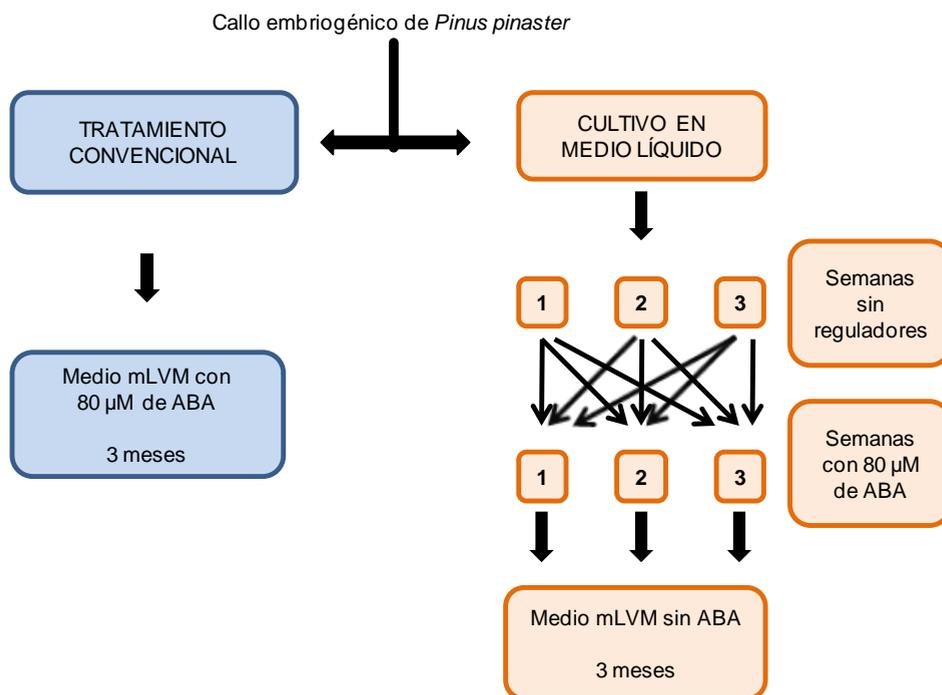
#### IV.2.1.2. Ensayos de maduración

Para el protocolo estandar utilizado durante los ensayos de maduración, también llamado protocolo convencional (Lelu y col., 2006), se realizaron los siguientes pasos: Se resuspendieron 120 mg de callo en tubos Corning de 15 ml con 5 ml de medio mLV líquido, sin reguladores, con 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de carbón activo. La mezcla se agitó suavemente hasta disgregar las células y la suspensión resultante se recogió sobre papel de filtro Whatman No. 2 (70 mm de diámetro) situado en un embudo encima de un kitasato conectado a una bomba de vacío. Se dejó drenar el exceso de líquido y se aplicó al final un leve pulso de vacío. El papel de filtro, con las células embriogénicas, se colocó en placas petri (100 x 20 mm) que contenían 30 ml de medio mLV de maduración (mLVM, con 60 g/l de sacarosa, 80  $\mu$ M de ácido abscísico -ABA- y 10g/l de agar Gelrite<sup>®</sup> Gellan Gum). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad y cámara de crecimiento a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses, con subcultivos mensuales, antes de proceder al recuento de los embriones con ayuda de una lupa binocular.

Para optimizar este proceso de maduración, se realizaron una serie de experimentos introduciendo variaciones a este protocolo que se exponen a continuación.

##### IV.2.1.2.1. Maduración en medio líquido

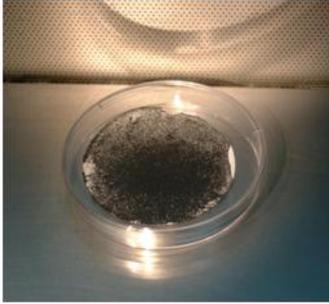
Se realizó un experimento de maduración en medio líquido y se comparó con el tratamiento convencional. En el tratamiento con medio líquido, 120 mg de la línea embriogénica V23-1a se inocularon en matraces Bellco<sup>®</sup> de 125 ml con 25 ml de medio mLV líquido sin reguladores de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron, durante 1, 2 o 3 semanas, en un agitador orbital (90 rpm) en una cámara de crecimiento a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y oscuridad. Transcurrido este periodo, se retiraron 20 ml del medio y se añadieron 25 ml de medio líquido mLVM y se mantuvieron durante 1, 2 y 3 semanas en las mismas condiciones. Posteriormente, los callos se transfirieron a medio sólido sin ABA. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento. Un esquema de este experimento se presenta en la Figura IV.2.



**Figura IV.2.** Esquema del experimento de medio líquido realizado para la maduración de callo embriogénico de pino marítimo.

#### IV.2.1.2.2. Efecto de la desecación y el periodo de cultivo con ABA

Se estudió el efecto de la desecación previa del callo durante 6 horas y del tiempo de aplicación de 80 µM de ABA en el medio de cultivo sobre la maduración de 8 líneas embriogénicas (V1G-2a, V2F-2d, V2J-2b, V2J-4a, V2J-7a, V4-1b, V4-1b y V4-7a) de *Pinus pinaster*. Para el tratamiento de desecación, se colocó el papel de filtro con las células embriogénicas en placas vacías tapadas y sin precintar en una cámara de flujo laminar durante 6 horas (Figura IV.3). La pérdida de agua se midió en forma de variación del peso fresco en 4 repeticiones de la línea V4-7a. Las líneas, desecadas o no, se cultivaron en medio mLVM durante 1 ó 3 meses. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y línea embriogénica.



**Figura IV.3.** Callo embriogénico expuesto a desecar en placa vacía dentro de la cabina de flujo en condiciones de esterilidad.

#### **IV.2.1.2.3. Efecto del período de cultivo en ABA y de la presencia de carbón activo**

Se utilizaron 14 líneas embriogénicas (AN1-1a, AN1-1b, AN1-2a, AN5-10c, C4-4a, C4-5a, S1-6b, S3-3a, V5-1b, V5-2a, V5-3a, V5-10a, V14-1a) de *Pinus pinaster* inducidas en medio mLV ó mLV + EBR. Se estudió el efecto del período de aplicación de 80  $\mu$ M de ABA en el medio de maduración (1 o 3 meses) y de la presencia o no de 4 g/l de carbón activo (CA). Se realizó un diseño factorial con 3 placas por línea y tratamiento.

#### **IV.2.1.2.4. Efecto del soporte celular utilizado**

Se utilizaron 15 líneas embriogénicas (AN1-1a, AN1-1b, AN1-2a, AN1-2c, AN5-10c, C4-4a, C4-5a, C5-5a, S1-6b, S3-3a, V5-1b, V5-2a, V5-3a, V5-10a, V14) de *Pinus pinaster*, generadas y mantenidas en medio mLV o mLV + EBR. Inicialmente las células embriogénicas, recogidas sobre papel de filtro, se cultivaron en medio mLVM (protocolo convencional), y tras 30 días se transfirieron a medio sin ABA y sobre 4 soportes diferentes: filtro de acetato de celulosa (50 mm  $\varnothing$  y 1.2  $\mu$ m de poro), filtro de nylon (47 mm  $\varnothing$  y 1.0  $\mu$ m de poro), filtro de poliéster (47 mm  $\varnothing$ ) y el mismo papel Whatman de 55 mm  $\varnothing$ . Tras 30 días, las células embriogénicas situadas sobre sus respectivos soportes se transfirieron a medio fresco. Se realizaron 6 repeticiones por cada tratamiento y línea embriogénica.

En todos los experimentos, transcurridos los 90 días de su inicio, se determinó el número de embriones obtenidos agrupándolos según estadios de desarrollo.

##### **IV.2.1.3. Conversión/germinación de los embriones somáticos**

Los embriones obtenidos en este último experimento se transfirieron a medio de germinación (medio mL<sub>V</sub> sin reguladores y con 30 g/l de sacarosa), y se almacenaron durante 3 semanas en frío (4°C) y oscuridad. Transcurrido este tiempo, todas las placas se subcultivaron al mismo medio y se colocaron en ángulo de 40° a 25 ± 2°C, manteniéndolas durante 14 días en oscuridad. Posteriormente las placas se colocaron bajo fotoperiodo de 16 horas y a la misma temperatura, con subcultivos cada 15 días, hasta observar la aparición de raíces y la elongación del tallo.

##### **IV.2.1.4. Aclimatación y transferencia al invernadero**

Las plántulas obtenidas se transfirieron a alvéolos con un sustrato compuesto de turba y perlita en relación 1:1 (v/v). Los alvéolos se colocaron en una bandeja cubierta con plástico transparente a modo de invernadero, para mantener inicialmente un 100% de humedad relativa y permitir el paso de luz. Estas bandejas se guardaron en una cámara de crecimiento a una temperatura de 25 ± 2°C con un fotoperiodo de 16 horas. Transcurrido un mes, se retiró la cubierta de plástico para disminuir la humedad hasta conseguir mantener las plantas a 70% de humedad relativa, para su aclimatación en el paso a invernadero.

## **IV.2.2. Ensayos de expresión transitoria en *Pinus pinaster* y *Pinus pinea***

### **IV.2.2.1. Material biológico**

Se utilizaron 8 líneas embriogénicas de *Pinus pinaster* (V2-2d, V2-3a V4-7a, V5-2g, V12-2a, V12-4a, V23-1a y V23-5f) y 2 de *Pinus pinea* (1F11 y 7F11), mantenidas en medio mLV semisólido. Las líneas embriogénicas de *Pinus pinea* fueron aportadas por el grupo del Dr. Mariano Toribio, del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) y se obtuvieron según se describen en Carneros y col., (2009). Todas las líneas se mantuvieron mediante subcultivos quincenales a medio fresco. En todos los experimentos se utilizó callo embriogénico tras 4 días de cultivo en medio fresco.

### **IV.2.2.2. Cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas utilizadas han sido AGL1 (Schroeder y col., 1993), EHA105 (Hood y col., 1993), C58 (Koncz y Schell, 1986), LBA4404 (Hoekema y col., 1983) y GV3101 (Holsters y col., 1980).

### **IV.2.2.3. Preparación de las construcciones**

Se utilizaron diferentes construcciones con los plásmidos pABC, pBIN35SGUSINT, pBINUbiGUSINT y pTAB16. Todas las construcciones incluían el gen *gusA*, que codifica una  $\beta$ -glucuronidasa para facilitar los ensayos de expresión transitoria.

El plásmido pABC (Mentewab y Stewart, 2005) lleva el gen *Atwbc19* junto con el promotor CaMV35S y fue enviado en marzo de 2009 por el Dr. Neal Stewart (University of Tennessee; USA). Se prepararon las construcciones con el plásmido pABC siguiendo los protocolos habituales: inicialmente se recuperó el plásmido, se transformaron células competentes de *E. coli* mediante choque térmico. Las colonias transformadas se seleccionaron con kanamicina y tras 16 horas, las colonias resistentes se resuspendieron en medio LB

(Luria-Bertani broth medium; Bertani, 1951) con kanamicina. Se aisló el plásmido, se digirió con *SacI*, *SacII* y *KpnI* y se comprobó mediante un gel de agarosa la presencia de los correspondientes fragmentos. Posteriormente se modificó la construcción para añadirle el gen *gusA* que nos permita realizar ensayos de expresión transitoria. Por último, el nuevo plásmido (pABC) se introdujo en la cepa C58 de *Agrobacterium tumefaciens*.

El plásmido pBIN35SGUSINT, de 14 kb, contiene el gen *gusA* fusionado con el promotor CaMV35S y el gen *nptII* controlado por el promotor nos (nopalina sintasa). Este gen es marcador para la resistencia a kanamicina (Vancanneyt y col., 1990). El plásmido pBINUbiGUSINT contiene los genes marcadores *nptII* y *gusA* bajo el control del promotor de la nopalina sintasa y el promotor del gen *ubi1* de poliubiquitina de maíz respectivamente (Humara y col., 1999). El plásmido pTAB16 incluye el gen *bar*, que confiere tolerancia al herbicida fosfotricina (PPT), y el gen *gusA*, ambos con el promotor CaMV 35S. El gen *gusA* no se expresa en *A. tumefaciens* debido a la inserción de un intrón de planta en la región codificante de la proteína (Schroeder y col., 1993).

#### IV.2.2.4. Medios y condiciones de cultivo

Los medios utilizados fueron el mLV (Tabla IV.1), el medio LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) y el medio MS (Tabla III.2). En los ensayos con la cepa AGL1 de *Agrobacterium*, el medio se completó con 0.4 g/l  $MgSO_4$ . El pH se ajustó a 7 en el medio LB, antes de proceder a su esterilización en autoclave ( $10^5$  Pa a 120°C, 20 min). La acetosiringona (AS), la fosfotricina (PPT), la kanamicina, la rifampicina, el ácido nalidixico, la gentamicina y la tetraciclina se filtraron previamente (filtro milipore de 22  $\mu m$  de diámetro) y se añadieron al medio ya estéril.

#### IV.2.2.5. Ensayos de expresión transitoria

Las bacterias fueron crecidas durante 16 horas a 28°C en un agitador orbital horizontal (200 rpm) en medio LB líquido conteniendo los antibióticos adecuados (Tabla IV.2) hasta alcanzar la densidad óptica (DO) deseada.

**Tabla IV.2.** Esquema de las cepas de *Agrobacterium* y construcciones utilizadas, con sus antibióticos de selección.

Cepas	Antibióticos (µg/ml)
AGL1	rifampicina (50)
C58	rifampicina (50) y ampicilina (50)
EHA105	ácido nalidíxico (30)
GV3101	gentamicina (25) y tetraciclina (25)
LBA4404	estreptomycin (25)
Construcciones	
pTAB16	tetraciclina (25)
pBIN35SGUSINT	kanamicina (50)
pBINUBIGUSINT	kanamicina (50)
pABC	kanamicina(50)

La suspensión bacteriana se centrifugó (3000 rpm, 20 min) y el precipitado se resuspendió en MS líquido a pH5, hasta alcanzar la DO deseada, y se añadió 100 µM de acetosiringona (AS). Para la infección, volúmenes iguales de suspensión bacteriana ( $DO_{600nm} = 0.3 - 0.8$ ) y de tejido (6 g de tejido/50 ml mLV) se mezclaron en un matraz kitasato de 25 ml y se aplicó 1 min de infiltración de vacío. Después de 10 minutos adicionales, la mezcla se recuperó en papel de filtro Whatman no. 2 de 55 mm de diámetro y se colocó sobre papel absorbente para drenar el exceso de líquido. El papel de filtro se colocó sobre medio mLV semi-sólido sin hidrolizado de caseína, en placas de 60 x 15 y 15 ml de volumen, por un período de cocultivo 3 días a  $25 \pm 2^{\circ}C$  en oscuridad. Pasado este período de tiempo, se realizó el análisis histoquímico del gen *gusA* para determinar la expresión transitoria.

#### IV.2.2.6. Análisis histoquímico del gen *gusA*

El papel con callo infectado se depositó dentro de placas de 60 mm Ø vacías, y se le añadió 2 ml de la solución X-gluc, descrita por Jefferson y col., (1987) (Tampón fosfato 100 mM, pH 7.0, EDTA 10 mM, Triton X-100, 0.1%,

ferricianuro potásico 0.5 mM, ferrocianuro potásico 0.5 mM, y 2 mM de ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucurónido).

Las placas se incubaron a 37°C durante la noche para ver la expresión histoquímica en forma de puntos azules.

#### **IV.2.2.7. Expresión transitoria en *Pinus pinaster***

Con el objetivo de optimizar el protocolo de infección, se abordaron una serie de experimentos que consisten en modificaciones del protocolo arriba explicado.

##### **IV.2.2.7.1. Efecto del período de infección**

Se ensayó el efecto de diferentes tiempos de infección (10, 30 y 60 minutos) con la cepa AGL1 en la línea V2-2d sobre la expresión transitoria del gen *gusA*. Se utilizó una  $DO_{600nm}$  de 0.8 y se mezclaron volúmenes iguales de tejido (6 g de tejido/50 ml mLV) y de suspensión bacteriana.

##### **IV.2.2.7.2. Efecto de la concentración bacteriana**

En un segundo ensayo se utilizaron las líneas V12-2a y V23-5f y se estudió el efecto de la concentración de la cepa AGL1 ( $DO$  0.3, 0.5 y 0.7) sobre la expresión transitoria, utilizando el mismo volumen y la misma concentración de células vegetales que en el anterior ensayo.

##### **IV.2.2.7.3. Efecto del método de infección**

En un tercer ensayo, se estudió la eficacia de diferentes métodos de infección utilizando una  $DO_{600nm}$  de 0.8 y 6 g de tejido por cada 50 ml de mLV. Para ello, se comparó el tratamiento estándar (aplicación previa de 1 minuto de vacío) con la aplicación de 1 minuto de sonicación durante la fase de infección de las líneas V12-2a y V23-5f.

#### **IV.2.2.7.4. Efecto de diferentes construcciones**

Se infectó la línea V23-1a con diferentes construcciones de *A. tumefaciens*, utilizando las cepas AGL1, C58, EHA105 y GV3101, y los plásmidos pABC, pBIN35SGUSINT o pBINUBIGUSINT, a una DO de 0.8 y aplicando 1 minuto de vacío previo a la infección. También se utilizó el plásmido pTAB16 con las cepas AGL1 y C58.

En todos los experimentos, después de 3 días de cocultivo se ensayó la actividad *gusA* y se anotó el número de “locus” azules en cada placa. Se realizaron al menos 3 repeticiones (placas) por experimento.

#### **IV.2.2.8. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos**

Por último, se determinó la concentración de agentes selectivos que inhiben el crecimiento de tejido no transformado, para una posterior selección de líneas transformadas. Así, 0.5 g de la línea V12-4a se diluyeron en 5 ml de medio Litvay líquido. Se agitó suavemente la mezcla y se filtró sobre papel Whatman (en este ensayo se utilizó papel de 70 mm de diámetro), depositado dentro de un embudo Buchner. Se dejó drenar el contenido, y se aplicó al final un suave pulso de vacío. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento y se cultivaron en medio mLV (en placas de 90 x 15 cm y 25 ml de volumen) suplementado con 2, 4 y 6 mg/l fosfotricina (PPT) o de 5, 10 y 20 mg/l de kanamicina, y se guardaron en oscuridad a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2 semanas. Para no paliar el efecto tóxico del PPT, no se añadió en su medio glutamina ni hidrolizado de caseína. Pasado este tiempo, las tasas de crecimiento se determinaron midiendo el incremento de peso fresco.

#### **IV.2.2.9. Expresión transitoria en *Pinus pinea***

Mientras no se diga lo contrario, se continuó con el mismo protocolo de transformación estándar de *Pinus pinaster*, con la aplicación de 1 minuto de vacío previo al cocultivo, y se realizaron 3 repeticiones en cada tratamiento. Se utilizaron las líneas 1F11 y 7F11, y se ensayaron los siguientes factores.

#### **IV.2.2.9.1. Efecto de diferentes construcciones y de la cantidad de células vegetales a infectar**

Se ensayó el efecto de dos construcciones (AGL1-pTAB16 y GV3101-pBIN35SGUSINT) y de dos concentraciones de tejido vegetal (6 y 12 g de tejido por cada 50 ml de medio líquido mLV) sobre la expresión transitoria en la línea embriogénica 1F11, utilizándose una  $DO_{600nm}$  de 0.8.

En base a los resultados obtenidos todos los ensayos que se detallan a continuación se utilizaron 12 g de tejido/50 ml de mLV, y la cepa AGL1 con el plásmido pTAB16.

#### **IV.2.2.9.2. Efecto del período de infección**

Se ensayó el efecto del período de infección, a una  $DO_{600nm}$  de 0.8, realizándose 2 tratamientos con 5 y 10 minutos de infección después del minuto de vacío. El período de 5 minutos de infección fue seleccionado para los siguientes experimentos.

#### **IV.2.2.9.3. Efecto de la dilución bacteriana**

Se ensayó el efecto de 2 concentraciones diferentes de AGL1-pTAB16, con unas  $DO_{600nm}$  de 0.3 y 0.8. La densidad óptica de 0.8 fue seleccionada para los posteriores ensayos.

#### **IV.2.2.9.4. Efecto de la concentración de acetosiringona**

Se ensayó el efecto de las concentraciones 0, 100 y 200  $\mu M$  de AS añadidas a la dilución bacteriana de la construcción AGL1-pTAB16 antes de la infección. La concentración 200  $\mu M$  de AS fue utilizada en los siguientes ensayos.

#### **IV.2.2.9.5. Efecto de diferentes plásmidos en la cepa AGL1**

Se probó el efecto sobre la expresión transitoria de los plásmidos pABC, pBIN35SGUSINT, pBINUBIGUSINT y pTAB 16 integrados en la cepa AGL1.

#### **IV.2.2.9.6. Efecto de diferentes cepas bacterianas**

Usando como vector el plásmido pBIN35SGUSINT, se realizó un ensayo con las cepas AGL1, C58, EHA105 y GV3101 de *Agrobacterium*.

En todos los ensayos se midió la expresión transitoria del gen *gusA* en forma de puntos azules.

#### **IV.2.2.10. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos**

Siguiendo el mismo protocolo que en *Pinus pinaster*, se determinó la concentración de agentes selectivos que inhiben el crecimiento de tejido no transformado. Las líneas 1F11 y 7F11 se cultivaron en medio semisólido Litvay suplementado con 0, 2, 4 y 6 mg/l fosfotricina (PPT) o de 0, 5, 10, 20 y 30 mg/l de kanamicina. De nuevo, para no paliar el efecto tóxico del PPT, no se añadió en su medio glutamina ni hidrolizado de caseína. Las tasas de crecimiento se determinaron midiendo el incremento de peso fresco después de dos semanas en cultivo.

### **IV.2.3. Análisis estadístico**

Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron determinadas mediante análisis de varianza (ANOVA) usando diseños completamente aleatorios. Los datos de los porcentajes fueron transformados a su arcoseno antes del análisis estadístico. Cuando era apropiado, se analizaron las medias de variación entre tratamientos usando el test de Tukey HSD (Diferencias Honestamente Significantes) (Tukey, 1953). Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS Statistics 20.0.0.

### **IV. 3. Resultados y discusión**

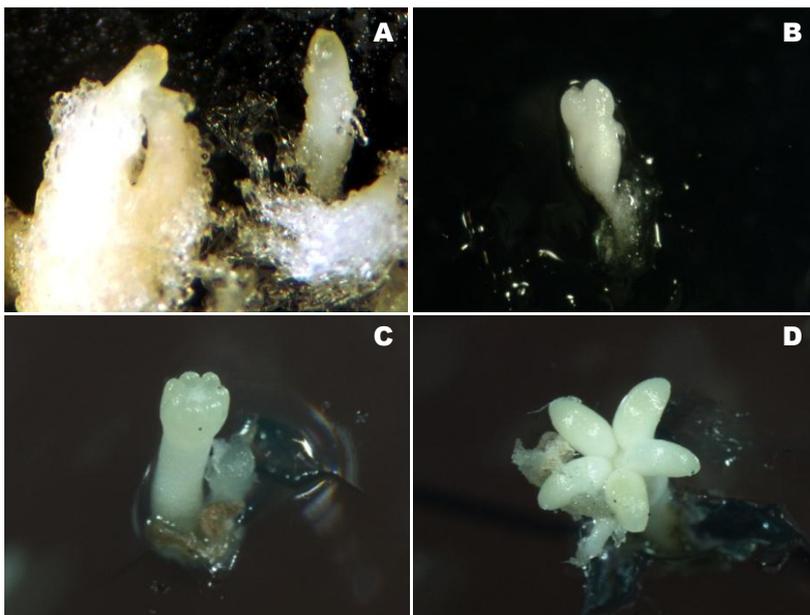
#### **IV.3.4. Ensayos de maduración de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster***

En los ensayos de maduración, se establecieron 4 estadios de desarrollo para los embriones somáticos obtenidos (Figuras IV.4 A-D). El primer y segundo estadio se refieren a embriones de menos de 1 mm, con suspensores elongados (Figura IV.4A), diferenciándose ambos por el tamaño y coloración (los embriones del primer estadio son más transparentes y pequeños que los del segundo). Cuando se transfieren a medio de germinación, estos embriones reierten a callo. El tercer estadio agrupa a los embriones que presentan cotiledones fusionados (Figura IV.4B), mientras que el cuarto estadio agrupa a los embriones maduros con cotiledones desarrollados (Figuras IV.4C y D). Puesto que únicamente los embriones que alcanzan los estadios 3-4 son capaces de germinar, los datos de estos experimentos se han analizado en dos bloques, uno que incluye los estadios 1-2 y otro que incluye los estadios 3-4. Para cada bloque, los datos se expresan en número de embriones somáticos por gramo de peso fresco (ES/gPF).

Las líneas C4-4a, C5-5a, V1-2a, V2-2b y V5-1b no produjeron embriones en ninguno de los experimentos, por lo que han sido excluidas de los análisis estadísticos.

##### **IV.3.4.1. Maduración en medio líquido**

En este experimento se estudió el efecto del cultivo en medio líquido de maduración, suplementado con 80  $\mu$ M de ABA durante 1, 2 y 3 semanas. Como control, se utilizó el cultivo en medio sólido (protocolo convencional). Los resultados obtenidos se exponen en la Tabla IV.3.



**Figura IV.4.** Estadios de desarrollo de embriones de *P. pinaster*. A) Estadio 2, embrión precotiledonar. B) Estadio 3, embrión con cotiledones fusionados; C y D) Estadio 4, embriones cotiledonares.

En general, el medio líquido afectó negativamente a la maduración y sólo se obtuvieron embriones diferenciados cuando los cultivos embriogénicos se agitaron durante 3 semanas en medio líquido sin ABA y se transfirieron a medio con 80  $\mu\text{M}$  de ABA durante 2 semanas (97.2 y 27.8 ES/gPF en estadios 1-2 y 3-4, respectivamente). En contraste, en el tratamiento convencional (medio sólido), se obtuvieron 269.4 y 47.2 ES/gPF en los estadios 1-2 y 3-4, respectivamente (Tabla IV.3). Es importante señalar que el escaso número de embriones maduros obtenidos en estos experimentos pudo ser debido al excesivo crecimiento del callo, lo que podría crear un estrés en las células que afectara a la maduración. Confirmando esta suposición, en el único tratamiento donde se diferenciaron embriones (3 semanas con ABA y 2 sin ABA) no se apreció crecimiento de callo.

**Tabla IV.3.** Efecto del medio líquido de maduración, con diferentes períodos de aplicación de 80  $\mu$ M de ABA (1, 2 y 3 semanas), sobre la maduración (ES/gPF) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones por tratamiento

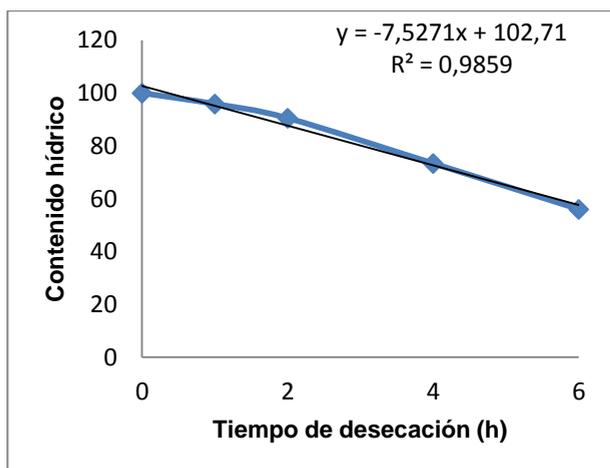
Semanas en medio líquido		ES/gPF	
Sin ABA	80 $\mu$ M ABA	1-2 <sup>x</sup>	3-4 <sup>z</sup>
1	1	0.0b	0.0b
	2	0.0b	0.0b
	3	0.0b	0.0b
2	1	0.0b	0.0b
	2	0.0b	0.0b
	3	0.0b	0.0b
3	1	0.0b	0.0b
	2	97.2ab	27.8ab
	3	0.0b	0.0b
Tratamiento convencional (medio sólido)		269.4a	47.2a
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Tratamiento	9	22869.3**	813.0**
Error	20	2949.1	233.8

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . <sup>x, z</sup>: Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

#### IV.3.4.2. Efecto de la desecación y el periodo de cultivo con ABA

Se ensayó el efecto de la desecación durante 6 horas, previa al cultivo en medio mLVM, con 80  $\mu$ M de ABA durante 30 o 90 días. La elección del periodo de 6 horas de desecación se basó en experimentos previos (Humánez, 2009), donde se observó que este período mejoraba la maduración de algunas líneas embriogénicas. En este ensayo, se midió la variación del contenido hídrico de la línea V4-7a durante las 6 horas de desecación, observándose una reducción lineal del contenido hídrico, llegando hasta una disminución del 43.8% (Figura IV.5).

Los resultados globales para cada tratamiento se exponen en la Figura IV.6. Los datos pormenorizados por estadíos y sus correspondientes análisis se exponen en la Tabla IV.4.



**Figura IV.5.** Variación del contenido hídrico de callo embriogénico de *Pinus pinaster* de la línea V4-7a sometido a 6 horas de desecación. Los resultados son valores medios de 4 repeticiones.

En este experimento, se obtuvieron pocos embriones maduros; de hecho, después de los 3 meses en los medios de maduración, se obtuvo un promedio 5.7 ES/gPF en los estadíos 1-2 y 12.3 en los estadíos 3- 4. El número de embriones en estadío 1-2 dependió significativamente de la línea y de la desecación. El ANOVA de estos datos mostró además una interacción significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre ambos factores (Tabla IV.4). Independientemente de los demás factores, la desecación perjudicó la maduración, obteniéndose una media de 2.4 ES/gPF con desecación frente a 9.3 ES/gPF sin desecación.

El período de cultivo en presencia de ABA afectó significativamente la maduración (12.2 vs. 8.3 ES/gPF a los 30 y 90 días de aplicación de ABA, respectivamente). La línea V2-2d fue prácticamente la única que produjo embriones en los primeros estadíos de desarrollo (43.7 ES/gPF), mientras que las otras, o no produjeron embriones, o los produjeron por debajo de 3.5 ES/gPF. En esta línea, la desecación disminuyó significativamente la maduración para el estadío 1-2 (72.2 vs. 15.8 ES/gPF).

El número de embriones en los estadíos 3-4 dependió de la línea, observándose además interacciones significativas entre éstas y la desecación o el período de aplicación de ABA, así como entre los tres factores ensayados (Tabla IV.4). En este experimento, la línea V4-7a sin desecación y 90 días de ABA produjo el mayor número de embriones maduros (en estadíos 3-4): 158.3 ES/gPF (Figura IV.6; Tabla IV.4).

Estos resultados sugieren que la aplicación de ABA durante un mes no es suficiente para promover la diferenciación del callo embriogénico hasta la formación de embriones cotiledonares. La presencia del ABA en el medio es fundamental para el desarrollo normal de los embriones somáticos (Montalbán y col., 2010; Lu y col., 2011) y su concentración óptima varía en función de las especies y genotipos (Stasolla y Yeung, 2003). Aunque el período óptimo de cultivo en presencia de ABA es un mes, este varía ampliamente (Stasolla y col., 2002), pudiéndose aumentar el número de embriones maduros con tratamientos más prolongados (von Arnold y col., 2002); no obstante, una exposición prolongada a dicha hormona es perjudicial para el posterior desarrollo de la planta (Bozhkov y von Arnold, 1998). En toda la bibliografía referente a maduración de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster* (Miguel y col., 2004; Klimaszewska y col., 2007; Humánez y col., 2012), el ABA se aplica durante 3 ó 4 meses. En estudios recientes se ha aumentado sustancialmente la tasa de maduración utilizando medios con elevadas concentraciones de sacarosa y de ABA (Kumar y Thomas, 2012; Rode y col., 2012).

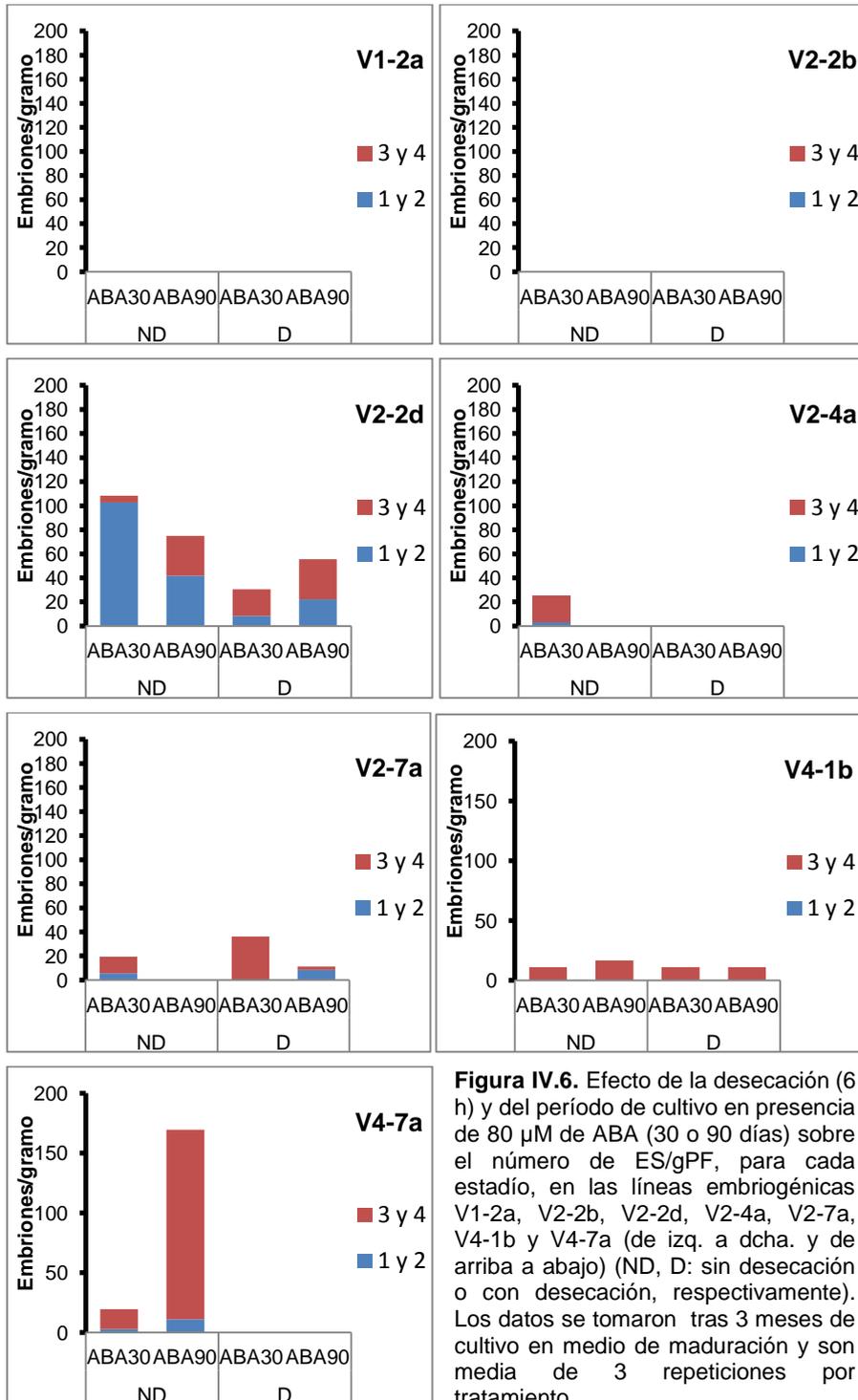
La desecación afectó negativamente la obtención de embriones en todos los estadios de desarrollo, aunque el efecto sólo fue significativo en los embriones en estadios 1-2. Puede que esto se deba a que la desecación es un proceso crítico, que causa daños en las células. El efecto de la desecación sobre la maduración no es un proceso simple, ya que es afectado por varios factores, como la acumulación de sustancias de reserva y de hormonas endógenas, o la tolerancia intrínseca de los embriones somáticos a la desecación (Bonga y col., 2010; Kharenko y col., 2011; Lu y col., 2011; Abrahamson y col., 2011). En *P. thunbergii*, *P. densiflora* y *P. armandii* (Maruyama y Hosoi, 2012), se ha visto que una desecación rápida, como la utilizada en este ensayo, provocaba daños o incluso la muerte de los embriones somáticos; por el contrario, la aplicación de una desecación lenta (manteniendo precintados pocillos con el tejido vegetal junto a pocillos con agua destilada), eliminó estos problemas y favoreció la tasa de maduración.

#### IV. Resultados y discusión: maduración en *Pinus pinaster*

**Tabla IV.4.** Efecto del período con ABA (80  $\mu$ M) y de la desecación (6 h) sobre la maduración (ES/gPF, para cada estadio) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones.

Línea	Días de ABA	Estadios			
		1-2		3-4 <sup>z</sup>	
		No desecación	Desecación	No desecación	Desecación
V1-2a	30	0.0	0.0	0.0	0.0
	90	0.0	0.0	0.0	0.0
V2-2b	30	0.0	0.0	0.0	0.0
	90	0.0	0.0	0.0	0.0
V2-2d	30	102.8	8.3	5.6b	22.2b
	90	41.7	22.2	33.3b	33.3b
	Media <sup>x</sup>	72.2a	15.3ab		
V2-4a	30	2.8	0.0	22.2b	0.0b
	90	0.0	0.0	0.0b	0.0b
	Media <sup>x</sup>	1.4b	0.0b		
V2-7a	30	5.6	0.0	13.9b	36.1b
	90	0.0	8.3	0.0b	2.8b
	Media <sup>x</sup>	2.8b	4.2ab		
V4-1b	30	0.0	0.0	11.1b	11.1b
	90	0.0	0.0	16.7b	11.1b
	Media <sup>x</sup>	0.0b	0.0b		
V4-7a	30	2.8	0.0	16.7b	0.0b
	90	11.1	0.0	158.3a	0.0b
	Media <sup>x</sup>	6.9ab	0.0b		
Análisis de la varianza		Cuadrados medios			
Fuente de variación	g.l.	Estadios 1-2		Estadios 3-4	
Línea (A)	4	4231.5**		2663.8NS	
Desecación (B)	1	2449.1*		3893.5NS	
Días de ABA (C)	1	226.8NS		2041.7NS	
A x B	4	1858.8*		5036.5*	
A x C	4	377.3NS		4052.7*	
B x C	1	1041.7NS		3893.5NS	
A x B x C	4	844.9NS		3011.0**	
Error	40	579.9		1378.5	

NS,\*\*,\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$  o  $P \leq 0.05$ , respectivamente. <sup>x,z</sup>: efecto de la interacción de la línea con la desecación sobre la obtención de embriones en estadios 1-2 y de la triple interacción sobre la obtención de embriones en estadios 3-4, respectivamente. Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. Las líneas que no maduraron en ninguno de los tratamientos fueron excluidas del análisis estadístico.



**Figura IV.6.** Efecto de la desecación (6 h) y del período de cultivo en presencia de 80  $\mu$ M de ABA (30 o 90 días) sobre el número de ES/gPF, para cada estadio, en las líneas embriogénicas V1-2a, V2-2b, V2-2d, V2-4a, V2-7a, V4-1b y V4-7a (de izq. a dcha. y de arriba a abajo) (ND, D: sin desecación o con desecación, respectivamente). Los datos se tomaron tras 3 meses de cultivo en medio de maduración y son media de 3 repeticiones por tratamiento.

El papel de la desecación en la maduración es actuar como señal para el cambio metabólico que marca el paso hacia la germinación, siendo, por tanto, beneficiosa para esta transición (Kermode, 1990). De hecho, la desecación parcial de masas embriogénicas de *Pinus patula* (Malabadi y van Staten, 2005), *Pinus pinea* (Carneros, 2009) y *Pinus kesiya* (Malabadi y col., 2004) favorece significativamente la maduración de los embriones. El contenido hídrico de las masas embriogénicas, después de la desecación, varió con las especies: 47 % en *P. patula*, 52% en *P. kesiya*, y 82.8-92.5 en *P. pinea*.

Otros investigadores han utilizado como agente desecador el silicagel (Fang y col., 2004), el hidróxido cálcico (Bajaj y col., 1987) e incluso el chorro de aire comprimido (Berjak y col., 2000), que deseca rápidamente explantos de alto contenido hídrico minimizando los posibles daños causados por la desecación. Finalmente, otros investigadores han inducido desecación disminuyendo el potencial osmótico del medio de cultivo. Así, en *Pinus kesiya* (Choudhury y col., 2008), en *P. radiata* (Montalbán y col., 2010, 2012), y en *P. rigida* y *P. taeda* (Shin y Kim, 2012), se ha obtenido las mayores tasas de maduración utilizando medios con elevadas concentraciones de azúcar y de agar. También se ha usado el PEG como agente osmótico en *P. thunbergii*, *P. densiflora* y *P. armandii* (Maruyama y Hosoi, 2012), y en *P. pinaster* (Ramarosandratana y col., 2001).

#### **IV.3.4.3. Efecto del período de cultivo con ABA y de la presencia de CA**

En este experimento se analizó el efecto de la duración de la aplicación de 80  $\mu\text{M}$  de ABA (1 o 3 meses) y de la presencia de CA (4 g/l) en el medio sobre la maduración de líneas embriogénicas de varias procedencias.

Los resultados globales de este ensayo de maduración, incluyendo los embriones formados en todos los estadíos, se presentan en la Figura IV.7. Los análisis estadísticos y los datos correspondientes a los estadíos 1-2 y 3-4, se presentan en las Tablas IV.5, IV.6 y IV.7.

Inicialmente, se analizó la influencia del ABA, CA, y la interacción entre ambos factores sobre la maduración. Posteriormente se analizó el efecto de la

procedencia geográfica del árbol madre (que genera la línea embriogénica) y del medio en que se indujeron y mantuvieron las líneas embriogénicas (mLV o mLV + EBR), sobre este proceso. En el análisis estadístico inicial se observó que todos los factores estudiados (línea, presencia de carbón activo y período con ABA), así como todas sus interacciones ejercieron una influencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) sobre los embriones en estadíos 1-2 de desarrollo. La línea AN1-1a produjo el mayor número de ES/gPF (211.8) y la presencia de CA fue favorable para la maduración (54.1 ES/gPF con CA frente 7.8 sin CA), así como el período de aplicación de un mes de ABA (39.7 ES/gPF frente 22.2 en 3 meses de cultivo en ABA). Los mejores resultados se obtuvieron cuando la línea AN1-1a se cultivó en medio mLVM con CA y aplicación de ABA durante 30 días, con transferencia final al mismo medio sin ABA (436.1 ES/gPF, Tabla IV.5).

**Tabla IV.5.** Efecto de la línea, de la presencia o ausencia del CA (4 g/l) y del período de cultivo en 80  $\mu$ M de ABA (30 o 90 días) sobre la maduración (ES/gPF en estadíos 1-2) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones.

Línea	Carbón activo en medio de maduración			
	No		Si	
	30 días ABA	90 días ABA	30 días ABA	90 días ABA
AN1-1a	33.3e	55.6de	436.1a	322.2b
AN1-1b	5.6e	2.8e	33.3e	16.7e
AN1-2a	11.1e	5.6e	33.3e	19.4e
AN5-10c	2.8e	0.0e	19.4e	2.8e
C4-4a	0.0	0.0	0.0	0.0
C4-5a	19.4e	0.0e	25.0e	27.8e
S1-6b	36.1e	5.6e	197.2c	77.8de
S3-3a	19.4e	16.7e	5.6e	2.8e
V5-1b	0.0	0.0	0.0	0.0
V5-2a	0.0e	0.0e	150.0cd	33.3e
V5-3a	0.0e	0.0e	19.4e	8.3e
V5-10a	0.0e	0.0e	8.3e	8.3e
V14-1a	0.0e	0.0e	41.7de	13.9e

Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. Las líneas que no maduraron fueron excluidas del análisis estadístico.

El número de embriones en estadios de desarrollo 3-4 dependió ( $p \leq 0.05$ ) de la línea embriogénica y presencia de CA. Independientemente de los demás factores, la línea S1-6b fue la que más embriones maduros produjo (media de los tratamientos de 92.4 ES/gPF). El ANOVA mostró además interacciones significativas entre la línea y la presencia de CA o el período de cultivo con ABA. Así, la presencia de CA únicamente favoreció la maduración en la línea S1-6b (173.6 vs 11.1 ES/gPF en presencia o ausencia de CA respectivamente). En esta línea, el número de embriones maduros tras el tratamiento con ABA durante 1 mes fue significativamente mayor que el obtenido en las demás líneas. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre la maduración de todas las líneas después de tres meses de aplicación de ABA (Tablas IV.6 y IV.7). Los mejores resultados se obtuvieron cuando la línea S1-6b se cultivó en presencia de CA en el medio mLVM durante 1 mes y posteriormente se transfirió al mismo medio sin ABA hasta finalizar el periodo (241.7 ES/gPF). Estos resultados, sin embargo, no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) a los obtenidos cuando los callos se mantuvieron en presencia de ABA durante todo el período de maduración (105.6 ES/gPF) (Tablas IV.6 y IV.7; Figura IV.7).

En el estudio del efecto de la procedencia del árbol madre sobre la maduración, se analizó, para cada procedencia, tanto el porcentaje de líneas que respondieron como la frecuencia de la respuesta, medida como porcentaje de placas con embriones. La procedencia no afectó a la maduración, y se obtuvo maduración en líneas embriogénicas de todas las procedencias ( $p > 0.05$ ). Cabe destacar que se obtuvieron embriones en todas las líneas procedentes de Anllo y Valsain (Tabla IV.8), mientras que únicamente el 50.0% de las líneas procedentes de Calderona y el 66.7% de las de Sinarcas produjeron embriones en al menos uno de los estadios estudiados (diferencias no significativas). La frecuencia de la respuesta dependió de la procedencia y fue mayor en las líneas de origen Anllo (70.83%) comparadas con las de origen Valsain (37.50%, Tabla IV.8).

**Tabla IV.6.** Efecto de la línea, de la presencia o ausencia del CA (4 g/l) y del período de cultivo en 80  $\mu$ M de ABA (30 o 90 días) sobre la maduración (ES/gPF en estadíos 3-4) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones.

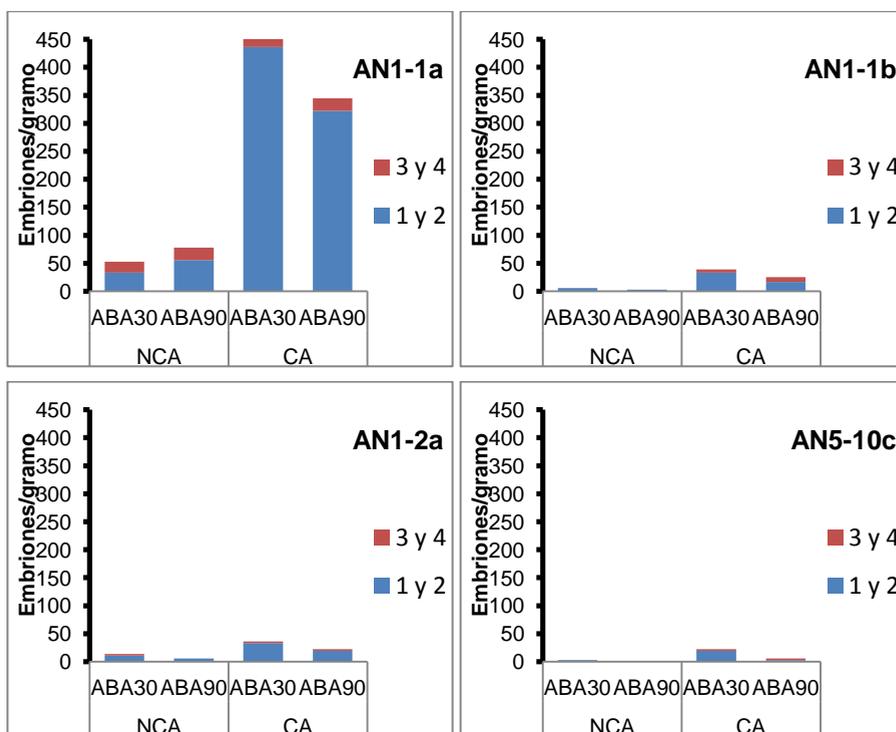
Línea	Carbón activo	Período en ABA		Media <sup>z</sup>
		30 días ABA	90 días ABA	
AN1-1a	No	19.4	22.2	20.8b
	Si	33.3	22.2	27.8b
	Media <sup>y</sup>	26.4b	22.2b	
AN1-1b	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	5.6	8.3	6.9b
	Media <sup>y</sup>	2.8b	4.2b	
AN1-2a	No	2.8	0.0	1.4b
	Si	2.8	2.8	2.8b
	Media <sup>y</sup>	2.8b	1.4b	
AN5-10c	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	2.8	2.8	2.8b
	Media <sup>y</sup>	1.4b	1.4b	
C4-4a	No	0.0	0.0	0.0
	Si	0.0	0.0	0.0
	Media <sup>y</sup>			
C4-5a	No	13.9	0.0	6.9b
	Si	0.0	25.0	12.5b
	Media <sup>y</sup>	6.9b	12.5b	
S1-6b	No	16.7	5.6	11.1b
	Si	241.7	105.6	173.6a
	Media <sup>y</sup>	129.2a	55.6ab	
S3-3a	No	8.3	30.6	19.4b
	Si	0.0	0.0	0.0b
	Media <sup>y</sup>	4.2b	15.3b	
V5-1b	No	0.0	0.0	0.0
	Si	0.0	0.0	0.0
	Media <sup>y</sup>			
V5-2a	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	41.7	2.8	22.2b
	Media <sup>y</sup>	20.8b	1.4b	
V5-3a	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	8.3	0.0	4.2b
	Media <sup>y</sup>	4.2b	0.0b	
V5-10a	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	2.8	0.0	1.4b
	Media <sup>y</sup>	1.4b	0.0b	
V14-1a	No	0.0	0.0	0.0b
	Si	25.0	13.9	19.4b
	Media <sup>y</sup>	12.5b	6.9b	

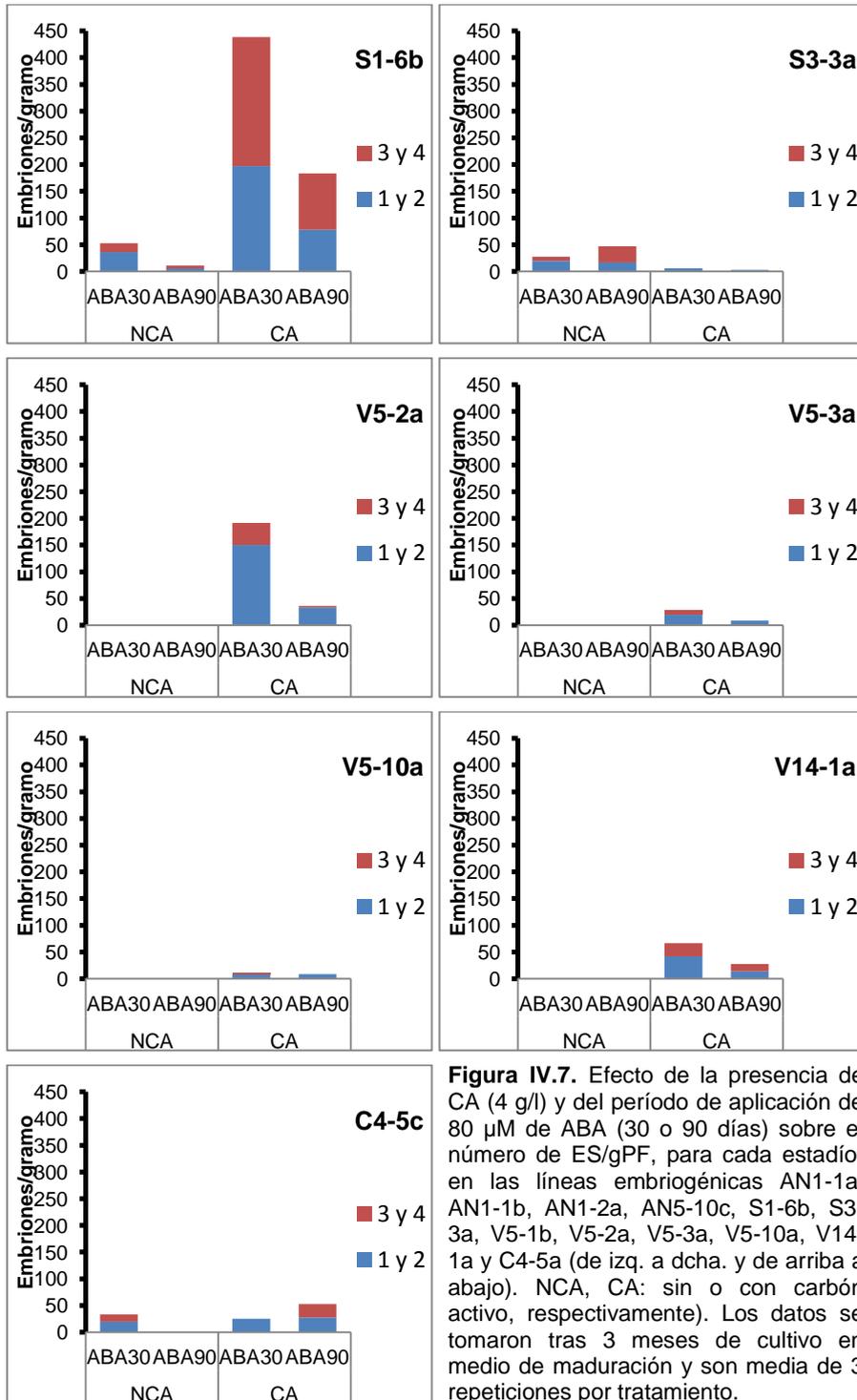
Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. <sup>z,y</sup>: efecto de la presencia de carbón activo y del período con ABA sobre la maduración. Las líneas que no maduraron fueron excluidas del ANOVA.

**Tabla IV.7.** Análisis de la varianza de las Tablas IV.5 y IV.6.

Análisis de la varianza		Cuadrados medios	
Fuente de variación	g.l.	1-2	3-4
Línea (A)	10	45296.1**	8431.5**
Carbón activo (B)	1	113266.0**	12476.8**
Periodo con ABA (C)	1	15564.0**	2291.7NS
A x B	10	29597.0**	7096.1**
A x C	10	1957.5**	1577.5*
B x C	1	10608.2**	2154.9NS
A x B x C	10	2080.4**	1250.9NS
Error	88	601.8	777.0

NS,\*,\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$  o  $P \leq 0.05$ , respectivamente. Las líneas que no maduraron fueron excluidas del análisis estadístico.





**Figura IV.7.** Efecto de la presencia de CA (4 g/l) y del período de aplicación de 80  $\mu$ M de ABA (30 o 90 días) sobre el número de ES/gPF, para cada estadio, en las líneas embriogénicas AN1-1a, AN1-1b, AN1-2a, AN5-10c, S1-6b, S3-3a, V5-1b, V5-2a, V5-3a, V5-10a, V14-1a y C4-5a (de izq. a dcha. y de arriba a abajo). NCA, CA: sin o con carbón activo, respectivamente). Los datos se tomaron tras 3 meses de cultivo en medio de maduración y son media de 3 repeticiones por tratamiento.

**Tabla IV.8.** Efecto de la procedencia del explanto sobre su posterior maduración. Los datos son media de 36 repeticiones, y fueron tomados después de 3 meses.

Procedencia	No. de líneas	Líneas con embriones (%)	Placas con embriones (%)
Anllo	4	100.0	70.8a
Calderona	2	50.0	52.8ab
Sinarcas	2	66.7	43.7ab
Valsain	5	100.0	37.5b

Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Procedencia	3	1752.1NS	8377.8*
Error	9	1296.3	2389.9

NS, \*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.05$ , respectivamente. Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

También se analizó el efecto del medio de inducción y proliferación de callos embriogénicos sobre la maduración. Sin embargo, no se observaron efectos significativos ( $p > 0.05$ ) de dicho medio sobre el porcentaje de líneas que maduraron. No obstante, se destaca que todas las líneas cultivadas en medio mLV maduraron, mientras que, de las cultivadas en mLV + EBR, maduraron un 71.4% ( $p > 0.05$ ). En cuanto a la frecuencia de maduración, la inducción en medio mLV favoreció el posterior proceso de maduración, obteniéndose un 66.7% de placas con embriones ( $p \leq 0.05$ ; Tabla IV.9).

De los datos expuestos en esta tabla, se puede concluir que, en general, se han obtenido mayores valores de ES/gPF en la presencia de CA, aunque efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) sólo para la obtención de estadíos 3-4 de la línea S1-6. El período de cultivo en ABA solo ha afectado significativamente a la línea AN1-1a, en cuanto a la obtención de embriones en estadíos 1-2 de desarrollo.

**Tabla IV.9.** Efecto del medio de inducción y proliferación de las líneas embriogénicas de *Pinus pinaster* sobre su posterior maduración. Los datos son media de 72 repeticiones, y fueron tomados después de 3 meses.

Medio de inducción	Líneas con embriones (%)	Placas con embriones (%)
mLV	100.0	66.7a
mLV + EBR	71.4	41.7b

Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Medio de inducción	1	2637.4NS	24230.8**
Error	154	1298.7	2364.7

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ . Para cada variable, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

En pino marítimo, la presencia de CA es muy importante para la maduración, debido probablemente a su propiedad higroscópica, que disminuye la disponibilidad de agua, siendo un factor crítico en la maduración de embriones somáticos (Klimaszwska y col., 2000). Además, el CA tiene la capacidad de absorber el ABA del medio, lo que favorece la maduración, ya que bajas concentraciones de esta hormona son más efectivas para la maduración de embriones somáticos (Lelu y col, 2006).

El CA también absorbe auxinas, citoquininas y compuestos fenólicos, que son inhibidores del desarrollo del embrión somático (von Aderkas y col., 1991; Thomas, 2008; De Diego y col., 2008; Montalbán y col., 2013). En *P. pinaster* (Lelu-walter y col., 2006) y *P. pinea* (Carneros y col., 2009), el revestimiento del tejido embriogénico con CA mejoró, notablemente, las tasas de maduración. No obstante, experimentos recientes con *Pinus radiata* (Montalbán y col., 2010), demuestran que el CA causaba alteraciones en la morfología de los embriones somáticos obtenidos después de la maduración.

#### IV.3.4.4. Efecto del soporte celular utilizado

En este experimento se estudió si la maduración de los embriones somáticos podría ser afectada por el soporte sobre el que se deposita el tejido embriogénico. Se ensayaron cuatro soportes: papel Whatman No. 2, filtro de poliéster, filtro de celulosa y filtro de nylon. Dado que en el anterior experimento se obtuvieron mejores resultados con 30 días de aplicación de ABA, se decidió realizar el ensayo con este período de aplicación. Los resultados globales de este ensayo de maduración, incluyendo los embriones formados en todos los estadíos, se presentan en la Figura IV.8. Los análisis estadísticos y correspondientes datos de los estadíos 1-2 y 3-4, se presentan en las Tablas IV.10 y IV.11.

De nuevo, la capacidad de maduración fue línea-dependiente, obteniéndose la mayoría de los embriones de estadíos de desarrollo 1-2 en la línea V14-1a (41.7 ES/gPF) y de los embriones en estadíos 3-4 en la línea S1-6b (65.3 ES/gPF). El papel Whatman favoreció significativamente la maduración en ambos grupos de desarrollo (28.0 y 26.7 ES/gPF en estadíos 1-2 y 3-4, respectivamente). La interacción de la línea con el soporte también fue significativa, y se obtuvo el mayor número de embriones en estadíos 1-2 (113.9 ES/gPF) en la línea V14-1a sembrada sobre papel Whatman, y el mayor número en estadíos 3-4 (144.4 ES/gPF) en la línea C4-5a sembrada sobre filtro de poliéster. El uso de membranas semipermeables de celulosa SIGMAR® (con capacidad para retener moléculas con un peso molecular superior a 12000 D), favoreció la maduración y germinación de callo embriogénico de olivo y aguacate (Palomo-Ríos, 2009), disminuyendo además la formación de callo durante la fase de germinación, debido a la desecación parcial que ésta provocaba sobre el callo embriogénico. En cítricos (Pensabene-Bevallia, 2005) se estudió el efecto de una membrana semipermeable de acetato sobre la viabilidad y desarrollo del callo embriogénico tras la descongelación, y se vio que limitó la maduración y favoreció la embriogénesis somática de algunos genotipos, probablemente debido al estrés que esta causa en el cultivo.

Es ampliamente conocido que las respuestas morfogénicas son

genotipo dependientes (Carneros, 2009); de hecho, existen evidencias de una fuerte varianza genética aditiva en la iniciación de embriogénesis somática, siendo el control genético menos importante 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 74%, lo que indicó influencia del genotipo en la capacidad de diferenciar embriones maduros. Esta frecuencia es superior a la obtenida en trabajos previos de maduración en *P. pinea* (45%; Carneros, 2009) y *P. pinaster* (29%; Miguel y col., 2004. 58%; Humánez y col., 2012).

**Tabla IV.10.** Efecto de la línea y del soporte sobre la maduración (ES/gPF en estadíos 1-2) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones.

Línea	Soporte			
	Whatman	Nylon	Acetato de celulosa	Poliéster
AN1-1a	0.0	0.0	0.0	0.0
AN1-1b	27.8bcdef	8.3f	8.3f	8.3f
AN1-2a	0.0f	0.0f	0.0f	0.0f
AN1-2c	2.8f	0.0f	0.0f	0.0f
AN5-10c	19.4cdef	0.0f	5.6f	0.0f
C4-4a	0.0	0.0	0.0	0.0
C4-5a	8.3f	16.7def	13.9ef	47.2bc
C5-5a	0.0	0.0	0.0	0.0
S1-6b	52.8b	44.4bcd	13.9ef	13.9ef
S3-3a	8.3f	2.8f	2.8f	5.6f
V5-1b	0.0	0.0	0.0	0.0
V5-2a	5.6f	0.0f	0.0f	0.0f
V5-3a	13.9ef	0.0f	2.8f	2.8f
V5-10a	55.6b	11.1ef	8.3f	11.1ef
V14-1a	113.9a	38.9bcde	2.8f	11.1ef

Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Línea (A)	10	2318.4**
Soporte (B)	3	3337.5**
A x B	30	873.8**
Error	88	96.3

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. Las líneas que no maduraron fueron excluidas del análisis estadístico.

#### IV. Resultados y discusión: maduración en *Pinus pinaster*

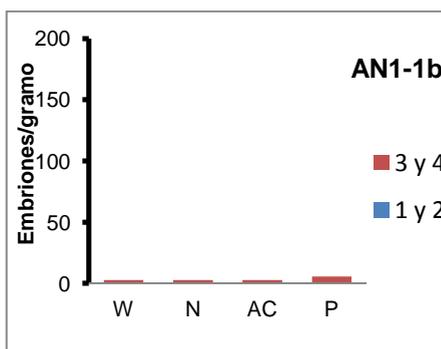
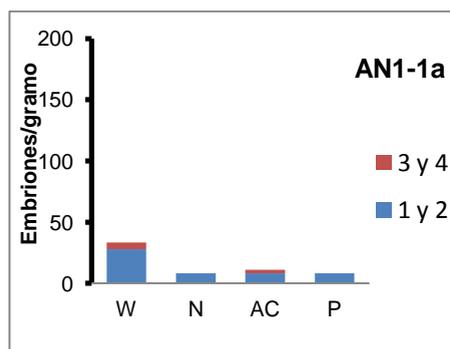
**Tabla IV.11.** Efecto de la línea y del soporte sobre la maduración (ES/gPF en estadíos 3-4) de líneas embriogénicas de *Pinus pinaster*. Los datos fueron tomados después de 3 meses en medio de maduración y son media de 3 repeticiones.

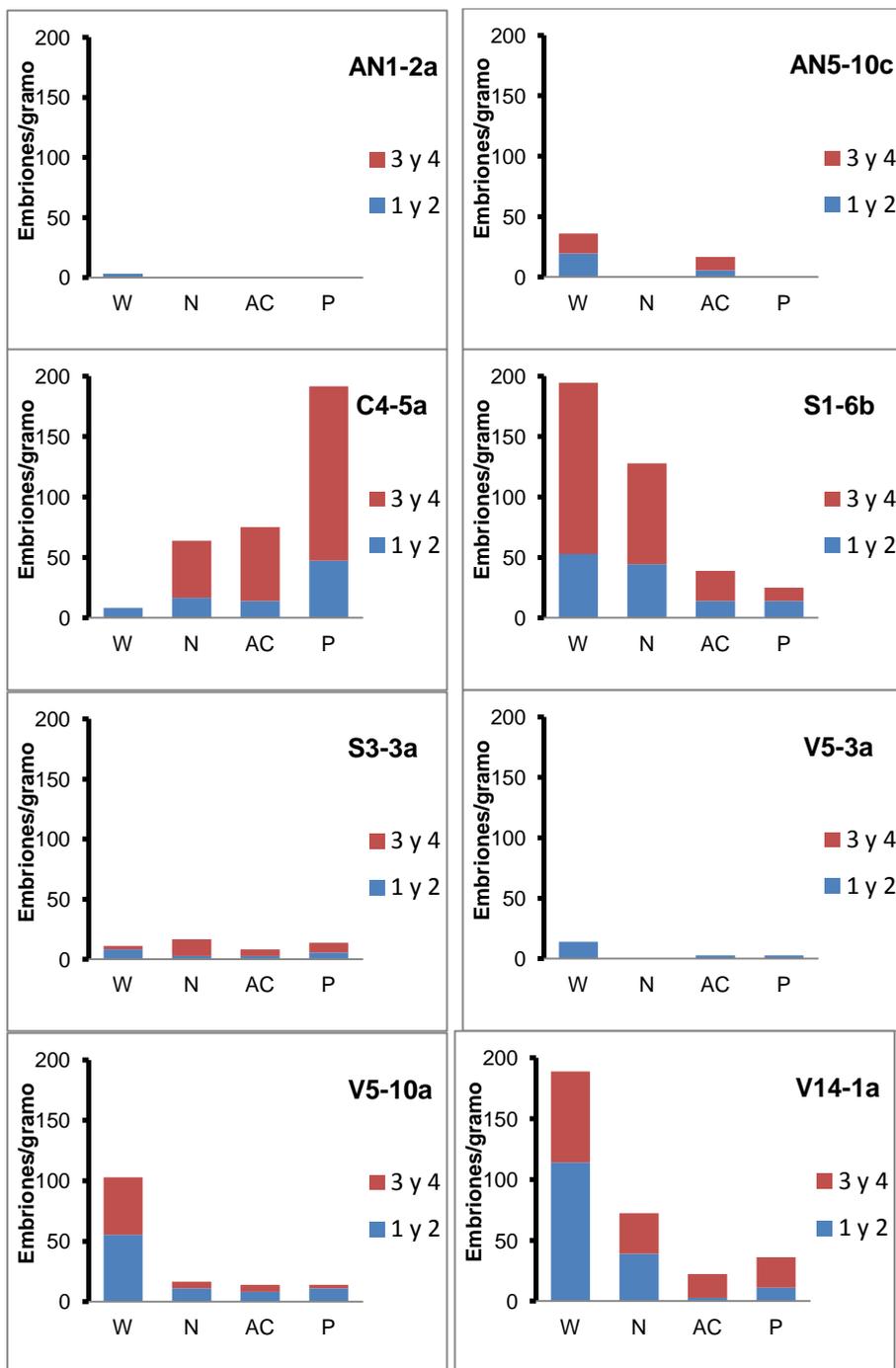
Línea	Soporte			
	Whatman	Nylon	Acetato de celulosa	Poliéster
AN1-1a	0.0	0.0	0.0	0.0
AN1-1b	5.6ef	0.0f	2.8ef	0.0f
AN1-2a	2.8ef	2.8ef	2.8ef	5.6ef
AN1-2c	0.0f	0.0f	0.0f	0.0f
AN5-10c	16.7def	0.0f	11.1ef	0.0f
C4-4a	0.0	0.0	0.0	0.0
C4-5a	0.0f	47.2bcde	61.1bcd	144.4a
C5-5a	0.0	0.0	0.0	0.0
S1-6b	141.7a	83.3b	25.0def	11.1ef
S3-3a	2.8ef	13.9ef	5.6ef	8.3ef
V5-1b	0.0	0.0	0.0	0.0
V5-2a	2.8ef	0.0f	0.0f	0.0f
V5-3a	0.0f	0.0f	0.0f	0.0f
V5-10a	47.2bcde	5.6ef	5.6ef	2.8ef
V14-1a	75.0bc	33.3cdef	19.4def	25.0def

#### Análisis de la varianza

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Línea (A)	10	7598.8**
Soporte (B)	3	1230.4**
A x B	30	2392.0**
Error	88	240.9

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. Las líneas que no maduraron fueron excluidas del análisis estadístico.





**Figura IV.8.** Efecto del soporte utilizado (W: papel Whatman; Nylon: filtro de nylon; AC: filtro de acetato de celulosa; P: filtro de poliéster) sobre el número de ES/gPF, para cada estadio, en las líneas embriogénicas AN1-1a, AN1-1b, AN1-2a, AN1-2c, AN5-10c, C4-4a, C4-5a, C5-5a, S1-6b, S3-3a, V5-1b, V5-2a, V5-3a, V5-10a y V14-1a (de izq. a dcha. y de arriba a abajo). Los datos se tomaron tras 3 meses de cultivo en medio de maduración y son media de 3 repeticiones por tratamiento.

Si se compara la tasa de ES/gPF, en estadios 3-4, en la mejor condición (241.7 ES/gPF, en la línea S1-6b, con 30 días de cultivo en 80  $\mu$ M de ABA, y en presencia de 4 g/l de CA), con las obtenidas en otras especies de pino, se observa que es similar o incluso superior en algunos casos: 220 ES/gPF en *P. pinea* (Carneros, 2009), 287 ES/gPF en *Pinus monticola* (Percy y col., 2000), 230 en *Pinus taeda* (Pullman y col., 2003), 147 ES/gPF en *Pinus strobus* (Klimaszewska y col., 2001) ó 54 ES/gPF en *Pinus nigra* (Salajová y Salaj, 2005). En ensayos anteriores de maduración en *Pinus pinaster*, el valor de la tasa osciló entre 24 y 441 ES/gPF (Lelu-Walter y col., 2006), y, se llegaron a contar, en otro ensayo, hasta 274 ES/gPF en estadio cotiledonar en las mejores condiciones (Humánez, 2009).

En todos los ensayos cabe destacar la influencia de la línea embriogénica. Así, de las 19 líneas ensayadas, las líneas C4-5a, S1-6b, V5-10a y V14-1a fueron las que presentaron una mayor capacidad de maduración en casi todos los ensayos realizados. Una comparación de la respuesta de estas líneas en los distintos tratamientos aplicados, muestra que el efecto de los factores ensayados es dependiente de la línea. Así, respecto al período de cultivo en 80  $\mu$ M de ABA, se han obtenido los mejores resultados en 30 días de aplicación en las líneas S1-6b, V5-10a y V14-1a, mientras que la aplicación de 4 g/l de CA al medio de cultivo ha favorecido la maduración de las 4 líneas, y la utilización del papel Whatman como soporte celular ha favorecido la maduración de todas las líneas excepto la C4-5a, donde se han obtenido los mejores resultados en la siembra sobre poliéster y, paradójicamente, los peores con papel Whatman No. 2.

#### IV.3.4.5. Conversión/germinación de los embriones somáticos

Los embriones maduros se sembraron en medio de germinación y se almacenaron durante 3 semanas a 4°C y oscuridad. Dos meses después, de los 287 embriones sembrados, el 21.8% se habían convertido en plantas completas, un 14.8% de embriones desarrollaron solo raíz y un 7.1% desarrollaron solo tallo (Tabla IV.12). Cabe destacar que el 70.8 y 78.6% de los embriones de las líneas V5-2a y S3-3a dieron lugar a plantas completas. En *P. sylvestris* y *P. pinaster* (Lelu y col., 1999), en *P. Monticola* (Percy y col., 2000), *P. kesiya* (Choudhury y col., 2008) y *P. halepensis* (Montalbán y col., 2013), se obtuvieron frecuencias de germinación entre el 60 y 80 %. En trabajos previos realizados en la misma especie (Humánez, 2009), germinaron el 42% de las líneas ensayadas. En *Pinus pinaster*, sin embargo, la germinación dependió más de la calidad del embrión que del genotipo (Miguel y col., 2004).

**Tabla IV.12.** Ensayo de germinación. Número de embriones maduros transferidos a medio de germinación y respuesta obtenida (porcentaje de explantos solo con raíz, solo con tallo o de plantas completas).

Línea	No. embriones	Embriones germinados (%)		
		Solo tallo	Solo raíz	Planta completa
AN1-1a	35	5.7	17.1	8.6
AN1-1b	5	0.0	80.0	0.0
AN1-2a	28	3.6	7.1	17.8
AN5-10c	11	0.0	18.2	0.0
C4-5a	14	0.0	7.1	7.2
S1-6b	133	53.4	0.0	42.9
S3-3a	14	0.0	0.0	78.6
V5-2a	24	8.3	0.0	70.8
V5-3a	3	0.0	33.3	0.0
V5-10a	6	0.0	0.0	0.0
V14-Br	14	7.1	0.0	14.3

Para su aclimatación, las plántulas obtenidas se colocaron en una bandeja con turba y perlita, cubierta con plástico transparente. Actualmente se espera su transferencia a invernadero (Figura IV.9).



**Figura IV.9.** Detalle de las plántulas sembradas en alveolos con turba y perlita para su posterior traslado a invernadero

La baja calidad de los embriones somáticos cotiledonares es una de las mayores limitaciones de la aplicación de la tecnología de embriogénesis somática en especies de pino (Humánez y col., 2012). Estudios recientes en pino silvestre, dirigidos a identificar los procesos que alteran el desarrollo normal de la embriogénesis somática, sugieren que las alteraciones en el transporte auxínico causan la producción de embriones tempranos, con suspensores celulares en exceso, que serían responsables de este desarrollo aberrante de los embriones (Abrahamsson y col., 2012). Varios estudios demuestran que las condiciones de cultivo pueden provocar la dormición de los embriones somáticos durante la maduración, lo que hace necesarios tratamientos específicos para estimular la germinación, tales como la estratificación a 4°C (Merkle y col., 1995). En nuestro caso, los tratamientos de estratificación y oscuridad seguidos de cultivo en inclinación a temperatura ambiente, han dado lugar a un índice de conversión completa a planta bastante elevado. La estratificación durante 3 semanas de los embriones somáticos de *Picea abies* (Konrádová y col., 2003) ejerció un efecto positivo en la germinación, relacionado con la acumulación del oligosacárido rafinosa, implicado en la adquisición de tolerancia al estrés. Pond y col., (2002) indicaron que, previamente a la desecación parcial, el tratamiento en frío de embriones de *Picea glauca* confería tolerancia a la desecación e incrementaba la

producción de embriones con mayor capacidad germinativa. Por ello, en algunas coníferas se ha propuesto este tratamiento como complemento a los tratamientos de desecación parcial en los protocolos de embriogénesis somática (Klimaszewska y col., 2007).

Otros tratamientos, como la aplicación de hormonas (ácido indóbutírico (IBA) o ácido giberélico), pueden estimular la germinación de los embriones (Merkle y col., 1995; George, 1996). También se ha visto que el uso de PEG en el medio de maduración favorecía la posterior germinación de los embriones somáticos (Rai y col., 2011; Maruyama y col., 2012). La orientación de los embriones en los medios de germinación también parece tener un papel importante en su desarrollo (Becwar y col., 1990), ya que durante la germinación del embrión zigótico, los cotiledones y los meristemas apical y radical están en contacto con el tejido nutritivo del megagametofito. Brown y Grifford (1958) cultivaron por primera vez embriones zigóticos de *Pinus lambertiana* insertando los cotiledones en el medio de cultivo y afirmaron que los nutrientes, especialmente la sacarosa, absorbidos directamente por los cotiledones, incrementaban la tasa de germinación y el crecimiento de la raíz. Por su parte, Becwar y col., (1989) estudiaron el efecto de la orientación de embriones somáticos de *Picea abies* durante la germinación, y obtuvieron las mejores frecuencias de conversión al disponer los cotiledones en contacto con el medio de cultivo, dejando el hipocótilo y la radícula libres, y los tubos de ensayo invertidos durante el período de cultivo. Lin y Leung (2002) realizaron estudios similares en embriones zigóticos de *Pinus radiata*, obteniendo mejor crecimiento de la raíz cuando los cotiledones se insertaban en el medio. Ahora bien, Klimaszewska y col., (2001) y Lelu-Walter y col., (2006) descubrieron que la germinación de los embriones somáticos de algunas especies de *Pinus* puede optimizarse al situarlos horizontalmente en contacto con el medio en placas Petri inclinadas 40°, y con los hipocótilos orientados hacia abajo, permitiendo el contacto de la raíz con el medio y facilitando la absorción de nutrientes; evitando de esta manera los posibles efectos negativos de la inmersión de la raíz en el medio.

### IV.3.5. Transformación genética en *P. pinaster* y *P. pinea*: ensayos de expresión transitoria

Se han realizado una serie de experimentos secuenciales para determinar qué factores afectan la eficacia de transformación de masas embriogénicas de *P. pinaster* y *P. pinea*, utilizando la técnica del cocultivo con diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. La eficacia de transformación se midió mediante la determinación de la expresión transitoria del gen *gusA*.

#### IV.3.5.1. Expresión transitoria del gen *gusA* en *Pinus pinaster*

##### IV.3.5.1.1. Efecto del período de infección

Se ensayó el efecto de diferentes períodos de infección (10, 30 y 60 minutos) con la cepa AGL1 sobre la línea V2-2d. Se demostró que 10 minutos es un período óptimo para infectar esta línea embriogénica (media de 193.5 puntos azules;  $p \leq 0.05$ ), con una gran diferencia respecto a los otros tiempos (2.0 y 58.0 puntos azules para 30 y 60 minutos de infección, respectivamente, Tabla IV.13).

**Tabla IV.13.** Efecto del período de infección con AGL1-pTAB16 sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en línea V2-2d de pino marítimo. Los datos son media de 3 repeticiones.

Período de infección (min)	No. loci/placa	
10	193.5a	
30	2.0b	
60	58.0b	
Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Período de infección	2	19671.2*
Error	3	1883.5

\*: Significativo para  $P \leq 0.05$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

#### IV.3.5.1.2. Efecto de la concentración bacteriana

En este ensayo se utilizaron las líneas V12-2a y V23-5f y se estudió el efecto de la infección (con 1 minuto de vacío y 10 de reposo) con diluciones de la cepa AGL1 ( $DO_{600nm}$  de 0.3, 0.5 y 0.7) sobre la expresión transitoria. Aunque no se apreciaron efectos significativos de las concentraciones bacterianas ( $p > 0.05$ ), cabe señalar que, independientemente de la línea, los mejores resultados se obtuvieron con una densidad óptica de 0.7 (24.5 puntos azules), mientras que con las densidades ópticas de 0.5 y 0.3 solo se obtuvo una media de 2.0 y 0.0 puntos azules, respectivamente (Tabla IV.14).

**Tabla IV.14.** Efecto de la  $DO_{600nm}$  sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas V12-2a y V23-5f de pino marítimo. Los resultados son media de 3 repeticiones.

Línea embriogénica	No. loci/placa		
	$DO_{600nm}$		
	0.30	0.50	0.70
V12-2a	0.0	0.2	19.7
V23-5f	0.0	3.7	29.2

Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Línea (A)	1	112.7NS
$DO_{600nm}$ (B)	2	1480.7NS
A x B	2	46.2NS
Error	18	721.9

NS: No significativo para  $P \leq 0.05$ .

Estos resultados son sensiblemente inferiores a los obtenidos en el anterior ensayo, posiblemente debido a que se realizaron con líneas embriogénicas diferentes. El efecto de la línea embriogénica en los ensayos de transformación genética ha sido descrita para otras procedencias de la especie (Trontin y col., 2002; Tereso y col., 2006).

### IV.3.5.1.3. Efecto del método de infección

Se estudió la eficacia de diferentes métodos de infección, aplicando previamente 1 minuto de vacío o 1 minuto de sonicación, en las líneas V12-2a y V23-5f y usando la construcción AGL1-pTAB16. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), tanto la sonicación como el vacío parecen facilitar la infección, puesto que con estos tratamientos se obtuvo un mayor número de puntos azules que con el tratamiento control. Así, en el control, la media de puntos azules fue de 0.66, mientras que con vacío se obtuvieron 46.8 y con sonicación, 26.3. No obstante, la línea V23-5f fue mejor que la V12-2a, aunque los efectos no fueron significativos ( $p > 0.05$ ) (Tabla IV.15).

**Tabla IV.15.** Efectos de la aplicación de sonicación y vacío sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas V12-2a y V23-5f de pino marítimo. Los datos son media de 3 repeticiones. La  $DO_{600nm}$  de las bacterias fue 0.8.

Línea embriogénica	No. loci/placa		
	Control	Vacío	Sonicación
V12-2a	0.0	42.0	0.0
V23-5f	1.3	51.7	52.7
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Línea (A)	1	2026.7NS	
Tratamiento (B)	2	3210.4NS	
A x B	2	1138.4NS	
Error	12	975.3	

NS: No significativo para  $P \leq 0.05$ .

### IV.3.5.1.4. Efecto de diferentes construcciones

Se ensayó la eficacia de infección de diferentes construcciones con las cepas AGL1, C58, EHA105 y GV3101, y los plásmidos pABC, pBIN35SGUSINT y pBINUBIGUSINT. También se usó el plásmido pTAB16 pero solo con las cepas AGL1 y C58. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes plásmidos, pero si entre las cepas bacterianas, siendo AGL1 la que mostró mayor capacidad infectiva (media de 41.9 puntos

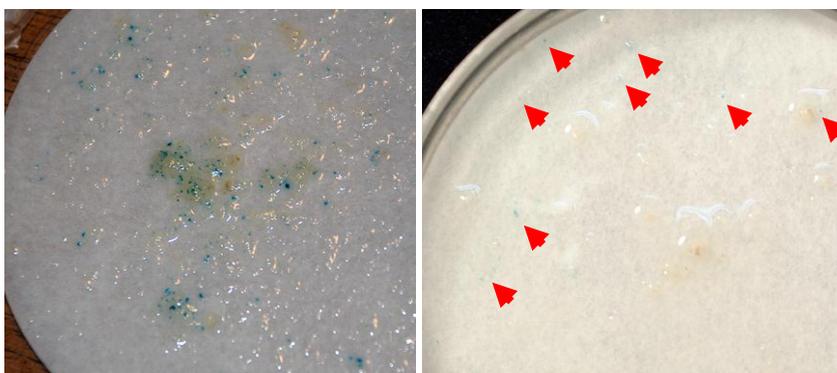
#### IV. Resultados y discusión: transformación genética en *P. pinaster* y *P. pinea*

azules), mientras que con GV3101, C58 y EHA105 se obtuvieron 30.0, 5.1 y 2.6 puntos azules, respectivamente. Cabe destacar que el promotor UBI parece mejorar la transformación en las cepas de *Agrobacterium* menos infecciosas (Tabla IV.16, Figura IV.10).

**Tabla IV.16.** Efecto de la cepa bacteriana y la construcción sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en la línea V23-1a de pino marítimo. Los datos son media de 3 repeticiones.

Cepa bacteriana	No. loci/placa			Media <sup>z</sup>
	Construcciones			
	pTAB16	pBIN35SGUSINT	pBINUBIGUSINT	
AGL1vir	41.6	45.3	39.0	41.9a
C58	0.0	0.0	15.3	5.1b
EHA105	n.e.	0.5	4.0	2.6b
GV3101	n.e.	27.2	34.7	30.0ab
Análisis de la varianza				
Fuente de variación	gl	Cuadrados medios		
Cepa (A)	3	3041.3**		
Construcción (B)	2	112.9NS		
AxB	4	106.2NS		
Error	23	629.5		

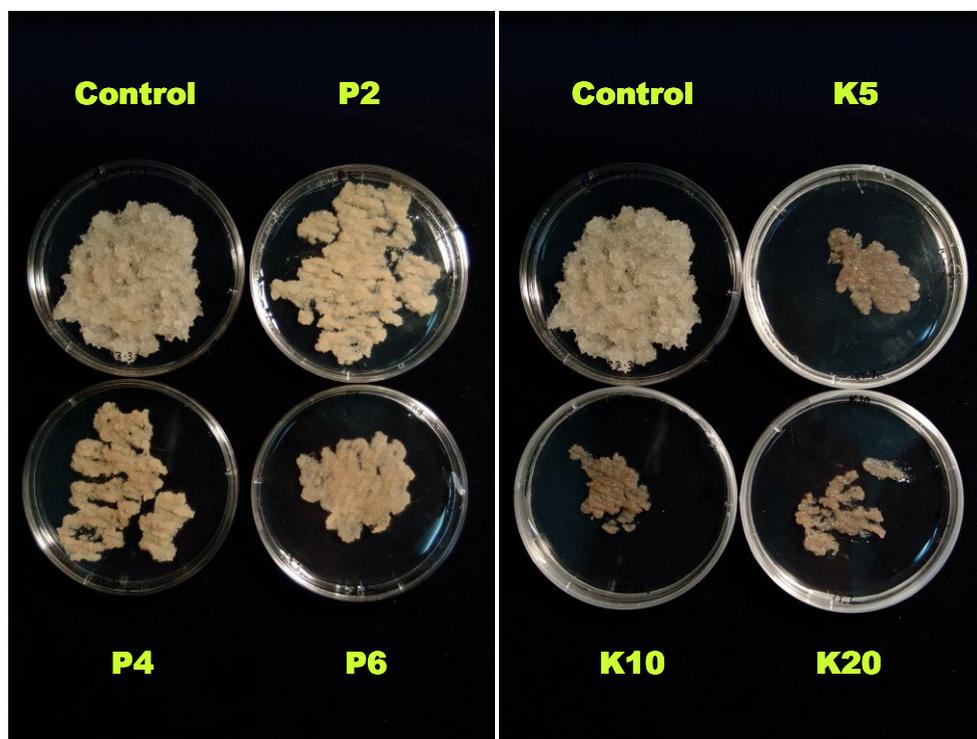
NS,\*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto de la cepa sobre la expresión transitoria. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey. n.e.: sin realizar.



**Figura IV.10.** Efecto de la cepa bacteriana sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en la línea V23-1a de pino marítimo. Izqda., infección con la cepa AGL1; dcha., con la cepa C58. Ambas cepas contenían el plásmido pBINUBIGUSINT.

#### IV.3.5.1.5. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos

Se ensayó el efecto de diferentes concentraciones de kanamicina (0, 5, 10 y 20 mg/l) y PPT (0, 2, 4 y 6 mg/l) sobre el crecimiento de la línea V12-4a. Tanto el PPT como la kanamicina redujeron significativamente el crecimiento celular, aunque no se observaron diferencias significativas entre las 3 concentraciones de PPT (Tabla IV.17, Figura IV.11), o kanamicina (Tabla IV.18, Figura IV.11) ensayadas.



**Figura IV.11.** Efecto de diferentes concentraciones de PPT (P1, P2, P4 y P6 corresponden a 1, 2, 4 y 6 mg/l respectivamente; izqda.) y kanamicina (K5, K10, K20 y K30 corresponden a 5, 10 20 y 30 mg/l respectivamente; dcha.) sobre el crecimiento de la línea embriogénica 12-4a de pino marítimo.

**Tabla IV.17.** Efecto de la concentración de PPT sobre el crecimiento de la línea V12-4a de pino marítimo tras 15 días de cultivo. Se partió de 0.5 g iniciales. Los datos son media de 2 repeticiones.

PPT (mg/l)	Peso medio del tejido vegetal (g)
0	3.3a
2	1.5b
4	2.0b
6	1.8b

**Análisis de la varianza**

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Concentración PPT	3	1.2**
Error	4	0.0

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

**Tabla IV.18.** Efecto de la concentración de kanamicina sobre el crecimiento de la línea V12-4a de pino marítimo tras 15 días de cultivo. Se partió de 0.5 g iniciales. Los datos son media de 2 repeticiones.

Kanamicina (mg/l)	Peso medio del tejido vegetal (g)
0	3.3a
5	1.0b
10	1.2b
20	0.6b

**Análisis de la varianza**

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Concentración kanam.	3	2.8**
Error	4	0.0

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

#### IV.3.5.2. Expresión transitoria del gen *gusA* en *Pinus pinea*

##### IV.3.5.2.1. Efecto de diferentes construcciones y de la cantidad de células vegetales a infectar

Se utilizaron las construcciones AGL1-pTAB16 y GV3101-pBIN35SGUSINT ( $DO_{600nm} = 0.8$ ) y dos cantidades de tejido vegetal (6 y 12 g

#### IV. Resultados y discusión: transformación genética en *P. pinaster* y *P. pinea*

por cada 50 ml de medio líquido mLV) de la línea embriogénica 1F11. Tanto la bacteria y cantidad de callo embriogénico utilizado en el cocultivo, como la interacción entre los dos factores, ejercieron un efecto significativo sobre la expresión transitoria del gen *gusA* ( $p \leq 0.05$ ). Así, la cepa AGL1 con la construcción pTAB16 fue prácticamente la única que dio respuesta, con una media de 159.1 puntos azules/placa. En cuanto a la cantidad de callo, 12 g/50 ml de medio fue óptima para la infección, ya que se obtuvieron 145.6 puntos azules frente a 13.6 con 6 g/50 ml (Tabla IV.19). La combinación de ambos factores (cepa AGL1-pTAB16 y 12 g/50 ml de concentración de callo) fue la más adecuada, ya que produjo una media de 291.0 puntos azules/placa (Figura IV.11).

**Tabla IV.19.** Efecto de la cantidad de callo embriogénico sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en la línea 1F11 de pino piñonero. Los callos se infectaron con 2 construcciones diferentes (AGL1-pTAB16 y GV3101- pBIN35SGUSINT). Los resultados son media de 3 repeticiones.

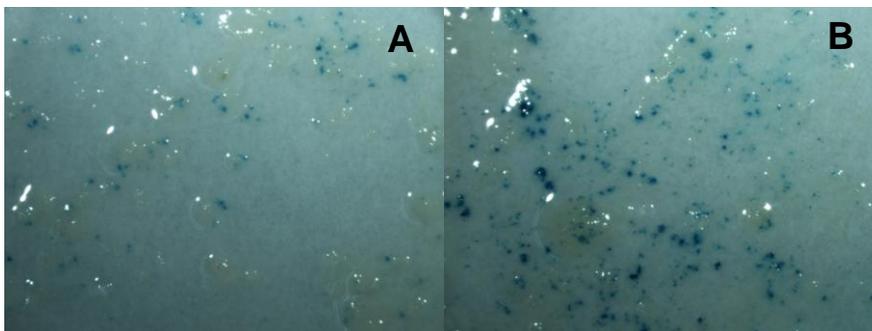
Cepa	Plásmido	No. loci/placa	
		Gramos de callo/50 ml mLV	
		6	12
ALG1	pTAB16	27.3b	291.0a
GV3101	pBIN35SGUSINT	0.0b	0.2b
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Construcción (A)	1	101124.0**	
Gramos de callo (B)	1	69696.0**	
A x B	1	69432.2**	
Error	12	4679.3	

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

##### IV.3.5.2.2. Efecto del período de infección

En este ensayo, 12 g de células embriogénicas de las líneas 1F11 y 7F11 se infectaron con la construcción AGL1-pTAB16 durante 5 y 10 minutos. Como se expone en la Tabla IV.20. No se observaron diferencias significativas

entre las líneas embriogénicas, y el período de infección de 5 minutos fue significativamente más efectivo ( $p \leq 0.05$ ) que el de 10 minutos (232.0 puntos azules frente 60.6, respectivamente).



**Figura IV.12.** Ensayos de expresión transitoria con la cepa AGL1 y el plásmido pTAB16 en las líneas 7F11 (A) y 1F11 (B) de *Pinus pinea*.

**Tabla IV.20.** Efecto de la línea embriogénica y del período de infección de callo embriogénico sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son media de 4 repeticiones.

Línea	No. loci/placa	
	Período de infección (min)	
	5	10
1F11	240.0	50.5
7F11	224.0	70.7
Media <sup>z</sup>	232.0a	60.6b
Análisis de la varianza		
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios
Línea (A)	1	18.1NS
Período de infección (B)	1	117477.6*
AxB	1	1314.1NS
Error	12	13438.3

NS, \*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.05$ , respectivamente. z: efecto del período de infección sobre la expresión transitoria. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

Los resultados obtenidos en este experimento con la línea 1F11 variaron respecto al anterior, puesto que hemos obtenido una media de 50.5 puntos azules, (con 10 minutos de infección), frente a los 291.0 obtenidos en el anterior ensayo (Tablas IV.19 y IV.20). Esto puede ser debido al estado

metabólico del tejido o al grado de fenolización, que podrían variar en el tiempo en que se realizaron los dos ensayos, afectando de manera diferente a la interacción de *A. tumefaciens* con las células vegetales (Levéé y col., 1999; Malabadi y Nataraja, 2007a).

#### IV.3.5.2.3. Efecto de la dilución bacteriana

Se ensayó el efecto de 2 concentraciones de *Agrobacterium* ( $DO_{600nm}$  de 0.3 y 0.8) sobre la infección, durante 5 minutos, de las líneas 1F11 y 7F11. Los resultados obtenidos demuestran que una  $DO_{600nm}$  de 0.8 es mejor que 0.3 para la expresión transitoria en ambas líneas embriogénicas (media de 173.1 puntos azules frente a 25.1, para una  $DO_{600nm}$  de 0.8 y 0.2, respectivamente;  $p \leq 0.05$ ). La línea embriogénica fue más sensible a la infección que la 7F11 (171.2 puntos azules frente a 54.0) (Tabla IV.21).

**Tabla IV.21.** Efecto de la dilución bacteriana de la construcción AGL1-pTAB16 sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son media de 4 repeticiones.

Línea	No. loci/placa		Media <sup>y</sup>
	$DO_{600nm}$		
	0.30	0.80	
1F11	47.7	294.7	171.2a
7F11	2.5	51.5	54.0b
Media <sup>z</sup>	25.1b	173.1a	
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.		Cuadrados medios
Línea (A)	1		83232.2*
Período de infección (B)	1		87616.0*
AxB	1		39204.0NS
Error	12		10238.5

NS,\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.05$ , respectivamente. <sup>z,y</sup>: efecto de la densidad bacteriana y de la línea, respectivamente, sobre la expresión transitoria. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

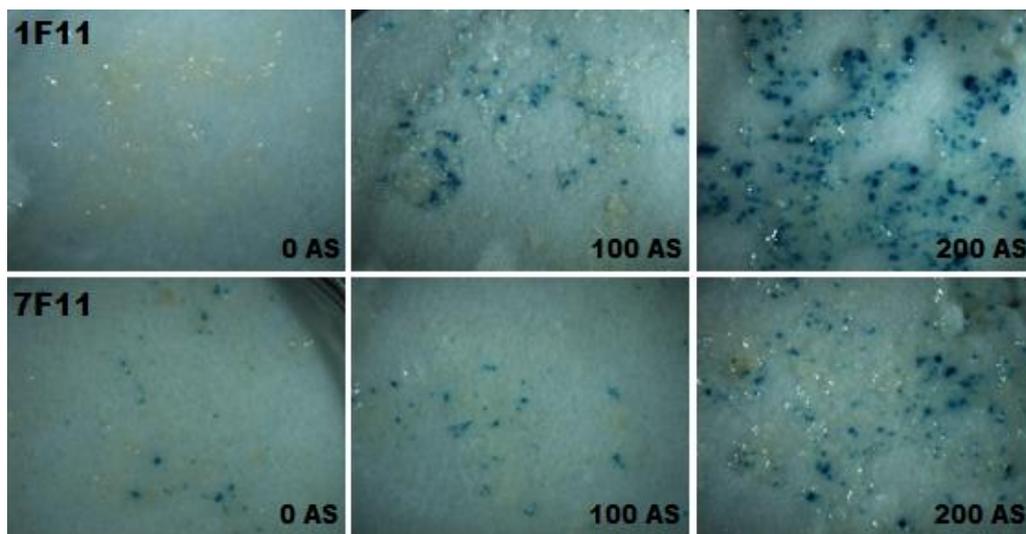
## IV.3.5.2.4. Efecto de la concentración de AS

En los ensayos anteriores, la concentración de AS en los medios de infección fue 100µM; en este ensayo, se utilizaron, además, concentraciones de 0 y 200 µM del compuesto y las líneas 1F11 y 7F11. De nuevo, la línea 1F11 produjo mayores niveles de expresión transitoria que la línea 7F11 (305.8 puntos azules frente a 146.8;  $p \leq 0.05$ ). La expresión transitoria del gen *gusA* también dependió de la concentración de AS, observándose que mayores concentraciones de AS favorecieron la expresión transitoria. De hecho, la concentración de 200 µM es la que dio significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más puntos azules en la línea 1F11, con una media de 646.7 puntos azules, seguido de la concentración de 100 µM, con 270.7 puntos; sin AS no se observó expresión transitoria en esta línea. La interacción entre la AS y la línea embriogénica también fue significativa, obteniendo con la línea 1F11 y 200 µM de AS los mejores resultados, con una media de 462.1 puntos azules. No se observaron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de AS probadas en la línea 7F11 (Tabla IV.22, Figura IV.13).

**Tabla IV.22.** Efecto de la concentración de AS en el medio MS sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son media de 4 repeticiones.

Línea	No. loci/placa		
	Concentración AS (µM)		
	0	100	200
1F11	0.0b	270.7b	646.7a
7F11	77.2b	85.7b	277.5b
Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Línea (A)	1	151686.0*	
Concentración de AS (B)	1	372576.5**	
AxB	1	100695.1*	
Error	12	18994.6	

\*\*, \*: Significativo para  $P \leq 0.01$  o  $P \leq 0.05$ , respectivamente. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.



**Figura IV.13.** Efecto de la AS sobre la expresión transitoria del gen *gusA* de dos líneas embriogénicas de pino piñonero. Arriba, línea 1F11; abajo, línea 7F11 (0, 100 y 200 AS = 0, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de AS).

#### IV.3.5.2.5. Efecto de diferentes plásmidos en la cepa AGL1

Se ensayó el efecto de los plásmidos pABC, pBIN35SGUSINT, pBINUBIGUSINT y pTAB 16, integrados en la cepa AGL1, sobre la infección de las líneas 1F11 y 7F11. Independientemente de la línea, el plásmido pTAB16 fue más efectivo en términos de expresión transitoria del gen *gusA* (número medio de puntos azules de 429.4); no obstante, su efecto solo fue significativamente superior a los otros en la línea 1F11, donde se obtuvo una media de 295.5 puntos azules frente a 93.6 con la 7F11 ( $p \leq 0.05$ ). Los mejores resultados se obtuvieron con la línea 1F11 infectada con el plásmido pTAB16 (606.5 puntos azules;  $p \leq 0.05$ . Tabla IV.23).

#### IV.3.5.2.6. Efecto de diferentes cepas bacterianas

Por último, se ensayó el efecto de las cepas AGL1 y EHA105, ambas con el plásmido pBIN35SGUSINT, sobre la expresión transitoria en las líneas 1F11 y 7F11. AGL1 fue la cepa que más expresión transitoria produjo ( $p \leq 0.05$ ),

#### IV. Resultados y discusión: transformación genética en *P. pinaster* y *P. pinea*

pero cabe destacar la gran discrepancia de resultados obtenidos con el anterior experimento, puesto que en este ensayo se obtuvo una media de 323.1 puntos azules por placa con la cepa AGL1, frente a 6.8 con EHA105. En este ensayo, la línea no tuvo un efecto significativo sobre la expresión transitoria del gen *gusA* (Tabla IV.24).

**Tabla IV.23.** Efecto del plásmido insertado en la cepa AGL1, sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son media de 4 repeticiones.

Línea	No. loci/placa			
	Plásmido			
	pABC	GUSINTNPTII	pBINUBIGUSINT	pTAB16
1F11	112.2b	157.7b	161.5b	606.5a
7F11	31.5b	74.0b	16.7b	252.2ab
Análisis de la varianza				
Fuente de variación	g.l.		Cuadrados medios	
Línea embriogénica (A)	1		220116.1**	
Plásmido (B)	3		229871.8**	
A x B	3		33281.5**	
Error	24		4723.7	

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

**Tabla IV.24.** Efecto de la cepa bacteriana, con el plásmido pBIN35SGUSINT, sobre la expresión transitoria del gen *gusA* en las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son media de 4 repeticiones.

Línea	No. loci/placa			
	Cepas bacterianas			
	AGL1	EHA105	C58	GV3101
1F11	332.5	11.5	0.0	0.0
7F11	313.7	2.2	0.0	0.0
Media <sup>z</sup>	323.1a	6.8b	0.0b	0.0b
Análisis de la varianza				
Fuente de variación	g.l.		Cuadrados medios	
Línea embriogénica (A)	1		392.0NS	
Plásmido (B)	3		205952.1**	
A x B	3		160.7NS	
Error	24		1736.5	

NS, \*\*: No significativo o significativo para  $P \leq 0.01$ , respectivamente. <sup>z</sup>: efecto de la cepa utilizada sobre la expresión transitoria. Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

#### IV.3.5.2.7. Determinación de las concentraciones de agentes selectivos

Se ensayó el efecto de inhibición de crecimiento de diferentes concentraciones de kanamicina (0, 5, 10, 20 y 30 mg/l) y PPT (0, 1, 2, 4 y 6 mg/l) sobre las líneas 1F11 y 7F11. Ambos agentes selectivos, kanamicina y PPT, redujeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) el crecimiento a las concentraciones más bajas utilizadas (5 mg/l de kanamicina o 1 mg/l de PPT) frente al tratamiento control sin agentes selectivos (Tablas IV.25 y IV.26). Así, sin tratamiento, el incremento de peso medio del callo embriogénico fue de 9.8 g, pasando a una media de 5.3 g con 5 mg/l de kanamicina y 3.8 g con 1 mg/l de PPT. Podemos concluir que concentraciones iguales o superiores a estas pueden ser utilizados para seleccionar tejido transformado de pino piñonero.

**Tabla IV.25.** Efecto de la concentración de kanamicina sobre el crecimiento de callo embriogénico tras 15 días de cultivo, de las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son valores medios de 3 repeticiones, donde en cada repetición se sembraron 0.5 g de peso fresco de callo.

Kanamicina (mg/l)	Peso medio del tejido vegetal (g)	
	Línea	
	1F11	7F11
0	12.4a	7.2a
5	6.5b	4.1ab
10	2.8c	2.9b
20	1.6c	1.3b
30	1.2c	1.0b

Análisis de la varianza			
Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Concentración kanam.	4	65.8**	19.2**
Error	10	1.0	1.7

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Para cada línea, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

**Tabla IV.26.** Efecto de la concentración de PPT sobre el crecimiento de callo embriogénico tras 15 días de cultivo, de las líneas 1F11 y 7F11 de pino piñonero. Los datos son valores medios de 3 repeticiones, donde en cada repetición se sembraron 0.5 g de peso fresco de callo.

PPT (mg/l)	Peso medio del tejido vegetal (g)	
	Línea	
	1F11	7F11
0	12.4a	7.2a
1	5.7bc	2.0b
2	3.4c	1.5b
4	2.3c	0.9b
6	2.2c	0.9b

Análisis de la varianza

Fuente de variación	g.l.	Cuadrados medios	
Concentración PPT	4	54.4**	21.6**
Error	10	0.8	1.1

\*\* : Significativo para  $P \leq 0.01$ . Para cada línea, valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ) de acuerdo con el test de Tukey.

### IV.3.5.3. Discusión

Después de los sucesivos ensayos de expresión transitoria, hemos obtenido una serie de conclusiones que nos ayudarán a establecer un protocolo mejorado de transformación estable para células embriogénicas de *P. pinaster* y *P. pinea*.

En todos los casos, hemos infectado callo embriogénico tras 4 días de subcultivo, porque este promueve la división celular, lo cual hace que las células sean más competentes para su transformación (Kavitah y col., 2010). Además, se ha eliminado el hidrolizado de caseína del medio de cocultivo porque es crucial para controlar el crecimiento de *Agrobacterium*, tal como se ha visto en *Pinus pinaster* (Tereso y col., 2006).

En los sucesivos ensayos hemos comprobado la importancia del genotipo sobre el número de eventos de transformación; lo que corrobora otras investigaciones sobre transformación de tejido embriogénico de *Pinus pinaster* (Trontin y col., 2002; Tereso y col., 2006). Dado que la competencia de transformación de plantas leñosas es dependiente del genotipo, la selección de genotipos con más facilidad de transformación es muy útil cuando se define,

por primera vez, un protocolo de transformación para nuevas especies (Nehra y col., 2005).

En nuestros ensayos, una densidad óptica bacteriana de 0.7 y 10 minutos de infección, incluyendo 1 minuto de vacío, se revelan como las condiciones más óptimas para la transformación de callo embriogénico de *Pinus pinaster*. Ambos factores fueron importantes en la transformación de masas de suspensores embrionarios de pino marítimo (Trontin y col., 2002) y en embriones zigóticos inmaduros de pino canadiense (Levéé y col., 1999). En tejido embriogénico de *Pinus radiata* (Charity y col., 2005) se hizo crecer *Agrobacterium* hasta una  $DO_{600nm}$  de entre 0.6 y 0.8 y se tomó una alícuota que fue subcultivada hasta una densidad óptica de entre 0.5 y 0.7, la cual transformó con éxito el tejido vegetal. En tejido embriogénico de *Pinus strobus* (Levéé y col., 1999) se transformó con éxito con una  $DO_{600nm}$  de 0.6 y en *Picea abies* y *Pinus tadea* (Wenck y col., 1999) se utilizó una densidad óptica de 1.

La aplicación de 1 minuto de vacío durante la infección promovió la expresión transitoria del gen *gusA* en *Pinus pinaster*. La aplicación de un pulso de vacío al cocultivo aumentaba la eficiencia de transformación en cotiledones de *Pinus radiata* (Charity y col., 2002), ya que mejora la penetración de *Agrobacterium* a través de las capas de la epidermis cotiledonar. Aunque en nuestros ensayos la sonicación no fue más eficaz que el vacío para favorecer la infección, en otras especies fue el método de elección para la transformación con *Agrobacterium* (Trick y Finer, 1997; Tang y col., 2007). La sonicación incrementa la infección por su capacidad de crear microheridas en los explantos, que inducen la producción de componentes fenólicos necesarios para la inducción de los genes *vir* (virulencia), causantes la transferencia del T-DNA (plásmido Ti) de *Agrobacterium* durante el proceso de transformación genética (Usami y col., 1988). De hecho, se ha llegado a afirmar que solo las células con heridas son susceptibles para la transformación (Bidney y col., 1992; Shimoda y col., 1990). Potrykus (1991) sugirió que solo las plantas con una apropiada respuesta a las heridas desarrollan grandes poblaciones de células adyacentes competentes para la regeneración y transformación. Por lo tanto, a pesar de que se ha visto que las heridas en exceso provocan un baja

expresión transitoria del gen *gusA* (Young y col., 2006), una moderada inducción de estas en el tejido diana provoca un aumento de la transferencia génica (Bidney y col., 1992). En *Pinus pinea* (Humara y col., 1999), la sonicación es más eficiente que el raspado con escarpelo y el bombardeo con microproyectiles de oro, aunque este último método ha demostrado una alta eficiencia en las tasas de infección de algunas especies (Bidney y col., 1992; Gutiérrez y col., 1997; Tingay y col., 1997). De hecho, se ha llegado a afirmar que los ultrasonidos deben crear más microheridas que cualquier otro procedimiento (Trick y Finer, 1998).

En los ensayos con *Pinus pinea*, documentamos que 12 g por cada 100 ml de medio de infección (50 ml de mLV + 50 ml de MS) es la óptima para la infección. Se han utilizado cantidades parecidas de callo embriogénico para la transformación de otras especies vegetales. Así, *Pinus pinaster* (Trontin y col., 2002) se transformó con éxito con 4-5 g de tejido embriogénico por cada 50 ml de medio de infección, mientras que en *Pinus radiata* (Charity y col., 2005) y *Pinus strobus* (Levéé y col., 1999), utilizaron 10 g/50 ml. En *Picea abies* y en *Pinus tadea* (Wenck y col., 1999) se resuspendieron 20 ml de cultivo celular embriogénico con 50 ml de medio cultivo, para realizar posteriormente la infección con 3 ml de medio con *Agrobacterium*.

En nuestros ensayos, un período de 5 minutos de infección se ha mostrado como el más adecuado para la transferencia del ADN-T, siendo el mismo con el que se obtuvieron altas tasas de transformación de cotiledones de *Pinus pinea* (Humara y col., 1999) con *Agrobacterium*. Tejido embriogénico de *Pinus radiata* (Cerdeira y col., 2002) se transformó con éxito aplicando un cocultivo de 3 minutos. Se han realizado otros experimentos con diferentes tipos de tejido vegetal, donde la infección se ha prolongado durante más tiempo, como en cotiledones de *Robinia pseudoacacia* (Zaragozá y col., 2004), de *Citrullus lanatus* (Kavitha y col., 2010), y en tejido embriogénico de banano cultivar Grande naine (Bermúdez y col., 2004), donde se infectaron durante 20, 30, 60 y 120 minutos, respectivamente. Por el contrario, hay ensayos donde no hay tiempo de reposo, como es el caso de la transformación de masas de suspensores embrionarios de *Pinus pinaster* (Trontin y col., 2002), donde el

período de infección se redujo al necesario para mezclar los cultivos embriogénicos resuspendidos y la correspondiente suspensión bacteriana.

Respecto a la densidad óptica, la  $DO_{600nm}$  de 0.8 se ha mostrado como la más eficiente para la expresión transitoria del gen *gusA* en *Pinus pinea*. Concentraciones mayores de bacteria podrían causar una inhibición competitiva que disminuiría su potencial para unirse a los explantos (Young y col., 2006), mientras que una baja concentración bacteriana daría como resultado una baja disponibilidad de bacterias para infectar a los explantos (Kavitha y col., 2010). No obstante, mayores concentraciones bacterianas también se han mostrado eficientes para la transformación de cotiledones de *Pinus pinea* (Humara y col., 1999), de *Vigna unguiculata* (Chaudhury y col., 2007) y de girasol (Mohamed y col., 2006), donde la  $DO_{600nm}$  de 1 produjo las mayores tasas de expresión transitoria. Además, la intensidad de las manchas azules decrecía al disminuir la densidad bacteriana. En cotiledones de *Robinia pseudoacacia* (Zaragozá y col., 2004) la máxima expresión transitoria se obtuvo con una  $DO_{600nm}$  de 0.6, y en las especies *Medicago* y *Trifolium* (Ding y col., 2003), se transformó con éxito a unas densidades ópticas de 0.20 y 0.35. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el grado de expresión transitoria en masas embriogénicas de *Pinus pinaster* (Trontin y col., 2002) al utilizar diferentes densidades ópticas, comprendidas entre 0.2 y 1.0. Así pues, las diferencias en la concentración bacteriana requerida para poder obtener unas tasas elevadas de expresión transitoria para el gen *gusA* con *Agrobacterium*, dependen fundamentalmente de la especie vegetal y de la línea embriogénica.

La presencia de 200  $\mu$ M de AS en el medio de infección promovió significativamente la expresión transitoria en *Pinus pinea*. Esta concentración también fue la más adecuada para la transformación de cotiledones de *Citrullus* (Kavitha y col., 2010) y de *Dactylis* (Lee y col., 2006). En algunas coníferas, la adición de AS al medio de cocultivo incrementa la expresión transitoria, como en *P. strobus* (100  $\mu$ M, Levée y col., 1999), *Picea abies* y *Pinus tadea* (25 – 50  $\mu$ M, Wenck y col., 1999), *Picea sitchensis* (50  $\mu$ M, Drake y col., 1997) y en *P. glauca* (50  $\mu$ M, Le y col., 2001), pero en *P. pinaster* (100  $\mu$ M, Trontin y col.,

2002; Tereso y col., 2006) no incrementó la expresión del gen *gusA*. La AS es considerada como un activador de la transformación por *Agrobacterium*, ya que es uno de los compuestos fenólicos lixiviados durante las lesiones del tejido vegetal que puede inducir la expresión de los genes *vir* que regulan el procesamiento y la transferencia del ADN-T de *Agrobacterium* a las células vegetales (Gelvin, 2003; Saharan y col., 2004; Wenck y col., 1999), aunque se ha visto que su papel en el medio de cultivo no es esencial cuando los componentes fenólicos exudados del tejido herido son suficientes para activar la respuesta *vir* (Cheng y col., 1997; Hiei y col., 1997; Park y col., 1996).

En *Pinus pinaster*, la cepa AGL1 mostró más capacidad infectiva que C58, EHA105 y GV3101. En tejido embriogénico de *Pinus tadea* y *Picea abies* (Wenck y col., 1999) y en cotiledones de *Pinus pinea* (Humara y col., 1999), la cepa EHA105 fue más eficiente para la transformación que otras ensayadas (LBA4404, GV3101 y C58). En *Pinus pinaster* (Trontin y col., 2002) y *Pinus strobus* (Levéé y col., 1999) se obtuvieron buenos resultados de transformación usando la cepa C58 de *Agrobacterium*. La cepa LBA 4404 (con plásmido pBI121) mostró una alta tasa de transformación de tejido embrionario en *Pinus radiata* (Cerde y col., 2002).

En cuanto a los plásmidos utilizados (pABC, pBIN35SGUSINT o pBINUBIGUSINT), no se observaron diferencias en la infección de cultivos embriogénicos de *Pinus pinaster*. Por el contrario, en *Pinus pinea*, comparando los plásmidos pABC, GUSINTNPTII, pBINUBIGUSINT y pTAB16 (con la cepa AGL1), pTAB16 fue el más idóneo para la transformación de callo embriogénico. En cotiledones de *Pinus radiata* (Grant y col., 2004) se consiguió una alta tasa de transformación utilizando la cepa AGL1 con un plásmido (pGA643) que contiene también los genes *nptII* y *gusA* (presentes en pBIN35SGUSINT y pBINUbiGUSINT).

Concentraciones iguales o mayores de 2 mg/l de PPT y 5 mg/l de kanamicina inhibieron el crecimiento del callo embriogénico de *Pinus pinaster*, mientras que las concentraciones de 5 mg/l de kanamicina o 1 mg/l de PPT redujeron el crecimiento de callos de *Pinus pinea*, siendo óptimas para la selección de callo transformado. En *Pinus strobus* (Levéé y col., 1999) se testó

la sensibilidad del tejido vegetal a concentraciones de 0-75 mg/l de kanamicina y se observó que 25 mg/l era suficiente para frenar el crecimiento de líneas transformadas. En *Pinus radiata* (Grant y col., 2004), los medios con kanamicina (10 mg/l) y gentamicina (10 y 15 mg/l) fueron eficientes para la selección de líneas transformadas.

Los resultados obtenidos, por tanto, señalan la importancia del método de infección del tejido embriogénico. Las bacterias deben ser crecidas a una  $DO_{600nm}$  de 0.8 y resuspendidas en MS líquido con 200  $\mu M$  de AS. La infección debe durar 5 minutos, aplicándose 1 minuto inicial de vacío. El cocultivo debe realizarse sobre medio mLV semi-sólido sin hidrolizado de caseína, durante 3 días a 28 ° C en oscuridad. Para la regeneración de líneas transgénicas, después del cocultivo, los callos han de ser transferidos a medio de selección, que debería contener un mínimo de 2 mg/l de PPT o 5 mg/l de kanamicina, en el caso de la infección de callo de *Pinus pinaster*, o de 1 mg/l de PPT o 5 mg/l de kanamicina, en el caso de la infección de callo de *Pinus pinea*. Como construcción, es preferible la utilización de la cepa AGL1 con el plásmido pTAB16.

Este es el primer estudio sobre transformación genética en cultivos embriogénicos de *Pinus pinea*.

## **V. CONCLUSIONES**

---



## V. CONCLUSIONES

En este trabajo se presentan protocolos para la conservación y mejora de recursos genéticos de *Quercus ilex*, *Pinus pinaster* y *Pinus pinea* utilizando la embriogénesis somática como método de propagación clonal. Las conclusiones más relevantes se exponen a continuación.

### V.1. Embriogénesis somática en *Quercus ilex*

\* Se han ensayado varios protocolos multifase que incluyen un cultivo en medio primario de inducción, una transferencia a medio secundario de inducción, y por último, un subcultivo en medio de manifestación.

\* En las condiciones ensayadas, no ha sido posible inducir embriogénesis somática a partir de hojas de brotes epicórmicos en ninguno de los 5 genotipos testados.

\* Se ha inducido embriogénesis somática a partir de lóculos aislados de flores femeninas de *Quercus ilex* del genotipo VA. No ha sido posible establecer líneas embriogénicas a partir de estos embriones.

El protocolo propuesto para la inducción de embriogénesis somática en estos explantos incluye tres fases

1) Siembra en un medio primario de inducción con macronutrientes B5, micronutrientes y vitaminas MS, 10  $\mu$ M de ANA y 10  $\mu$ M de BA, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar, durante 30 días, en oscuridad.

2) Transferencia al mismo medio de cultivo, con las dos hormonas reducidas a 0.5  $\mu$ M y fotoperiodo de 16 h durante 30 días (medio secundario de inducción).

3) Subcultivo al mismo medio sin reguladores de crecimiento (medio de manifestación), en las mismas condiciones, con subcultivos mensuales.

\* Se ha descrito, por primera vez, un protocolo para la obtención y establecimiento de líneas embriogénicas de *Quercus ilex* a partir de flores masculinas. El genotipo, el estado de desarrollo del amento, y la composición del medio primario de inducción ejercieron una influencia significativa sobre este proceso.

\* Se han obtenido embriones somáticos en 3 (VA, RE y HU) de los 5 genotipos ensayados.

\* De los dos medios primarios de inducción ensayados (SH y MS), únicamente el medio MS propició la inducción de embriogénesis somática.

\* Para inducir la maduración de los embriones, se ha ensayado el efecto del sorbitol, el inositol y el ABA. Posteriormente, se estudió el efecto de la BA y la estratificación sobre la germinación de los embriones cotiledonares obtenidos. En estas condiciones no ha sido posible regenerar plantas. No obstante, indirectamente hemos optimizado un protocolo para amplificar y establecer líneas embriogénicas mediante embriogénesis secundaria, con la combinación de 6% de sorbitol y 3% de sacarosa en medio MS.

\* Se han establecido líneas embriogénicas de 2 genotipos (VA y HU).

\* Se han caracterizado histológicamente callos embriogénicos procedentes de diferentes tratamientos y embriones cotiledonares. El análisis histológico de los embriones cotiledonares mostró que, aunque estaban malformados, contenían los meristemos apical y radicular, así como el procambium.

\* Se ha determinado, mediante citometría de flujo, el carácter diploide de los callos y embriones obtenidos.

\* Se propone el siguiente protocolo para establecer líneas embriogénicas de árboles adultos de *Quercus ilex*

- 1) Selección de amentos de más de 10 mm de longitud.
- 2) Siembra de amentos enteros o flores aisladas en medio primario de inducción con macronutrientes, micronutrientes y vitaminas MS, 10  $\mu$ M de BA, 10  $\mu$ M de ANA, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Cultivo durante 30 días en oscuridad.
- 3) Transferencia a medio secundario de inducción con macronutrientes de SH, micronutrientes y vitaminas de MS, 0.5  $\mu$ M de ANA, 0.5  $\mu$ M de BA, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Cultivo en condiciones de fotoperiodo durante 30 días.

- 4) Transferencia a medio de manifestación con los macronutrientes SH sin reguladores de crecimiento o con macronutrientes MS, con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a la mitad de su concentración original, y  $0.5 \mu\text{M}$  de BA y  $0.5 \mu\text{M}$  de NAA. En ambos casos el medio contiene micronutrientes y vitaminas de MS, 30 g/l de sacarosa y 6 g/l de Plantagar. Cultivo en condiciones de fotoperiodo con subcultivos mensuales a medio fresco.
- 5) Inducción de embriogénesis secundaria y establecimiento de líneas embriogénicas, en medio MS sin reguladores de crecimiento con 30g/l de sacarosa, 60 g/l sorbitol y 6 g/l de Plantagar.

Es necesario determinar las condiciones para la correcta maduración y posterior germinación de estos embriones.

### **V.2. Maduración en *Pinus pinaster***

- \* Los diferentes ensayos de maduración realizados demuestran la importancia de la línea embriogénica utilizada.
- \* La desecación previa de 6 horas ha perjudicado la maduración del callo embriogénico.
- \* La utilización del medio líquido, durante la fase de maduración, ha provocado un sobre-crecimiento del callo que creó un estrés celular perjudicando este proceso.
- \* La reducción del periodo de incubación con ABA, de 3 meses a 1 mes, durante la fase de maduración ha favorecido la obtención de embriones en los estadios 1-2 de desarrollo, pero no ha sido determinante en la obtención de embriones en estadios 3-4.
- \* La adición de 4 g/l de CA al medio de maduración ha favorecido la obtención de embriones en estadios 1-2 y, en una línea, también en estadios 3-4.
- \* La composición del soporte utilizado para las células embriogénicas ha afectado significativamente su maduración. El papel Whatman No. 2 ha favorecido la maduración en la mayoría de las líneas, frente a la utilización de filtro de poliéster, filtro de celulosa o filtro de nylon.

\* Se propone el siguiente protocolo para la maduración de líneas embriogénicas:

- 1) Disgregación del callo embriogénico (120 mg) en medio mLV líquido sin reguladores de crecimiento, con 30 g/l de sacarosa y 10 g/l de CA.
- 2) Recuperación del tejido sobre papel de filtro Whatman al que se le aplica un pulso de vacío.
- 3) Depósito del papel de filtro en placas con medio de maduración (60 g/l de sacarosa, 80  $\mu$ M de ABA y 1% de Gelrite<sup>®</sup>) con 4 g/l de CA. Cultivo en oscuridad durante un mes y subcultivo al mismo medio de maduración, sin ABA, hasta completar un periodo de 3 meses.
- 4) Germinación de los embriones cotiledonares en medio Litvay de germinación (30 g/l de sacarosa, 0.4% de Gelrite<sup>®</sup>, sin reguladores de crecimiento). Esta fase incluye una estratificación en frío durante tres semanas y una transferencia de las placas a cámara de crecimiento ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con cultivo en oscuridad los primeros 14 días, hasta la emergencia y elongación de la raíz.
- 5) Transferencia de las plantas somáticas a alvéolos con turba y perlita en condiciones de humedad elevada (cercana a 100%) y cultivo en una cámara de crecimiento a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo de 16 horas. Aclimatación progresiva hasta su traspaso al invernadero.

### **V.3. Transformación genética en *Pinus pinaster* y *Pinus pinea*, ensayos de expresión transitoria**

De los ensayos realizados en ambas especies, se han obtenido las siguientes conclusiones:

\* En los ensayos de expresión transitoria en *Pinus pinaster*, la línea embriogénica utilizada es un factor determinante.

\* La densidad óptica bacteriana de 0.7 y la aplicación de 10 minutos de infección, incluyendo 1 minuto de vacío, se han mostrado como las más óptimas para la infección de callo embriogénico de *Pinus pinaster*.

\* La  $DO_{600nm}$  bacteriana de 0.8, la concentración de 12 g de callo por cada 100 ml de medio de infección (50 ml de mLV + 50 ml de MS), la adición de 200  $\mu$ M AS, y un período de infección de 5 minutos, incluyendo 1 minuto de vacío, se han mostrado como los más adecuados para la transformación de callo embriogénico de *Pinus pinea*.

\* La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 ha sido la más efectiva en la transformación de callo embriogénico de ambas especies.

\* Los diferentes plásmidos utilizados (pABC, pBIN35SGUSINT, pBINUBIGUSINT y pTAB16) fueron igualmente eficaces para la transformación de *Pinus pinaster*. Por el contrario, el plásmido pTAB16, que contiene el gen *bar* que confiere tolerancia a la fosfotricina, fue más eficaz para la infección de *Pinus pinea*.

\* Se describe por primera vez, un protocolo para la transformación de *Pinus pinea* que incluye:

- 1) Utilización de la cepa AGL1 con el plásmido pTAB16.
- 2) Crecimiento de la bacteria hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0.7-0.8, centrifugación y resuspensión en MS líquido con 200  $\mu$ M de AS.
- 3) Infección con 1 minuto inicial de vacío y posterior reposo hasta completar 5 ó 10 minutos para *Pinus pinea* y *Pinus pinaster*, respectivamente.
- 4) Cocultivo en medio mLV semi-sólido sin hidrolizado de caseína, durante 3 días a 28 ° C en oscuridad.
- 5) Regeneración de líneas transgénicas, después del cocultivo, en medio de selección con 2 mg/l de PPT, en el caso de la infección de callo de *Pinus pinaster*, o de 1 mg/l de PPT, en el caso de la infección de callo de *Pinus pinea*. En los plásmidos con el gen *nptII*, el medio de selección debe incluir 5 mg/l de kanamicina.

Los protocolos descritos en esta memoria abren importantes posibilidades para la conservación y propagación en masa de genotipos

selectos de *Quercus ilex* y *Pinus pinaster*, así como para la mejora genética de líneas seleccionadas de *Pinus pinaster* y *Pinus pinea*.

### **Publicaciones y comunicaciones a congresos derivadas de esta memoria**

- Blasco M, Barra A, Brisa C, Corredoira E, Segura J, Toribio M, Arrillaga I (2013). Somatic embryogenesis in holm oak male catkins. *Plant Growth Regul.* Publicado on line. DOI 10.1007/s10725-013-9826-3.
- Blasco M, Humanez A, Mendoza-Poudereux I, Muñoz-Bertomeu J, Almazan V, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2010). Optimizing DNA delivery on somatic embryogenic tissue of maritime pine. XVII Congress of the FESPB. 4-9 de junio, 2010, València. P05-037. Publicado online, <http://www.geyseco.es/fespb/pdf/book-of-abstracts.pdf>
- Blasco M, Barra A, Brisa C, Segura J, Toribio M, Arrillaga (2011). Inducción de embriogénesis somática en amentos de encina (*Quercus ilex* L.). IX Reunión de la SECIVTV. 26-29 abril 2011, Puerto de La Cruz, Tenerife. Abstract pag 62. Publicado online: <http://www.secivtvtenerife.com/>
- Blasco M, Barra A, Brisa C, Segura J, Toribio M, Arrillaga (2012). (2012) Somatic embryogenesis induction on male catkins of Holm oak (*Quercus ilex* L.). In: Park YS and Bonga JM (eds). Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. Published online: <http://www.iufro20902.org/> pp. 143-145.

### **Colaboración en otras publicaciones:**

- Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2011). Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine *Pinus pinaster*. *In Vitro Cell Dev Biol* 47: 569-577.
- Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012). Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 111: 373-383.
- Morcillo A, Blasco M, Lorenzo L, Almazán V, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012). Somatic embryogenesis from Spanish provenances of maritime pine. (2012). In: Park, Y.S. and Bonga, J.M. (eds). Integrating vegetative propagation, biotechnologies and genetic improvement for tree production and sustainable forest management. Published online: <http://www.iufro20902.org/> pp. 163-165.

## **VI. BIBLIOGRAFIA**

---



## VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsson M, Valladares MS, Larsson E, Clapham D, von Arnold S (2012). Patterning during somatic embryogenesis in Scots pine in relation to polar auxin transport and programmed cell death. *Plant Cell Tiss Org Cult* 109: 391-400.
- Alejano R, Vázquez-Piqué J, Carevic F, Fernández M (2011). Do ecological and silvicultural factors influence acorn mass in Holm Oak (southwestern Spain)?. *Agro Sys* 83: 25-39.
- Aleza P, Juárez J, Cuenca J, Ollitrault P, Navarro L (2010). Recovery of citrus triploid hybrids by embryo rescue and flow cytometry from 2x x 2x sexual hybridization and its application to extensive breeding programs. *Plant Cell Rep* 29: 1023-1034.
- Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, Bock R, Capell T, Christou P, Daniell H, Datta K, Datta S, Dix PJ, Fauquet C, Huang N, Kohli A, Mooibroek H, Nicholson L, Nguyen TT, Nugent G, Raemakers K, Romano A, Somers DA, Stoger E, Taylor N, Visser R (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities. *Mol Breed* 15: 305-327.
- Álvarez R, Ordás RJ (2007). Improved genetic transformation protocol for cork oak (*Quercus suber* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 91: 45-52.
- Ammirato PV (1983). The regulation of somatic embryo development in Plant Cell Cultures: suspension culture techniques and hormone requirements. *Nat Biotechnol* 1: 68-74.
- Andrade GM, Nairn CJ, Le HT, Merkle SA (2009). Sexually mature transgenic American chestnut trees via embryogenic suspension-based transformation. *Plant Cell Rep* 28: 1385-1397.
- Arrillaga I, Tobolski JJ, Merkle SA (1994). Advances in somatic embryogenesis and plant production of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Rep* 13: 171-175.
- Arya S, Kalia RK, Arya ID (2000). Induction of somatic embryogenesis in *Pinus roxburghii* Sarg. *Plant Cell Rep* 19: 775-780.
- Bajaj YPS, Korneva S, Gutiérrez R, Maribona R (1987). Freeze preservation of plantlets excised meristems and cell cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) at -196°C. En: *Proc Int Conf Cryogenics*. A. Bose, P. Sengupta (Eds.). McGraw-Hill, New Delhi pp: 222-226.
- Barra A, Blasco M, Ruíz-Galea M, Celestino C, Alegre J, Arrillaga I, Toribio M (2012). Induction of somatic embryogenesis in developing ovules of *Quercus ilex* L. 2<sup>nd</sup> International Conference of the IUFRO Working Party. Book of Abstracts S1-P9.

- Barro F, Canalejo A, Martin A. (1999). Genomic influence on somatic embryogenesis in the *Triticeae*. *Plant Cell Rep* 18: 769-772.
- Baucher M, Chabbert B, Pilate G, Van Doorselaere J, Tollier MT, Conil MP, Cornu D, Monties B, Van Montagu M, Inze D, Jouanin L, Boerjan W (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. *Plant Physiol* 112:1479-1490.
- 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, 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.
- Benelli C, Fabbri A, Grassi S, Lambardi M, Rugini E (2001). Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *J Hortic Sci Biotech* 76: 112-119.
- 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) Gymnosperms. Kluwer Dordrecht Netherlands 3: 269-285.
- Bergmann BA, Stomp AM (1992). Effect of host plant genotype and growth rate on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gall formation in *Pinus radiata*. *Phytopathology* 82:1457-1462.
- Berjak P, Walter M, Mycock D, Wesley-Smith J, Watt P, Pammenter N (2000). Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. En: Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research Progress and application. Engelman F, Takagi H (Eds). Japan International Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/Int. *Plant Genet Res Inst Rome Italy* 710: 140-155.
- Bermúdez I, Gómez R, Chong B, Reyes M, Machado JM, Portal O, Ocaña B, Alvarado Y, Leiva M, Acosta M, Cruz M, Roque B, Swennen R, Sagi L, Hernández L (2004). Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de suspensiones celulares embriogénicas de banano cultivar Grande naine (AAA). *Biotec Veget* 1: 31 - 35.
- Bertani G (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300.
- Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L, Huffman G (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 18 :301-313.

- Birch RG (1997). Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 297-326.
- Boerjan (2005). Biotechnology and the domestication of forest trees. *Curr Opin Biotech* 16: 159-166.
- Bonga JM (1985). Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and rejuvenation. En: Bonga JM, Durzan DJ (eds). *Tissue culture in forestry*. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers Dordrecht pp: 387-412.
- Bonga JM, von Aderkas P (1992). *In vitro* culture of trees. Kluwer Dordrecht Netherlands.
- Bonga JM, MacDonald JE, von Aderkas P (2008). Cloning of conifers, with emphasis on mature trees. En: Rao GP, Zhao Y, Radchuck VV, Batnagar SK (eds). *Advances in plant biotechnology*. Studium Press LLC, Houston pp: 475-490.
- Bonga JM, Klimaszewska KK, von Aderkas P (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100: 241-254.
- Bowler C, Slooten L, Vanderbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montagu M, Inze D (1991). Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10: 1723-1732.
- 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 Arnold S (1998). Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol Plant* 104: 211-224.
- Bravo-Oviedo A, Del Río M, Montero G (2004). Site index curves and growth model for Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) in Spain. *For Ecol Manag* 23: 121-197.
- Britton MT, Leslie CH, McGranahan GH, Dandekar AM (2007). Walnuts. En: Pua EC, Davey MR (eds). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 60, *Transgenic crops V*. Springer, Berlin pp: 349-370.
- Brown CL, Grifford EM (1958). The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown *in vitro*. *Plant Physiol* 33: 57-64.
- Bueno MA, Astorga R, Manzanera JA (1992). Plant regeneration through somatic embryogenesis in *Quercus suber*. *Physiol Plant* 85: 30-24.
- Bueno MA, Gómez A, Boscaiu M, Manzanera JA, Vicente Ó (1997). Stress-induced formation of haploid plants through anther cultura in cork oak (*Quercus suber*). *Physiol Plant* 99: 335-341.
- Bueno MA, Gómez A, Sepúlveda F, Seguí JM, Testillano PS, Manzanera JA, Risueño

- MC (2003). Microspore-derived embryos from *Quercus suber* anthers mimic zygotic embryos and maintain haploidy in long-term anther culture. *J Plant Physiol* 160: 953-960.
- 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.
- Cangahuala-Inocente GC, Steiner N, Santos M, Guerra MP (2004). Morphohistological analysis and histochemistry of *Feijoa sellowiana* somatic embryogenesis. *Protoplasma* 224: 33-40.
- Canhoto JM, Cruz GS (1996). Histodifferentiation of somatic embryos in cotyledons of pineapple guava (*Feijoa sellowiana* Berg). *Protoplasma* 191: 34-45.
- 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 (2009). Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). Tesis Doctoral. Departamento de Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá.
- Carneros E, Celestino C, Klimaszcwska K, Park YS, Toribio M, Bonga JM (2009). Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 98: 165-178.
- Carr DJ (1976). Plasmodesmata in growth and development. En: Gunning BES, Robards AW (eds). *Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata*. Springer, Berlin pp: 243-289.
- Carraway DT, Merkle SA (1997). Plantlet regeneration from somatic embryos of American chestnut. *Can J For Res* 27: 1805-1812.
- Carrier DJ, Bock CA, Cunningham JE, Cyr D, Dunstan DI (1997). (+)-ABA content and lipid deposition in interior spruce somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 236-239.
- Carron MP, Etienne H, Michaux-Ferrière N, Montoro P (1995). Somatic embryogenesis in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). En: Bajaj YPS, ed. *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 30. Berlin/Heidelberg: Springer: Somatic embryogenesis and synthetic seed I pp: 353-369.
- Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D, y Toribio M (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For* 14: 345-357.
- Celestino C, Hernandez I, Lopez-Vela D, Carneros E, Alegre J, Toribio M, Fernandez-Guijarro B, Cardo L (2007). First data from a field trial of *Quercus suber* plants regenerated from mature selected trees and from their half-sib progenies by

- somatic embryogenesis. *Acta Hort* 748: 215-218.
- Cerda F, Aquea F, Gebauer M, Medina C, Arce-Johnson P (2002). Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 251-257.
- Chalupa V (2000). In vitro propagation of mature trees of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *J For Sci* 46: 537-542.
- Charest PJ, Devantier Y, Lachance D (1996). Stable genetic transformation of *Picea mariana* (Black spruce) via microprojectile bombardment. *In Vitro Cell Dev Biol* 32: 91-99.
- Charity JA, Holland L, Donaldson SS, Grace LJ, Walter C (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum infiltration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 70: 51-60.
- Charity JA, Holland L, Grace JL, Walter C (2005). Consistent and stable expression of the nptII, uidA and bar genes in transgenic *Pinus radiata* after *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using nurse cultures. *Plant Cell Rep* 23: 606-616.
- Chaudhury D, Madanpotra S, Jaiwal R, Saini R, Kumar PA, Jaiwal PK (2007). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated high frequency genetic transformation of an India cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivar and transmission of transgenes into progeny. *Plant Sci* 172: 692-700.
- Choudhury H, Kumaria S, Tandon P (2008). Induction and maturation of somatic embryos from intact megagametophyte explants in Khasi pine (*Pinus kesiya* Royle ex. Gord.). *Curr Sci* 95: 1433-1438.
- Cheliak WM, Klimaszewska K (1991). Genetic variation in somatic embryogenic response in open-pollinated families of black spruce. *Theor Appl Genet* 82: 185-190.
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980.
- Chiang VL (2002). From rags to riches. *Nat Biotechnol* 20:557-558.
- Choi YE, Yang DC, Choi KT (1998). Induction of somatic embryos by macrosalt stress from mature zygotic embryos of *Panax ginseng*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 52: 177-181.
- Clapham D, Demel P, Elfstrand M, Koop HU, Sabala I, Von Arnold S (2000). Gene transfer by particle bombardment to embryogenic cultures of *Picea abies* and the production of transgenic plantlets. *Scand J For Res* 15: 151-160.

- Coke JE (1996). Basal nutrient medium for *in vitro* cultures of loblolly pine. Patent #5, 534, 443.
- Comai L, Facciotti D, Hiatt WR, Thompson G, Rose RE, Stalker DM (1985). Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
- Cornu D, Delran S, Garbaye J, Le Tacon F (1977). Research on the best rooting conditions for green shoots of oak (*Q. petraea* (M) Liebl.) and beech (*Fagus sylvatica* L.). *Ann Sci For* 34: 1-16.
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM (2006). Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In Vitro Cell Dev Biol* 42: 525-533.
- Corredoira E, San-Jose MC, Vieitez AM, Ballester A (2007). Improving genetic transformation of European chestnut and cryopreservation of transgenic lines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 91: 281-288.
- Crespo, M (1988). Atlas de botànica. Flora i vegetació. Barcelona: Edibook SA.
- Crossway A, Oaks JV, Irvine JM, Ward B, Knauf VC, Shewmaker CK (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol Breed* 7: 25-33.
- Cuenca B, San-José MC, Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (1999). Somatic embryogenesis from stem and leaf explant of *Quercus robur* L. *Plant Cell Rep* 18: 538-543.
- Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I (1990). Genetically engineered fertile Indica-rice plants recovered from protoplasts. *Nat Biotechnol* 8: 736-740.
- DeCleene M, DeLey J (1976). The host range of crown gall. *Bot Rev* 42: 389-466.
- de Buck S, de Wilde C, van Montagu M, Depicker A (2000). Determination of the T-DNA transfer and T-DNA integration frequencies upon cocultivation of *Arabidopsis thaliana* root explants. *Mol Plant-Micro Int* 6: 658-665.
- De Diego N, Montalbán IA, Fernández de Larrinoa E, Montcaleán P (2008). *In Vitro* regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Can J For Res* 38: 2607-2615.
- Deng MD, Cornu D (1992). Maturation and germination of walnut somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 28: 195-202.
- Dhir SK, Oglesby J, Bhagsari AS (1998). Plant regeneration via somatic embryogenesis, and transient gene expression in sweet potato protoplasts. *Plant Cell Rep* 17: 665-669.
- Dillen W, De Clercq J, Kapila J, Zambre M, Van Montagu M, Angenon G (1997). The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to

- plants. *Plant J* 12: 1459-1463.
- Ding YL, Humble GA, Ludlow E, Drayton M, Lin YH, Nagela J, Dupala M, Zhaoa G, Pallaghyb C, Kallaa R, Emmerlinga M, Spangenberg G (2003). Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Medicago* and *Trifolium* species. *Plant Sci* 165: 1419-1427.
- Diner AM (1999). Genetic transformation of *Pinus palustris* (longleaf pine). En: Bajaj YPS (Ed) *Trans Trees. Biotech Agric For* 44: 185-192.
- Diner AM, Karnosky DF (1987). Differential responses of two conifers to *in vitro* inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Eur J Forest Pathol* 17: 211-216.
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* 43: 1407-1420.
- Dodueva IE, Frolova NV, Lutova LA (2007). Plant tumorigenesis: different ways for shifting systemic control of plant cell division and differentiation. *Trans Plant J* 1: 17-38.
- Drake PMW, John A, Power JB, Davey MR (1997). Expression of the *gusA* gene in embryogenic cell lines of Sitka spruce following *Agrobacterium*-mediated transformation. *J Exp Bot* 48: 151-155.
- Du N, Pijut PM (2009). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fraxinus pennsylvanica* hypocotyls and plant regeneration. *Plant Cell Rep* 28: 915-923.
- El Maâtaoui M, Espagnac H, Michaux-Ferrière N (1990). Histology of callogenesis and somatic embryogenesis induced in stem fragments of cork oak (*Quercus suber*) cultured *in vitro*. *Ann Bot* 66: 183-190.
- Elfstrand M, Fossdal CG, Sitbon F, Olsson O, Lonneborg A, von Arnold S (2001). Overexpression of the endogenous peroxidase-like gene *spi 2* in transgenic Norway spruce plants results in increased total peroxidase activity and reduced growth. *Plant Cell Rep* 20: 596-603.
- Ellis DD, Roberts D, Sutton B, Lazaroff W, Webb D, Flinn B (1989). Transformation of white spruce and other conifer species by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 8: 16-20.
- Ellis DD, McCabe DE, Mcinnis S, Ramachandran R, Russell DR, Wallace KM, Martinell BJ, Roberts DR, Raffa KF, McCown BH (1993). Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. *Biotechnol* 11: 84-89.
- Endemann M, Wilhem E (1999). Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur*. *Biol Plantarum* 42: 499-504.
- Estrada-Luna AA, Huanga-Mamani W, Acosta-Garcia G, Leon-Martinez G, Becerra-Flora A, Perez-Ruiz R, Vielle-Calzada JPH (2002). Beyond promiscuity: from

- sexuality to apomixis in flowering plants. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 146-151.
- Etienne H (2005). Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). En: Jain SM & Gupta PK (eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants pp: 167-179.
- Etienne H, Berthouly M (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 215-231.
- Etienne H, Lartraud M, Michaux-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.
- Fang JY, Wetten A, Hadley P (2004). Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci* 166: 669-675.
- Fehér A, Pasternak TP, Dudits D (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 201-228.
- Féraud-Keller C, Espagnac H (1989). Conditions d'apparition d'une embryogénèse somatique sur des cals issus de la culture de tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). *Can J Bot* 67: 1066-1070.
- Fernández-Galiano E, Mauri PV, Garcia G (1996). Somatic embryogenesis induction on *Quercus faginea* Lamk . ISHS Acta Horticulturae. III International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 447: 143-145.
- 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 (1995). Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41: 99-106.
- 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.
- Finkelstein RR, Crouch ML (1986). Rapeseed embryo development in culture on high osmoticum is similar to that in seeds. *Plant Physiol* 81: 907-912.
- Fowler DP (1986). Strategies for the genetic improvement of important tree species in Frame BR, Drayton PR, Bagnall SV, Lewnau CJ, Bullock WP, Wilson HM, Dunwell JM, Thompson JA, Wang K (1994). Production of fertile transgenic maize plants by silicon-carbide whisker-mediated transformation. *Plant J* 6: 941-948.
- Fromm M, Taylor L, Walbot V (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793.
- Gamborg OL (1966). Aromatic metabolism in plants. II. Enzymes of the shikimate

- pathway in suspension cultures of plant cells. *Can J Biochem* 44: 791-799.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968). Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50: 50-151.
- García-Martín G, Manzanera JA, González-Benito ME (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in *Quercus suber* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 80: 171-177.
- Garfinkel DJ, Simpson RB, Ream LW, White FF, Milton P, Gordon MP, Nester EW (1981). Genetic analysis of crown gall: fine structure map of the TDNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27: 143-153.
- 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.
- Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 16-37.
- 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.
- Gingas VM (1991). Asexual embryogenesis and plant regeneration from male catkins of *Quercus*. *HortSci* 26: 1217-1218.
- Gingas VM, Lineberger R (1989). Asexual embryogenesis and plant regeneration in *Quercus*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 17: 191-203.
- Godwin I, Gordon T, Ford-Lloyd B, Newbury HJ (1991). The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Rep* 9: 671-675.
- Goldberg RB, de Paiva G, Yadegari R (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266: 605-614.
- González-Benito ME, García-Martín G, Manzanera JA (2002). Shoot development in *Quercus suber* L. somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 38: 477-480.
- González-Rodríguez V, Navarro-Cerrillo RM, Villar R (2011). Artificial regeneration with *Quercus ilex* L. and *Quercus suber* L. by direct seeding and planting in southern Spain. *Ann For Sci* 68: 637-646.
- Gould JH, Zhou YX, Padmanabhan V, Magallanes-Cedeno ME, Newton RJ (2002). Transformation and regeneration of loblolly pine: shoot apex inoculation with *Agrobacterium*. *Mol Breed* 10: 131-141.
- Grace LJ, Charity JA, Gresham B, Kay N, Walter C (2005). Insect-resistant transgenic

- Pinus radiata*. Plant Cell Rep 24: 103-111.
- Grant JE, Cooper PA, Dale TM (2004). Transgenic *Pinus radiata* from *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cotyledons. Plant Cell Rep 22: 284-902.
- Gunning BES, Robards AW (1976). Plasmodesmata: current knowledge and outstanding problems. En: Gunning BES, Robards AW (eds). Intercellular communication in plants: studies on plasmodesmata. Springer, Berlin pp: 297-311.
- 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. Nat Biotechnol 4: 643-645.
- Gupta PK, Durzan DJ (1987). Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. Nat Biotechnol 5: 147-151.
- Gutiérrez MA, Luth D, Moore GA (1997). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrus* and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. Plant Cell Rep 16: 745-753.
- Gutmann M (1995). Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. J Microsc 179: 277-281.
- Hansen G, Wright MS (1999). Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci 4: 226-231.
- Hargreaves CL, Reeves CB, Find JI, Gough K, Josekutty P, Skudder DB, van der Maas SA, Sigley MR, Menzies MI, Low CB, Mullin TJ (2009). Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media and explant preparation. Can J For Res 39: 1566-1574.
- Hellens RP, Mullineaus PM (2000). A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. Trends Plant Sci 5: 446-451.
- Hernández I (2007). Regeneración clonal de alcornoques adultos (*Quercus suber* L.) mediante embriogénesis somática. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Alcalá.
- Hernández I, Celestino C, Martínez I, Manjón JL, Díez J, Fernández-Guijarro B, Toribio M (2001). Cloning mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees by somatic embryogenesis. Melhoramento 37: 50-57.
- Hernández I, Celestino C, Toribio M (2003a). Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: I. Factors affecting the induction in leaves from

- mature cork oak trees. *Plant Cell Rep* 21: 759-764.
- Hernández I, Celestino C, Alegre J, Toribio M (2003b). Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep* 21: 765-770.
- Hernández I, Cuenca B, Carneros E, Alonso-Blázquez N, Ruiz M, Celestino C, Ocaña L, Alegre J, Toribio M (2011). Application of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. *TFSB* 5: 19-26.
- Hernandez-Fernandez MM, Christie BR (1989). Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genome* 32: 318-321.
- Herschbach C, Kopriva S (2002). Transgenic trees as tools in tree and plant physiology. *Trees* 16: 250-261.
- Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35: 205-218.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Höxtermann E (1997). Cellular elementary organisms *in vitro*. The early vision of Gottlieb Haberlandt and its realization. *Physiol Plant* 100: 716-728.
- [http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-forestal-nacional/index\\_Tercer\\_inventario\\_forestal\\_nacional.aspx](http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-forestal-nacional/index_Tercer_inventario_forestal_nacional.aspx) III Inventario Forestal Nacional (2007).
- [http://www.mma.es/conserv\\_nat/acciones/mejora\\_genet/html/reg\\_procedencia.htm](http://www.mma.es/conserv_nat/acciones/mejora_genet/html/reg_procedencia.htm) Unidades para la comercialización de materias forestales de reproducción (2003). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/>).
- [http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes\\_politica\\_forestal/pinus\\_pinaster.gif](http://www.mma.es/images/general/biodiversidad/montes_politica_forestal/pinus_pinaster.gif) Unidades para la comercialización de materias forestales de reproducción (2003). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/>).
- [http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursos-geneticos/pinus\\_pinea\\_tcm7-26026.gif](http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/recursos-geneticos/pinus_pinea_tcm7-26026.gif) Unidades para la comercialización de materias forestales de reproducción (2003). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (<http://www.magrama.gob.es/es/>).

- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inze D, Engler G, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid* 3: 212-230.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers S, Hoekema A (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). *Trans Res* 2: 208-218.
- Humánez A (2009). Biotecnología aplicada a la propagación y conservación de recursos forestales de *Pinus pinaster* Aiton. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universitat de València.
- Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2011). Thidiazuron enhances axillary and adventitious shoot proliferation in juvenile explants of Mediterranean provenances of maritime pine *Pinus pinaster*. *In Vitro Cell Dev Biol* 47: 569-577.
- Humánez A, Blasco M, Brisa C, Segura J, Arrillaga I (2012). Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 111: 373-383.
- Humara JM, López M, Ordás RJ (1999). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pinus pinea* L. cotyledons: an assessment of factors influencing the efficiency of *uidA* gene transfer. *Plant Cell Rep* 19: 51-58.
- Jain MS, Dong N, Newton RJ (1989). Somatic embryogenesis in slash pine (*Pinus elliotii*) from immature embryos cultured in vitro. *Plant Sci* 65: 233-241.
- James DJ, Uratsu S, Cheng J, Negri P, Viss P, Dandekar AM (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep* 12: 559-563.
- Jarlet-Hugues E (1989). Recherches sur l'aptitude à l'embryogenèse somatique de matériel juvénile et de matériel issu d'arbres adultes de *Pinus pinaster* Sol. Ph. Doctorado en Biología y Fisiología de Plantas, Universidad de París VI, 135 pp.
- Jefferson A, Kavanagh A, Bevan W (1987). GUS fusions: glucuronidase as sensitive marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907.
- Jensen WA (1962). *Botanical Histochemistry*. H. Freeman (ed.). San Francisco.
- Jones NB, van Staden J (1995). Plantlet production from somatic embryos of *Pinus patula*. *J Plant Physiol* 145: 519-525.
- Jiménez J, López-Vela D, Ruiz-Galea M, Celestino C, Toribio M, Alegre J (2013). Embryogenic suspensions of adult cork oak: the first step towards mass propagation. *Trees* 27: 13-23.
- Kamada HK, Kobayashi TK, Harada H (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev Biol* 25:

1163-1166.

- Kavitah G, Taghipour F, Huyop F (2010). Investigation of factors in optimizing *Agrobacterium*-mediated gene transfer in *Citrullus lanatus* cv. Round Dragon. *J Biol Sci* 10: 209-216.
- Keinonen-Mettälä K, Jalonen P, Eurola P, von Arnold S, von Weissenberg K (1996). Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris*. *Scand J For Res* 11: 242-250.
- Kermode AR (1990). Regulatory mechanism in the transition from seed development to germination. *Crit Rev Plant Sci* 9: 155-195.
- Kim Y (2000). Somatic embryogenesis in *Quercus acutissima*. En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants Vol 6*. Kluwer Dordrecht Netherlands pp: 671-686.
- Kim Y, Youn Y, Noh ER, Kim JC (1997). Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of five families of *Quercus acutissima*. *Plant Cell Rep* 16: 869-873.
- Kharenko OA, Zaharia LI, Giblin M, Cekic V, Taylor DC, Palmer CD, Abrams SR, Loewen MC (2011). Abscisic acid metabolism and lipid accumulation of a cell suspension culture of *Lesquerella fendleri*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 105: 415-422.
- 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 Dordrecht Netherlands pp: 67-79.
- Klimaszewska K, Cyr DR (2002). Conifer somatic embryogenesis: I. Development. *Dendrobiology* 48: 31-39.
- Klimaszewska K, Smith D (1997). Maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* is promoted by a high concentration of gellan gum. *Physiol Plant* 100: 949-957.
- Klimaszewska K, Park YS, Overton C, MacEacheron I, Bonga JM (2001). Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell and Dev Biol - Plant* 37: 392-399.
- Klimaszewska K, Lachance D, Bernier-Cardou M, Rutledge RG (2003). Transgene integration patterns and expression levels in transgenic tissue lines of *P. mariana*, *P. glauca* and *P. abies*. *Plant Cell Rep* 21: 1080-1087.
- Klimaszewska K, Trontin JF, Becwar MR, Devillard C, Park YS, Lelu-Walter MA (2007). Recent Progress in Somatic Embryogenesis of Four *Pinus* spp. *Tree For Sci Biotech* 1: 11-25.
- Klimaszewska K, Noceda C, Pelletier G, Label P, Rodriguez R, Lelu-Walter MA (2009). Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 45: 20-33.

- Klimaszewska K, Overton C, Stewart D, Rutledge RG (2011). Initiation of somatic embryos and regeneration of plants from primordial shoots of 10-year-old somatic white spruce and expression profiles of 11 genes followed during the tissue culture process. *Planta* 233: 635-47.
- Koncz C, Schell J (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 204: 383-396.
- Konrádová H, Grigová M, Lipavská H (2003). Cold-induced accumulation of raffinose family oligosaccharides in somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). In *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 39: 425-427.
- Kumar GK, Thomas TD (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria Ternatea* Linn. *Plant Cell Tiss Org Cult* 110: 141-151.
- Isabel C, Muñoz B (2009). Fenolpogía de *Quercus ilex* L. y *Quercus suber* L. en una dehesa del centro peninsular. Proyecto Fin de Carrera. UPM.
- L'Hégoual'ch M, Espagnac H (1987). First observations on the adventitious rhizogenic capacity of holm oak (*Quercus ilex* L.) (in French). *Ann Sci For* 44: 325-334.
- Laarman JG, Sedjo RA (1992). *Global forests: issues for six billion people*. McGraw Hill, Inc. New York, USA.
- Lara-Chávez A, Flinn BS, Egertsdotter U, Sederoff R (2011). Initiation of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of Oocarpa pine (*Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal). *Tree Physiol* 5: 539-554.
- Lainé E, David A (1990). Somatic embryogenesis in immature embryos and protoplasts of *Pinus caribaea*. *Plant Sci* 69: 215-224.
- Le VQ, Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, Tremblay FM (2001). An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *J Exp Bot* 52: 2089-2095.
- Lee SH, Lee DG, Woo HS, Lee KW, Kim DH, Kwak SS, Kim JS, Kim H, Ahsan N, Choi MS, Yang JK, Lee BH (2006). Production of transgenic orchardgrass via *Agrobacterium-mediated* transformation of seed-derived callus tissues. *Plant Sci* 171: 408-414.
- 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 or without growth regulators. *Plant Physiol* 105: 719-728.
- Lelu MA, Pilate G (2000). Transgenic in Larix. En: Jain SM, Minocha SC (Eds). *Molecular Biology of Woody Plants (Vol 2)*, Kluwer Dordrecht Netherlands pp: 119-134.

- 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.
- Leple JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L (1992). Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Rep* 11: 137-141.
- Levéé V, Garin E, Klimaszewska K, Séguin A (1999). Stable genetic transformation of white pine (*Pinus strobus* L.) after cocultivation of embryogenic tissues with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed* 5: 429-440.
- Li L, Zhou YH, Cheng XF, Sun JY, Marita JM, Ralph J, Chiang VL (2003). Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci* 100: 4939-4944.
- Li ZN, Fang F, Liu GF, Bao MZ (2007). Stable *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of London plane tree (*Platanus acerifolia* Willd.). *Plant Cell Rep* 26: 641-650.
- Liao C, Luo Y, Fang C, Li B (2010). Ecosystem Carbon Stock Influenced by Plantation Practice: Implications for Planting Forests as a Measure of Climate Change Mitigation. *PLoS ONE* 5: 1.
- 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* 38: 191-197.
- Lindroth AM, Gronroos R, Clapham D, Svensson J, von Arnold S (1999). Ubiquitous and tissue-specific gus expression in transgenic roots conferred by six different promoters in one coniferous and three angiosperm species. *Plant Cell Rep* 18: 820-828.
- Litvay JD, Verma DC, Jonson 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.
- Liu X, Pijut PM (2010). *Agrobacterium*-mediated transformation of mature *Prunus serotina* (black cherry) and regeneration of transgenic shoots. *Plant Cell Tiss Org Cult* 101: 49-57.
- Lloyd G, McCown B (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot-tipe culture. *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421-427.
- Loopstra CA, Stomp AM, Sederoff RR (1990). *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in sugar pine. *Plant Mol Biol* 15:1-9.
- Lu J, Vahala J, Pappinen A (2011). Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in

- Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 107: 25-33.
- Mackay JJ, Becwar MR, Park YS, Corderro JP, Pullman GS (2006). Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genet Genomes* 2: 1-9.
- Maheswaran G, Williams EG (1985). Origin and development of somatic embryos formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. *Ann Bot* 56: 619-630.
- Malabadi RB, Nataraja K (2007a). Genetic Transformation of Conifers: Applications in and Impacts on Commercial Forestry. *Trans Plant J* 1: 289-313.
- Malabadi RB, Nataraja K (2007b). Spatio-temporal accumulation of peroxidases and assessment of clonal identity of somatic seedlings by ISSR and RAPD in *Pinus roxburghii*. *Am J Plant Physiol* 2: 356-366.
- Malabadi RB, van Staden J (2005). Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula*. *Tree Physiol* 25: 11-16.
- 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. *HortSci* 102: 449-459.
- Mallón R, Covelo P, Vieitez AM (2012). Improving secondary embryogenesis in *Quercus robur*: application of temporary immersion for mass propagation. *Trees* 26: 731-741.
- Manzanera JA (1992). Inducción de embriogénesis somática en roble (*Quercus robur* L.). *Invest Agrar Sist Rec For Vol* 1: 1.
- Manzanera JA, Astorga R, Bueno MA (1993). Somatic embryo induction and germination in *Quercus suber* L. *Silvae Genet* 42: 2-3.
- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Power JB (1996). Somatic embryogenesis and plant regeneration in Floribunda rose (*Rosa hybrida* L.) cvs. Trumpeter and Glad Tidings. *Plant Sci* 120: 95-105.
- Martínez MT, Corredoira E, Valladares S, Jorquera L, Vieitez AM (2008). Germination and conversion of somatic embryos derived from mature *Quercus robur* trees: the effects of cold storage and thidiazuron. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95: 341-351.
- Maruyama TE, Hosoi Y (2012). Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss Org Cult* 110: 45-52.
- Mathew MM, Philip VJ (2003). Somatic embryogenesis versus zygotic embryogenesis in *Ensete superbum*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 72: 267-275.
- Mathews JH, Campbell MM (2000). The advantages and disadvantages of the

- application of genetic engineering to forest trees: a discussion. *Forestry* 73: 371-380.
- Mauri PV, Manzanera JA (2003). Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 229-235.
- Mauri PV, Manzanera JA (2004). Effect of abscisic acid and stratification on somatic embryo maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 40: 495-498.
- McAfee BJ, White EE, Pelcher LE, Lapp MS (1993). Root induction in pine (*Pinus*) and larch (*Larix*) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 34: 53-62.
- Mentewab A, Stewart Jr. N (2005). Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to genetic plants. *Nat Publ Group* 23: 1177-80.
- Merkle SA (1995). Strategies for the dealing with limitations of somatic embryogenesis in hardwood trees. *Plant Tiss Cult Biotech* 1: 112-121.
- Merkle SA, Dean JFD (2000). Forest tree biotechnology. *Curr Opin Biotech* 11: 298-302.
- Merkle SA, Wiecko AT, Sotak RJ, Sommer HE (1990). Maturation and conversion of *Liriodendron tulipifera* somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 1086-1093.
- Merkle SA, Watson-Pauley BA (1994). *Ex vitro* conversion of pyramid magnolia somatic embryos. *HortSci* 29: 1186-1188.
- Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA, Lukyanov S, Gadella TW, Chudakov DM (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4: 555-7.
- Michaux-Ferrière N, Carron MP (1989). Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*: the importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tiss Org Cult* 19: 243-256.
- Michaux-Ferrière N, Grouth H, Carron MP (1992). Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (*Euphorbiaceae*). *Am J Bot* 79: 174-180.
- 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.
- Miguel C, Gonzalves S, Tereso S, Marum L, Maroco J, Oliveira MM (2004). Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 121-130.
- Milhinhos A, Miguel C, Oliveira MM, Tereso S (2007). Transformation of *P. pinaster* for

- studying nitrogen metabolism regulation. En: IUFRO Tree Biotechnology Conference, June 3-8, 2007, Ponta Delgada, Azores, Portugal, No. SIX p: 9.
- Mohamed SH, Boehm R, Schnabl H (2006). Stable genetic transformation of high oleic *Helianthus annuus* L. genotypes with high efficiency. Plant Sci 171: 546-554.
- Molina D, Aponte ME, Cortina H, Moreno G (2002). The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. Plant Cell Tiss Org Cult 71: 117-123.
- Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P (2010). Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. Trees 24: 1061-1071.
- Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P (2012). Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. Acta Physiol Plant 34: 451-460.
- Montalbán IA, Setién-Olarra A, Hargreaves CL, Moncaleán P (2013). Somatic embryogenesis in *Pinus halepensis* Mill.: an important ecological species from the Mediterranean forest. Trees. DOI 10.1007/s00468-013-0882-0.
- Morcillo A, Blasco M, Lorenzo L, Almazán V, Brisa C, Segura J, Arrillaga (2012). Somatic embryogenesis from Spanish provenances of maritime pine. 2nd. International Conference of the IUFRO WORKING PARTY. Brno- Czech Republic june 25-28- 2012. abstract S1-5P.
- Msogoya T, Kanyagha H, Mutigitu J, Kulebelwa M, Mamiro D (2012). Identification and management of banana *in vitro* cultures. J Appl Biosci 55: 3987-3994.
- Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.
- 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, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchee MA (2005). Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41: 701-717.
- Newman GR, Jasani B, Williams ED (1982). The preservation of ultrastructure and antigenicity. J Microsc 127: RP5 - RP6.
- Nigro SA, Makunga NP, Jones NB, van Staden J (2004). A biolistic approach towards producing transgenic *Pinus patula* embryonal suspensor masses. Plant Growth Regul 44: 187-197.
- O'Brien TP, McCully ME (1981). The study of plant structure: principles and selection methods. Hermacarphi. Pty. Ltd., Melbourne.

- Oliveira P, Barriga J, Cavaleiro C, Peixe A, Potes AZ (2003). Sustained *in vitro* root development obtained in *Pinus pinea* L. inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Forestry* 76: 579-587.
- Osakabe Y, Kajita S, Osakabe K (2011). Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment. *Physiol Plant* 142: 105-117.
- Pacurar DI, Thordal-Christensen H, Pacurar ML, Pamfil D, Botez C, Bellini C (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiol Mol Plant Pathol* 76: 76-81.
- Palomo-Ríos E, Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F (2009). Efecto del uso de membranas semipermeables en la mejora de calidad de embriones somáticos de aguacate y olivo. Libro de Actas de la VIII Reunión de la SECIVTV p: 42. Murcia, España.
- Park SH, Pinson SRM, Smith RH (1996). T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Mol Biol* 32: 1135-1148.
- Park YS (2001). Implementation of somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. Proceedings of the WBB Conference "Wood, Breeding, Biotechnology and industrial expectations", June 2001, Bordeaux, <http://www.pierroton.inra.fr/WBB/>
- Park YS, Pond SE, Bonga JM (1993). Initiation of somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): genetic control, culture treatment effects, and implications for tree breeding. *Theor Appl Genet* 86: 427-436.
- Park YS, 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.
- Park YS, Bonga JM, Cameron SI, Barrett JD, Forbes K, De Verno LL, Klimaszewska K (1998b). Somatic embryogenesis in jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.). En: Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (Eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (Vol 4). Kluwer Dordrecht Netherlands pp: 491-504.
- Park YS, Lelu-Walter AM, Harvengt L, Trontin JF, MacEacherton 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.
- Parrot WA (1991). Auxin-stimulated somatic embryogenesis from immature cotyledons of white clover. *Plant Cell Rep* 10: 17-21.
- Pasonen HL, Lu J, Niskanen AM, Seppänen SK, Rytönen A, Raunio J, Pappinen A,

- Kasanen R, Timonen S (2009). Effects of sugar beet chitinase IV on root-associated fungal community of transgenic silver birch in a field trial. *Planta* 230: 973-983.
- Pedroso MC, Pais MS (1992). A scanning electron microscopy and Xray microanalysis study during induction of morphogenesis in *Camelia japonica* L. *Plant Sci* 87: 99-108.
- Pena L, Sequin A (2001). Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends Biotechnol* 19: 5000-5506.
- Pensabene-Bellavia G, Ortega C, Olivares-Fuster O, Navarro L (2005). Estudio del efecto de una membrana semiimpermeable en el desarrollo de callos y embriones criopreservados de cítricos. Libro de Actas de la VI Reunión de la SECIVTV p: 64.
- 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.
- Pijut PM, Lawson SS, Michler CH (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. *In Vitro Cell Dev Biol* 47: 123-147.
- Pilate G, Guiney E, Holt K, Petit-Conil M, Lapierre C, Leple JC, Pollet B, Mila I, Webster EA, Marstorp HG, Hopkins DW, Jouanin L, Boerjan W, Schuch W, Cornu D, Halpin C (2002). Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nat Biotechnol* 20: 607-612.
- Pinto G, Valentim H, Costa A, Castro S, Santos C (2002). Somatic embryogenesis in leaf callus from a mature *Quercus suber* L. tree. *In Vitro Cell Dev Bio* 28: 569-572.
- Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA (2010). Oak somatic and gametic embryos maturation is affected by charcoal and specific aminoacids mixture. *Ann For Sci* 67: 205.
- Pond SE, von Aderkas P, Bonga JM (2002). Improving tolerance of somatic embryos of *Picea glauca* to flash desiccation with a cold treatment (dessication after cold acclimation). *In vitro Cell Dev Biol Plant* 38: 334-341.
- Potrykus I (1991). Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42 :205-225.
- Prada MA, Mutke S (2008). Guía técnica para la conservación genética y utilización del pino piñonero (*Pinus pinea*.) en España. Foresta, Madrid. 2 páginas.
- Prewein C, Vagner M, Wilhelm E (2004). Changes in water status and proline and abscisic acid concentrations in developing somatic embryos on pedunculate oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree Physiol* 24: 1251-1257.
- Puigdejarrols P, Fernández-Guijarro B, Toribio M, Molinas M (1996). Origin and early

- development of secondary embryos in *Quercus suber* L. Int J Plant Sci 157: 674-684.
- Puigdejarrols P, Mir G, Molinas M (2001). Ultrastructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.). Ann Bot 87:179-189.
- Pulido FJ, Díaz M, Hidalgo de Trucios SJ (2001). Size structure and regeneration of Spanish holm oak *Quercus ilex* forest and dehesas: effects of agroforestry use on their long-term sustainability. For Ecol Manag 146: 1-13.
- Pullman GS, Skryabina A (2007). Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. Plant Cell Rep 26: 873-887.
- Pullman GS, Bucalo K (2011). Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. Methods Mol Biol 710: 267-91.
- Pullman GS, Namjoshi K, Zhang Y (2003). Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation with abscisic acid, silver nitrate, and cytokinin adjustments. Plant Cell Rep 22: 85-95.
- Pullman GS, Chase KM, Skryabina A, Bucalo K (2008). Conifer embryogenic tissue initiation: improvements by supplementation of medium with D-xylose and D-chiro-inositol. Tree Physiol 29: 147-56.
- Rai MK, Shekhawat NS, Harish, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, Jaiswal U (2011). The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. Plant Cell Tiss Org Cult 106: 179-190.
- Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Paques M (2001). Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration of embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. In Vitro Cell Dev Biol 37: 29-34.
- Rancillac M, Klinger A, Klinger S, Millet B (1996). Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of *Quercus rubra*. Plant Growth Regul 20: 67-73.
- Ranganath RM (2004). Harnessing the developmental potential of nucellar cells: barriers and opportunities. Trends Biotechnol 22: 504-510.
- Reidiboym-Talleux L, Diemer F, Sourdioux M, CHapelain K, De March GG (1998). Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. Plant Cell Tiss Org Cult 55: 199-209.
- Renying Z, Guirong Q, Zongxiu S (2007). Transgene expression in Chinese sweetgum driven by the salt induced expressed promoter. Plant Cell Tiss Org Cult 88: 101-107.
- Roca WM, Mroginski LA (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, Centro Internacional

- de Agricultura Tropical (CLAT). Cali, Colombia pp: 152-153.
- Rode C, Lindhorst K, Braun HP, Winkelmann T (2012). From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta* 235: 995-1011.
- Rugh CI, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA (1998). Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nat Biotechnol* 16: 925-928.
- Saharan V, Yadav RC, Yadav NR, Ram K (2004). Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *Afric J Biotech* 3: 572-575.
- Salaj T, Blehová A, Salaj J (2007). Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiol Plant* 29: 225-231.
- Salajova 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.
- San-José MC, Corredoira E, Martínez MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez AM (2010). Shoot apex explants for induction of somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Rep* 29: 661-671.
- Sánchez MC, Martínez MT, Valladares S, Ferro E, Viéitez AM (2003). Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *J Plant Physiol* 160: 699-707.
- Sánchez MC, Martínez MT, Vidal N, San-José MC, Valladares S, Vieitez AM (2008). Preservation of *Quercus robur* germplasm by cryostorage of embryogenic cultures derived from mature trees and RAPD analysis of genetic stability. *CryoLetters* 29: 493-504.
- Sasaki N, Putz FE (2009). Critical need for new definitions of “forest” and “forest degradation” in global climate change agreements. *Putz Cons Lett* 2: 226-232.
- Schenk RH, Hildebrandt AC (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199-204.
- Schroeder HE, Schotz AH, Wardley-Richardson T, Spencer D, Higgins TJV (1993). Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol* 101: 751-757.
- Schumann G, Ryschika U, Schulze J, Klocke E (1995). Anatomy of somatic embryogenesis. En: Bajaj, YPS [ed.] *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed. Springer, Berlin 1: 71-86.
- Seppänen SK, Pasonen HL, Vauramo S, Vahala J, Toikka M, Kilpeläinen I, Setälä H, Teeri T. H, Timonen S, Pappinen A (2007). Decomposition of the leaf litter and

- mycorrhiza forming ability of silver birch with a genetically modified lignin biosynthesis pathway. *Appl Soil Ecol* 36: 100-106.
- Sheikholeslam SN, Weeks DP (1987). Acetosyringone promotes high frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 8: 291-298.
- Shen JL, Li Y, Jiang JZ, Chen SY (2008). Establishment of a transgenic system in fast-growing black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *For Stud China* 10: 243-252.
- Sheng JS, Citovsky V (1996). *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8: 1699-1710.
- Sheres B, Benfey PN (1999). Asymmetric cell division in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 505-537.
- Shimoda N, Toyoda-Yamamoto A, Nagamine J, Usami S, Katayama M, Sakagami Y, Machida Y (1990). Control of expression of *Agrobacterium vir* genes by synergistic action of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6684-6688.
- Shin DI, Podila GK, Huang Y, Karnosky DF (1994). Transgenic larch expressing genes for herbicide and insect resistance. *Can J For Res* 24: 2059-2067.
- Shin H, Kim YW (2012). Somatic embryogenesis of *Pinus rigida* x *P. taeda* and the relationship between the initiation of embryogenic tissue and zygotic embryo development. *Plant Biotechnol Rep* 6: 175-181.
- Silveira V, dos Santos ALW, Astarita LV, Nodari RO (2000). Somatic embryogenesis in *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. En: *Somatic embryogenesis in woody plants*. Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds). Kluwer Dordrecht Netherlands 6: 457-478.
- Smit C, Díaz M, Jansen P (2009). Establishment limitation of holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* (Desf.) Samp.) in a Mediterranean savanna-forest ecosystem. *Ann For Sci* 66: 511-517.
- Smith DL, Krikorian AD (1989). Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Am J Bot* 76: 1832-1843.
- 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 For Ser Inst p: 21.
- Sociedad Española de Ciencias Forestales (2010). *Situación de los Bosques y del Sector Forestal en España*. ISBN 978-84-937964-1-9.
- Stachel SE, Messens E, Montague MV, Zambryski P (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in

- Agrobacterium tumefaciens*. Nature 318: 624-629.
- Stasolla C, Yeung EC (2003). Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. Plant Cell Tiss Org Cult 74: 14-35.
- 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 38: 93-105.
- Steinitz B, Barr N, Tabib Y, Vaknin Y, Bernstein N (2010). Control of *in vitro* rooting and plant development in *Corymbia maculata* by silver nitrate, silver thiosulfate and thiosulfate ion. Plant Cell Rep 29: 1315-1323.
- Steward FC (1968). Growth and organization in plants: structure, development, metabolism, physiologys. Addison-Wesley Publishing Company, Reading.
- Strauss SH, Rottmann WH, Brunner AM, Sheppard LA (1995). Genetic engineering of reproductive sterility in forest trees. Mol Breed 1: 5-26.
- Strauss SH, Bradshaw HD (2001). Proceedings of the First International Symposium on Ecological and Societal Aspect of Transgenic Plantations. College of Forestry, Oregon State University.
- Sunderlikova V, Wilhelm E (2002). High accumulation of legumin and Lea-like mRNAs during maturation is associated with increased conversion frequency of somatic embryos from pedunculate oak (*Quercus robur* L.). Protoplasma 220: 97-103
- Sutton B (2002). Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. Ann For Sci 59: 657-661.
- Sutton WRJ (1999). Does the world need planted forests? New Zealand J For 44: 24-29.
- Suz LM, Martín MP, Oliach D, Fischer CR, Colina C (2008). Mycelial abundance and other factors related to true productivity in *Tuber melanosporum-Quercus ilex* orchards. FEMS Microbiol Lett 285: 72-78.
- Tang W (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation and assessment of factors influencing transgenic expression in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) Cell Res 11: 237-243.
- Tang W, Newton RJ (2003). Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. Plant Cell Rep 22: 1-15.
- Tang W, Sederoff R, Whetten R (2001). Regeneration of transgenic loblolly pine (*Pinus taeda* L.) from zygotic embryos transformed with *Agrobacterium tumefaciens*. Planta 213: 981-989.
- Tang W, Lin J, Newton RJ (2007). Okadaic acid and trifluoperazine enhance *Agrobacterium*-mediated transformation in eastern white pine. Plant Cell Rep 26: 673-682.

- Tautorus TE, Fowke LC, Dunstan DI (1991). Somatic embryogenesis in conifers. *Can J Bot* 69: 1873-1899.
- ten Hove CA, Heidstra R (2008). Who begets whom? Plant cell fate determination by asymmetric cell division. *Curr Opin Plant Biol* 11: 34-41.
- Tereso S, Miguel C, Zoglauer K, Valle-Piquera C, Oliveira MM (2006). Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic tissues from *Pinus pinaster* Portuguese genotypes. *Plant Growth Regul* 50: 57-68.
- Tereso S, Zoglauer K, Milhinos A, Miguel C, Oliveira MM (2007). Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiol* 27: 661-669.
- Thorpe TA (1980). Organogenesis *in vitro*: structural, physiological and biochemical aspects. En: Vasil IK (ed). International review of cytology, Suppl. 11A, perspectives in plant cell and tissue culture. Academic Press, New York 71-111.
- Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv* 26: 618-631.
- Tibok A, Power JB, Davey MR (1995). Progress in protoplast technology for woody angiosperms. En: Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol 1, History, Molecular and Biochemical Aspects, and Applications (Jain SM, Gupta PK, Newton RJ, eds). Kluwer Dordrecht Netherlands 143-166.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thornton S, Brettell R (1997). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J* 11: 1369-1376.
- Toribio M, Celestino C, Gallego J, Martínez I (2000). Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. En: Ríordáin FÓ (ed). Development of integrated systems for large-scale propagation of elite plants using *in vitro* techniques. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. ISBN 92-828-8599-2 pp: 236-237.
- Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004). Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Tiss Org Cult* 76: 283-287.
- Toribio M, Celestino C, Molinas M (2005). Cork oak, *Quercus suber* L. En: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Jain SM, Gupta PK (eds) *For Sci* 77: 445-458.
- Trick HN, Finer JJ (1998). Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Rep* 17: 482-488.
- Trontin JF, Harvengt L, Garin E, López-Vernaza M, Arancio L, Hoebeke J, Canlet F,

- Pâques M (2002). Towards genetic engineering of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ann For Sci* 59: 687-697.
- Trontin JF, Michel R, Germain A, Pillet-Emanuel H, Canlet F, Harvengt L (2007). Bar genetic transformation of maritime pine. En: IUFRO Tree Biotechnology Conference, June 3-8, 2007, Ponta Delgada, Azores, Portugal, No. SIX. p 20 (Abstract).
- Tukey JW (1953). Some selected quick and easy methods of statistical analysis. *Trans NY Acad Sci* 16:88-97.
- Tzfira T, Citovsky V (2002). Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends Cell Biol* 12: 121-129.
- Tzfira T, Yarnitzky O, Vainstein A, Altman A (1996). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis*. *Plant Cell Rep* 16: 26-31.
- Usami S, Okamoto S, Takebe I, Machida Y (1988). Factor inducing *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression is present in monocotyledonous plants. *Proc Natl Acad Sci* 85: 3748-3752.
- Valdés AE, Ordás RJ, Fernández B, Centeno ML (2001). Relationships between hormonal contents and the organogenic response in *Pinus pinea* cotyledons. *Plant Physiol Bioch* 39: 377-384.
- Valderrama AM, Arango R, Afanador L (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería Genética Natural Aplicada". *Rev Fac Nal Agr Medellín* 58: 2569-2585.
- Valladares S, Sánchez C, Martínez MT, Ballester A, Vieitez AM (2006). Plant regeneration through somatic embryogenesis from tissues of mature oak trees: true-to-type conformity of plantlets by RAPD analysis. *Plant Cell Rep* 25: 879-886.
- van Raemdonck D, Jaziri M, Boerjan W, Baucher M (2001). Advances in the improvement of forest trees through biotechnology. *Bulgarian J Bot* 134: 64-78.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez L, Willmitzer L, Rocha-Rosa M (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol Gen Genet* 220: 245-250.
- Vengadesan G, Pijut PM (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 97: 141-149.
- Verdeil JL, Hocher V, Huet C, Grosdemange F, Escoute J, Ferrière N, Nicole M (2001). Ultrastructural changes in coconut calli associated with the acquisition of embryogenic competence. *Ann Bot* 88: 9-18.
- Vieitez AM, Corredoira E, Martínez MT, San-José MC, Sánchez C, Valladares S, Vidal

- N, Ballester A (2012). Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur J Forest Res* 131: 519-539.
- Vihervuori L, Pasonen HL, Lyytikäinen-Saarenmaa P (2008). Density and composition of an insect population in a field trial of chitinase transgenic and wild-type silver birch (*Betula pendula*) clones. *Environ Entomol* 37: 1582-1591.
- Villalobos-Amador E, Rodriguez-Hernandez G, Perez-Molphe-Balch E (2002). Organogenesis and *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting in *P. maximartinezii* and *P. pinceana*. *Plant Cell Rep* 20: 779-785.
- 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, Bonga JM, Klimaszewska K, Owens J (1991). Comparison of larch embryogeny *in vivo* and *in vitro*. En: Ahuja MR (ed). *Woody plant biotechnology*. Plenum Press, New York pp: 139-155.
- von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002). Development pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 69: 223-249.
- Walter C, Grace LJ, Wagner A, White DWR, Walden AR, Donaldson SS, Hilton H, Gardner RC, Smith DR (1998). Stable transformation and regeneration of transgenic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Rep* 17: 460-468.
- Walter C, Grace LJ, Donaldson SS, Moody J, Gemmell JE, van der Maas S, Kvaalen H, Lönneborg A (1999). An efficient Biolistic transformation protocol for *Picea abies* embryogenic tissue and regeneration of transgenic plants. *Can J For Res* 29: 1539-1546.
- Wenck AR, Quinn M, Whetten RW, Pullman G, Sederoff R (1999). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of Norway spruce (*Picea abies*) and loblolly pine (*Pinus taeda*). *Plant Mol Biol* 39: 407-416.
- Whetten RW, Kellison R (2010). Research gap analysis for application of biotechnology to sustaining US forests. *J For* 108: 193-201.
- Williams EG, Maheswaran G (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryo group. *Ann Bot* 57: 443-462.
- Winnar W (1988). Clonal propagation of papaya *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 12: 305-310.
- Yantcheva A, Vlahoma M, Antanassov A (1998). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Rep* 18: 148-153.
- Yeung EC (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. En:

- Thorpe TA, ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Dordrecht Netherlands pp: 205-247.
- Young WTL, Abdullah JO, Mahmood M (2006). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. *Sci Hort* 109: 78-85.
- Zambryski P, Joos PH, Genetello C, Leemans J, Van Montagu M, Schell J (1983). Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2: 2143-2150.
- Zaragozá C, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I (2004). Regeneration of herbicide-tolerant black locust transgenic plants by SAAT. *Plant Cell Rep* 22: 832-838.
- Zegzouti R, Arnould MF, Favre JM (2001). Histological investigation of the multiplication step in secondary embryogenesis of *Quercus robur* L. *Ann For Sci* 58: 681-690.
- Zeng F, Qian J, Luo W, Zhan Y, Xin Y, Yang C (2010). Stability of transgenes in long-term micropropagation of plants of transgenic birch (*Betula platyphylla*). *Biotechnol Lett* 32: 151-156.
- Zoglauer K, Behrendt U, Rahmat A, Ross H, Taryono (2003). Somatic embryogenesis - the gate to biotechnology in conifers. En: *Plant Tiss Cult: 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Laimer M, Rucker W (eds). Springer-Verlag, Viena pp: 175-202.

