

Embriogénesis somática: alternativa para la producción de planta forestal elite

Itziar Aurora Montalbán¹,
Bixente Dorronsoro²,
José Manuel Oria Alústiza²,
Roberto Hurtado Arrizabalaga²,
Paloma Moncaleán¹

¹ Neiker-Tecnalia.

² Departamento de Promoción Económica, Medio Rural y Equilibrio Territorial. Dirección General de Montes y Medio Natural. Servicio de Montes y de Gestión de Hábitats. Diputación Foral de Gipuzkoa

La propagación vegetativa de especies forestales ha sido la mejor alternativa para la producción de planta forestal. Entre todos los métodos de propagación vegetativa, la embriogénesis somática es el desarrollado más recientemente, y está siendo utilizada por grandes empresas forestales para la producción de planta a escala comercial. El desarrollo de esta tecnología, además de otras como la crioconservación del tejido embriogénico, ofrece la posibilidad de desarrollar los programas de mejora genética de especies forestales contribuyendo a la silvicultura de alta productividad en las plantaciones. En los últimos años, Neiker, en colaboración con la Diputación Foral de Gipuzkoa, ha establecido una parcela demostrativa de planta de *Pinus radiata* procedente de embriogénesis somática y ha abordado la optimización y el desarrollo de este tipo de sistemas productivos en otras especies de coníferas de interés para la comunidad autónoma vasca.

Palabras clave: Cultivo in vitro, Embriones somáticos, Pinus, Propagación vegetativa

Los bosques absorben un décimo de las emisiones mundiales de carbono, con lo que contribuyen positivamente a la respuesta planetaria al cambio climático. Tanto el protocolo de Kioto como los planes nacionales de investigación y el Plan Forestal español instan a los gobiernos a incrementar la superficie forestal a través de procesos de forestación y reforestación, y a mejorar la eficiencia de los sistemas forestales en términos de biomasa. La superficie forestal española es de aproximadamente 27 millones de ha, lo que corresponde al 54 % del territorio nacional. En este

contexto, las coníferas tienen un papel decisivo tanto desde el punto de vista ecológico como forestal, ocupando una superficie de 6.000.000 ha de acuerdo con el Segundo Inventario Forestal Nacional (MAPAMA, 2018).

Desde hace varios años, la FAO viene instando a los investigadores al estudio de diferentes aspectos biotecnológicos en el ámbito forestal que contribuyan al incremento económico de forma sostenible. Uno de los principales objetivos de la biotecnología forestal es el desarrollo de técnicas que posibiliten la multiplicación ilimitada de genotipos elite. En la última década

se ejecutado numerosos proyectos de conservación y mejora forestal que, por lo general, persiguen un fin económico: mejorar cuantitativa y cualitativamente la producción forestal; en particular, en coníferas.

Pinus radiata (D. Don) es una de las especies más utilizadas en las plantaciones forestales a nivel mundial, lo que da una idea de su potencial económico (Rogers, 2002). El área de distribución de este pino en la cornisa cantábrica ocupa una franja estrecha de precipitaciones y temperaturas, ya que las heladas y la escasez de lluvias afectan negativamente a su crecimiento. De acuerdo con el Inventario Forestal de 2016 del País Vasco (Gobierno Vasco, 2018), las plantaciones de *P. radiata* ocupan más de 125.000 ha, el 32 % de la superficie forestal a nivel de esta comunidad y el 49 % de la superficie ocupada por esta especie a nivel nacional y contribuyen de forma importante al PIB agrario en esta comunidad. Por esta razón, la empresa NEIKER-Tecnalia inició en el año 1985 un programa de mejora genética en esta especie, que se centró fundamentalmente en aspectos relativos al crecimiento. Posteriormente se inició una línea de trabajo referente al cultivo de tejidos in vitro y técnicas organogénicas para la producción de planta élite con independencia de la edad del individuo élite seleccionado. Una vez superado este objetivo para las principales especies de pino de España (De Diego et al., 2008; 2010; 2011; Moncaleán et al., 2005; Montalbán et al., 2011), siguiendo las directrices de centros de investigación internacionales con los que se mantienen estrecha colaboración (Montalbán et al., 2016), durante los últimos años nos hemos centrado en el estudio de la embriogénesis somática como mejor alternativa para la producción de planta élite.

La embriogénesis somática es un proceso complejo en el que las células somáticas se convierten en células competentes capaces de producir un individuo completo (embrión somático) gracias a su totipotencia (Zeng et al., 2007). Este sistema presenta diversas ventajas, como:

- Elevado potencial de multiplicación (Montalbán et al., 2010).



Figura 1:
Tejido embriogénico
de *Pinus radiata*
en el momento de
su extrusión
del megagametofito



Figura 2: Líneas
embriogénicas de
Pinus radiata en fase
de proliferación

- Posibilidad de cultivo en biorreactores (Gupta y Hartle, 2015).
- Posibilidad de desarrollar semillas sintéticas/manufacturadas (Gupta y Hartle, 2015).
- Utilización de los cultivos embriogénicos como dianas para la transformación genética (Walter, 2004).

El tejido embriogénico, además, puede ser crioconservado, manteniendo su potencialidad mientras se realizan los ensayos de progenie (Park, 2002). La combinación de estas dos técnicas (embriogénesis somática y crioconservación) es la que ha hecho posible el desarrollo de la selvicultura clonal de alto valor (Weng et al., 2010) que se está llevando a cabo en países avanzados en el sector forestal.

El proceso de embriogénesis so-

mática comprende los siguientes pasos:

1. Iniciación de tejido embriogénico y establecimiento de masas embriogénicas (Fig. 1). En este punto, uno de los aspectos fundamentales es la selección del tejido inicial para obtener las primeras células embriogénicas susceptibles de ser multiplicadas *in vitro* en atmósfera controlada.
2. Proliferación de tejido embriogénico y conservación de las masas embriogénicas en estado óptimo (Fig. 2). Es esta etapa en la que puede llevarse a cabo la crioconservación de las masas embriogénicas a baja temperatura (-196 °C). Esta técnica permite la conservación de los recursos genéticos generados por un tiempo ilimitado.

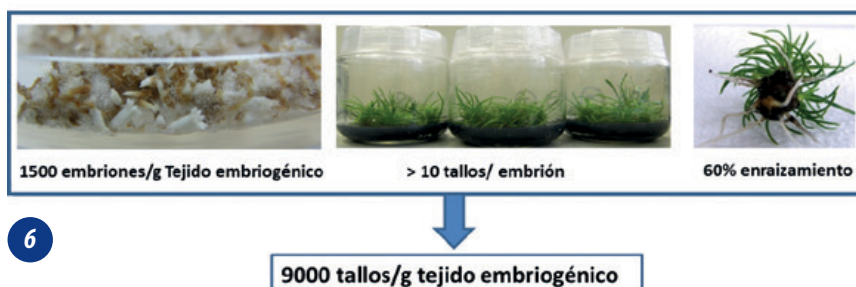


3. Maduración del tejido embriogénico (Fig. 3). Durante este periodo se diferencian los embriones somáticos que poseen las mismas características que el embrión zigótico procedente de la fusión gamética que se produce en la reproducción sexual.
4. Germinación de los embriones somáticos (Fig.4). En esta fase se desarrolla la primera raíz que convertirá al embrión en plántula somática. En este punto, las multinacionales están desarrollando métodos para la obtención de semillas manufacturadas que contienen en su interior los embriones somáticos y pueden plantarse por medio de maquinaria especial. Estas semillas permiten la conservación de embriones somáticos desarrollados, el abaratamiento de los costes de producción y el incremento de la supervivencia de las plantas somáticas tras su siembra (P. Gupta, comunicación personal).
5. Aclimatación de las plantas somáticas a condiciones *ex vitro* en un invernadero de atmósfera controlada (Fig. 5).
6. Instalación de la planta somática en campo (Fig. 6).

Aunque el proceso de embriogénesis somática se hace tradicionalmente en medios solidificados con agentes gelificantes, en la actualidad muchas son las empresas que producen planta forestal mediante embriogénesis somática en biorreactores o sistemas de inmersión temporal (Karun et al., 2015). Estos sistemas acortan notablemente los tiempos de producción, además de mejorar la eficiencia del proceso en términos de número de planta obtenida por cm² de cultivo.

Actualmente, empresas estadounidenses (p.e. Weyerhaeuser, MINICO, ARAUCO) y canadienses (p.e. Arborgen) están utilizando la embriogénesis somática como alternativa para la regeneración de planta élite, centrándose fundamentalmente en los siguientes géneros: *Abies*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga* y *Sequoia*.

Además, el desarrollo y la optimización de estas técnicas han facilitado que empresas multinacionales como las anteriormente citadas apliquen el modelo de gestión forestal sostenible a nivel mundial (Fenning et al. 2008).



En la actualidad, NEIKER, en colaboración con la Diputación de Gipuzkoa, trabaja en varios proyectos para optimizar sistemas de embriogénesis somática en otras especies de interés en la región como *Pinus strobus*. En este sentido, hemos logrado regenerar planta somática de individuos sobresalientes de esta especie y nos encontramos en disposición de instalarla en campo en los próximos meses (Fig. 7a, b). Además, uno de nuestros objetivos inmediatos es la puesta en marcha de estos sistemas de producción de planta clonal en dos especies de interés para el sector forestal del País Vasco, *Sequoia sempervirens* y *Cryptomeria japonica*.

Paralelamente, nuestro equipo de trabajo está centrando sus esfuerzos en obtener planta somática con diferentes tolerancias a condiciones de sequía mediante la manipulación de las condiciones físico-químicas al inicio del proceso embriogénico, es decir, responder a las siguientes preguntas: ¿Seremos capaces de producir planta con diferentes tolerancias a distintos grados de sequía mediante la manipulación de las condiciones ambientales al inicio del proceso embriogénico? ¿Podremos producir en el futuro plantas a la carta adaptadas a diferentes tipos de condiciones negativas de carácter abiótico? ¿Será posible responder a las demandas del sector derivadas de los cambios ambientales que lleve consigo el inminente escenario de cambio climático? A estas, y otras muchas preguntas, los equipos de investigación, en colaboración con los entes asociados, deben tratar de responder en el futuro, para asegurar la rentabilidad de los bosques, la sostenibilidad de los sistemas forestales y el bienestar social de las comunidades que viven en regiones forestales.

Figura 3: Embriones somáticos de *Pinus radiata* al final de su etapa de maduración

Figura 4: Plantula somática de *Pinus radiata* al final de su etapa de germinación

Figura 5: Planta somática de *Pinus radiata* al final de su etapa de aclimatación

Figura 6: Planta somática de *Pinus radiata* de 2 años de edad instalada en una parcela en Ataun (Gipuzkoa)

Figura 7: Eficiencia teórica del sistema de regeneración de plantas de *Pinus radiata* combinando la embriogénesis somática con la organogénesis



REFERENCIAS

- De Diego N, Montalbán IA, Fernández de Larrinoa E, Moncaleán P. 2008. In vitro regeneration of *Pinus pinaster* adult trees. *Can J For Res* 38: 2607–2615.
- De Diego N, Montalbán IA, Moncaleán P. 2010. In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* trees. *S Afr J Bot* 76: 158–162.
- De Diego N, Montalbán IA, Moncaleán P. 2011. Improved micropropagation protocol for maritime pine using zygotic embryos. *Scan J For Res* 26(3): 202–211.
- Fenning T, Walter C, Gartland KMA. 2008. Forest biotech and climate change. *Nature Biotech* 26: 615–616.
- Gobierno Vasco. 2018. Inventario forestal CAE 2016. <http://www.euskadi.eus/informacion/inventario-forestal-cae-2016/web01-a3estbin/es>.
- Gupta P, Hartle J. 2015. Progress on scale-up somatic embryogenesis and manufacture seed technology of conifer species at Weyerhaeuser. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 51, S13–S14.
- Karun A, Rajesh M, Muralikrishna KS. 2015. Somatic embryogenesis and bioreactors. *Curr Sci* 108(10), 1782–1783.
- MAPAMA. 2018. Segundo Inventario Forestal Nacional. <http://www.mapama.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/ifn2.aspx>
- Moncaleán P, Alonso P, Centeno ML, Rodríguez A, Fernández B, Ordás R. 2005. Organogenic response of *Pinus pinaster* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiol* 25 (1): 1–9.
- Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P. 2010. Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees-Struc Func* 24(6): 1061–1071.
- Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P. 2011. Testing novel cytokinins for improved in vitro adventitious shoots formation and subsequent ex vitro performance in *Pinus radiata*. *For* 84: 363–373.
- Montalbán IA, García-Mendiguren O, Moncaleán P. 2016. Somatic embryogenesis in *Pinus* spp. En MA Germanà M Lambardi (eds.). *In vitro embryogenesis in higher plants*, pp. 405–415. Springer, New York.
- Park YS. 2002. Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci* 59: 651–656.
- Rogers DL. 2002. In situ genetic conservation of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don): information and recommendations. Report 26. Davis, University of California.
- Weng Y, Tosh KH, Fullarton MS. 2010. Determining and projecting realised genetic gains: Results from early-stage spruce improvement programmes in New Brunswick, Canada. *New Zeal J For Sci* 40: 5–17.
- Walter C. 2004. Genetic engineering in conifer forestry: Technical and social considerations. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 40(5): 434–441.
- Zeng F, Zhang X, Cheng L, Hu L, Cao J, Guo X. 2007. A draft gene regulatory network for cellular totipotency reprogramming during plant somatic embryogenesis. *Genomics* 90(5): 620–628.