

La biotecnología forestal como herramienta clave para la mejora de *Pinus spp.* frente al cambio climático

Castander-Olarieta A.¹,
Montalbán I.A.¹,
Moncaleán P.¹

¹ NEIKER-BRTA

La sequía, las altas temperaturas y los patógenos se encuentran entre los principales factores de estrés que afectan tanto a bosques naturales como plantaciones forestales.

Muchos están siendo los esfuerzos tanto de la comunidad científica como de los organismos encargados de gestionar los montes para conseguir optimizar la calidad de las plantaciones que se instalan. El principal objetivo es aumentar las garantías de que crezcan en condiciones óptimas para asegurar un buen rendimiento económico para sus propietarios y además una conservación sostenible de los ecosistemas naturales. En este artículo, repasaremos las estrategias que hemos y estamos llevando a cabo en Neiker (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario) para tratar de obtener planta forestal con mejor adaptación a los principales estreses derivados del cambio climático a los que se enfrentan las especies forestales.

Palabras clave: embriogénesis somática, fisiología, micropropagación, organogénesis, *Pinus radiata*, técnicas moleculares.

El cambio climático está provocando fenómenos meteorológicos extremos, como aumento de las temperaturas, patrones de precipitaciones erráticos y sequías prolongadas, que tienen un impacto directo en la salud de los bosques. Su conservación es clave para mitigar los efectos del cambio climático (Anderegg et al., 2020). La producción de biomasa forestal aporta servicios críticos como el

secuestro de carbono y el suministro de productos madereros y no madereros esenciales para el bienestar humano y el crecimiento económico. No obstante, la productividad forestal fluctúa debido a variaciones temporales del clima como la disponibilidad de agua y la temperatura (McDowell et al., 2020). Por este motivo, urge desarrollar y aplicar métodos que incrementen no solo la supervivencia

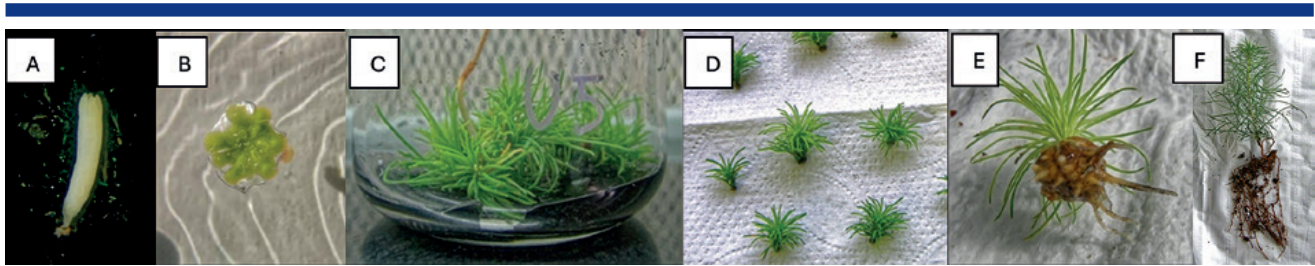


Fig. 1. Organogénesis de semillas de *Pinus radiata* in vitro. (A) Embrión maduro despojado del megagametofito y de la testa; (B) Embrión desnudo insertado en el medio de cultivo por la parte cotiledonar; (C) Tallos desarrollados in vitro a partir de (B); (D) Tallos elongados y separados del explanto inicial; (E) Tallos enraizados; (F) Planta aclimatada y endurecida en condiciones ex vitro

de los bosques sino también la calidad de sus productos estableciendo planta forestal élite. En este sentido, una de las mejores alternativas para lograr obtener planta de calidad es la propagación vegetativa. Sin embargo, la mayor parte de las características deseables (crecimiento, horizontalidad de las ramas, tolerancia a diferentes estreses, etc.) se manifiestan cuando el individuo ha entrado en la fase adulta, y por lo tanto ha perdido la capacidad de ser propagado de forma convencional (estaquillado, injerto, etc.). Por este motivo, los países avanzados en el sector forestal comenzaron hace décadas a combinar los procedimientos tradicionales de mejora (huertos semilleros, cruces controlados, etc.) con herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* a través de la organogénesis o la embriogénesis somática.

Hace ya más de 20 años, en NEIKER comenzamos a desarrollar técnicas de organogénesis *in vitro* a partir de semillas maduras de las principales especies de pino plantadas en el arco atlántico: *Pinus radiata*, *P. pinea*, *P. pinaster*. La Figura 1 (A, B, C, D, E, F) muestra todas las fases del proceso organogénico en *Pinus radiata*.

Pese al éxito obtenido mediante este sistema de propagación, debido al efecto de los parentales, en muchas ocasiones no se lograba reproducir en la producción clonal a partir de semillas las características élite del árbol donador. En este punto, en nuestro laboratorio decidimos abordar el difícil reto de tratar de re-

producir exactamente el genotipo del árbol élite. Para ello, comenzamos a desarrollar una técnica de organogénesis a partir de yemas adultas. Seleccionamos individuos élite, y en época de parada de crecimiento recogimos yemas de crecimiento y las introdujimos *in vitro* en presencia de altas concentraciones de reguladores de crecimiento para lograr desarrollar múltiples tallos adventicios genéticamente idénticos al árbol madre. Esta técnica resultó exitosa en *P. radiata* (Montalbán et al., 2013) (Figura 2 A, B, C, D, E), entre otras especies, como *P. pinea*, *P. pinaster* y *P. sylvestris*.

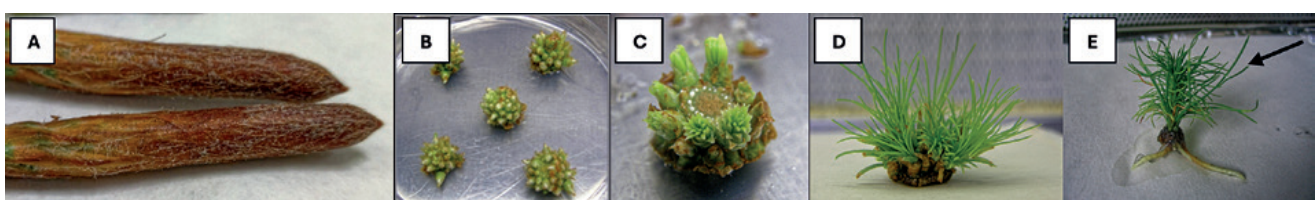
Sin embargo, tras algunos meses en condiciones *in vitro*, los tallos revigorizados perdían su potencial para ser enraizados y aclimatados, y comenzaban a mostrar características de material adulto (acículas secundarias, crecimiento plagiotrópico, etc.) (Figura 2 E). Esto, a su vez, dificultaba la posibilidad de estaquillarlos con éxito para aumentar la eficiencia del proceso. Por ese motivo, en muchos países de importancia a nivel forestal (Canadá, USA, Chile, etc.) empresas como ARBORGEN, CELLFOR, etc. comenzaron a utilizar una técnica denominada embriogénesis somática. La embriogénesis somática es un proceso mediante el cual las plantas pueden generar estructuras bipolares, llamadas embriones somáticos, a partir de una célula somática, sin mediar reproducción sexual. Estos embriones somáticos, en condiciones adecuadas, pueden generar planta completa y funcional. Este proceso

posee un enorme potencial para la micropropagación de especies leñosas; además, los tejidos somáticos embriogénicos son susceptibles de ser conservados a temperaturas ultrabajas para su posterior utilización como diana para la edición/transformación genética, o para el desarrollo de la silvicultura multivarietal (Park et al., 2016), entre otras aplicaciones. Una de las ventajas de la silvicultura multivarietal es que permite la entrada en fase comercial de las variedades obtenidas en los programas de mejora genética mucho antes que si vinieran de un programa de mejora tradicional (Park et al., 2016).

En el laboratorio de cultivo de tejidos de NEIKER optimizamos las diversas fases del proceso embriogénico (Figura 3 A, B, C, D, E, F) con el objetivo de hacerlo mucho más eficiente.

Para ello, estudiamos la importancia del árbol donador y el estado de desarrollo óptimo del material inicial (Montalbán et al., 2012), las consecuencias de la conservación en frío de los conos inmaduros (fuente de

Fig. 2. Organogénesis in vitro de yemas de material adulto de *Pinus radiata*. (A) Yemas de crecimiento de árboles adultos. (B) Secciones de las yemas introducidas in vitro. (C) Tallos desarrollados a partir de las secciones de yemas inducidas. (D) Tallos en fase de elongación. (E) Tallos enraizados que ya muestran algunas características de árboles adultos (flecha negra)



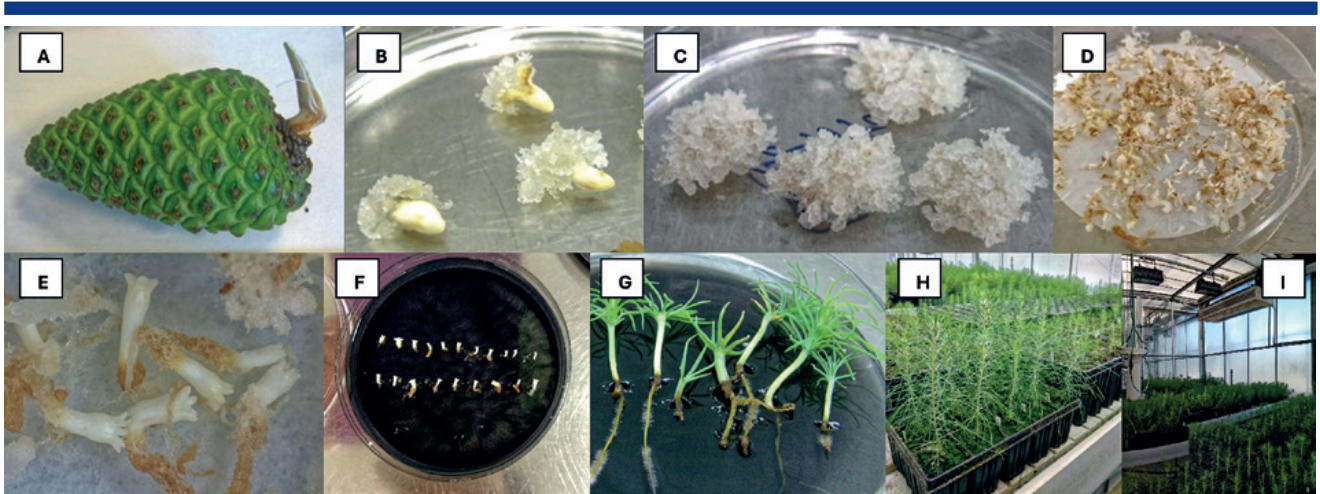


Fig. 3. Proceso de embriogénesis somática en *Pinus radiata*. (A) Conos inmaduros de los que se extraerán los megagametofitos. (B) Megagametofitos con embrión inmaduro extruyendo tejido embriogénico. (C) Tejido embriogénico en proliferación. (D) Embriones somáticos desarrollados a partir del tejido embriogénico. (E) Embriones somáticos germinados. (F) Plántulas somáticas en fase de aclimatación en el invernadero

embriones inmaduros) en el posterior éxito del proceso (Montalbán et al., 2015), el efecto de diferentes combinaciones de azúcar, determinados reguladores de crecimiento y aminoácidos en el proceso de maduración del tejido embriogénico (Montalbán et al., 2010), la implicación de la presencia/ausencia de diferentes reguladores de crecimiento en esta última fase del proceso (Castander-Olarieta et al., 2023) y la influencia del tipo de contenedor de cultivo en la germinación de los embriones somáticos (Montalbán y Moncaleán, 2019). Asimismo, conseguimos poner a punto esta técnica en otras especies de pino como *Pinus halepensis*, híbridos entre *P. radiata* y *Pinus attenuata* y *P. canariensis*, en las que estas técnicas no habían sido desarrolladas con anterioridad.

A pesar de haber mejorado la eficacia del proceso gracias a los estudios de optimización previamente descrito, existían árboles parentales o líneas genéticas específicas de las que se obtenía poco material. En estos casos, las tasas de iniciación, proliferación, maduración y conversión a planta eran muy bajas. Para maximizar la eficiencia del proceso, desarrollamos un método combinado (embriogénesis somática/conservación a 4 °C/organogénesis) mediante el cual llegamos a superar estos cuellos de botella (Montalbán et al., 2011).

En este punto, fuimos conocedores de los trabajos realizados en *Picea abies* en los que se describía que la temperatura durante la embriogénesis cigótica parecía establecer una memoria adaptativa (basada en cambios epigenéticos, es decir, modificaciones

de la expresión de genes sin alteraciones en la secuencia del ADN) que podía regular la fenología de las yemas años después y, por tanto, la aclimatación al frío de dichas plantas (Kvaalen y Johnsen, 2008). Basándonos en dichos estudios, nos planteamos la hipótesis de que modificar la temperatura y la disponibilidad de agua durante la fase inicial del proceso embriogénico en especies de *Pinus* podría alterar la tolerancia al estrés de las plantas generadas. Inicialmente, pudimos comprobar que la aplicación de temperaturas altas durante la fase de iniciación del tejido embriogénico daba como resultado la obtención de un mayor número de embriones somáticos, aumentando la eficiencia del proceso. Asimismo, temperaturas elevadas provocaban alteraciones en la morfología de las masas embriogénicas y de los embriones somáticos en *P. radiata* (Castander-Olarieta et al., 2019) y *P. halepensis* (Pereira et al., 2020).

Posteriormente, nos centramos en el análisis de procesos fisiológicos y moleculares relacionados con la mejor adaptación de las plantas al estrés. A nivel metabólico, se observó que los tejidos embriogénicos iniciados a altas temperaturas presentaban diferencias significativas en el perfil de algunas citoquininas (Castander-Olarieta et al., 2021), fitohormonas relacionadas con los procesos de desarrollo vegetal.

Del mismo modo, las altas temperaturas durante la fase de iniciación del tejido embriogénico promovieron la acumulación de proteínas involucradas en los procesos de defensa contra el estrés oxidativo, en la división celular, en la organización de las paredes celulares

y en la síntesis de aminoácidos específicos como la isoleucina. También se vieron modificaciones en las concentraciones de azúcares solubles en *P. radiata* (Castander-Olarieta et al., 2022) y *P. halepensis* (Pereira et al., 2023).

La temperatura también provocó la alteración de la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés a lo largo de las diferentes fases de la embriogénesis somática en ambas especies, así como un descenso del nivel de metilación global del ADN (marca epigenética) en masas embriogénicas y plantas somáticas de pino radiata procedentes de las temperaturas más extremas (Castander-Olarieta et al., 2020).

Para estudiar la posible mejora en la adaptación de las plantas a situaciones de estrés, las plantas somáticas regeneradas a partir de líneas celulares embriogénicas iniciadas a altas temperaturas se sometieron a estrés por sequía en condiciones controladas de invernadero. Los resultados mostraron que el régimen de temperatura durante la inducción del tejido embriogénico puede modular tanto el crecimiento de las plantas en condiciones control (libres de estrés) como su tolerancia a la sequía, aunque en este caso, las plantas procedentes de tratamientos a altas temperaturas eran más sensibles al estrés, presentando tasas de supervivencia y actividad fotosintética más bajas (Castander-Olarieta et al., 2020).



Fig. 4. (A) 1ª Plantación de *Pinus radiata* somático realizada en Europa en el año 2019 en Ataun (Gipuzkoa). (B) Plantación de *Pinus radiata* somático establecida en 2021 en Laudio (Araba). Estas plantaciones serán analizadas anualmente para poder determinar la evolución de las plantas somáticas

Estos resultados confirmaron que las condiciones fisicoquímicas durante el proceso de la embriogénesis somática pueden crear una memoria a largo plazo que modifique las características de las plantas producidas, abriendo la puerta a nuevos estudios para optimizar las condiciones de cultivo y así obtener plantas más productivas y mejor adaptadas al cambio climático.

Tras los estudios de laboratorio e invernadero, los árboles somáticos fueron trasladados al campo. Por primera vez en Europa, en el año 2019 y 2021 se realizaron plantaciones de *P. radiata*

somático en Ataun (Gipuzkoa) (Figura 4A) y Laudio (Araba) (Figura 4B), respectivamente. Posteriormente, y con planta procedente de experimentos complementarios, se ha realizado una tercera plantación mixta (*P. radiata* y *P. pinaster*) en el año 2023. Estas plantaciones actuarán como laboratorios de campo y nos servirán para monitorizar si los cambios epigenéticos se mantienen en el tiempo, si estos afectan a la supervivencia, tasa de crecimiento y calidad de madera, y si transmiten algún rasgo a la descendencia una vez los árboles hayan fructificado.

A lo largo de este artículo, hemos dado un repaso a cómo la biotecnología está ayudando a desarrollar nuevas estrategias para la mejora de especies de interés forestal. Estos experimentos posibilitan conocer cuáles son los mecanismos que utilizan las plantas para adaptarse con mayor eficiencia a los cambios derivados del estrés abiótico, y ofrecen la oportunidad de ser utilizados para la inducción de tolerancias al estrés biótico, otro efecto del cambio climático que está adquiriendo cada vez más importancia, tal y como ejemplifica la expansión de las enfermedades de las bandas roja y marrón en Euskadi que están causando grandes pérdidas en las plantaciones de pino radiata.

Referencias

- Anderegg, R.L., Trugman, A.T., Badgley, G., Anderson, C.M., Bartuska, A., Gais, P., Cullenward, D., Field, C.B., Freeman, J., Goetz, S.J., Hicke, J.A., Huntzinger, D., Jackson, R.B., Nickerson, J., Pacela, S., Randerson, J.T. 2020. Climate-driven risks to the climate mitigation potential of forests. *Science* 368: 1327.
- Castander-Olarieta, A., Montalbán, I.A., de Medeiros, E., Moncaleán, P. 2019. Effect of thermal stress on tissue ultrastructure and metabolite profiles during initiation of radiata pine somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-19.
- Castander-Olarieta, A., Pereira, C., Meijón, M., Moncaleán, P., Montalbán, I.A. 2020. Induction of radiata pine somatic embryogenesis at high temperatures provokes a long-term decrease in DNA methylation/hydroxymethylation and differential expression of stress-related genes. *Plants* 9(12): 1-16.
- Castander-Olarieta, A., Moncaleán, P., Pereira, C., Pencik, A., Petrik, I., Novak, O., Strand, M., Goicoa, T., Ugarte, D., Montalbán, I.A. 2021. Cytokinins are involved in drought tolerance of *Pinus radiata* plants originating from embryonal masses induced at high temperatures. *Tree Physiology* 41(6): 912-926.
- Castander-Olarieta, A., Pereira, C., Mendes, V.M., Correia, S., Manadas, B., Canhoto, J., Montalbán, I.A., Moncaleán, P. 2022. Thermopriming-associated proteome and sugar content responses in *Pinus radiata* embryogenic tissue. *Plant Science* 321: 111327.
- Castander-Olarieta, A., Moncaleán, P., Montalbán, I.A. 2023. Multi-strategy approach towards optimization of maturation and germination in radiata pine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ culture* 153: 173-190.
- Do Nascimento, M., Montalbán, I.A., Llamazares, D., Ugarte, D., Goicoa, T., Moncaleán, P. 2022. High temperature and water deficit cause epigenetic changes in somatic plants of *Pinus radiata* D. Don. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 151(1): 107-121.
- Kvaalen, H., Johnsen, Ø. 2008. Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. *New Phytology* 177: 49-59.
- McDowell, N.G., Allen, C.D., Anderson-Teixeira, K., Aukema, B.H., Bond-Lamberty, B., Chini, L., Clark, J.S., Dietze, M., Grossiord, C., Hanbury-Brown, A., Hurr, G.C., Jackson, R.B., Johnson, D.J., Kueppers, L., Lichstein, J.W., Ogle, K., Poulter, B., Pugh, T.A., Seidl, R., Turner, M.G., Uriarte, M., Walker, A.P., Xu, C. 2020. Pervasive shifts in forest dynamics in a changing world. *Science* 368: 6494.
- Montalbán, I.A., De Diego, N., Moncaleán, P. 2010. Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees-Structure and Function* 24: 1061-1071.
- Montalbán, I.A., De Diego, N., Igartua, E., Moncaleán, P. 2011. A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnology Reports* 5 (2): 177-186.
- Montalbán, I.A., 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 adjustment. *Acta Physiologiae Plantarum* 34 (2): 451-460.
- Montalbán, I.A., Novak, O., Rolčik, J., Strnad, M., Moncaleán, P. 2013. Endogenous cytokinin and auxin profiles during in vitro organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physiologia Plantarum* 148(2): 214-231.
- Montalbán, I.A., García-Mendiguren, O., Goicoa, T., Moncaleán, P. 2015. Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New Forest* 46: 309-317.
- Montalbán, I.A., Moncaleán, P. 2019. Rooting of *Pinus radiata* somatic embryos: factors involved in the success of the process. *Journal of Forest Research* 21(3): 143-150.
- Park, Y.S., Beaulieu, J., Bousquet, J. 2016. Multi-varietal Forestry integrating genomic selection and somatic embryogenesis. En: Park y.S., Bonga J.M., Moon H.K (eds.) *Vegetative Propagation of Forest Trees. National Institute of Forest Science (NIFoS)*. 302-322. Seoul, Korea.
- Pereira, C., Castander-Olarieta, A., Montalbán, I.A., Moncaleán, P. 2020. Embryonal masses induced at high temperatures in Aleppo Pine: Cytokinin profile and cytological characterization. *Forests* 10: 2-26.
- Pereira, C., Montalbán, I.A., Pedrosa, A., Tavares, J., Pstryakov, A., Bogdanchikova, N., Canhoto, J., Moncaleán, P. 2021. Regeneration of *Pinus halepensis* (Mill.) through organogenesis from apical shoot buds. *Forests* 12(3): 36312.
- Pereira, C., Castander-Olarieta, A., Montalbán, I.A., Mendes, V.M., Correia, S., Pedrosa, A., Manadas, B., Moncaleán, P. 2023. Proteomic and metabolic analysis in *Pinus halepensis* Mill. embryonal masses induced under heat stress. *International Journal of Molecular Sciences* 24(8): 721124.