



Factores implicados en la embriogénesis somática: El caso de *Pinus radiata*

Olatz García Mendiguren (2017)

Factores implicados en la embriogénesis somática: El caso de *Pinus radiata*

Directoras

Paloma Moncaleán

Itziar A Montalbán

Olatz García Mendiguren (2017)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1- Situación de los bosques	3
2- Especie modelo: <i>Pinus radiata</i> D. Don	5
3- Biotecnología forestal	7
3.1. Organogénesis	10
3.2. Embriogénesis somática.....	11
3.2.1. Tejido juvenil.....	11
3.2.1.1. Iniciación.....	12
3.2.1.2. Proliferación.....	13
3.2.1.3. Maduración	13
3.2.1.4. Germinación y conversión a planta.....	14
3.2.1.5. Aclimatación <i>ex vitro</i> de los explantos.....	14
3.2.2. Tejidos adultos.....	17
4- Importancia de las proteínas como marcadores moleculares	19
5- Planteamiento general y objetivos.....	21
6- Referencias	23
CAPÍTULO 1: Environmental conditions at the initial stages of <i>Pinus radiata</i> somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos	39
1- Introduction	41
2- Material and methods	43
2.1. Plant material.....	43
2.2. Experiment 1- Initiation	43
2.3. Experiment 2- Proliferation.....	47
3- Results	50
4- Discussion.....	58
5- References	61
CAPÍTULO 2: Environmental conditions at maturation stage of <i>Pinus radiata</i> somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos	65
1- Introduction	67

2-	Material and methods	68
2.1.	Plant material.....	68
2.2.	Initiation and proliferation.....	69
2.3.	Maturation experiment	69
2.4.	Germination of somatic embryos	69
2.5.	Data collection.....	70
3-	Results	70
4-	Discussion.....	74
5-	References	78

CAPÍTULO 3: Different environmental conditions at initiation of radiata pine somatic embryogenesis determine the protein profile of somatic embryos83

1-	Introduction	85
2-	Material and methods	87
2.1.	Plant material.....	87
2.2.	Water availability in cultura media	89
2.3.	Protein extraction.....	89
2.4.	2-D electrophoresis and image analysis	90
2.5.	Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry	91
2.5.1.	Tryptic digestión.....	91
2.5.2.	Mass spectrometry.....	91
2.5.3.	Database search	91
3-	Results	92
3.1.	Characterization of ECLs	92
3.2.	Water availability	93
3.3.	Comparison of 2D Gels and protein identification.....	94
4-	Discussion.....	100
5-	Conclusions	105
6-	Referencces.....	106

CAPÍTULO 4: Gene expression profiling of shoot derived calli from adult radiata pine and zygotic embryo-derived embryonal masses.....113

1-	Introduction	115
2-	Material and methods	117
2.1.	Tissue culture of shoot explants	117

2.2. Induction of embryogenic cultures from immature zygotic embryos	119
2.3. Morphological characterization.....	119
2.4. Gene expression profiling using absolute real-time qPCR.....	120
2.5. Statistical analysis of expression data	122
3- Results and discussion	123
3.1. Experimental approach.....	123
3.2. Shoot explants responses.....	124
3.2.1. Tissue morphology and impact of PGR composition.....	124
3.2.2. Explant position effect (apical versus basal)	125
3.2.3. Genotype effect and culture age	126
3.3. Expression profiling of embryonal masses.....	126
3.3.1. Reference gene	127
3.3.2. Mitotic activity	129
3.3.3. Embryogenic markers.....	130
3.3.4. KNOX meristematic markers	131
3.3.5. Vegetative marker WOX4.....	132
3.4. Expression profiling of primordial and axillary shoot-derived calli.....	133
3.4.1. Reference gene	134
3.4.2. Mitotic activity	134
3.4.3. Expression of embryogenic and meristematic markers.....	135
4- Conclusions	138
5- References	140
DISCUSIÓN GENERAL	147
CONCLUSIONES	157

ABREVIATURAS

2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

2-D: Dos dimensiones

ABA: Abscisic acid

ANOVA: Analysis of variance

BA: benzyladenine

ECLs: Embryogenic cell lines

EDM: Embryo development medium

EM: Embryonal mass

EMs: Embryonal masses

HI: Embryogenic cell lines from treatments producing high percentages of initiation

LEC: genes leafy cotyledon

LI: Embryogenic cell lines from treatments producing low percentages of initiation

LP: Medio Quorin Lepoivre (Quorin and Lepoivre medium)

LRE: Linear regression of efficiency

MS: Espectrometría de masas

MVF: Silvicultura multivarietal

NAA: Naphthaleneacetic acid

PGR: Plant growth regulators

SE: Somatic embryogenesis

se: Somatic embryos

SERK: receptor-like quinasa

WOX: homeobox WUSCHELL

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.-Situación de los bosques

Los bosques son vitales para el mantenimiento del bienestar ecológico, social, cultural y económico. Éstos juegan un papel fundamental en el ciclo global del carbono, así como en la protección de los suelos y recursos hídricos, controlan la desertificación y proporcionan el hábitat para muchas plantas y animales (FAO 2010). Además, los bosques son una pieza clave en el control del cambio climático (Schimel 2014), ya que secuestran grandes cantidades de carbono atmosférico (Fenning et al. 2008). Por otra parte, los bosques proveen la materia prima para innumerables empresas abasteciendo de madera, pulpa, papel y envases. Asimismo, desde los últimos años, proporcionan la materia prima para la producción de bioenergía, biocombustibles y biomateriales (Hall y Jack 2014). Por último, son importantes para actividades recreativas, el turismo y el bienestar cultural (Hägman et al. 2013).

La propiedad de los bosques en Europa está muy repartida, existen más de 10 millones de propietarios forestales que, junto con innumerables trabajadores de zonas rurales y de las industrias de transformación, dependen del manejo sostenible de los bosques para asegurar su renta (Montalbán 2011). Ante el previsible aumento del uso de la madera y otros productos forestales a medida que las poblaciones se expanden, el reciclado de papel, el establecimiento de plantaciones forestales intensivas y la silvicultura altamente productiva incorporando los métodos más avanzados para la mejora genética, se están considerando como la mejor defensa de los ecosistemas amenazados por deforestación. A este respecto, desde el protocolo de Kyoto (http://unfccc.int/kyoto_protocol/status_of_ratification/items/2613.php), se insta a los

gobiernos tanto a incrementar la superficie forestal como a mejorar la eficiencia de los sistemas forestales. Además, el Plan Forestal Español (2002-2032) refleja la necesidad de utilizar planta de calidad en los programas silvícolas en respuesta al mencionado aumento de la demanda de madera de coníferas, a los incendios y a las enfermedades que sufren nuestros bosques.

El consumo medio por habitante y año de productos de todo tipo que emplean materias primas de origen forestal ha crecido de forma continuada durante las últimas décadas en todos los países del mundo, particularmente en los más desarrollados (Celestino et al. 2005). Debido al predecible aumento del consumo mundial de madera, se cree bastante improbable que la actual superficie forestal pueda satisfacer dichas demandas. Por esta razón se ha sugerido que para 2030, un 50-75% del suministro de madera tendrá que proceder de la silvicultura (Sedjo 2004).

La superficie forestal española es de 27,7 millones de hectáreas (ha), lo que corresponde al 55% del territorio nacional. En este contexto, las coníferas tienen un papel decisivo tanto desde el punto de vista ecológico como forestal. Los pinos están representados en España por siete especies autóctonas (Martín y González 2000): pino negro (*Pinus uncinata*), pino silvestre o albar (*P. sylvestris*), pino laricio o salgareño (*P. nigra*), pino marítimo, negral, rodeno o resinero (*P. pinaster*), pino piñonero (*P. pinea*), pino carrasco (*P. halepensis*), y pino canario (*P. canariensis*). Existen otras Pináceas introducidas con fines de producción maderera en repoblaciones forestales, o con carácter ornamental. De ellas, sólo el pino radiata, insigne o de Monterrey (*P. radiata*) alcanza una notable significación territorial (Ferrerías y Arozena 1987).

Las especies del género *Pinus* citadas ocupan en España una superficie de 6 millones de ha (Inventario Forestal Nacional, 1997-2000,

<http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/inventarios/ifn/index.htm>.

2.-Especie modelo: *Pinus radiata* D. Don

El pino radiata (*Pinus radiata* D. Don) (Figura 1A) es un pino originario de la costa del pacífico de Norteamérica, hallándose su hábitat natural reducido a cinco poblaciones separadas, tres a lo largo de la costa de California y dos en las islas mexicanas de Cedros y Guadalupe, en la costa de Baja California (Rogers 2002).



Figura 1. A) Porte de un ejemplar de *Pinus radiata* B) Detalle de un cono y acículas de *Pinus radiata*

Estas poblaciones ocupan 5300 ha (Burdon 2001). Las situadas en la zona del continente se sitúan en una región climática caracterizada por inviernos suaves con ausencia de heladas y temperaturas estivales moderadas (Lindsay 1937) y las situadas en las islas reciben menores precipitaciones y soportan temperaturas algo más extremas (Libby et al. 1968). Desde los últimos 150 años, el *P. radiata* ha sido introducido en numerosas áreas del mundo, convirtiéndose en una de las especies de pino más plantadas del mundo (Lavery y Mead 1998). De hecho, las plantaciones de pino radiata ocupan en el mundo 4 millones de ha. Actualmente, en el Hemisferio Sur las plantaciones de esta especie ocupan 1400000 ha en Chile, 1540000 ha en Nueva Zelanda, 770000 ha en Australia y 570000 ha en Sudáfrica (Mead 2013). En el Hemisferio Norte, además de su área natural californiana y una reducida presencia en Calabria (Italia), en España el pino radiata ocupa 280000 ha, y su distribución se

encuentra principalmente localizada en la Cornisa Cantábrica (Fig. 2). El 56% de esta superficie corresponde a la Comunidad Autónoma del País Vasco (Michel 2003).

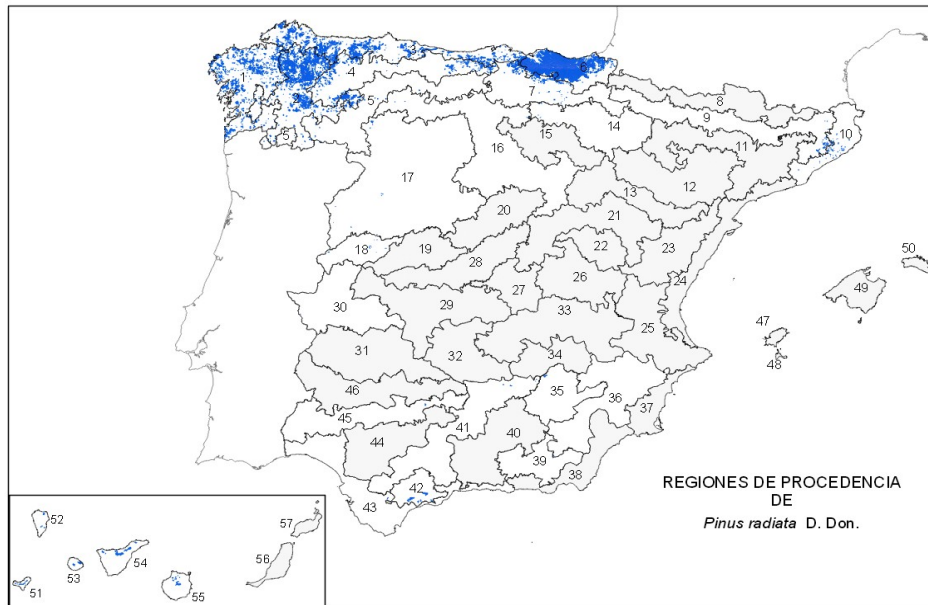


Figura 2. Distribución de las regiones de procedencia de *Pinus radiata* D. Don. Imagen tomada del Inventario Forestal Nacional (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente)

Es una especie de crecimiento rápido, monoica, de talla grande a muy grande, en España puede sobrepasar los 30 m, alcanzando en otros países hasta 50 m. Las acículas con una longitud entre 7 y 15 cm, son persistentes, simples, flexibles y de color verde brillante, se hallan reunidas en grupos de tres (salvo la variedad "binata" de las islas Guadalupe y Cedros que lo hacen predominantemente en fascículos de dos) (Figura 1B). Las piñas muy asimétricas y subsentadas, poseen un tamaño de 7-14 x 5-8 cm, son serótinas, su peso medio es de 100 g y contiene entre 70 y 120 semillas. Las semillas miden de 5 a 8 mm, de aspecto negruzco, con ala estrecha de 15 a 20 mm y cabeza lignificada, maduran en otoño del año siguiente al de la floración, y la producción de semillas es máxima cuando el árbol alcanza entre 15-20 años de edad. El pino radiata se cultiva principalmente a baja altitud, por debajo de los 800 m, en zonas de clima suave y húmedo.

Esta especie proporciona una madera homogénea que la hace muy apreciada para la industria de carpintería y mueble, de estructuras de madera y de embalaje. Debido a su rapidez de crecimiento, es manejado en la península en turnos de corta en torno a 30 años. Scott (1962) cifraba su crecimiento en $9-20 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$, aunque tras los programas de mejora genética desarrollados en algunos países, se ha aumentado esta cifra hasta alcanzar $25-30 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ (Burdon y Moore 1997).

3.-Biotecnología forestal

Como hemos dicho anteriormente, la utilización de productos forestales está incrementándose paralelamente al incremento de población y al desarrollo económico. Se espera que la demanda de biomasa forestal sufrirá también un incremento en el futuro ya que por un lado es un método de captura del dióxido de carbono atmosférico (Scholes y Noble 2001), y por otro una fuente alternativa de energías renovables (Campbel et al. 2003). Una vía para incrementar la productividad forestal es el aumento de la productividad en las plantaciones forestales (Kanowski 1997). Estas plantaciones de alto rendimiento podrían cumplir con los dos objetivos planteados, mitigación del cambio climático y suministro de productos y servicios tradicionales (Fenning et al. 2008). El uso de genotipos seleccionados es una de las estrategias más importantes en los programas de mejora genética forestal (Park y Bonga 1992). En este sentido, la biotecnología vegetal juega un papel fundamental, definiéndose como el conjunto de aplicaciones tecnológicas que utilizan sistemas biológicos para la obtención o modificación de determinados productos para un uso específico (Canhoto 2010).

En el ámbito forestal, el desarrollo de la biotecnología se ha centrado fundamentalmente en los siguientes aspectos:

- Desarrollo de técnicas de propagación vegetativa (Nehra et al. 2005).
- Búsqueda de herramientas moleculares que nos permitan la obtención de marcadores moleculares para caracteres de interés (Castell y Ernst 2012).
- Obtención de herramientas que permitan la transformación genética de árboles para lograr individuos con resistencia a enfermedades, a estreses bióticos, etc. (Merkle et al. 2007).

Los métodos de propagación vegetativa se han utilizado desde hace años en el área forestal (Zobel y Talbert 2003). Con el uso de estos métodos es posible la regeneración de múltiples copias de una planta donadora. Los métodos tradicionales de propagación vegetativa son el estaquillado y el injerto, aunque este último se utiliza fundamentalmente para el establecimiento de huertos semilleros y no se usa en la actualidad como método de propagación clonal (Bonga 2015) ya que, por ejemplo en coníferas, es común observarse rechazo de la púa (Miller y DeBell 2013). Aunque hoy en día se sigue utilizando con éxito para algunas especies (Bonga 2015), estas técnicas clásicas presentan algunos problemas, como que cuando los árboles muestran las características de interés han perdido la capacidad de ser multiplicados asexualmente. El cambio de fase de un árbol, es decir, el paso de edad juvenil a edad adulta, supone una disminución en la capacidad de enraizamiento de sus estaquillas. Además, la producción de planta clonal por métodos tradicionales también suele suponer el requerimiento de superficies muy amplias para su cultivo (Rezende et al. 2014).

Además, los programas de mejora basados en el establecimiento de huertos semilleros producen alrededor de un 10% de incremento en volumen por generación (Tosh 2012). Aunque los programas de mejora convencional proporcionan un interesante incremento en productividad, las plantaciones forestales en el futuro se enfrentan a nuevos retos que

deberán ser analizados desde un punto de vista más amplio y flexible (Park 2014). Los recientes avances en técnicas biotecnológicas están favoreciendo el desarrollo de nuevo programas de mejora que incorporan técnicas como la micropropagación.

Esta técnica se fundamenta en dos principios básicos: la totipotencia celular (Haberlandt 1902) y la hipótesis del balance hormonal (Skoog y Miller 1957). La micropropagación presenta varias ventajas sobre los métodos de propagación clásicos (Canhoto 2010):

- Permiten obtener un número elevado de plantas en poco tiempo partiendo de un pequeño explanto inicial.
- Hace posible la propagación de especies imposibles de multiplicar mediante técnicas convencionales.
- Permite la producción de variedades de elevado interés comercial.
- Es esencial en la regeneración de plantas a partir de células genéticamente modificadas.
- Es útil para el establecimiento de bancos de germoplasma.
- Permite el mantenimiento de planta en condiciones asépticas y libres de patógenos.

Por este motivo, la regeneración *in vitro* permite una completa regulación de los eventos morfogénicos bajo condiciones controladas, complementando así el potencial de otras herramientas biotecnológicas (Celestino et al. 2005).

La regeneración *in vitro* puede conseguirse tanto por organogénesis como por embriogénesis somática (SE). La organogénesis partiendo de diferentes explantos iniciales ha sido utilizada con éxito en diferentes especies forestales desde hace tiempo. Así, se utiliza para propagar especies de angiospermas con importante valor económico como son *Eucalyptus* y *Populus*, *Prunus*, *Juglans*, *Ulmus*, *Robinia pseudoacacia* y *Liquidambar styraciflua* (Merkle y Nairn 2005). La regeneración *in vitro* en coníferas

fue descrita por primera vez por Brown y Giffon (1954). Desde entonces, se han desarrollado numerosos estudios con el fin de desarrollar protocolos para obtener una micropropagación eficiente en diferentes especies de *Pinus*, utilizando en su mayoría embriones zigóticos y plántulas (Moncaleán et al. 2005; Hargreaves et al. 2005).

3.1.-Organogénesis

En la organogénesis, las yemas adventicias se desarrollan directamente del embrión zigótico, de partes del embrión zigótico, o de tejido meristemático (Bonga 2015). Una vez desarrolladas esas yemas, se forman tallos que pueden ser multiplicados y que posteriormente se enraízan para formar plántulas. La mayor ventaja de esta técnica es que puede iniciarse en cualquier momento del año, puesto que se utilizan semillas maduras como material de partida.

Para muchas especies de coníferas, la organogénesis no ha llegado a ser aplicable debido a las bajas tasas de formación de plántula y de enraizamiento, a los excesivos gastos que supone su manejo (Bonga 2015) y al comportamiento irregular *ex vitro* (plagiotropismo, baja supervivencia) (Niemi et al. 2004). Sin embargo, para otras especies de coníferas como *P. radiata* (Aitken-Christie et al. 1988; Montalbán et al. 2011), *P. pinea* (Moncaleán et al. 2005) o *P. pinaster* (Tereso et al. 2006) ha sido exitosa. Además, algunos estudios han permitido desarrollar protocolos de transformación y crio-conservación (Hargreaves et al. 2004; 2005) que han hecho posible la producción de gran cantidad de material clonal a partir de explantos cotiledonares.

Sin embargo, los protocolos mencionados utilizan semillas o partes de las mismas para la obtención de planta clonal, lo que no permite la captura genética del árbol seleccionado. Por este motivo, durante los últimos años muchos han sido los esfuerzos

desarrollados para la obtención de protocolos eficaces de producción de planta clonal mediante organogénesis de yemas de material adulto seleccionado (Pierik 1990; Greenwood 1995) como método para proveer de planta élite a las plantaciones comerciales (Menzies y Aimers-Halliday 1997). En este sentido, nuestro equipo ha desarrollado y optimizado sistemas organogénicos para la regeneración de planta de árboles adultos en *Pinus pinaster* (De Diego et al. 2008), *P. pinea* (Cortizo et al. 2009), *P. sylvestris* (De Diego et al. 2010) y *P. radiata* (Montalbán et al. 2013). De nuestras investigaciones podemos concluir que, aunque es posible lograr que los tallos muestren apariencia juvenil y logren desarrollar un sistema radicular viable, el porcentaje de éxito tras la aclimatación en el invernadero es bajo, lo cual indica que lo que se induce es una revigorización de los meristemas (Cortizo et al. 2009). Esta revigorización se puede obtener adicionando reguladores de crecimiento como citoquininas (Bonga y von Aderkas 1992; von Aderkas y Bonga 2000; Titon et al. 2006). Sin embargo, este proceso es transitorio y los caracteres adultos vuelven a aparecer con el tiempo (Cortizo et al. 2009; Montalbán et al. 2013; Wendling et al. 2014).

Por todas las limitaciones encontradas para la propagación de coníferas forestales mediante métodos organogénicos, durante los últimos años los esfuerzos de investigación han estado centrados en la obtención de protocolos optimizados de embriogénesis somática.

3.2.- Embriogénesis somática

3.2.1.-Tejido juvenil

La embriogénesis somática es la generación de embriones completos a partir de una o más células somáticas. Estas células somáticas sufren un cambio completo en el patrón de expresión génica y se reprograman hacia la ruta embriogénica (Pullman y Bucalo

2014). Los nuevos embriones tienen las mismas características que un embrión zigótico pero no son el resultado de una fusión gamética (Dodeman et al. 1997; Ramage y Williams 2002).

La primera descripción de embriogénesis somática se realizó en zanahoria (Levine 1947) y desde entonces numerosos protocolos se han venido desarrollando para todo tipo de especies vegetales. En coníferas, se describió por primera vez en *Picea abies* (Hakman et al. 1985), *Larix decidua* (Nagmani y Bonga 1985) y *Pinus lambertiana* (Gupta y Durzan 1986). Desde entonces, ha sido ampliamente utilizada en muchas especies de coníferas con un amplio rango de posibilidades de éxito (Park 2014). En el caso del género *Pinus* han sido descritos protocolos de embriogénesis somática en *Pinus pinea* (Carneros et al. 2009), *P. radiata* (Montalbán et al. 2010; 2012), *P. halepensis* (Montalbán et al. 2013) entre otros.

La SE se divide en diferentes etapas: iniciación de la respuesta embriogénica, proliferación o fase multiplicativa, maduración del tejido embriogénico, germinación y conversión a planta y aclimatación a condiciones *ex vitro*.

3.2.1.1. Iniciación

En la iniciación se produce el cambio del patrón de expresión de las células de la planta donadora (Celestino et al. 2005). La iniciación de la SE se ve afectada por factores como el estado de desarrollo del embrión inmaduro (Montalbán et al. 2012), el genotipo de los parentales (Park et al. 1993; Lelu et al. 1999) y el tipo de medio de cultivo (incluidos los reguladores del crecimiento) (Pullman et al. 2004; Park et al. 2006). Además también se ha visto que el estrés, en particular el estrés oxidativo, puede tener un papel importante en la iniciación de la SE (Von Aderkas y Bonga 2000; Neilson et al. 2010; Feher 2015).

3.2.1.2. Proliferación

Una vez se ha inducido embriogénesis, las masas embriogénicas (EMs) entran en un ciclo continuo de crecimiento. Este estado cíclico se mantiene utilizando el mismo medio de iniciación o con ligeras modificaciones (Park 2014) y adicionando pequeñas cantidades de auxinas y/o citoquininas (Merkle et al. 1995), o incluso sin PGR (Fernández-Guijarro et al. 1995).

3.2.1.3. Maduración

El proceso de la histodiferenciación de los embriones somáticos es bastante similar al de los embriones zigóticos (Fehér 2015). Para estimular un cambio en el desarrollo de las EMs, las técnicas habituales utilizan una restricción de la disponibilidad de agua. Ésta se consigue mediante la adición de altas concentraciones de agente gelificante o aumentando la osmolaridad (Klimaszewska et al. 2000). En muchas especies de coníferas, la maduración de los embriones somáticos sólo se alcanza mediante la suplementación de ABA de manera exógena al medio de maduración (Stasolla y Yeung 2003). La deshidratación del tejido embriogénico es un factor fundamental para que se produzca el proceso de maduración de los embriones somáticos en coníferas (Silveira et al. 2004).

Además, se ha descrito que concentraciones de sacarosa relativamente altas promueven la maduración de embriones somáticos en *Pinus pinaster* (Ramarosandratana et al. 2001), *P. monticola* (Percy et al. 2000) y otras especies de abetos (Iraqi y Tremblay 2001). En experimentos previos realizados en *P. radiata* en nuestro laboratorio, demostramos que la sacarosa funciona tanto de fuente de carbono como de agente osmótico, siendo más determinante para la maduración del tejido embriogénico la

combinación de ésta y de aminoácidos que la concentración de ABA (Montalbán et al. 2010).

3.2.1.4. Germinación y conversión a planta

En la germinación se lleva a cabo el desarrollo coordinado del tallo y la raíz. La calidad de los embriones somáticos está relacionada con su morfología (Maruyama et al. 2007; Aronen et al. 2009), por lo que los embriones somáticos que tengan una morfología que se asemeje a los zigóticos, con sustancias de reserva acumuladas suficientes y que hayan adquirido tolerancia a la desecación, son los que podrán germinar y convertirse en plantas (von Arnold et al. 2002). La germinación se suele llevar a cabo en medio semi-sólido sin adicionar PGR, y se ha visto que mejora si los cultivos se mantienen en semi oscuridad los primeros 7 días antes de exponerlos a la luz, ya que se asegura la elongación del hipocótilo y se reduce la síntesis de antocianinas (Klimaszewska et al. 2007; Park 2014). Asimismo, en ciertas especies del género *Pinus* como *P. halepensis*, *P. nigra* y *P. radiata*, la presencia de carbón activo en el medio de cultivo es necesaria para el correcto desarrollo de las plántulas somáticas (Montalbán et al. 2016).

3.2.1.5 Aclimatación *ex vitro* de los explantos

Una vez se han obtenido plantas a partir de embriones somáticos, éstos han de ser transferidos y aclimatados *ex vitro*. Las condiciones de cultivo *in vitro* hacen que las plantas regeneradas tengan una cutícula poco desarrollada y un funcionamiento anormal de los estomas (Merkle et al. 1995). Por este motivo, el proceso de aclimatación es una de las grandes limitaciones de las plantas micropropagadas, puesto que éstas cambian de condiciones heterotróficas a condiciones autotróficas y se ven sometidas a severos estreses con respecto a la humedad, temperatura, luz y microorganismos (Canhoto 2010). Normalmente durante los 7 o 10 primeros días se mantiene una alta humedad

relativa, que se va reduciendo gradualmente durante unos días hasta alcanzar las condiciones ambientales (Atree et al. 1990; Klimaszewska et al. 2007; Park 2014).

La utilización de la SE tiene muchas ventajas como las que a continuación se enumeran:

- Elevada tasa de multiplicación (Etienne y Berthouly 2004).
- Permite la crioconservación del tejido embriogénico (Park 2002) y de embriones somáticos (Bonga y Park 2003).
- Los cultivos embriogénicos se pueden utilizar como dianas para la transformación genética (Cerdeira et al. 2002; Charity et al. 2005).
- Permite la producción de variedades de elevado interés comercial y especies híbridas con resistencia a enfermedades (Lu 2008).
- Los embriones somáticos se pueden encapsular para producir semillas sintéticas (Aquea et al. 2008).
- Puede ser utilizada para el rescate de embriones (Uma et al. 2011).
- Es una valiosa herramienta para la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción (Park et al. 2010).
- Puede ser utilizada para el estudio de la memoria epigenética (Johnsen et al. 2005; von Aderkas et al. 2007).

Pese a todo, el carácter embriogénico de una especie está afectado genéticamente, de modo que existen genotipos más predispuestos que otros a la inducción de SE (Arnold et al. 2002) y todavía no se conoce del todo el control genético del proceso completo como para poder manipularlo (Zoglauer et al. 2003).

Una de las mayores ventajas de la propagación vegetativa a través de SE es que las líneas embriogénicas generadas pueden crio-conservarse mientras los árboles

correspondientes a estas líneas son testados en campo (Park 2002); esto ha permitido el desarrollo de la silvicultura multivarietal (MVF). Conforme a lo descrito por Park y colaboradores en 1998, la MVF es la utilización de variedades de árboles testados genéticamente en las plantaciones forestales. Para ello se realizan cruzamientos controlados de árboles élite seleccionados, a partir de las semillas generadas en estos cruzamientos se producen líneas embriogénicas que se crio-conservan paralelamente a la realización de ensayos de progenie. Una vez identificados los genotipos élite en las plantaciones, las líneas embriogénicas de las que provienen pueden ser descongeladas y propagadas de nuevo. El uso de otras herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares puede mejorar la eficiencia de esta estrategia (Park y El-Kassaby 2006). Mediante este sistema se están desarrollando en Europa programas de silvicultura multivarietal para diversas especies perteneciente a géneros como *Abies*, *Picea* y *Pinus* (Lelu-Walter et al. 2013).

Pese a los múltiples beneficios que presenta, la MVF no ha sido aplicada en algunas especies coníferas debido a los siguientes factores:

- Las tasas de iniciación, particularmente en algunas especies del género *Pinus*, son bajas (Yildirim et al. 2006; Carneros 2009).
- La ventana de competencia para la iniciación de la SE se reduce a unas 4 semanas (MacKay et al. 2006; Yildirim et al. 2006).
- El estado del desarrollo del embrión inmaduro influye en la iniciación de la SE, así como el genotipo de los parentales y la composición del medio de cultivo (Klimaszewska et al. 2001; Pullmann et al. 2004; Park et al. 2006; Montalbán 2012).
- Algunas especies de coníferas son recalcitrantes a la iniciación de la SE (Pullman y Bucalo 2014).

- En algunas especies, pese a obtener tasas de iniciación altas, se produce una baja conversión a planta. Esto ocurre principalmente porque la maduración presenta bajos porcentajes de éxito (Wendt dos Santos 2002, Tretyakova and Shuvaev 2015).

3.2.2.-Tejidos adultos

Como hemos descrito anteriormente, la SE presenta un potencial sin precedentes para la propagación clonal a gran escala de coníferas y está siendo utilizada comercialmente por compañías que utilizan grandes cantidades de plantas somáticas al año en sus plantaciones (Cyr y Klimaszewska 2002; Celestino et al. 2013; Lelu-Walter et al. 2013).

Tal y como hemos señalado, la SE se lleva a cabo principalmente a partir de embriones inmaduros y tejidos juveniles (Harvengt et al. 2001; Lelu-Walter et al. 2006; Park et al. 2006; Klimaszewska et al. 2007), ya que se ha observado que la inducción de tejido embriogénico a partir de explantos procedentes de individuos adultos en coníferas no ha sido viable en la mayor parte de las especies ensayadas. Por este motivo, se han realizado numerosos estudios para controlar el cambio de fase que tiene lugar en el explanto a medida que crece (Gupta y Durzan 1985; Monteuis 1991; Bonga 1997; Merkle et al. 1998; Andersone e Ievinsh 2002). Las características elite de un individuo son detectables cuando este alcanza su madurez sexual (Park 2002; Nehra et al. 2005; Bonga et al. 2008; Bonga et al. 2010). El desarrollo de sistemas de embriogénesis somática utilizando explantos procedentes de árboles elite es el escenario ideal, ya que podrían reproducirse las características genéticas del individuo sin necesidad de tener que esperar los largos tiempos de evaluación de los ensayos de progenie que deben realizarse en los procesos de embriogénesis somática convencional (Bonga 2015).

En los últimos años muchos han sido los estudios que se han centrado en la obtención de perfiles metabólicos en las masas embriogénicas que pudieran actuar como marcadores de la capacidad regenerativa de dicho tejido (Robinson et al. 2009). Otros autores se han centrado en el estudio del papel desempeñado por diversos genes implicados en los procesos de embriogénesis somática. En este sentido, según Komamine et al. (2005) hay 3 categorías de genes implicados en el proceso embriogénico: 1) genes implicados en la división celular 2) genes implicados en la formación de órganos 3) genes específicos para el proceso de SE. El último grupo de genes ha sido el objetivo principal de varios estudios: *receptor-like quinasa* (SERK) en zanahoria (Schrader et al. 1997), genes *leafy cotyledon* (LEC) en *Arabidopsis* (Gaj et al. 2005), *homeobox WUSCHELL* (WOX) en *Picea abies* (Palovaara y Hakman 2008) y WUS en el ginseg (Kiselev et al. 2009). Este tipo de herramientas moleculares utilizadas para la obtención de marcadores de expresión fiables asociados a las etapas iniciales de la SE permiten distinguir entre tejido embriogénico y no-embriogénico (Palovaara y Hakman 2008). Entre algunos de los marcadores putativos, se sabe que los factores de transcripción y HAP3 (codificado por genes LEC) juegan un papel fundamental en el control de muchos aspectos de la SE en plantas (Yazawa et al. 2004; Gaj et al. 2005; Palovaara y Hakman 2008; Palovaara et al. 2010).

Está bastante bien establecido que la respuesta al estrés es un factor clave para la inducción de la SE en una gran variedad de especies, aunque las rutas moleculares subyacentes aún son desconocidas (Radoeva et al. 2014; Fehér et al. 2015). Por eso, los marcadores también serían útiles para el estudio de estos mecanismos moleculares que regulan el cambio de células somáticas a células embriogénicas (Park et al. 2010). En este sentido, en *Picea abies* se han comparado los niveles de transcripción entre diferentes líneas embriogénicas que producen embriones y líneas proembriogénicas

cuyo desarrollo se ha detenido en diferentes etapas de la SE (Stasolla et al. 2004). También hay estudios de regeneración de planta mediante SE a partir de individuos adultos de *Olea europea* (Rugini y Caricato 1995) o *Quercus robur* (Toribio et al. 2004); en *Pinus sylvestris* se ha obtenido tejido embriogénico pero su conversión a planta todavía no ha sido posible (Aronen et al. 2009). En contraposición a esto, se ha generado un grupo de árboles somáticos a partir de una única línea embriogénica de *Picea glauca*. Las yemas han manifestado respuesta a la inducción de SE durante una década, y han seguido mostrando esa respuesta incluso tras alcanzar la madurez sexual (Klimaszewska et al. 2011).

Por todo esto, nuestro equipo en Neiker-Tecnalia y otros centros de investigación internacionales han centrado su trabajo fundamentalmente en la SE a partir de tejidos procedentes de individuos adultos del género *Pinus* spp. Debido a este interés común y para aunar esfuerzos, se ha creado un consorcio de investigación para el desarrollo de estrategias comunes y el enriquecimiento de todos los equipos que trabajan con el mismo objetivo en diversas especies. En este sentido, nuestro equipo de investigación aporta la experiencia obtenida a través de diversos estudios sobre organogénesis de individuos adultos en el género *Pinus* (De Diego et al. 2008; Cortizo et al. 2009; De Diego et al. 2010). Los tejidos revigorizados *in vitro* han sido una buena fuente de explantos primarios para conseguir tejido embriogénico en diversas especies angiospermas (San-José et al. 2010; Conde et al. 2004; Corredoira et al. 2014).

4.-Importancia de las proteínas como marcadores moleculares

Evidencias recientes indican que hay mecanismos epigenéticos, como la metilación del DNA y la modificación de las histonas, que juegan un papel crucial en la regulación de

la expresión génica en las respuestas de las plantas a los estreses ambientales (Boyko y Kovalchuk 2008). Estos cambios epigenéticos se producen a lo largo del proceso de desarrollo de los embriones somáticos (Fraga et al. 2012). Para controlar mejor estos cambios, es esencial entender mejor los mecanismos que se producen durante la embriogénesis (Rode et al. 2011). La SE implica multitud de procesos moleculares abarcando no sólo la diferenciación de la expresión génica, sino varias rutas de transducción de señales de activación/represión de muchos genes (Fraga et al. 2013). En este sentido, los estudios de proteómica, que combinan geles de electroforesis de dos dimensiones (2-D) con un alto grado de precisión en la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas (MS), han sido aplicados exitosamente para el análisis de la expresión proteica en varias especies (Almeida et al. 2012; Correia et al. 2012; Zhao et al. 2015). En los mencionados estudios, se han descrito diferentes patrones proteicos durante las diferentes etapas de desarrollo del proceso embriogénico. Debido a que las proteínas influyen directamente en la bioquímica celular y dan un análisis más preciso de los cambios celulares que se dan durante el crecimiento y el desarrollo (Pan et al. 2009), la identificación de proteínas asociadas a la formación de los embriones somáticos puede ayudar al conocimiento de los mecanismos que controlan el proceso de SE (Fraga et al. 2013). Además, cabe destacar que la proteómica ayuda a reconocer algunas proteínas metabólicas y constitutivas como inductores de señalización importantes en las rutas del desarrollo (Takaea et al. 2011). De estos estudios se puede destacar que algunas proteínas detectadas en los embriones somáticos pueden ser importantes marcadores de malformaciones en el desarrollo de la planta. Estos patrones diferenciales también han sido observados tras someter el tejido embriogénico a diferente disponibilidad de agua durante la fase de maduración (Teyssier et al. 2011). En relación a esto, varios estudios han indicado que variaciones

en las condiciones ambientales, como la temperatura, en etapas iniciales de la SE mejoran la iniciación y la proliferación, ya que actúan como un estrés medio que favorece la reprogramación celular (Bonga et al. 2010; Montalbán et al. 2015). Además, también se ha postulado recientemente que la temperatura ejerce una presión selectiva en las etapas iniciales del proceso que conlleva unas bajas tasas de iniciación, pero altas tasas de proliferación y maduración (Fehér 2015).

A pesar de los sistemas de modelos biológicos, el potencial de la proteómica está lejos de ser totalmente explotado en los estudios de biología vegetal (Abril et al. 2011) ya que el dinamismo, la variabilidad y el comportamiento de las proteínas son más complejos de lo que se pensaba. Por eso, sólo unas pocas especies de coníferas han sido sometidas a una identificación proteica de alta precisión por espectrometría de masas (MS) [*Cupressus sempervirens* (Sallandrouze et al. 1999), *Picea glauca* (Lippert et al. 2005) y *Larix ×eurolepis* (Teyssier et al. 2014), *Pinus pinaster* (Morel et al. 2014)].

5.-Planteamiento general y objetivos

Esta tesis nace con el interés de estudiar el efecto de algunas condiciones físico químicas en las diferentes fases del proceso embriogénico utilizando como material de partida tanto tejido juvenil como adulto de *Pinus radiata*. Este objetivo general lo dividimos en los siguientes objetivos parciales:

- 1.- Evaluar el efecto de la temperatura y disponibilidad de agua en las fases iniciales del proceso embriogénico (iniciación y proliferación) además de identificar en qué etapa tienen estas condiciones mayor efecto a la hora de evaluar el éxito final de la embriogénesis somática.

- 2.- Analizar el efecto de las condiciones físicas y químicas en la etapa de maduración de la SE de pino radiata para establecer si esta fase es crítica para modular el éxito de la etapa de maduración, así como en las siguientes etapas de proceso tales como germinación y aclimatación de los embriones somáticos obtenidos.
- 3.- Determinar si las diferentes condiciones ambientales que condicionan las tasas de iniciación de tejido embriogénico se traducen en diferencias en el perfil proteico de los embriones somáticos obtenidos.
- 4.- Desarrollar un sistema de embriogénesis somática partiendo de yemas revigorizadas *in vitro* de individuos adultos y analizar molecularmente el carácter embriogénico de las masas celulares obtenidas.

6.-Referencias

Aitken-Christie J, Singh AP, Davies H (1988) Multiplication of meristematic tissue: a new tissue culture system for radiata pine. In: Hanover JW, Keathley DE (eds) Genetic manipulation of woody plants. Plenum Publishing Corp, New York, pp 413–432

Almeida AM, Parreira JR, Santos R, Duque AS, Francisco R, Tomé DF, Ricardo CP, Coelho AV, Fevereiro P (2012) A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiol Plant* 146:236–249

Andersone U, Ievinsh G (2002) Changes of morphogenic competence in mature *Pinus sylvestris* L. buds in vitro. *Ann. Bot* 90: 293-298

Aquea F, Poupin MJ, Matus JT, Gebauer M, Medina C, Arce-Johnson P (2008) Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. *Biotechnol Lett* 30:1847–1852

Aronen T, Pehkonen T, Ryyänen L (2009) Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. *Scan J For Res* 24:372-383

Attree SM, Budimir S, Fowke LC (1990) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cultured shoots and cotyledons of seedlings from stored seeds of black and white spruce *Picea mariana* and *Picea glauca*. *Can J Bot* 68:30-34

Bonga JM (1997) The effect of collection date and frozen storage on the formation of embryo-like structures and elongating shoots from explants from mature *Larix decidua* and *L. x eurolepis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 51:195–200

Bonga JM (2015) A comparative evaluation of the application of somatic embryogenesis, rooting of cuttings, and organogenesis of conifers. *Can J For Res* 45:379-383

Bonga JM, Klimaszewska K, Von Aderkas P (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss Org Cult* 100:241-254

Bonga JM, MacDonald JE, von Aderkas P (2008) Cloning of conifers, with emphasis on mature trees. In: Rao GP, Zhao Y, Radchuck VV, Batnagar SK (eds) Advances in plant biotechnology. Studium Press LLC, Houston, pp 475–490

Bonga JM, Park YS (2003) Clonal Propagation, Forest Trees. In: Thomas B, Murphy D, Murray B (eds) Encyclopaedia of Applied Plant Sciences. Elsevier (Academic Press), Oxford, UK, pp1395-1402

Bonga JM, von Aderkas P (1992) In vitro culture of trees. Kluwer Acad Publ, Dordrecht

Boyko A, Kovalchuk I (2008) Epigenetic control of plant stress response. Environ Mol Mutagen 49:61–72

Brown CL, Gifforn EM (1954) The relation of the cotyledons to root development of pine embryos grown in vitro. Plant Physiol 33: 57–64

Burdon RD (2001) *Pinus radiata*. In: Last FT (eds) Ecosystems of the world, vol. 19. Tree crop ecosystems, pp 99–161

Burdon RD, Moore JM (1997) IUFRO'97 Genetics of radiata pine. FRI Bulletin No 203. Rotorua, New Zealand, pp 354

Campbell MM, Brunner AM, Jones HM, Strauss SH (2003) Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. Plant Biotechnol J 1:141–154

Carneros E (2009) Embriogénesis somática en pino piñonero (*Pinus pinea* L.). PhD Thesis. University of Alcalá, Spain. <http://dspace.uah.es/dspace/bitstream/handle/10017/9681/Tesis%20Doctoral%20Elena%20Carneros%20Garc%c3%ada%202009.pdf>

Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Toribio M, Bonga JM (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult 98:165–178

Castell W, Ernst D (2012) Experimental 'omics' data in tree research: facing complexity. Trees 26:1723–1735

- Celestino C, Carneros E, Ruiz-Galea M, Alonso-Blázquez N, Alegre J, Toribio M (2013) Cloning stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis In: Mediterranean Stone Pine for Agroforestry. Mutke ZS, Piqué M, Calama R (eds) CIHEAM/FAO/INIA/IRTA/CESEFOR/CTFC, 2013, Options Méditerranéennes: Série A, 105, Séminaires Méditerranéens, pp 89–96
- Celestino C, Hernández I, Carneros E, López-Vela D, Toribio M (2005) La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. Invest. Agrar.: Sist Recur For 14(3):345-357
- Cerda F, Aquea F, Gebauer M, Medina C, Arce-Johnson P (2002) Stable transformation of *Pinus radiata* embryogenic tissue by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue Organ Cult 70:251-257
- Charity JA, Holland L, Grace LJ, 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
- Conde P, Loureiro J, Santos C (2004) Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Ulmus minor* Mill. Plant Cell Rep 22:632–639
- Corredoira E, Toribio M, Vieitez AM (2014) Clonal propagation via somatic embryogenesis in *Quercus* spp. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, Ahuja MR (eds) Tree biotechnology. CRC Press, Boca Raton FL, pp 262–302
- Correia S, Vinhas R, Manadas B, Lourenço AS, Veríssimo P, Canhoto JM (2012) Comparative proteomic analysis of auxin induced embryogenic and nonembryogenic tissues of the Solanaceous tree *Cyphomandra betacea* (Tamarillo). J Proteome Res 11: 1666–1675
- Cortizo M, de Diego N, Moncaleán P, Ordás RJ (2009) Micropropagation of adult Stone pine (*Pinus pinea* L.). Trees Struct Funct 23:835-842
- Cyr DR, Klimaszewska K (2002) Conifer somatic embryogenesis: II. Applications. Dendrobiology 48: 41–49

- David A (1964) Physiologie vegetale—recherches preliminaries sur les cultures de *Pinus pinaster*—realisation de cultures initials. CR Acad Sci Paris 258: 695–695
- 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
- Dodeman VL, Ducreux G, Kreis M (1997) Zygotic embryogenesis versus SE. J Exp Bot 48:1493–1509
- dos Santos ALW, Silveira V, Steiner N, Vidor M, Guerra MP (2002) Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). Brazi Archi Bio/Tech 45(1):97-105
- Etienne H, Berthouly M (2004) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult 69:215-231
- FAO (2010) FAO strategy for forests and forestry. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy <http://www.fao.org/docrep/012/al043e/al043e00.pdf>
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. Biochim Biophys Acta 1849:385-402
- Fenning TM, Walter C, Gartland KMA (2008) Forest biotech and climate change. Nat Biotechnol 26: 615–617
- 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 Tissue Org Cult 41, 99-106
- Ferreras C, Arozena ME (1987) Guía física de España, 2. Los bosques. Alianza Editorial, Madrid, Spain, pp 389
- Fraga HPF, Agapito-Tenfen SA, Caprestano CA, Nodari RO, Guerra MP (2013) Comparative proteomic analysis of off-type and normal phenotype somatic plantlets

derived from somatic embryos of Feijoa (*Acca sellowiana* (O. Berg) Burret). *Plant Sci* 210: 224–231

Fraga HPF, Vieira LN, Caprestano CA, Steinmacher DA, Micke GA, Spudeit DA, Pescador R, Guerra MP (2012) 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Rep* 12:2165-76

Gaj MD, Zhang S, Harada JJ, Lemaux PG (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* 222:977–988

Greenwood MS (1995) Juvenility and maturation in conifers: current concepts. *Tree Physiol* 15: 433–438

Gupta PK, Durzan DJ (1985) Shoot multiplication from mature trees of Douglas fir, *Pseudotsuga menziesii*, and sugar pine, *Pinus lambertiana*. *Plant Cell Rep* 4:177-179

Gupta PK, Durzan DJ (1986) Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/Technol* 4:643-645

Haberlandt G (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber, Akad Wiss Wien Math-Naturwiss Kl. Abt J* 11:69-92

Hägglman H, Raybould A, Borem A, Fox T, Handley L, Hertzberg M, LU MZ, Macdonald P, Oguchi T, Pasquali G, Pearson L, Peter G, Quemada H, Séguin A, Tattersall K, Ulian E, Walter C, McLean M (2013) Genetically engineered trees for plantation forests: key considerations for environmental risk assessment. *Plant Biotechnol J* 11(7):785–798

Hakman I, Fowke LC, von Arnold S, Eriksson T (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). *Plant Science* 38: 53–59

Hall P, Jack M (2014) Bioenergy Opportunities from Forests in New Zealand. In: Fenning T (ed) *Challenges and opportunities for the world's forests in the 21st century*. Forestry Sciences: Springer, pp 659-676

Hargreaves C, Grace L, Van der Maas S, Reeves C, Holden G, Menzies M, Kumar S, Foggo M (2004) Cryopreservation of *Pinus radiata* zygotic embryo cotyledons: effect of storage duration on adventitious shoot formation and plant growth after 2 years in the field. *Can J For Res* 34:600-608

Hargreaves CL, Grace LJ, Van der Maas SA, Menzies MI, Kumar S, Holden DG, Foggo MN, Low CB, Dibley MJ (2005) Comparative in vitro and early nursery performance of adventitious shoots from cryopreserved cotyledons and axillary shoots from epicotyls of the same zygotic embryo of control-pollinated *Pinus radiata*. *Can J For Res* 35:2629-2641

Harvengt L, Trontin JF, Reymond I, Canlet F, Pâques M (2001) Molecular evidence of true-to-type propagation of a 3-year-old Norway spruce through somatic embryogenesis. *Planta* 213:828-832

Inventario Forestal Nacional, 1997-2000
(<http://www.mma.es/portal/secciones/biodiversidad/inventarios/ifn/index.htm>)

Iraqi D, Tremblay FM (2001) The role of sucrose during maturation of black spruce (*Picea mariana*) and white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Physiol Plant* 111:381-388

Johnsen Ø, Fossdal CG, Nagy N, Molmann J, Dælen OG, Skråppa T (2005) Climatic adaptation in *Picea abies* progenies is affected by the temperature during zygotic embryogenesis and seed maturation. *Plant Cell Environ* 28:1090–1102

Kanowski PJ (1997) Plantation forestry for the 21st century. In: Proceedings of the XI World Forestry Congress, 13–22 October 1997, Antalya, Turkey

Kiselev KV, Turlenko AV, Zhuravlev YN (2009) PgWUS expression during somatic embryo development in a *Panax ginseng* 2c3 cell culture expressing the rolC oncogene. *Plant Growth Regul* 59:237–243

Klimaszewska K, Bernier-Cardou M, Cyr DR, Sutton BCS (2000) Influence of gelling agents on culture medium gel strength, water availability, tissue water potential, and maturation response in embryogenic cultures of *Pinus strobus* L. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:279–286

Klimaszewska K, Park YS, Overton C, Mac Eacheron I, Bonga JM (2001) Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. in vitro cell, Dev Biol Plant 37:392–399

Klimaszewska K, Trontin J-F, Becwar MR, Devillard C, Park Y-S and Lelu-Walter M-A (2007) Recent Progress in somatic embryogenesis of four *Pinus* spp. Tree For Sci Biotech 1:11-25; <http://www.globalsciencebooks.info>

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 233:635–647

Komamine A, Murata N, Nomura K (2005) 2004 SIVB Congress Symposium Proceeding: mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures— morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. In Vitro Cell Dev Biol Plant 41:6–10

Lavery PB, Mead DJ (1998) *Pinus radiata*: a narrow endemic from North America takes on the World. In: Richardson DM (eds) Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge, UK, Cambridge University Press, pp 432–449

Lelu MA, Bastien C, Drugeault A, Gouez ML, Klimaszewska K (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without plant growth regulators. Physiol Plant 105:719-728

Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K (2006) Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). Plant Cell Rep 25:767–776

Lelu-Walter MA, Thompson D, Harvengt L, Sanchez L, Toribio M, Pâques LE (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. Tree Genetics & Genomes – 9:883-899

Levine M (1947) Differentiation of carrot root tissue grown in culture. Bull. Torrey Bot. Club 74:321-328

Libby WJ, Bannister MH, Linhart YB (1968) The pines of cedros and Guadalupe Islands. *J Forest* 66:846-953

Lindsay AD (1937) Report on Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don) in its native habitat. Bulletin No. 10. Canberra, Commonwealth Forestry and Timber Bureau

Lippert D, Zhuang J, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, Ritland K, Ellis B, Douglas CJ, Bohlmann J (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5:461–473

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 Genom* 2:1-9

Martín S, González SC (2000) Conservación de recursos genéticos de coníferas en España. *Investig Agrar Sist Recur For* 2:151-183

Maruyama E, Hosoi Y, Ishii K (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in yakutanegoyou, *Pinus armandii* Franch. var. *amamiana* (Koidz.) Hatusima, an endemic and endangered species in Japan. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 43:28-34

Mead DJ (2013) Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. *FAO Forestry Paper* 1-51

Menzies MI, Aimers-Halliday J (1997) Propagation options for clonal forestry with radiata pine. *Genetics of radiata pine. Proceedings IUFRO Conference, Rotorua, New Zealand. FRI Bull.* 203: 256–263

Merkle SA, Parrott WA, Flinn BS (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA (eds) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers pp 155-203

Merkle SA, Neu KA, Battle PJ, Bailey RL (1998) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from immature and mature tissues of sweetgum (*Liquidambar styraciflua*). *Plant Sci* 132:169–178

Merkle SA, Nairn CJ (2005) Hardwood Tree Biotechnology. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 602–619

Merkle SA, Andrade GM, Nairn CJ, Powell WA, Maynard CA (2007) Restoration of threatened species: a noble cause for transgenic trees. *Tree Genet Genomes* 3:111–118

Michel M (2003) El pino radiata (*Pinus radiata* D. Don) en la historia forestal del País Vasco. Análisis de un proceso de forestalismo intensivo. PhD Thesis. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes Madrid, Spain, 393 pp

Miller LK, DeBell J (2013) Current seed orchard techniques and innovations. In: National proceedings: forest and conservation nursery associations 2012. USDA Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fort Collins, Colorado, Proceedings RMRS-P-69. pp 80–86

Moncaleán P, Alonso P, Centeno ML, Cortizo M, Rodríguez A, Fernández B, Ordás RJ (2005) Organogenic responses of *Pinus pinea* cotyledons to hormonal treatments: BA metabolism and cytokinin content. *Tree Physiol* 25:1-9

Montalbán (2011) Desarrollo y optimización de herramientas biotecnológicas para la obtención de material clonal de *Pinus radiata* D. Don. PhD Thesis. University of Basque Country.
[https://addi.ehu.es/bitstream/10810/8264/5/Montalb%C3%A1n%20\(TH\)%20Desarrollo%20y%20optimizacion%20de%20herramientas%20biotecnologicas%20para%20la%20obtencion%20de%20material%20clonal%20de%20Pinus%20radiata%20D.%20Don.pdf](https://addi.ehu.es/bitstream/10810/8264/5/Montalb%C3%A1n%20(TH)%20Desarrollo%20y%20optimizacion%20de%20herramientas%20biotecnologicas%20para%20la%20obtencion%20de%20material%20clonal%20de%20Pinus%20radiata%20D.%20Don.pdf)

Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P (2010) Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: Improving maturation and germination. *Trees Struct Funct* 24:1061–1071

Montalbán IA, De Diego N, Aguirre-Igartua E, Setién A, Moncaleán P (2011) A combined pathway of somatic embryogenesis and organogenesis to regenerate radiata pine plants. *Plant Biotechnol Rep* 5:177–186

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, Novák 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. *Physiol Plant* 148: 214–231

Montalbán IA, García-Mendiguren O, Goicoa T, Ugarte MD, Moncaleán P (2015) Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New For* 46:157–165

Monteuuis O (1991) Rejuvenation of a 100-year-old *Sequoiadendron giganteum* through in vitro meristem culture. I. Organogenic and morphological arguments. *Physiol Plant* 81:111-115

Morel A, Teyssier C, Trontin J-F, Eliášová K, Pešek B, Beaufour M, Morabito D, Boizot N, Le Metté C, Belal-Bessai L, et al. (2014) Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: Transcriptomic and proteomic analyses. *Physiol Plant* 152: 184–201

Nagmani R, Bonga, JM (1985) Embryogenesis in subcultured callus of *Larix decidua*. *Can J For Res* 15: 1088– 1091

Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L, Chowdhury K, Chang S, Wilde HD, Kodrzycki RJ, Zhang C, Gause KC, Parks DW, Hinchey MA (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 41:701–717

Neilson KA, Gammulla CG, Mirzaei M, Imin N, Haynes PA (2010) Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics* 10:828–845

Niemi K, Scagel C, Häggman H (2004) Application of ectomycorrhizal fungi in vegetative propagation of conifers. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 78:83-91

Palovaara J, Hakman I (2008) Conifer WOX-related homeodomain transcription factors, developmental consideration and expression dynamic of WOX2 during *Picea abies* somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 66:533–549

Pan Z, Guan R, Zhu S, Deng X (2009) Proteomic analysis of SE in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep* 28:281–289

Park YS (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann For Sci* 59:651-656

Park YS (2014) Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry. In: Fenning T (eds) *Challenges and opportunities for the world's forests in the 21st century*. Forestry Sciences: Springer pp 425-439

Park YS, Bonga JM (1992) Conifer micropropagation: its function in tree improvement programs. In: *Micropropagation of Woody Plants* (Ed) Ahuja MR. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 457–470

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. *Theory Appl Genet* 86:427-436

Park YS, Barrett JD, Bonga JM (1998) Application of SE in highvalue clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:231–239

Park YS, El-Kassaby YA (2006) New breeding and deployment strategy using conifer somatic embryogenesis and pedigree reconstruction. In: *Proc. of IUFRO Div. 2 joint Conf.: Low input breeding and conservation of forest genetic resources*. Antalya, Turkey, pp 194–195. Oct 9–13

Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:87-101

Park S-Y, Klimaszewska K, Park J-Y, Mansfield SD (2010) Lodgepole pine: the first evidence of seed-based somatic embryogenesis and the expression of embryogenesis marker genes in shoot bud cultures of adult trees. *Tree Physiol* 30:1469–1478

Percy RE, Klimaszewska K, Cyr DR (2000) Evaluation of somatic embryogenesis for clone propagation of western white pine. *Can J For Res* 30:1867-1876

Pierik RLM (1990) Rejuvenation and micropropagation. Progress in plant cellular and molecular biology. In: Nikkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aatrijk J (eds) Proceedings of the VIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, 24–29 June 1990, Amsterdam, the Netherlands. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, pp 91–101

Pullman GS, Bucalo K (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forests* 45:353-377

Pullmann GS, Johnson S, Van Tassel S, Zhang Y (2004) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80:91-103

Radoeva T, Weijers D (2014) A roadmap to embryo identity in plants. *Trends Plant Sci* 19:709–716

Ramage CM, Williams RR (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 38:116-124

Ramarosandratana A, Harvengt L, Bouvet A, Calvayrac R, Pâques M (2001) Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellam gum concentration on embryonal suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime pine somatic embryos. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 37:29-34

Rezende GDSP, Resende MDV, de Assis TF (2014) Eucalyptus Breeding for Clonal Forestry. In: Fenning T (eds) Challenges and opportunities for the world's forests in the 21st century. *Forestry Sciences: Springer*, pp 393-424

Robinson AR, Dauwe R, Ukrainetz NK, Cullis IF, White R, Mansfield S (2009) Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant Biotechnol J* 7:952–963

Rode C, Gallien S, Heintz D, Dorsselaer A, Braun H, Winkelmann T (2011) Enolases: Storage compounds in seeds? Evidence from a proteomic comparison of zygotic and somatic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. *Plant Mol Biol* 75:305–319

Rogers DL (2002) In situ genetic conservation of Monterey pine (*Pinus radiata* D. Don): information and recommendations. Report 26. Davis, California, USA, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program

Rugini E, Caricato G (1995) Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) “Canino” and “Moraiolo”. *Plant Cell Rep* 14(4):257–260

Sallandrouze A, Faurobert M, El-Maataoui M, Espagnac H (1999) Two-dimensional electrophoretic analysis of proteins associated with somatic embryogenesis development in *Cupressus sempervirens* L. *Electrophoresis* 20:1109–1119

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* L. trees. *Plant Cell Rep* 29:661–671

Schimel D (2014) Forests in the global carbon cycle. In: Fenning T (eds) *Challenges and opportunities for the world’s forests in the 21st century*. *Forestry Sciences*: Springer, pp 231-240

Scholes RJ, Noble IR (2001) Storing carbon on land. *Science* 294:1012–13

Schrader S, Kaldenhoff R, Richter G (1997) Expression of novel genes during somatic embryogenesis of suspension-cultured carrot cells (*Daucus carota*). *J Plant Physiol* 50:63–68

Scott CW (1961) Pino insigne (*Pinus radiata* D. Don) In: *Estudios sobre selvicultura y productos forestales n°14*. FAO Publicaciones, Roma, Italy, 340 pp

Scott CW (1962) El pino de Monterrey como especie exótica. *Montes* 18:477-490

Sedjo RA (2004) Biotech and planted trees: Some economic and regulatory issues. *AgBioForum* 6:29-35

Silveira V, Floh EIS, Handro W, Guerra MP (2004) Effect of plant growth regulators on the cellular growth and levels of intracellular protein, starch and polyamines in embryogenic suspension cultures of *Pinus taeda*. *Plant Cell Tiss Org* 76:53–60

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol* 11:118-131

Stasolla C, Bozhkov PV, Chu TZ, van Zyl L, Egertsdotter U, Suarez M, Craig D, Wolfinger RD, von Arnold S, Sederoff RR (2004) Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol* 24:1073-1085

Stasolla C, Yeung EC (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss Org Cult* 74: 15-35

Takáèa T, Pechanb T, Šamaja J (2011) Differential proteomics of plant development,c.J. *Proteomics* 74 577–588

Tereso S, Gonçalves S, Marum L, Oliveira M, Maroco J, Miguel C (2006) Improved axillary and adventitious bud regeneration from Portuguese genotypes of *Pinus pinaster* Ait. *Prop Ornamental Plants* 6:24–33

Teyssier C, Grondin C, Bonhomme L, Lomenech AM, Vallance M, Morabito D, Label P, Lelu-Walter MA (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol Plantarum* 141:152-165

Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter MA (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepis*): Global DNA methylation and proteomic analyses. *Physiol Plant* 150:271–291

Titon M, Xavier A, Otoni WC (2006) Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and micro-cuttings techniques. *Sci For* 71:109–117

Toribio M, Fernández C, Celestino C, Martínez MT, San-José MC, Vieitez AM (2004) Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 76:283–287

Tosh K (2012) New Brunswick tree improvement council. <http://nbforestry.com/?section=13&subsection=66>. Accessed Aug 2012

Tret'yakova IN, Shuvaev DN (2015) Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation in vitro. *Russ J Dev Biol* 46:327-337

Uma S, Lakshmi S, Saraswathi MS, Akbar A, Mustaffa MM (2011) Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 105:105–111

van Arnold S, Sabala I, Bozhkov P et al (2002) Developmental pathways of SE. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233–249

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, Kong L, Hawkins B, Rohr R (2007) Effects of non-freezing low temperatures on quality and cold tolerance of mature somatic embryos of interior spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss 9 *P. engelmannii* Parry ex. *Engelm.*). *Propag Ornament Plants* 7:112–121

von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J, Filonova L (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:233-249

Wendling I, Trueman SJ, Xavier A (2014) Maturation and related aspects in clonal forestry – part II: reinvigoration, rejuvenation and juvenility maintenance. *New Forest* 45:473-486

Yazawa K, Takahata K, Kamada H (2004) Isolation of the gene encoding Carrot leafy cotyledon1 and expression analysis during somatic and zygotic embryogenesis. *Plant Physiol Biochem* 42(3):215–223

Yildirim T, Kaya Z, Isik K (2006) Induction of embryogenic tissue and maturation of somatic embryos in *Pinus brutia* TEN. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 87:67–76

Zhao J, Wang B, Wang X, Zhang Y, Dong M, Zhang J (2015) iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell Tiss Org* 120:655–669

Zobel B, Talbert J (2003) Applied forest tree improvement, 3rd edn. Blackburn Press, Caldwell, NJ, USA, pp 505

Zoglauer K, Behrendt U, Rahmat A, Ross H, Taryono (2003) Somatic embryogenesis – The gate to biotechnology in conifers. In: Laimer M, Rucker W (eds) Plant tissue culture – 100 years since Gottlieb Haberlandt. Springer, pp 175-202

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSIÓN GENERAL

Durante los últimos años, uno de los principales objetivos de los programas de mejora ha sido el desarrollo y aplicación de herramientas biotecnológicas capaces de lograr sistemas de producción de plantas élite adaptadas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico en el futuro escenario de cambio climático. La embriogénesis somática ha sido el desarrollo más importante para el cultivo de tejidos vegetales durante los últimos años. Esta metodología no sólo ha sido de gran importancia por su utilización para la propagación masiva, sino también por permitir la implementación de herramientas biotecnológicas que puedan ser utilizadas en programas de mejora genética destinadas a aumentar la productividad y la calidad de la planta forestal. La embriogénesis somática en árboles de interés forestal no está suficientemente optimizada. Por ello, durante los últimos años muchos han sido los esfuerzos que se han llevado a cabo para desarrollar/optimizar los actuales protocolos de embriogénesis somática en el género *Pinus* (Carneros et al. 2009; Montalbán et al. 2010; 2012). Tradicionalmente, los ensayos han ido dirigidos a la selección del explanto (Salaj et al. 2015), a las características químicas del medio nutritivo (Giri et al. 2004) y las condiciones físicas de los cultivos (Hazubska-Przybyl et al. 2016; Montalbán et al. 2016). Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que la aplicación de un estrés medio, inducido a través de la modificación de las condiciones físico-químicas, puede favorecer en gran medida la adquisición de competencia embriogénica (Feher 2015, Isah 2016). En este trabajo, hemos analizado el efecto de la temperatura y la disponibilidad de agua en las diferentes etapas de la embriogénesis somática (Iniciación, proliferación y maduración) tratando de evaluar su efecto, y de determinar en cuál se producía el mayor impacto en el éxito final del proceso embriogénico. Para ello, se aplicaron 9 tratamientos que fueron aplicados aisladamente en las tres fases del proceso, manteniéndose las condiciones

estándar en el resto de las fases. Pese al diseño factorial, en ninguno de los tres experimentos ni de los parámetros analizados en cada uno de ellos hubo una interacción significativa entre las variables temperatura y concentración de agar. Se observó que la temperatura más alta ensayada, 28°C, tenía un efecto negativo en la fase en la que era aplicada, si bien sólo provocaba efectos a largo plazo cuando se aplicaba durante la fase de iniciación del tejido embriogénico. Por otro lado, una menor disponibilidad de agua tenía un efecto positivo si era aplicada en la fase de iniciación y maduración, desapareciendo su efecto en las siguientes fases del proceso. Por todo ello, la aplicación de temperaturas bajas (18°C/4 gL⁻¹ gelrite) durante la fase de iniciación puede utilizarse para aumentar el número de líneas embriogénicas establecidas, y por tanto para aumentar la diversidad clonal de un programa. Por el contrario, realizar el proceso de iniciación a 28°C con la misma concentración de agente gelificante aumenta la eficiencia del proceso, ya que incrementa el número de embriones obtenidos por línea embriogénica, pudiendo ser usado en megagametofitos de cruces seleccionados.

A la vista de nuestros resultados parece ser que la modificación de las condiciones ambientales tiene un mayor impacto cuando es realizada durante la etapa de iniciación de tejido embriogénico. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la temperatura ejerce una presión selectiva en las primeras etapas del proceso embriogénico y resulta en tasas de iniciación más bajas, pero mayor éxito en proliferación y maduración, tal y como postularon Feher et al. (2003).

Por otro lado, muchos son los esfuerzos que se están realizando para conseguir una comprensión más profunda de los factores biológicos (fisiológicos, bioquímicos, etc.) que influyen en la estabilidad y la productividad de la embriogénesis somática en coníferas (Brownfield et al. 2007). Además, la obtención de marcadores moleculares promete aportar información valiosa para incrementar el vigor embriogénico (Robinson

et al. 2009). Un enfoque para generar tales marcadores y para comprender mejor la regulación de la embriogénesis *in vitro* es utilizar la expresión global traducción de proteínas (Lippert et al. 2005; Zhao et al. 2015) durante las diferentes etapas del proceso embriogénico. Como se ha comentado anteriormente, la aplicación de diferentes condiciones ambientales se traducían en altos y bajos porcentajes de iniciación. Con el fin de analizar si este hecho se traducían en diferencias a nivel proteómico, se realizó un estudio del perfil proteico de los embriones obtenidos. Este es el primer estudio en el que se realiza un análisis proteómico en embriones somáticos de coníferas generados en diferentes condiciones ambientales aplicadas en la etapa de la iniciación. Gran parte de las proteínas expresadas diferencialmente en los embriones obtenidos de condiciones ambientales desfavorables para la iniciación pertenecían a categorías funcionales como la respuestas de defensa (proteínas OsmC, vicilinas) o respuesta frente a estrés oxidativo (Chaperonas), pudiendo haberse originado en respuesta a estrés abiótico. Nuestro estudio constituye una aproximación que aporta información sobre algunas proteínas implicadas en el proceso embriogénico de *Pinus radiata*.

Investigaciones previas nos permitieron desarrollar sistemas para la clonación *in vitro* de individuos adultos mediante organogénesis de yemas en diferentes especies del género *Pinus* (De Diego et al 2008; 2010; Cortizo et al, 2009; Montalbán et al 2013). Estos sistemas de propagación *in vitro* presentaban bajos porcentajes de enraizamiento y además, la revigorización de los tejidos observada era transitoria (De Diego et al 2008). Por todo ello, la embriogénesis somática en coníferas a partir de material adulto sigue siendo un reto desde hace años (Park et al 2006). El desarrollo de esta tecnología nos proporcionaría no sólo un gran potencial para la producción en masa de árboles élite seleccionados, sino la posibilidad de crioconservar masas embriogénicas capaces de proporcionar genotipos élite para los programas de mejora genética y para los planes de

forestación y reforestación (Trontin et al. 2016). El éxito en la clonación mediante SE de genotipos adultos en coníferas se restringe a un clon de 10 años de *Picea glauca*, generado a su vez mediante embriogénesis somática, establecido en el campo (Klimaszewska et al 2011). Nuestro equipo de investigación formó parte de un “consorcio” que centró sus estudios en la obtención de embriogénesis somática en diversas especies de pino (*Pinus contorta*, *P. patula*, *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. sylvestris* and *P.strobus*). Todos los equipos obtuvimos células con características embriogénicas (Trontin et al. 2016) y en nuestro caso, además, se observó expresión de genes implicados en la inducción de embriogénesis (LEC1). Sin embargo, estas células no desarrollaron suspensores. Será necesario desarrollar otros experimentos para tratar de determinar la presencia de otros genes implicados, además de para conseguir la proliferación del tejido celular como el obtenido mediante la utilización de sulfoquinas que han favorecido el desarrollo de suspensores en otras coníferas (Umehara and Kamada 2005).

En resumen, esta tesis doctoral se ha centrado en profundizar en algunos aspectos relativos a la embriogénesis somática en *Pinus radiata*, con especial énfasis en la utilización del estrés abiótico como herramienta para incrementar el éxito del proceso embriogénico. Además, contribuye a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos bioquímicos que intervienen en el desarrollo de embriones somáticos de *Pinus radiata*. Asimismo, describe el método para obtener tejido de tipo embriogénico a partir de individuos adultos y para testar que dicho tejido expresa genes asociados tradicionalmente a los procesos embriogénicos a partir de individuos juveniles.

REFERENCES

- Brownfield DL, Todd CD, Stone SL, Deyholos MK, Gifford DJ (2007) Patterns of storage protein and triacylglycerol accumulation during loblolly pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss Org* 88: 217–223
- Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Toribio M, Bonga JM (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 98:165–178
- 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, Cortizo M, de Diego N, Moncaleán P, Ordás RJ (2009) Micropropagation of adult Stone pine (*Pinus pinea* L.). *Trees Struct Funct* 23:835-842
- De Diego N, Montalbán IA, Moncaleán P (2010) In vitro regeneration of adult *Pinus sylvestris* trees. *S Afr J Bot* 76:158-162
- Fehér A (2015) Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochim Biophys Acta* 1849:385-402
- Feher A, Pasternak TP, Dudits D (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 74:201–228
- Giri CC, Shyamkumar B, Anjaneyulu C (2004) Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. *Trees* 18:115–135
- Isah T (2016) Induction of somatic embryogenesis in woody plants. *Acta Physiol Plant* 38:118
- 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: 635–647

Lippert D, Zhuang J, Ralph S, Ellis DE, Gilbert M, Olafson R, Ritland K, Ellis B, Douglas CJ, Bohlmann J (2005) Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics* 5: 461–473

Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P (2010) Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: Improving maturation and germination. *Trees Struct Funct* 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, Novák 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. *Physiol Plant* 148: 214–231

Park YS, Lelu-Walter MA, Harvengt L, Trontin JF, MacEacheron I, Klimaszewska K, Bonga JM (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 86:87-101

Robinson AR, Dauwe R, Ukrainetz NK, Cullis IF, White R, Mansfield S (2009) Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant Biotechnol J* 7: 952–963

Salaj T, Matusova R, Salaj J (2015) Conifer somatic embryogenesis – an efficient plant regeneration system for theoretical studies and mass propagation. *Dendrobiology* 74:69-76

Trontin JF, Aronen T, Hargreaves C, Montalbán IA, Moncaleán P, Reeves C, Quioniou S, Lelu-Walter MA, Klimaszewska K (2016) International effort to induce somatic embryogenesis in adult pine trees. In: Park YS, Bonga JM, Moon HK (eds) *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea. pp 211-260

Umehara M, Kamada H (2005) Development of the embryo proper and the suspensor during plant embryogenesis. *Plant Biotechnol* 22:253-260

Zhao J, Wang B, Wang X, Zhang Y, Dong M, Zhang J (2015) iTRAQ-based comparative proteomic analysis of embryogenic and non-embryogenic tissues of Prince Rupprecht's larch (*Larix principis-rupprechtii* Mayr). *Plant Cell Tiss Org* 120: 655–669

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.-La modificación de las condiciones físico-químicas utilizadas para la iniciación del tejido embriogénico de *P. radiata* suponen una mejora en el número de líneas celulares establecidas, con lo que se puede utilizar para aumentar la diversidad clonal de un programa de mejora genética. Disminuir la temperatura y la disponibilidad de agua (18°C/4 gL⁻¹gelrite) mejora los porcentajes de iniciación. Un incremento de la temperatura de cultivo durante la fase de iniciación del tejido embriogénico (28°C) ejerce un efecto a largo plazo observándose al final de la fase de maduración un aumento en el número de embriones somáticos producidos.

2.-Las modificaciones de las condiciones ambientales durante la fase de maduración del tejido embriogénico no tienen un efecto significativo en la conversión de embriones somáticos a plantas.

3.-La aplicación de condiciones ambientales “desfavorables” para la iniciación de tejido embriogénico determinan el perfil proteico de los embriones somáticos tras la etapa de maduración del tejido embriogénico. Algunas de estas proteínas están relacionadas con respuestas de defensa y estrés oxidativo.

4.-Es posible obtener células de características embriogénicas a partir de material adulto de *Pinus radiata* D. Don. El tejido obtenido no pudo proliferarse aunque se observó expresión del genLEC1, descrito como marcador en procesos embriogénicos.

