

La embriogénesis somática como vía de regeneración clonal de especies forestales mediterráneas

Somatic embryogenesis as a regeneration method for clonal propagation of Mediterranean forest species

C. Celestino¹, I. Hernández¹, E. Carneros¹, D. López-Vela¹, J. Jiménez¹, J. Alegre¹, A. Vieira-Peixe², A. Zavattieri² & M. Toribio¹

RESUMO

La mejora y conservación de recursos genéticos en especies forestales lleva siglos de retraso con respecto a las especies agrícolas. Los recursos forestales se han considerado tradicionalmente como recursos “mineros”, en los que primaba la mera extracción dejando exclusivamente a la regeneración natural la labor de sostenibilidad en los montes y dehesas o montados. Hoy en día, el necesario desarrollo del medio rural obliga a la explotación racional de los recursos como medio de garantizar su sostenibilidad. Por ello se está empezando a extender el criterio de que las especies forestales se pueden y deben “cultivar” en determinados espacios.

Las características biológicas de las especies forestales las hacen, a menudo, recalci-trantes a las técnicas de mejora y conservación de recursos genéticos tradicionalmente aplicadas a especies agrícolas. En particular, la propagación vegetativa se ha utilizado ampliamente en muchos cultivos leñosos como una herramienta muy poderosa para capturar todo el potencial genético de combinaciones genéticas valiosas. En especies forestales, en

particular en las mediterráneas, esta posibilidad raramente se ha podido aplicar debido a la baja capacidad morfogénica de estas especies y la fuerte influencia de la maduración o cambio de fase.

En los últimos años la biotecnología forestal ha tenido un desarrollo espectacular. En particular las técnicas de regeneración clonal de plantas basadas en técnicas de cultivo *in vitro*, fundamentalmente vía embriogénesis somática, se están ya aplicando por muchas empresas privadas e instituciones públicas a nivel semi-operativo con diversas especies, para la conservación de material selecto y el establecimiento de ensayos clonales.

Nuestros grupos de trabajo están desarrollando protocolos de regeneración por embriogénesis somática en distintas especies forestales. En esta comunicación se presenta el estado actual de los conocimientos en dos especies típicamente mediterráneas, el alcornoque (*Quercus suber* L.) y el pino piñonero (*Pinus pinea* L.), destacando los principales cuellos de botella para su aplicación a gran escala.

¹ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín, Apdo. Postal 127, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España; e-mail: mariano.toribio@madrid.org;

²Instituto de Ciências Agrárias Mediterrânicas (ICAM), Universidade de Évora; e-mail: zavattieri@uevora.pt

ABSTRACT

Breeding programs and activities of conservation of genetic resources of forest species are years behind the equivalents in agriculture. Forest resources have been traditionally considered as "mining supplies", in which extraction was the main object, leaving exclusively to natural regeneration the "labour" of maintenance of the stands. Nowadays, the necessary development of rural lands forces to a rational exploitation of resources to guarantee its sustainability. Because of that, the opinion that forest species can and must be "harvested" in specific areas is beginning to be spread.

Biological characteristics of forest species make them, sometimes, recalcitrant to the breeding and conservation techniques usually applied to agricultural species. Particularly, vegetative propagation has been highly used in woody harvests as an effective tool for achieving higher genetic gains, making use of the best genetic combinations. In forest species, especially the Mediterranean ones, this method of improvement has been hardly applied, due to the low morphogenetic ability and the great influence of maturation or phase change on this trait. Over the last few years, forest biotechnology has had a great development. Particularly, plant regeneration techniques based on *in vitro* tissue culture, mainly via somatic embryogenesis, are being used by different private firms and public institutions for the conservation of selected trees and for the establishment of clonal trials with different species.

Our research teams are developing protocols for the regeneration of different forest species via somatic embryogenesis. This work presents the actual state of knowledge in two typical Mediterranean species: cork oak (*Quercus suber* L.) and stone pine (*Pinus pinea* L.) highlighting the main bottle-necks for their application on a large scale.

INTRODUCCIÓN

En términos globales, debido al incremento previsto de la población mundial, así como al necesario aumento de la calidad de vida en áreas actualmente deprimidas, se espera un aumento considerable de la demanda de productos de la agricultura y de la silvicultura. Las proyecciones para el año 2010 indican que la industria forestal necesitará un 30% más de materias primas que en 1995, considerando incluso la creciente utilización de fibra reciclada. Hace 10 años más del 70% de la producción forestal venía de los bosques naturales y menos del 30% de plantaciones (Pâques, 1999). Sin embargo, ya en 1992 se empezaba a utilizar en Canadá, país en que la actividad forestal es una de las bases de su economía, un lema muy gráfico, "from mining to farming": pasar de considerar la producción forestal como una actividad minera, de simple extracción, a comenzar el cultivo de especies forestales, siguiendo las pautas aprendidas de la agricultura. Como consecuencia de la Conferencia de Río, se espera que la contribución de productos forestales procedente de los bosques naturales baje a menos del 30%, mientras que la contribución de las plantaciones y de las industrias de reciclado suba a más del 40 y 30% respectivamente (Pâques, 1999). Ello permitirá la conservación de la biodiversidad y de la variabilidad genética de especies forestales en los bosques naturales (que se deben aprovechar pero con otros criterios, fomentando también actividades de caza, ocio, culturales, etc.), y que la producción se lleve a cabo de forma intensiva en plantaciones expresamente diseñadas para ello. En estas plantaciones la mejora, genética (incluyendo la opción clonal) y silvícola ha de jugar un papel fundamental. El incremento de la producción que se puede lograr en dichas plantaciones será un freno a la presión antrópica sobre los bosques naturales.

En Europa, los excedentes de producción agraria llevaron hace ya unos años a la reforma de la Política Agraria Comunitaria (PAC) que instituía, entre otras medidas, un régimen de ayudas a la reforestación de tierras agrarias (Reglamento CEE 2080/92). Con base en estas medidas se inició tanto en España como en Portugal, entre 1994 y 1996, un ambicioso programa de reforestación, cuya primera fase se dio por concluida en 1999. El conjunto de los planes a desarrollar supuso la forestación de 400.930 ha con una inversión de 755 millones de euros en España (Ayuso & Méndez, 1999), y 139.047 ha invirtiendo 136 millones de euros en Portugal (Lopes & Pinto-Ribeiro, 1999). Una parte muy importante de dicha reforestación se llevó a cabo con especies mediterráneas de los géneros *Quercus* y *Pinus*. La experiencia acumulada en la ejecución de estos planes abrió grandes perspectivas para los años siguientes que se concretaron, en el caso de España, sobre la base de lo acordado en la Agenda 2000 y en un nuevo Programa Nacional de Forestación. Dicha experiencia debería haber contribuido a mejorar aspectos poco considerados en el periodo anterior, sobre todo el relacionado con una mayor atención a la calidad del material genético empleado (Mejías, 1999), pero sin embargo en este último aspecto se carece aún de mucho conocimiento. Así, se dispone de información sobre técnicas silvícolas para la implantación y cuidados de las especies utilizadas, pero se tiene una información muy escasa sobre los aspectos genéticos relacionados con las mismas. El desarrollo rural, particularmente en las regiones mediterráneas, obliga a cuidar y explotar adecuadamente sus recursos forestales, por lo que ha llegado el momento de empezar a considerar muchas de sus especies como un cultivo y tratarlas como tal en plantaciones, en las que la calidad y uniformidad sean de-

terminantes. Para su consecución la biotecnología puede jugar un papel fundamental.

APLICACIONES DE LA BIOTECNOLOGÍA FORESTAL

“En la segunda mitad del siglo XX ha habido un desarrollo considerable de la Electrónica y de la Informática. El siglo XXI será testigo de la explosión de la Biotecnología”. Esta consideración, frecuentemente mencionada en círculos económicos, toma sus bases en los espectaculares desarrollos de los últimos años del siglo pasado, que culminaron con la publicación de la secuencia del genoma humano. La biotecnología es un campo de actuación con los seres vivos y sus productos que tiene muchas facetas y de la que se han dado múltiples definiciones, desde algunas muy amplias hasta otras demasiado utilitaristas. El-Kassaby (2004) propone la siguiente: “*el uso de organismos enteros o de porciones específicas de los mismos para proporcionar información cuantitativa y/o productos valiosos, que puede incluir el aislamiento y/o la manipulación de componentes genéticos específicos de dichos organismos*”. Con esta definición el autor pretende hacer ver que la biotecnología no es sólo la manipulación de los genomas de los seres vivos, aspecto que causa preocupación en la opinión pública, sino que también tiene otras posibilidades de gran interés. Sus herramientas permiten por una parte generar información para una mejor gestión de los recursos naturales (conservación y uso sostenible), y por otra parte producir plantas para utilizar con fines operativos en plantaciones con gestión genética y silvícola intensiva, las cuales serán la mejor defensa de los bosques naturales al satisfacer la presión de la demanda (Sutton, 2002). Una estrategia ibérica sobre los recursos genéticos forestales debería contem-

plar el papel de la Biotecnología para no perder el tren de otros países. Debido a la importancia de este ámbito, organismos internacionales como la FAO, que tienen grupos interdepartamentales sobre biotecnología y bioseguridad, en su programa regular sobre recursos genéticos forestales están tratando estos temas. Para ello se basan en las recomendaciones de un panel internacional de expertos que se lleva reuniendo cada 2-4 años desde 1968. En su última reunión celebrada a final de 2003, sobre la base de un documento de trabajo previo (El-Kassaby, 2004) este panel resaltó el papel a desempeñar por la FAO en la concienciación del potencial y limitaciones de la Biotecnología en el sector forestal, recomendando que continúe proporcionando información amplia y actualizada a los países y otras organizaciones internacionales sobre aspectos relacionados con el uso de estas tecnologías (FAO, 2004).

Biotecnologías y Aplicaciones

La Biotecnología Forestal sigue los pasos de la Biotecnología vegetal aplicada a la Agricultura. De los muchos congresos habidos en los últimos años sobre esta materia, así como de diversas revisiones (Campbell *et al.*, 2003) se pueden establecer diferentes divisiones en categorías tecnológicas de la Biotecnología Forestal, que varían según los autores (El-Kassaby, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, se pueden apreciar dos grandes líneas en función de su aplicación: las categorías destinadas a obtener información sobre la variabilidad de los seres vivos y sobre sus procesos de crecimiento y desarrollo, basadas fundamentalmente en las técnicas de biología molecular, y las destinadas a producir plantas, nativas o modificadas, basadas en las técnicas del cultivo *in vitro*. En la primera línea se situarían

cuatro grandes categorías, en cada una de las cuales se podrían encontrar diferentes campos de aplicación: Marcadores, Genómica, Proteómica y Metabólica. En la segunda línea tendríamos dos categorías básicas: Regeneración de Plantas y Modificación Genética. Entre todas estas categorías se establecen solapamientos, precisando en muchas ocasiones unas de otras. Asimismo, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos ha propiciado el desarrollo de la Crioconservación, como categoría adicional, de amplio uso en el sector agrícola. La embriogénesis somática, por su gran capacidad multiplicativa y por sus posibilidades de automatización, se está configurando como la vía principal para la regeneración clonal de plantas de especies forestales. En muchos países, tanto instituciones públicas como empresas privadas la están utilizando para el establecimiento de plantaciones operativas (como es el caso de la palma de aceite), o a nivel semioperativo para la conservación de genotipos selectos y la instalación de ensayos clonales (Celestino *et al.*, 2005a).

Situación en España

El número de grupos de trabajo implicados en España en este campo tan amplio y diverso es muy escaso y con poca masa crítica (Toribio & Celestino, 2000), aunque se encuentran en claro aumento. En los últimos años se han constituido redes temáticas para coordinar la actividad de estos grupos de investigación, fomentando las interrelaciones entre los mismos. Los grupos de investigación españoles que trabajan en el desarrollo de herramientas biotecnológicas, o usan de las herramientas de la biotecnología para diversas aplicaciones en el ámbito del uso y la conservación de recursos genéticos forestales, se encuentran mayoritariamente reflejados en las páginas web de dos redes. La primera, de ámbito más general, es GENFO-

RED (INIA, 2005). La segunda, que recoge un mayor número de grupos dedicados a la Biotecnología Forestal y en la que se disponen encuadrados en las diferentes categorías antes mencionadas, es la red “Genómica Funcional en especies de interés Forestal” (MEC, 2005). Recientemente se han empezado a promover nuevas formas de intercomunicación, ligadas al VI programa marco de la UE. Así por ejemplo, se está en proceso de creación de una “Plataforma Española de Genómica Vegetal” con el fin de conectar la comunidad científica con el sector empresarial y la Administración en el campo de la Genómica y la Biotecnología Vegetal en general. Asimismo, organizaciones empresariales del sector forestal como CONFEMADERA y ASPAPEL han promovido la constitución del nodo español de la “Plataforma Forestal Europea” para potenciar el futuro de innovación y desarrollo tecnológico.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ALCORNOQUE Y PINO PIÑONERO

El equipo de investigación del IMIDRA lleva años trabajando sobre embriogénesis somática en alcornoque (*Quercus suber* L.) y recientemente ha comenzado una colaboración con el equipo de la Universidad de Évora sobre el pino piñonero (*Pinus pinea* L.), dos especies forestales típicamente mediterráneas.

Las primeras respuestas de embriogénesis en alcornoque se observaron en cotiledones de embriones cigóticos (Toribio & Celestino, 1989). Años después se demostró la posibilidad de obtener embriones somáticos a partir de hojas de plantas jóvenes (Fernández-Guijarro *et al.*, 1991), determinándose las condiciones para su conversión en plantas (Fernández-Guijarro *et al.*, 1994). La multiplicación de embriones somáticos tiene

lugar mediante embriogénesis secundaria en medio sin reguladores de crecimiento, lo que genera un proceso recurrente prácticamente ilimitado en el tiempo (Fernández-Guijarro *et al.*, 1995). Estos embriones secundarios se generan fundamentalmente por medio de un proceso de gemación multicelular a partir de células superficiales de la caliptra, pero también se pueden observar embriones que se inician a partir de células únicas o de pequeños grupos celulares que se aíslan del tejido en proliferación (Puigderrajols *et al.*, 1996). Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden generar variación somaclonal; sin embargo no se ha observado variación en el patrón de marcadores de ADN tipo RAPDs dentro de diferentes líneas embriogénicas de alcornoque (Gallego *et al.*, 1997). El resultado más importante ha sido la demostración de que es posible obtener embriones somáticos a partir de tejidos procedentes de árboles adultos, tanto en alcornoque como en encina (*Quercus ilex* L.) (Toribio *et al.*, 2000). Desde entonces se está logrando la regeneración a partir de hojas de alcornoques de distintas procedencias (Hernández *et al.*, 2001), e incluso de árboles selectos (Hernández *et al.*, 2003). Las líneas embriogénicas de alcornoque soportan bien la crioconservación, pudiéndose reactivar y regenerar plantas sin especiales dificultades (Valladares *et al.*, 2004). Asimismo los cultivos embriogénicos son un material ideal para aplicar técnicas de transformación genética (Álvarez *et al.*, 2004). Se ha establecido un ensayo en campo para comparar el comportamiento de las plantas procedentes de embrión somático frente a las de bellota, así como de las que proceden de inducciones en árboles adultos frente a las de inducciones en hojas de plantas jóvenes, a fin de verificar el supuesto rejuvenecimiento (Celestino *et al.*, 2005b).

Por tanto, la posibilidad de clonar genotipos selectos de alcornoque, bien para su

conservación o bien para establecer ensayos clonales a fin de obtener información sobre parámetros genéticos e influencia del ambiente sobre los caracteres de interés, es hoy en día una posibilidad real. Sin embargo quedan cuellos de botella si se trata de llevar esta técnica al terreno operativo. El más importante, de cara a poder establecer sistemas automatizados de producción, es lograr cultivos sincrónicos de embriones, en los que se pueda controlar de forma más efectiva el proceso de maduración. El fomento de la iniciación de embriogénesis secundaria por la vía unicelular, así como el cultivo en biorreactores de inmersión transitoria (TIS), son posibilidades muy atractivas (Jiménez *et al.*, 2005).

El pino piñonero es una especie muy recalcitrante a la propagación vegetativa. Presenta dificultades en el estaquillado y puede mostrar una influencia muy acusada del fenómeno de topófitis. Nunca se ha publicado un artículo sobre embriogénesis somática en esta especie. En nuestros equipos, colaborando con los Drs. Bonga, Klimaszewska y Park (Canadá), se ha logrado la inducción de masas pre-embriogénicas a partir de embriones cigóticos de familias selectas, procedentes de un huerto semillero clonal (Carneros *et al.*, 2005). En los cultivos de masas de embriones-suspensores, se han observado embriones con diferentes grados de diferenciación. Por el momento existen dificultades para el mantenimiento en crecimiento activo de estas líneas embriogénicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, R., Alonso, P., Cortizo, M., Celestino, C., Hernández, I., Toribio, M. & Ordás, R.J. 2004. Genetic transformation of selected mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees. *Plant Cell Rep*, **23**: 218-223.
- Ayuso, J. & Méndez, P. 1999. Balance cualitativo y cuantitativo del programa de forestación de tierras agrarias en España. Reglamento (CEE) 2080/92 sobre medidas forestales en la agricultura. *Congreso sobre Forestación en las Dehesas*. Junta de Extremadura, Mérida, España.
- Campbell, M.M., Brunner, A.M., Jones, H.M. & Strauss, S.H. 2003. Forestry's fertile crescent: the application of Biotechnology to forest trees. *Plant Biotechnology Journal*, **1**: 141-154.
- Carneros, E., Zavattieri, A., Hernández, I., Toribio, M. & Celestino, C. 2005. Inducción de masas preembriogénicas en embriones cigóticos de pino piñonero. *Congreso Forestal Nacional, Sociedad Española de Ciencias Forestales (SECF)*, pp. 202. Zaragoza, España.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D. & Toribio, M. 2005a. La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. In I. Aranda, M.T. Cervera, M. Pardos (eds) *Ecophysiology: from genes to ecosystems. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de serie*, pp. 345-357. INIA, Madrid, España.
- Celestino, C., Hernández, I., López-Vela, D., Carneros, E., Alegre, J., Fernández-Guijarro, B., Cardo, L. & Toribio, M. 2005b. First data from a field trial of *Quercus suber* plants regenerated from mature selected trees and from their half-sib progenies by somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* (en prensa).
- El-Kassaby, Y. 2004. Feasibility and proposed outline of a global review of forest biotechnology. Forest Genetic Resources Working Paper FGR/77E: Forest Resources Development Service, Forest Resources Division. Fao, Rome.
- FAO. 2004. Report of the 13th Session of the FAO Panel of Experts on Forest Genetic

- Resources. Rome, Italy. 10-12 November 2003. FO:FGR/13/Rep.
- Fernández-Guijarro, B., Celestino, C. & Toribio, M. 1991. Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. I.U.F.R.O. Working Party on Genetics of *Quercus* species. Arboretum National des Barres, France.
- Fernández-Guijarro, B., Celestino, C. & Toribio, M. 1994. Somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. In J.A. Pardos, M.R. Ahuja, R. Elena-Rossello (eds) *Biotechnology of Trees. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie nº 4*, pp. 105-110. INIA, Madrid, España.
- 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*. *Plant Cell, Tissue Org Cult*, **41**: 99-106.
- Gallego, F.J., Martínez, I., Celestino, C. & Toribio, M. 1997. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos. *Int J. Plant Sci.*, **158**: 563-567.
- Hernández, I., Celestino, C., Alegre, J. & Toribio, M. 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis: II. Plant regeneration from selected cork oak trees. *Plant Cell Rep.*, **21**: 765-770.
- Hernández, I., Celestino, C., Martínez, I., Manjón, J.L., Díez, J., Fernández-Guijarro, B. & Toribio, M. 2001. Cloning mature cork oak (*Quercus suber* L.) trees by somatic embryogenesis. *Melhoramento*, **37**: 50-57.
- INIA. 2005. <http://www.inia.es/gcont/redes tem/centrosydep.jsp?idcentro=69&tema=relint>
- Jiménez J., Hernández, I., López-Vela, D., Toribio, M. & Alegre, J. 2005. Desarrollo de embriones somáticos de alcornoque en biorreactores de inmersión temporal. VI *Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos vegetales*, pp. 38 Córdoba, España.
- Lopes, F.J. & Pinto-Ribeiro, J.R.D. 1999. Arborização de terras agrícolas em Portugal. Análise quantitativa e qualitativa (considerações breves). *Congreso sobre Forestación en las Dehesas*. Junta de Extremadura, Mérida, España.
- MEC. 2005 http://foto.difo.uah.es/forestgenomics_es/index_esp.html. Ministerio de Educación y Ciencia, España.
- Mejías, F. 1999. Balance del programa de forestación de tierras agrarias en Extremadura. *Congreso sobre Forestación en las Dehesas*. Junta de Extremadura, Mérida, España.
- Pâques, M. 1999. Industrial applications of forest biotechnology. In S. Espinel & E. Ritter (eds) *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics Biofor'99*, pp. 525-526. Vitoria-Gasteiz, España.
- Puigderrajols, P., Fernández-Guijarro, B., Toribio, M. & Molinas, M. 1996. Origin and early development of secondary embryos in *Quercus suber* L. *Int J Plant Sci*, **157**: 674-684.
- Sutton, B. 2002. Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Annals of Forest Science*, **59**: 657-661.
- Toribio, M. & Celestino, C. 1989. Cultivo in vitro del alcornoque. *Scientia Gerundensis*, **15**: 11-21.
- Toribio, M. & Celestino, C. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. In L.A. Gil & R. Alía (eds) *Conservación de Recursos Genéticos Forestales. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales. Fuera de Serie, nº 2*, pp. 249-260. INIA, Madrid, España.
- Toribio, M., Celestino, C., Gallego, J. & Martínez, I. 2000. Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature

oak trees. In F.Ó. Ríordáin (eds) *Development of Integrated Systems for Large-scale Propagation of Elite Plants Using in Vitro Techniques*. EUR 19237, ISBN 92-828-8599-2, pp. 236-237. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C. & Vieitez, A.M. 2004. Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. *CryoLetters*, **25**: 177-186.