UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y BIOSANITARIA

**Mejora de protocolos de regeneración por
embriogénesis somática en pino piñonero**

TESIS DOCTORAL

Nuria González Cabrero

Licenciada en Biología

2018

**Programa Oficial de Doctorado en Biotecnología y Recursos Genéticos de Plantas
y Microorganismos Asociados**

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL

INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL,
AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDRA)

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Tesis doctoral:

Mejora de protocolos de regeneración por embriogénesis somática en pino piñonero

Autora:

Nuria González Cabrero

Licenciada en Biología

Directora de Tesis:

Dra. Cristina Celestino Mur

Doctora en Ciencias Biológicas

Año: 2018

POLITÉCNICA

UNIVERSDAD POLIOTÉCNICA DE MADRID

Tribunal nombrado por el Magnífico y Excelentísimo Sr. Rector de la
Universidad Politécnica de Madrid, el día _____

Presidente:

Secretario:

Vocal:

Vocal:

Vocal:

Suplente:

Suplente:

A Nati

*“Nada en el mundo sustituye a la constancia.
El talento no la sustituye, pues nada es tan
corriente como los inteligentes frustrados. El
genio tampoco, ya que resultan ser tópico el
caso de los genios ignorados. Ni si quiera la
educación sustituye a la constancia, pues el
mundo está lleno de fracasados bien
educados. Solamente la constancia y la
decisión lo consiguen todo.”*

Baltasar Gracián

INDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. DESCRIPCIÓN Y DISTRIBUCIÓN, APROVECHAMIENTO Y MEJORA GENÉTICA DE LA ESPECIE	15
1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CONÍFERAS	26
1.2.1. <i>Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros</i>	31
1.2.2. <i>Inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos</i>	34
1.2.3. <i>Establecimiento y mantenimiento de líneas embriogénicas en medio líquido. Producción de biomasa en medio semisólido y líquido</i>	37
1.2.4. <i>Diferenciación-maduración de embriones somáticos</i>	39
1.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD HÍDRICA SOBRE EL PATRÓN DE METILACIÓN EN LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS	41
1.4. OBJETIVOS	44
II. MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS	49
2.1.1. <i>Caracterización y almacenamiento en frío de las piñas</i>	50
2.1.2. <i>Inducción de embriogénesis somática</i>	50
2.1.3. <i>Proliferación del material embriogénico</i>	53
2.2. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SECUNDARIA EN EMBRIONES SOMÁTICOS	54
2.2.1. <i>Inducción en embrión somático cotiledonar</i>	56
2.2.2. <i>Inducción en embrión somático precotiledonar e inmaduro</i>	57
2.2.3. <i>Diferenciación-maduración en el material generado</i>	57
2.3. ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS EN MEDIO LÍQUIDO. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO SEMISÓLIDO Y LÍQUIDO	58
2.3.1. <i>Condiciones de cultivo para el establecimiento de cultivos en suspensión</i>	58
2.3.2. <i>Procedimientos para el mantenimiento de los cultivos en suspensión</i>	59
2.3.3. <i>Escalado de los cultivos para la producción de biomasa</i>	60
2.3.4. <i>Evaluación de la capacidad de maduración de los cultivos embriogénicos generados</i>	61
2.4. DIFERENCIACIÓN-MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO	62

2.4.1. <i>Efecto del suplemento con carbohidratos durante la maduración</i>	63
2.4.2. <i>Efecto de la temperatura durante la proliferación y maduración de líneas embriogénicas</i>	64
2.4.3. <i>Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración</i>	66
2.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD HÍDRICA SOBRE EL PATRÓN DE METILACIÓN EN LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS	68
2.5.1. <i>Material vegetal y condiciones de cultivo</i>	68
2.5.2 <i>Análisis del grado de metilación del ADN (MSAP)</i>	69
III. RESULTADOS	77
3.1. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS	79
3.1.1. <i>Caracterización y almacenamiento en frío de las piñas inmaduras</i>	79
3.1.2. <i>Inducción de embriogénesis somática</i>	87
3.1.3. <i>Proliferación del material embriogénico</i>	90
3.2. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SECUNDARIA EN EMBRIONES SOMÁTICOS	91
3.2.1. <i>Inducción en embrión somático cotiledonar</i>	91
3.2.2. <i>Inducción en embrión somático precotiledonar e inmaduro</i>	93
3.2.3. <i>Diferenciación – maduración en el material generado</i>	96
3.3. ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS EN MEDIO LÍQUIDO. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO SEMISÓLIDO Y LÍQUIDO	98
3.3.1. <i>Condiciones de cultivo para el establecimiento de cultivos en suspensión</i>	98
3.3.2. <i>Procedimientos para el mantenimiento de los cultivos en suspensión</i>	104
3.3.3. <i>Escalado de los cultivos para la producción de biomasa</i>	105
3.3.4. <i>Evaluación de la capacidad de maduración de los cultivos embriogénicos generados</i>	107
3.4. DIFERENCIACIÓN-MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO	108
3.4.1. <i>Efecto del suplemento con carbohidratos durante la maduración</i>	108
3.4.2. <i>Efecto de la temperatura durante la proliferación y maduración de líneas embriogénicas</i>	109
3.4.3. <i>Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración</i>	114
3.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD HÍDRICA SOBRE EL PATRÓN DE METILACIÓN EN LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS	116
3.5.1. <i>Cuantificación del ADN</i>	116
3.5.2. <i>Marcadores MSAP</i>	118

IV. DISCUSIÓN	123
4.1. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EMBRIONES CIGÓTICOS INMADUROS	125
4.2. INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SECUNDARIA EN EMBRIONES SOMÁTICOS	130
4.3. ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS EN MEDIO LÍQUIDO. PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN MEDIO SEMISÓLIDO Y LÍQUIDO	135
4.4. DIFERENCIACIÓN-MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CULTIVO	144
4.5. EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DISPONIBILIDAD HÍDRICA SOBRE EL PATRÓN DE METILACIÓN EN LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS	150
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFÍA	161
VII. AGRADECIMIENTOS	191
VIII. ANEXO	195

RESUMEN

El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie forestal nativa de la cuenca mediterránea de alto valor ecológico, como medio de protección de costas y estabilización de dunas continentales, así como económico por sus semillas comestibles. Las plantaciones forestales de producción intensiva podrían aliviar la gran demanda de productos forestales de calidad. Los programas de mejora genética en España de esta especie, considerada como frutal, se dirigen principalmente a la mejora del rendimiento de semilla mediante el cultivo en huertos injertados. Para ello sería conveniente el desarrollo de variedades de portainjertos adaptados a diferentes condiciones ambientales. La embriogénesis somática (ES) como biotecnología para la propagación clonal, se considera una herramienta indispensable en el desarrollo de variedades y plantaciones forestales. La regeneración de plantas por ES se ha conseguido en varias coníferas de interés económico, y la producción industrial en masa de embriones somáticos ha requerido el desarrollo de técnicas de cultivo en suspensión del tejido embriogénico en biorreactores. Para maximizar la eficiencia de esta biotecnología, se requiere la optimización de las condiciones de cultivo en cada una de las etapas de su desarrollo.

El establecimiento de marcas epigenéticas inducidas por el medio ambiente conforma una memoria epigenética en las plantas que afecta la expresión a largo plazo de los rasgos adaptativos. La ES se podría utilizar para producir plantas con una impronta que las acondicione para responder a diferentes tipos de estrés. La metilación de las citosinas del ADN es uno de los procesos principales que subyacen a estas marcas epigenéticas. El pino piñonero se caracteriza por su muy baja variación genética pero alta plasticidad adaptativa, relacionada con altos niveles de variación epigenética. Las condiciones de cultivo, temperatura y disponibilidad hídrica, podrían modificar el perfil de metilación de citosinas en líneas embriogénicas de pino piñonero.

Se ha obtenido la regeneración de plantas de pino piñonero por ES a partir de embriones cigóticos inmaduros; sin embargo, esta especie se ha mostrado recalcitrante a la respuesta embriogénica. Entre las principales limitaciones se encuentran las bajas frecuencias de inducción y su variabilidad entre años, así como la baja producción de embriones somáticos con morfología normal en las líneas embriogénicas generadas. La solución de los problemas que se plantean en las etapas de inducción, proliferación y diferenciación-maduración de embriones somáticos podría venir a través de la caracterización del explanto inicial y de las variaciones de las condiciones de cultivo

habituales. La inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos, procedentes de cultivos que han perdido su capacidad para formar embriones con morfología normal, podría ser un sistema de reactivación de las líneas embriogénicas. El desarrollo de cultivos en suspensión de líneas embriogénicas podría incrementar la producción de embriones somáticos.

En el presente trabajo de tesis, aunque se han utilizado varias familias de semillas de polinización abierta y diferentes condiciones de cultivo, no se han podido mejorar las frecuencias de inducción previamente descritas, confirmandose la recalcitrancia del pino piñonero a la respuesta embriogénica. Se ha obtenido una ligera mejora en la producción de embriones en medios suplementados con determinados carbohidratos. El aumento de la temperatura desde la fase de proliferación a la de maduración estimuló la maduración. Cultivos mantenidos a 28°C durante la proliferación y maduración produjeron mayor número de embriones en una de las líneas embriogénicas. La menor disponibilidad hídrica durante la proliferación redujo la producción de embriones. Las masas generadas por embriogénesis secundaria mostraron una capacidad para producir embriones similar a las masas procedentes de los cultivos envejecidos. Los cultivos embriogénicos en suspensión incrementaron la producción de biomasa. Un moderado estrés hidrodinámico y una menor concentración de reguladores durante la proliferación mejoraron la producción de embriones somáticos.

El perfil de metilación del ADN, determinado por marcadores MSAP, detectó diferencias entre genotipos y entre distintas condiciones de temperatura y disponibilidad hídrica en uno de los genotipos. Algunos de los marcadores MSAP mostraron un aumento de intensidad de bandas desde las masas en proliferación a los embriones somáticos aislados, lo cual sugiere un mayor grado de desmetilación asociado con el proceso de diferenciación.

ABSTRACT

The stone pine (*Pinus pinea* L.) is a native forest species of the Mediterranean basin. This specie has high ecological value such as coast protection and stabilization of continental dunes, as well as economic value for its edible seeds. Intensive management forest plantations could reduce the increased demand for high-quality forest products. Genetic programs to improve this specie in Spain, considered as fruit tree, are leaded mainly to the improvement of seed yield through cultivation in grafted orchards. For this purpose, development of varieties of rootstocks adapted to different environmental conditions would be convenient. Somatic embryogenesis (SE) is a biotechnology for clonal propagation and it is considered an indispensable tool in the development of forest varieties and plantations. The regeneration of plants by SE has been achieved in several economical interesting conifers. The large-scale production of somatic embryos has required for the development of embryogenic suspension cultures in bioreactors. To maximize the efficiency of this biotechnology, it is necessary to optimize cultivation conditions at each development stages.

The epigenetic marks induced by the environment factors establish an epigenetic memory in plants that affects expression of adaptive traits for long-term. SE could be used to produce primed plants conditioned to cope with different kind of stress. Cytosine methylation of global DNA is one of the main processes underlying these epigenetic marks. The stone pine is characterized by its very low genetic variation but high adaptive plasticity, related to high levels of epigenetic variation. Culture conditions as temperature and water availability, could modify the cytosine methylation profile in embryogenic lines of stone pine.

Plant regeneration of stone pine by SE has been achieved through immature zygotic embryos. However, this species has been described recalcitrant to the embryogenic response. Among the main limitations are the low induction frequencies and their variability between years, as well as the low production of normal somatic embryos in the generated embryogenic lines. The problems solving of induction stage, proliferation stage and differentiation-maturation of somatic embryos could solve by characterization of the initial explant and usually variations of the culture conditions. Induction of secondary embryogenesis in somatic embryos, which have lost their capacity

to produce embryos with normal morphology, could be a reactivation system of embryogenic lines. The development of embryogenic suspension cultures could increase the production of somatic embryos.

In the present thesis, although several families of open-pollinated cones and different culture conditions have been used, the previously described induction frequencies have not been improved. It has been confirmed the stone pine recalcitrance to the embryogenic response. A slight improvement in the production of embryos has been obtained on media supplemented with some carbohydrates. The increase in temperature from proliferation phase to maturation phase stimulated somatic embryo maturation. Embryogenic cultures maintained at 28°C during proliferation and maturation phases produced a greater number of embryos in one embryogenic line. The lower water availability during proliferation phase reduced embryos production. The embryogenic masses generated by secondary embryogenesis showed a similar embryo production ability that the aged cultures. Embryogenic suspension cultures increased biomass production. Moderate hydrodynamic stress and lower concentration of PGRs during proliferation phase improved the somatic embryos production.

DNA methylation profile detected by MSAP markers, showed differences between genotypes and between different temperature conditions and water availability in one genotype. Some of the MSAP markers associated with development showed an increase in intensity of the bands from proliferation masses to isolated somatic embryos, suggesting a greater degree of demethylation associated with differentiation processes.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y distribución, aprovechamiento y mejora genética de la especie

Descripción y distribución. El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) es una especie forestal de gran interés económico, cultural y ambiental. La taxonomía lo ubica como una especie única de la familia *Pinaceae*, subgénero *Pinus* en la sección *Pinea*. Distinguiendo dos variedades: *correvoniana* Hornib y *fragilis* Duhamel (Prada *et al.*, 1997). Esta especie xerófila y relativamente termófila crece en torno a una temperatura media anual de 11.7-17.7°C, aunque soporta temperaturas extremas desde los -15°C hasta los 45°C. Se encuentra en terrenos ubicados en un rango desde el nivel del mar hasta altitudes entre 800-1000 m. Tiene unos requerimientos hídricos entre los 250 mm de precipitaciones mínimas hasta un máximo de 1000 mm al año, y es poco exigente en cuanto a nutrientes. Por el contrario, es exigente a nivel de la aireación del suelo, prefiere suelos ácidos arenosos, de baja retención de agua, profundos y frescos (Abellanas, 1990; Ália *et al.*, 2009; García *et al.*, 2012; Calama *et al.*, 2015).

Los individuos de pino piñonero pueden vivir entre los 200-250 años de longevidad, llegando en algunos casos a más de 400 años. El estado adulto y por tanto reproductivo lo alcanzan a los 18 años en individuos aislados y los 25 años en individuos que forman parte de una masa forestal. En este momento pueden alcanzar alturas de 20-30 m incluso superar estas alturas en condiciones óptimas de suelo y clima (Prada *et al.*, 1997; Ália *et al.*, 2009). Presentan un tronco robusto, regular y cilíndrico. Las ramas son abundantes en la parte alta debido a la poda natural en la base del mismo, constituyendo la copa aparasolada típica de esta especie. Sin embargo, los individuos juveniles tienen una copa esférica debido a las ramificaciones de la base. Su corteza es de color pardo-rojizo y luego se resquebraja en teselas grises. Las acículas se disponen en fascículos de dos insertos en braquiblastos, son de color verde oscuro, ligeramente arqueadas, rígidas, pinchosas y ásperas en los márgenes (Borrero Fernández, 2004; García *et al.*, 2012).

Pinus pinea es una gimnosperma y presenta los órganos reproductores o estróbilos de forma independiente en el mismo árbol. La posición de los órganos reproductores dentro de cada pie está más relacionada con el vigor de la rama y el brote anual sobre el que aparecen que por la zonificación de la copa (Mutke, 2000). Estos órganos reproductivos se desarrollan a partir de primordios axilares. Los estróbilos masculinos son oblongo-cilíndricos de 10 a 12 por 2-4 mm, dispuestos en espigas en brotes laterales

o dominantes. Albergan los microesporangios que por meiosis forman los granos de polen. Además, la maduración de las flores masculinas se produce antes que la maduración de las flores femeninas.

La reproducción es alógama y autógena por el corto período que dura la polinización, reducida a unas pocas semanas (García *et al.*, 2012). Los estróbilos femeninos son ovoides de 20 mm de largo, verdosos-rojizos, en escaso número sobre pedúnculos erectos en los brotes dominantes. La diferenciación de estos primordios florales se da un año antes de la polinización entre abril y marzo. Por tanto, las fases de diferenciación floral, polinización, maduración de las semillas y la dehiscencia abarcan un período total de cuatro años, uno más a diferencia de otros pinos (Fig. 1).

Figura 1. Ciclo reproductivo de *Pinus pinea* descrito en Abellanas (1989).

Tras el primer año en el que se diferencian los estróbilos masculinos y femeninos se da la polinización anemófila a comienzos del segundo año. Consiste en el desplazamiento del polen a través del viento desde los estróbilos masculinos hasta los sacos embrionales dispuestos en las escamas ovulíferas de los estróbilos femeninos abiertos. Al entrar el polen en las escamas ovulíferas, se hinchan y se cierran. Sin embargo, no es hasta el tercer año cuando el polen germina formando los tubos polínicos

que conducen dos núcleos espermáticos hasta los arquegonios, produciéndose la fecundación. En este momento, el megagametofito sintetiza sustancias de reserva sin que la piña apenas aumente de tamaño. Siendo el desarrollo del gametofito el que requiere el año de más con respecto a otras especies. Seguidamente la dehiscencia de las piñas y la caída del piñón se produce a lo largo del cuarto año, aunque esta fase desaparece por el apeo (recolección) de las piñas para la extracción del piñón con fines comerciales (Valdivieso y Pimpão, 2017).

El piñón o semilla tiene un tamaño medio de 15-20 x 7-11 mm, aovado-oblonga de color pardo oscuro a negruzco con un ala muy estrecha, rudimentaria, caduca y la testa leñosa (Prada *et al.*, 1997; García *et al.*, 2012). En el interior del megagametofito de color crema encierra al embrión, que constituyen un fruto de gran interés comercial. Es rico en calorías ya que de cada 100 g de piñón sin cáscara el aporte asciende a 693 Kcal. Es rico en proteínas, vitaminas B1 y B2 además de minerales, especialmente potasio, fósforo, hierro y zinc. Sin embargo, son los ácidos grasos insaturados los nutrientes que lo convierten en un fruto con beneficios cardiovasculares además de diferenciarlo dentro del mercado internacional de otros piñones comestibles de *P. koraiensis*, *P. bungeana* y *P. Armandii* con un menor precio. Concretamente los piñones de *P. koraiensis* procedentes de China han devaluado mucho el precio del piñón de piñonero. Sin embargo, la calidad de estos piñones competidores en el mercado internacional es menor debido a su fácil enranciamiento que se debe a la diferente composición en ácidos grasos insaturados. Destaca del ácido pinolénico postulado como marcador bioquímico (Prada *et al.*, 1997; Evaristo *et al.*, 2010; Moreiras *et al.*, 2013).

El ciclo vegetativo, reproductivo y la producción de piñones están muy influenciados por la temperatura del lugar y del año, lo cual puede modificar el momento de iniciación de cada fase en función de la zona geográfica (Borrero Fernández, 2004). Además como especie con períodos no reproductivos o vecería, la producción de piñas se dilata aún más en el tiempo y por tanto también la regeneración de las masas forestales o la obtención de piña (Yagüe, 1997). El interés humano por su valor ornamental o por el fruto comestible han motivado la expansión esta especie en la cuenca mediterránea, ocupando unos 0,7 millones de hectáreas sólo en esta zona (Mutke *et al.*, 2010). Distribuida desde Portugal hasta Israel, identificándose zonas alejadas estrechamente relacionadas a la actividad humana, como Chile que se introdujo en el siglo XX por la

llegada de inmigrantes europeos (Loewe y Delard, 2012). U otros lugares Asia (Georgia, Rusia, Irak, Israel y China), Norteamérica (California, EE.UU.), Sudamérica (Argentina, Chile, Brasil y Uruguay), Europa (Albania, Rusia y Croacia) y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda), además del Norte de África (Túnez, Argelia y Marruecos) (Loewe y Delard, 2016).

Cabe destacar que España es el país donde esta especie ocupaba mayor superficie natural (490.000 has) seguida de Portugal (175.000 has). Por tanto, esta amplia distribución ha llevado a los científicos a preguntarse en los últimos siglos por el origen de la especie, aunque aún está en proceso de debate. Existen dos vertientes en relación al origen de esta especie, la opinión más extendida en la segunda mitad del siglo XX es que el área originaria de *Pinus pinea* está en el mediterráneo oriental y por tanto las poblaciones del centro y occidente de la cuenca mediterránea son consecuencia del factor humano (Borrero Fernández, 2004). Pero la idea de que el centro difusor se encuentre en la Península Ibérica tiene mucho peso porque en ella existe más del 60% de las masas consideradas naturales. Incluso hallazgos paleobotánicos sitúan la presencia de *Pinus pinea* desde el Pleistoceno superior en tierras del sur de España (Carrión *et al.*, 2003; Martínez y Montero, 2004).

El estudio de esta especie en España, llevó a la identificación de siete regiones de procedencia junto a cuatro procedencias de área restringida (ambientes alejados de su óptimo ecológico, suponiéndose que mantienen una estructura genética peculiar que debería conservarse) descritas por Prada y col. en 1997. Sin embargo, los datos más actuales de la Resolución del 28 de julio de 2009 de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, clasifican estas regiones y procedencias además de una quinta procedencia de área restringida, ubicada en la provincia de Badajoz como se pueden ver en la Figura 2.

Las regiones de procedencia son:

1. Meseta Norte
2. Valles del Tiétar y del Alberche
3. La Mancha
4. Depresión del Guadalquivir

5. Sierra Morena
6. Cataluña Litoral
7. Cataluña Interior

Las áreas restringidas son:

- A. Biar
- B. Sierra de Alcaraz
- C. Garrovillas
- D. Marbella
- E. Valverde de Leganés

Figura 2. Regiones de procedencia y áreas restringidas de *Pinus pinea* de la Resolución del 28 de julio de 2009 de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos.

Aprovechamiento y mejora genética. Según los datos extraídos del Anuario de Estadística Forestal (MARM, 2011), la superficie que ocupan las formaciones forestales de *Pinus pinea* en todo el territorio español asciende a un 2,2% del total. Estas áreas son de gran interés para los selvicultores por considerarse al pino piñonero un árbol frutal con grandes perspectivas económicas al alcanzarse un precio cada vez más elevado de piña y piñón. Con el objetivo de adelantar considerablemente la entrada en producción de las nuevas masas a los 5-10 años el injerto cobra gran importancia en España y Portugal a partir de los años cincuenta tras la propagación de clones de grandes productores de piña en Italia. Esto requería un material genético seleccionado para el establecimiento de plantaciones comerciales. Dicha comercialización del piñón debe estar autorizada por la normativa que regula la producción de material forestal de reproducción, que garantice la identidad de la calidad genética (Iglesias *et al.*, 2015; Guadaño *et al.*, 2016). Sin embargo, el proceso de injerto es complejo y debe realizarlo personal especializado.

La necesidad de un material selecto para la propagación del pino piñonero hizo que se desarrollaran Programas de Mejora, paralelos o coordinados, por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, a través del Centro Nacional de Recurso Genéticos Forestales (CNRGF) de la Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal, por la Junta de Castilla y León y la Junta de Andalucía en 1990. Estos programas establecieron en España una serie de bancos clonales de pino piñonero gestionados por:

- Centro Nacional de Recurso Genéticos Forestales
 - “Puerta de Hierro” en las terrazas fluviales del río Manzanares en las afueras de la ciudad de Madrid.
 - “El Serranillo” en la carretera de Fontanar km 2, próximo a la ciudad de Guadalajara.
- Servicio Territorial de Medio Ambiente de la Junta de Castilla y León
 - “El Carrascal” de Quintanilla de Onésimo (Valladolid) en la Meseta Norte I
 - “Navales, Molinillo y la Reguera” en la Meseta Norte II
- Junta de Andalucía
 - “La Mediana” en Almonte (Huelva)
 - “Cabeza Aguda” en Villaviciosa de Córdoba
 - “Peña Sierpes” en Aroche (Huelva)
 - “La Morla” en Arcos de la Frontera (Cádiz)

Estos bancos clonales se establecieron con material vegetal de individuos selectos procedente de las regiones previamente indicadas en el territorio español. Lugares de conservación *ex situ* de individuos de interés para programas de mejora genética, además de ser fuentes de material para ensayos de propagación vegetal. Los bancos clonales del piñonero son plantaciones que permiten conocer la relevancia de los factores genéticos y ambientales para la cantidad y calidad del rendimiento de piñones además del desarrollo de los conos (Mutke *et al.*, 2005a).

Se está incrementando la ya elevada demanda de recursos procedentes de las masas naturales. Se ha estimado que esta demanda de recursos ascendía a 3,4 billones de m³/año (Lelu-Walter *et al.*, 2013), y estimaciones más actuales indican un aumento de las mismas para el 2050 del 75% de la producción (Bonga, 2016). El elevado requerimiento de recursos forestales incluye recursos madereros y no madereros. Incluyendo a *Pinus pinea* dentro de los recursos no madereros debido al consumo humano de piñones.

El rendimiento de la recolección de piñas estaba documentado en 25 kg de piña para producir 1kg de piñones, pero los últimos datos publicados especifican que para obtener esa misma cantidad de piñones actualmente se requieren 40 kg de piñas (Mutke *et al.*, 2017). Este rendimiento se ha reducido debido a los cambios climáticos y el efecto de plagas endémicas para piñón, como *Pissodes validirostris* y *Dioryctria mendacella* además de la plaga americana *Leptoglossus occidentalis*. Esto ha puesto a España por detrás de la producción de piñón de Portugal, aun siendo España el país con mayor extensión de masas forestales de *Pinus pinea* (Iglesias *et al.*, 2015). Por tanto, se requieren herramientas rápidas y eficientes, no sólo plantaciones forestales donde los individuos presenten combinación de caracteres de interés económicos aleatorios. Sino herramientas que permitan producir plantas con los caracteres seleccionados en programas de mejora.

Los programas de mejora genética en España del piñonero surgen del incremento en la demanda sostenida en el mercado internacional de fruto de calidad. Aun siendo un árbol forestal integrado en los ecosistemas mediterráneos, podría considerarse como una especie de cultivo frutal a través del injerto sobre patrones de la misma especie. Para ello, es necesario la delimitación de regiones de procedencia y la prospección masal de árboles grandes productores de piña en las principales regiones de procedencia. Posteriormente, los árboles candidatos seleccionados se propagan vegetativamente mediante su injertado

en parcelas específicas (establecimiento de bancos clonales), para su evaluación. Las púas se recogen de ramillos de la parte alta de la copa cuando aún se encuentran en reposo vegetativo, injertándose en el patrón que debe encontrarse en crecimiento activo (Mutke *et al.*, 2003). La constitución de parcelas homogéneas permite la evaluación de la estima del grado de determinación genética, del valor de mejora de cada clon y de la ganancia genética esperada según la intensidad de selección (Mutke *et al.*, 2005a).

Estudios multidisciplinarios de *Pinus pinea* han concluido que es una especie genéticamente uniforme. Uno de los primeros trabajos que describió este rasgo fue el análisis de variación isoenzimática de Fallour y col. en 1997. Posteriormente, estudios fenotípicos como el crecimiento de las ramas (Buitrago *et al.*, 2001), la producción de piñas (Gordo, 2004; Mutke *et al.*, 2005a), la tasa de supervivencia y adaptabilidad al medio ambiente (Gordo *et al.*, 2007), la altura y el diámetro (Mutke *et al.*, 2010). Estudios bioquímicos como la composición de los ácidos grasos (Nasri *et al.*, 2005; Evaristo *et al.*, 2010) y los minerales en el piñón (Gómez-Ariza *et al.*, 2006). Y estudios genéticos como RAPD (Evaristo *et al.*, 2002), microsatélites de cloroplastos (Gómez *et al.*, 2002; Vendramin *et al.*, 2008), microsatélites nucleares nSRRs (Pinzauti *et al.*, 2012) y MSAP (Sáez-Laguna *et al.*, 2014).

Actualmente los estudios de carácter epigenético han suscitado gran interés en especies forestales como *Pinus radiata* (Fraga *et al.*, 2002), *Picea abies* (Yakovlev *et al.*, 2011), *Quercus ilex* (Rico *et al.*, 2014) o (Sáez-Laguna *et al.*, 2014); siendo esta última idónea para el estudio de la interacción genotipo-ambiente desde un punto de vista epigenético. No se ha encontrado otra especie forestal tan abundante y extendida que tenga tan poca diversidad genética a nivel de marcadores nucleares y de cloroplastos como el pino piñonero, sin embargo alberga una cantidad no despreciable de variación en los rasgos de adaptación (Vendramin *et al.*, 2008). Por tanto, estos autores indican que “no se puede dar por sentada una relación causal entre la diversidad genética, medida por los loci marcadores, y la precariedad evolutiva de una especie” (Vendramin *et al.*, 2008, p. 686).

Estudios recientes tratan de entender el papel de procesos epigenéticos en ecología y evolución. Hoy se conoce que la variación natural puede existir no solo en la secuencia de ADN sino también a nivel epigenético, y que la variación epigenética puede causar

una variación heredable significativa en los rasgos fenotípicos (Richards *et al.*, 2010; y referencias incluidas). Además, determinadas modificaciones epigenéticas hereditarias pueden ser desencadenadas por la exposición a diferentes condiciones ambientales (Bräutigam *et al.*, 2013). A nivel molecular, los fenómenos epigenéticos están mediados por marcas reversibles como la metilación del ADN y modificaciones de la histona, y por pequeños ARNs que pueden alterar los estados reguladores de genes o regiones genómicas. Las modificaciones del epigenoma están involucradas en procesos biológicos que incluyen la impresión genética, el silenciamiento del transposón, la regulación de la expresión génica y la organización de la heterocromatina (Bräutigam *et al.*, 2013).

En numerosos estudios se analizan señales epigenéticas capaces de producir cambios heredables de la expresión génica sin determinar modificaciones de la secuencia primaria del ADN nuclear. Se caracterizan por mantener o revertir estados transcripcionales metaestables que son fundamentales para la capacidad de la célula de "recordar" eventos pasados. Los cambios en el entorno externo o señales de desarrollo estimulan esta nueva vía de control génico (Bonasio *et al.*, 2010; Yakovlev *et al.*, 2011). De hecho, implican una interacción compleja de diferentes elementos de la genética molecular que podrían clasificarse en:

✦ Regulación post-transcripcional. Los cambios los ejercen ARN no codificantes, especialmente pequeños ARN interferentes (siARN) y micro ARN (miARN) principalmente. Esta vía de control se ha estudiado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Henderson y Jacobsen, 2007) y en coníferas los últimos estudios se han realizado en *Picea abies* (Yakovlev *et al.*, 2016).

✦ Reorganización de la cromatina. Es un tipo de control génico primario que consiste en modificaciones covalentes de las histonas. Se sabe que las histonas tienen especial importancia en el empaquetamiento del ADN. Y estudios sobre la acetilación y desacetilación de las histonas sugirieron que estos cambios de reorganización de la cromatina fueran una vía de control epigenético (Turner, 2000). En plantas, las modificaciones de las histonas responsables de la vernalización en *Arabidopsis thaliana* se describió como un tipo de “memoria del invierno” (Sung y Amasino, 2004). Estrechamente a la idea de empaquetamiento del DNA y control de la expresión génica, se han realizado numerosos estudios epigenéticos; como en el algodón (Adams *et al.*, 2003), *Arabidopsis thaliana* (Zhou

et al., 2010) o en coníferas como *Pinus radiata* (Valledor *et al.*, 2010).

✦ **Modificaciones del ADN.** Hace referencia a la metilación del ADN sin cambiar la secuencia de bases. Concretamente la metilación en el carbono 5' del anillo aromático de la citosina. Este cambio de estado del ADN es habitual en las plantas y los motivos más comunes son CpG, CpHpG, CpHpHp. Al igual que en la reorganización de la cromatina, regula la expresión variable y el silenciamiento de genes, el control de elementos transponibles y la impronta del genoma (Rapp y Wendel, 2005; Rico *et al.*, 2014). Desde los primeros estudios de la metilación en zanahoria que describían una relación entre la metilación del ADN y la cantidad de citoquininas (LoSchiavo *et al.*, 1989); muchos más se han realizado en diversas especies. Estudios de metilación como el fin de diferenciar línea embriogénicas o no embriogénicas en *Medicago truncatula* (Santos y Fevèreiro, 2002), análisis del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* (Cervera *et al.*, 2002), o cambios epigenéticos en *Secale cereale L.* (Linacero *et al.*, 2011). En gimnospermas como *Pinus pinea* se ha analizado posibles cambios epigenéticos (Sáez-Laguna *et al.*, 2014). Podemos concluir que los cambios de metilación en el ADN son posibles causantes de señales epigenéticas. Y su análisis se puede abordar empleando diversas técnicas genéticas; como la técnica de AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud variable), que requieren de marcadores de secuencia conocidos o los MSAP (Amplificación de fragmentos sensibles a metilación polimórficos) que no requiere del conocimiento previo de la secuencia genómica y permite analizar genomas de organismos no modelo.

Un análisis genómico del patrón de metilación de la citosina indicó una alta variabilidad epigenética en el pino piñonero, especie caracterizada por un muy bajo nivel de variación genética y un notable grado de plasticidad fenotípica (Sáez-Laguna *et al.*, 2014). Avances recientes en biotecnología forestal para varias especies de coníferas han permitido el desarrollo de una mejora forestal más flexible y estrategias de despliegue que los que ofrecen los enfoques convencionales como los huertos semilleros (Park, 2014). La embriogénesis somática (ES) y la criopreservación ofrecen la implementación de la silvicultura multi-varietal (MVF), que se define como el despliegue de variedades de árboles genéticamente probados en plantaciones forestales. Nos referimos como variedad a un clon que se selecciona y propaga por determinados atributos. La posibilidad de desarrollar variedades de árboles con valor añadido para plantaciones forestales

supondría una nueva estrategia de mejora e implementación de árboles, siendo más flexible que los huertos semilleros. La eficacia de dicha estrategia podría mejorarse con la utilización de otras biotecnologías como los marcadores moleculares (Park, 2014).

1.2. Embriogénesis somática en coníferas

Como se describe en una reciente revisión, la propagación vegetativa mediante embriogénesis somática sola o en combinación con esquejes enraizados obtenidos de las plantas jóvenes regeneradas por ES, pueden facilitar la mejora forestal (mayor precisión de selección y ganancias, archivos de material de reproducción donante para hacer cruces después de la selección) y la implementación de estrategias de plantación para materiales de reforestación mejorados (Lelu-Walter *et al.*, 2016). Se han alcanzado muchos progresos en la aplicación de esta biotecnología en especies con gran valor económico, pero se podrían incrementar con una mejor comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan el desarrollo de los embriones somáticos y cigóticos (Klimaszewska *et al.*, 2016). La embriogénesis somática requiere de una serie de procesos celulares, bioquímicos y moleculares complejos, regulado por varios factores que incluyen reguladores de crecimiento (PGRs), proteínas y factores de transcripción; sin embargo aún se necesitan muchos estudios para clarificar la interacción de estos factores en la determinación del mecanismo de su regulación. Un gran número de genes parece que están involucrados en el inicio de la formación de embriones somáticos, su maduración y germinación, lo cual indica que varias vías de regulación contribuyen al desarrollo embrionario. Varios de estos genes codifican proteínas involucradas en procesos de detoxificación, la síntesis y utilización de metionina y el metabolismo de carbohidratos. Entre los genes que muestran una reducción de los transcritos durante el desarrollo normal, varios están involucrados en el metabolismo de la auxina. La síntesis, el transporte y la utilización de auxina están implicados en varios de los procesos que regulan el desarrollo del embrión, como es el establecimiento de un eje apical-basal, dirigido por el transporte polar de auxina (Stasolla *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la familia de genes *SERK* podría ser un marcador molecular que identifica las células que son competentes para iniciar ES (Bonga *et al.*, 2010).

La embriogénesis somática es una biotecnológica descrita desde hace más de 30 años, como método de captura de genotipos de árboles forestales seleccionados (Cheliak y Rogers, 1990; Tautorus *et al.*, 1991) y producción de una descendencia uniforme (Timmis, 1998). La primera conífera de la que se obtuvo embriones somáticos fue en *Picea abies* (Hakman *et al.*, 1985) y diez años después se obtuvo en el género *Pinus*, en la especie *P. taeda* (Becwar y Pullman, 1995). Desde entonces cada vez más especies son

estudiadas para conseguir desarrollar protocolos de obtención de embriones somáticos y su conversión a planta. No obstante, cada etapa tiene desafíos específicos que determinan el éxito de la fase siguiente; siendo las mejoras de los protocolos en las primeras fases importantes, ya que condicionan el desarrollo de las etapas posteriores hasta llegar a producir plantas viables.

Inducción. En general, el patrón de la diferenciación y desarrollo de los embriones somáticos en coníferas es similar entre las distintas especies; y comienza a partir del cultivo de embriones inmaduros aislados o incluidos en los megagametofitos o de embriones maduros aislados. La embriogénesis somática es un proceso de varias etapas, mediante el cual se producen copias idénticas de un genotipo en número teóricamente ilimitado (Fig. 3). El estado de desarrollo de los embriones cigóticos influye en las frecuencias de obtención de las masas embrión-suspensor (MES) (MacKay *et al.*, 2006; Hargreaves *et al.*, 2009; Montalbán *et al.*, 2012). En la mayoría de coníferas y especialmente en *Pinus*, la iniciación de ES resulta más eficiente en embriones cigóticos inmaduros, en el estado de pre- o post-poliembrionía de partición. Sin embargo, como en el caso de *P. radiata*, se obtenían mejores frecuencias de inducción cuando el embrión se cultivaba aislado del megagametofito; obteniéndose cultivos más homogéneos al permitir elegir el estado de desarrollo (Klimaszewska *et al.*, 2007). En otras especies como en *P. strobus* (Garin *et al.*, 1998) y *P. pinaster*, se ha inducido ES también en embriones cotiledonares (Humánez *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha observado una disminución del potencial embriogénico desde que el embrión dominante se encuentra en el estado precotiledonar hasta conseguir el estado cotiledonar (Trontin *et al.*, 2016b). Se ha descrito en *Pinus* la fertilización de los múltiples arquegonios por diferentes pólenes, lo que resulta en múltiples cigotos genéticamente diferentes (Klimaszewska *et al.*, 2007). Este hecho puede producir cultivos embriogénicos genéticamente diferentes en relación a cuando se utiliza embriones dominantes, pero resulta difícil determinar en qué frecuencia ocurre y su impacto en la utilización de la técnica en la propagación clonal (Klimaszewska *et al.*, 2007). La utilización de marcadores genéticos para determinar el genotipo de los cultivos originados podría ser útil.

En la iniciación de los cultivos embriogénicos se emplea principalmente auxinas y citoquininas (Arnold *et al.*, 2002); apareciendo las masas proembriogénicas precedida de una división asimétrica de las células a las 4-6 semanas del inicio del cultivo, en

condiciones de oscuridad a 23-25°C (Park, 2014). Sin embargo, la supervivencia de las masas proembriogénicas generadas no siempre se corresponde con el establecimiento de una línea embriogénica con capacidad para producir embriones normales (Lelu *et al.*, 1999).

Figura 3. Fases de la embriogénesis somática, aclimatación y conversión a planta en coníferas, descrito en Park (2014).

Se han realizado estudios moleculares analizando genes, transcritos, proteínas, metabolitos y mecanismos epigenéticos para la identificación de posibles marcadores del potencial embriogénico en coníferas. Se ha considerado por ejemplo a los genes *GLPs* (Germin-like protein encoding genes), *LEC* (Leafy cotyledon) y *WUS* (Wuschel) como marcadores de la totipotencia en especies vegetales (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015), sugiriéndose que la expresión de los genes *WOX2* (Wuschel-related Homeobox2) y *ABI3* (ABA-insensitive3) como posibles marcadores de la iniciación en coníferas (Elhiti *et al.*, 2013).

Multiplicación. Una vez que extruyen las masas embrión-suspensor (MES) a través del micropilo del megagametofito, se amplifican a través de subcultivos seriados, generalmente bisemanales, en el mismo medio de inducción o en medios de diferente composición, tanto sólidos como líquidos (Park, 2014). Para mantener el potencial embriogénico de algunos cultivos se han descrito, subcultivos semanales, disminución en los contenidos de PGRs, sustitución de la sacarosa por maltosa, incremento en el contenido de carbohidratos, dispersión de la muestra de tejido en medio líquido, entre otros (Klimaszewska *et al.*, 2016). Las MES se componen de células meristemáticas pequeñas y células alargadas altamente vacuoladas capaces de organizarse para formar embriones somáticos inmaduros (Arnold *et al.*, 2016). Se ha sugerido que el proceso de poliembrionía de partición se repite cada vez que se forma un nuevo embrión, de forma que cada embrión formado se multiplica formando de nuevo embriones a partir de las células del suspensor o de la escisión de las cabezas embrionarias en crecimiento. Estas estructuras se organizan en un eje polar donde las células compactas y globulares se disponen en la parte apical, mientras que células alargadas se disponen en la parte inferior constituyendo el suspensor (Park, 2014; Bonga, 2016). Un fenómeno reconocido especialmente en *Pinus* es la progresiva disminución de la capacidad regenerativa en los cultivos establecidos. Estudios recientes tratan de predecir la capacidad regenerativa de los cultivos embriogénicos de coníferas a través de su perfil metabólico. Un eficiente consumo de sacarosa y glutamina, principal fuente endógena de carbono y nitrógeno, contribuía positivamente en la capacidad regenerativa de los cultivos de *Pinus taeda* (Robinson *et al.*, 2009).

En *Pinus radiata* se han analizado diferencias moleculares entre líneas embriogénicas y no embriogénicas, caracterizándose las últimas por la presencia de niveles bajos de transcritos de los genes relacionados con la embriogénesis y altos niveles de metilación global del ADN (Bravo *et al.*, 2017).

Maduración. Para promover el posterior desarrollo y maduración de los embriones somáticos iniciales, las masas de embrión-suspensor en proliferación se transfieren (en algunos casos después de unos precultivos en medios de acondicionamiento) a medios donde se han sustituido la auxina-citoquinina por el ácido abscísico (ABA) conjuntamente con una bajada del potencial hídrico del medio (Arnold *et al.*, 2002; Klimaszewska *et al.*, 2016; Lelu-Walter *et al.*, 2016). En estas revisiones se indica que, el conmutador que posibilita el paso desde la proliferación a la maduración de los embriones es inducido por la retirada de los PGRs del medio de cultivo (Bozhkov *et al.*, 2002); siendo dependiente del genotipo, condiciones de cultivo y edad de los cultivos. En general, el envejecimiento de los cultivos embriogénicos (tiempo en mantenimiento) influye negativamente en la capacidad de producir embriones maduros con morfología normal. Se han estudiado los mecanismos celulares y moleculares de esta transición, incluyendo entre otros el desarrollo de la muerte celular programada (PCD), que se manifiesta a través de la fragmentación del ADN nuclear y la degradación del citoplasma. La muerte celular es especialmente crítica para el establecimiento de la polaridad en las primeras fases de la embriogénesis, cuando la diferenciación del suspensor es seguida por su eliminación programada; siendo la desregulación de esta vía la que conduce a un desarrollo embrionario aberrante o detenido (Filonova *et al.*, 2000; Bozhkov *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2016). Se ha sugerido que el gen *LECI* juega un papel principal en la transición del estado inicial al tardío del embrión, y está involucrado en la acumulación de almidón y lípidos en el embrión en maduración y la inhibición de la germinación precoz (Bonga *et al.*, 2010). Estos autores sugieren que los genes que se expresan a altos niveles en la embriogénesis temprana podrían servir para determinar si los tejidos son recalcitrantes o potencialmente embriogénicos.

Se ha relacionado el incremento en la capacidad de maduración de líneas embriogénicas de *Pinus nigra* con un descenso en los niveles de metilación global (5-mdC), sugiriendo que la utilización de agentes desmetilantes podrían mejorar la capacidad de regeneración en cultivos embriogénicos de pinos (Noceda *et al.*, 2009). Sin embargo, en *P. pinaster*, los cambios en la metilación global del ADN no estaban asociados con diferencias en la capacidad de regeneración de los cultivos, sino con el estado de metilación de secuencias diana específicas; sugiriendo un cambio epigenético discreto (Klimaszewska *et al.*, 2009).

Las condiciones de cultivo como la reducción del potencial osmótico (Arnold *et al.*, 2002), el etileno, el pH y el fotoperíodo influyen en la maduración (Klimaszewska *et al.*, 2016). Especialmente, la presencia del ABA estimula la maduración de los embriones somáticos, la tolerancia a la desecación, la latencia y retraso de la germinación, además de la síntesis de proteínas de almacenamiento y lípidos (Rai *et al.*, 2011). No obstante, la exposición prolongada al ABA puede tener un efecto secundario negativo en el crecimiento de la planta (Bozhkov y Arnold, 1998).

La calidad de los embriones somáticos generados para la obtención de altas tasas de conversión y producción de plantas vigorosas, supone otro factor limitante para la aplicación de esta biotecnología. Un embrión de calidad vendría definido respecto a la acumulación de sustancias de reserva (proteínas, lípidos, almidón, azúcares-alcohol, ácidos orgánicos, entre otros compuestos) y la adquisición de tolerancia a la desecación. Hay evidencias que sugieren que la respuesta metabólica al estrés osmótico podría ser un factor principal involucrado en el normal desarrollo de los embriones, actuando algunos de los metabolitos como osmoprotectores (Trontin *et al.*, 2016a).

1.2.1. *Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros*

Generalmente en coníferas, la ES se obtiene a partir de embriones cigóticos inmaduros mediante un proceso de multiplicación por poliembriónía de partición sostenido, en lugar de a partir de la desdiferenciación de un tejido diferenciado (verdaderamente somático) (Klimaszewska *et al.*, 2007; Hargreaves *et al.*, 2009). Aunque las frecuencias de iniciación de la ES y supervivencia de las líneas embriogénicas generadas descritas en los primeros estudios resultaban muy bajas y variables entre familias (Becwar *et al.*, 1990; Percy *et al.*, 2000), en la actualidad se han alcanzado muchos progresos en la optimización de protocolos en especies de importancia en la industria forestal, realizándose plantaciones extensivas. Revisiones recientes describen las mejoras alcanzadas en la regeneración de plantas mediante ES en algunas especies de *Pinus* (Arnold *et al.*, 2002; Stasolla y Yeung, 2003; Zoglauer *et al.*, 2003; Klimaszewska *et al.*, 2007) y el impacto de esta biotecnología en las plantaciones forestales (Park, 2002; Sutton, 2002; Nehra *et al.*, 2005). Sin embargo, para la mayoría de las especies de *Pinus* descritas las frecuencias de iniciación siguen resultando aún insuficientes para su

aplicación a nivel comercial, requiriéndose mayores esfuerzos en la optimización de los protocolos para aumentar la eficiencia en el establecimiento de líneas embriogénicas y maduración de los embriones generados (Park y Bonga, 2011). Solo frecuencias de iniciación superiores al 30% serían efectivas, y podrían incrementarse utilizando el parental con más alta capacidad de iniciación en cruzamientos controlados (Bonga, 2016).

En unas pocas especies se induce ES en embriones maduros aislados del megagametofito, aunque con frecuencias más bajas como en *P. sylvestris* (Hohtola, 1995), *P. nigra* (Salajova *et al.*, 1995), *P. koraiensis* (Bozhkov *et al.*, 1997), *P. strobus* (Garin *et al.*, 1998) y *P. taeda* (Tang *et al.*, 2001). La utilización de semillas maduras sería más conveniente ya que se evitarían problemas como (1) las restricciones ocasionadas por la “ventana de respuesta”, es decir, por un estado de desarrollo del embrión muy concreto y reducido a un corto período de tiempo; (2) su variabilidad entre los años de recolección (Zoglauer *et al.*, 2003); (3) y la posibilidad de almacenamiento en frío durante períodos más largos sin variaciones aparentes en el desarrollo del embrión (Park, 2002).

Ya que el estado de desarrollo del embrión cigótico condiciona la respuesta embriogénica, se debe testar el óptimo estado de maduración de los piñones a través de la recolección de piñas a lo largo de varias fechas, debido principalmente a las grandes variaciones observadas entre diferentes años de recolección (Park, 2002; Carneros *et al.*, 2009; Hargreaves *et al.*, 2009). Con el fin de prolongar la disponibilidad de los embriones inmaduros, las piñas tienen que almacenarse en frío durante períodos determinados. Se ha descrito en algunos casos una estimulación de la ES, encontrándose un efecto familiar significativo; aunque también se observó que los porcentajes de iniciación disminuían con la duración del almacenamiento (Park, 2002).

En Park y col. (2006) se describen los protocolos de iniciación optimizados para *P. banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* y *P. sylvestris* basándose principalmente en la selección de genotipos, la formulación de los medios de cultivo y la aplicación de diferentes PGRs, alcanzándose altos rendimientos en la aplicación de esta biotecnología en las especies con mayor interés económico. El grado del control genético de la respuesta dependería en gran medida del estado de madurez del embrión cigótico y de las condiciones experimentales. Se han logrado importantes mejoras en las frecuencias de

iniciación de la ES a través de la utilización de semillas con una amplia diversidad genética como en el caso de *P. taeda* (Pullman y Johnson, 2002) y especialmente por la selección del parental femenino más favorable (Niskanen *et al.*, 2004; MacKay *et al.*, 2006); además de la aplicación de diferentes formulaciones de los medios nutritivos, concentraciones de auxinas y citoquininas, la auxina sintética Picloram (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk, 2008), brasinoesteroides (Pullman *et al.*, 2003b), de la potente citoquinina CPPU [N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea] (Park *et al.*, 2006), carbohidratos y agentes gelificantes (Klimaszewska *et al.*, 2007), y la adición de vitaminas (biotina, ácido fólico) (Pullman *et al.*, 2005).

El megagametofito provee los nutrientes y las señales necesarias indispensables para mantener el crecimiento del embrión cigótico que se desarrolla en su interior, existiendo estudios que cuestionan si determinados compuestos nutritivos o reguladores del crecimiento producidos por el megagametofito podrían influir en la inducción de ES (Pullman y Buchanan, 2003). Estos autores han descrito cambios significativos en la composición en los minerales principales durante el desarrollo de la semilla, encontrándose que la concentración básica en el megagametofito mostraba mayor correlación con la fecha de recolección que con el estado de desarrollo del embrión que contenía. Como resultado de estudios de la expresión génica en el megagametofito, se han propuesto distintas herramientas para mejorar la iniciación de tejido embriogénico y el desarrollo del embrión somático (Pullman y Bucalo, 2014). Se ha caracterizado la expresión relativa de determinados genes que regulan el desarrollo del embrión cigótico, comparándola con el desarrollo del embrión somático (Lara-Chávez *et al.*, 2012; Pullman y Bucalo, 2014). El contenido en ABA y ácido indolacético (IAA) fluctuaba en el megagametofito y en el embrión cigótico durante los diferentes estados de la embriogénesis, postulándose al ABA como una señal de reconocimiento necesaria para el normal desarrollo del megagametofito y el embrión (Vuosku *et al.*, 2009). También se ha observado en *Picea glauca* que durante la maduración el contenido de IAA aumentaba en el megagametofito, mientras que disminuía en el embrión (Kong *et al.*, 1997).

En un sistema modelo para dilucidar los mecanismos bioquímicos y moleculares que regulan la respuesta embriogénica, esta estaría condicionada por la presencia/ausencia de receptores específicos para los PGRs, alteraciones en el balance endógeno de PGRs, y variaciones a nivel del estado de metilación del ADN en genes

particulares, mutaciones o reorganización cromosómica, entre otros factores (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Klimaszewska *et al.*, 2016).

Estudios recientes han encontrado correlaciones entre mecanismos epigenéticos y cambios adaptativos en las plantas como respuesta a factores de estrés ambiental (Sáez-Laguna *et al.*, 2014). El estrés producido por altas o bajas temperaturas producían diferentes respuestas moleculares en los tejidos vegetales (Neilson *et al.*, 2010). La mayoría de las modificaciones epigenéticas inducidas por este tipo de estrés en la naturaleza podrían ser reversibles, sin embargo, algunas serían estables y heredables (Achrem *et al.*, 2012). El estrés causado por la baja temperatura podría beneficiar la respuesta embriogénica, como en el caso de *Brassica napus* donde la inducción de ES en microsporas se obtiene a 32°C, pero la aplicación de 18°C durante un período largo favoreció la embriogénesis a través de las primeras divisiones de las células asimétricas, el establecimiento inicial de la polaridad y la formación de las estructuras típicas del suspensor y el desarrollo del embrión (Prem *et al.*, 2012).

El potencial hídrico del medio también puede ser un factor determinante de la respuesta embriogénica. El desarrollo del embrión ocurre en un medio con un potencial hídrico reducido (añadiendo azúcares) o con una reducción de la disponibilidad de agua (aumento de la fuerza del gel) (Pullman y Bucalo, 2011). En *Pinus taeda*, el incremento en las concentraciones de mioinositol en el medio incrementó significativamente la iniciación de tejido embriogénico (Pullman y Johnson, 2002). La disponibilidad de agua determinada por la concentración del gel afectaba el crecimiento de callo (Owens y Wozniak, 1991). En *P. taeda*, se ensayaron medios de inducción con concentraciones de gelificante entre 0 y 4 g/l, obteniéndose que el nivel óptimo se encontraba en 2 g/l (Pullman y Johnson, 2002). Sin embargo, en *P. radiata* el medio de inducción óptimo contenía 3 g/l, y en *P. sylvestris* 4 g/l (Humánez *et al.*, 2012).

1.2.2. Inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos

Un fenómeno generalmente observado en el proceso embriogénico en coníferas y especialmente en *Pinus*, es la pérdida de capacidad para producir embriones somáticos maduros con morfología normal después de que la línea embriogénica generada se haya

subcultivado durante varios meses (Klimaszewska *et al.*, 2009). Esta pérdida de la capacidad de maduración se ha asociado con variaciones somaclonales que pueden manifestarse a nivel fenotípico, citológico, bioquímico y genético/epigenético (Kaeppler *et al.*, 2000).

Las líneas embriogénicas que degeneran como consecuencia de un período prolongado de subcultivos (“envejecimiento”) mostraban alteraciones a nivel micro y macroscópico, relacionadas con cambios en la morfología de los embriones somáticos iniciales y en la composición/organización celular del cultivo durante la proliferación (Breton *et al.*, 2005). Se ha sugerido que la inhibición del potencial embriogénico podría estar relacionado con cambios en la metilación del ADN (mecanismo epigenético), alterando los patrones de expresión génica sin cambiar la secuencia del ADN (Kaeppler *et al.*, 2000). En *P. pinaster*, aunque los niveles de metilación global del ADN encontrados en los cultivos con potencial embriogénico y los que lo habían perdido fueron similares, si se encontraron alteraciones cualitativas en secuencias específicas del ADN (Klimaszewska *et al.*, 2009). En *P. nigra*, la línea embriogénica mostró unos niveles de metilación más bajos que la línea no embriogénica (Noceda *et al.*, 2009). En *P. radiata*, las líneas no embriogénicas mostraron más alta metilación global del ADN y un nivel más bajo de transcripción de genes relacionados con la embriogénesis que las líneas embriogénicas, junto con una pérdida de polaridad de los agregados celulares (Bravo *et al.*, 2017).

Se ha propuesto que la competencia embriogénica de las líneas envejecidas podría recuperarse a través de la inducción de nuevos cultivos a partir de los embriones somáticos cotiledonares que puedan generarse. El embrión somático podría ser una fuente de embriones secundarios, asociado con la pérdida del control del crecimiento organizado de las células del embrión (Raemarkers *et al.*, 1995). Esta capacidad embriogénica podría mantenerse durante períodos de tiempo prolongados mediante ciclos repetidos de embriogénesis secundaria. Al observarse en *Pinus pinaster* y *P. strobus* que los cultivos obtenidos por embriogénesis secundaria producían un mayor número de embriones maduros comparado con los cultivos de más edad (Klimaszewska *et al.*, 2007), se ha propuesto que la reinducción de embriones en embriones somáticos maduros podría ser un sistema para el “rejuvenecimiento” de líneas senescentes, pudiéndose convertir en una alternativa a la crioconservación para la preservación de la capacidad de producción de

embriones de calidad en aquellas líneas que la han perdido con el tiempo en cultivo (Klimaszewska *et al.*, 2009). En *Abies numinica*, se ha utilizado habitualmente la embriogénesis secundaria para mejorar el potencial de maduración en aquellas líneas que la estaban perdiendo (Vooková *et al.*, 2003).

Sin embargo también se ha observado que, aunque la ES pudiera ser útil para la mejora de la capacidad de maduración de las líneas que muestran declive, las frecuencias de inducción podrían diferir entre embriones somáticos obtenidos a partir de distintos ciclos de inducción de ES, disminuyéndose la producción de embriones maduros (Vooková y Kormuták, 2006).

Se ha estudiado la posibilidad de obtener ES en embriones somáticos en distintos estados del desarrollo. También se ha descrito que los embriones somáticos en germinación de *Juniperus communis* retenían el programa embriogénico en su parte basal; donde un 44% formaron nuevo tejido embriogénico después de 2 semanas en cultivo (Helmersson y von Arnold, 2009). En *Larix*, se ha encontrado que las frecuencias de inducción iban disminuyendo en función del tiempo en cultivo del embrión somático primario en el medio de maduración (Saly *et al.*, 2002). Sin embargo, en *Abies numídica*, el estado cotiledonar resultó más competente (Vooková *et al.*, 2003). La iniciación de ES comenzaba con la formación de un callo sobre todo el cuerpo del embrión somático, en general cultivado en el mismo medio de inducción que el utilizado con el embrión cigótico, seguido de la aparición de estructuras embrionarias emergiendo de la superficie del callo (Klimaszewska *et al.*, 2009). En *Picea glauca*, la inducción de embriones secundarios se producía directamente en el meristemo apical del embrión somático inmaduro sin intermediar la formación de callo (Kong y von Aderkas, 2011). Estos mismos autores indicaron que los embriones somáticos inmaduros requerían menos tiempo para generar tejido embriogénico que los embriones maduros.

Se ha sugerido que la recalcitrancia mostrada por algunas especies y tejidos podría revertirse mediante variaciones en los procedimientos de cultivo; a través de la determinación de aquellos factores externos que pudieran activar la expresión de aquellos genes relacionados con la embriogénesis (Bonga *et al.*, 2010). Se considera que las auxinas son los principales componentes en la regulación de la respuesta embriogénica, a través del establecimiento del gradiente auxínico durante la fase de inducción, y junto

con las citoquininas, el mantenimiento de las divisiones celulares (Jiménez, 2005). Se ha estimulado la inducción de embriogénesis en *Picea* utilizando Picloram (actividad auxínica) junto con citoquinina en el medio de cultivo (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk, 2008). El CPPU [N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea] mostraba una potente acción citoquinínica estimulando la iniciación de embriogénesis en *Pinus pinaster* y *P. banksiana*, pero mostró un efecto negativo en *P. strobus* y *P. sylvestris* (Park *et al.*, 2006). Los brasinólidos se encuentran de forma natural en los vegetales y han mostrado ser activos en procesos de división y diferenciación, mostrando más actividad en sinergismo con auxinas (Pullman *et al.*, 2003b). Estos autores indicaron que el medio de inducción suplementando con brasinólido incrementaba las frecuencias de inducción en las familias más recalcitrantes de *Pinus taeda*, *Pseudotsuga menziesii* y *Picea abies*. El suplemento de arabinogalactanos (proteínas) en los medios de cultivo podría estimular el desarrollo de los embriones somáticos en *Picea abies* (Egertsdotter y von Arnold, 1995). En *Quercus bicolor* también se demostró su efecto promotor de la embriogénesis somática (Mallón *et al.*, 2013). Se ha descrito una mejora en la iniciación y formación de embriones en *Pinus taeda* por la adición al medio de cultivo de vitaminas como la biotina y el ácido fólico (Pullman *et al.*, 2005), o por la suplementación de mayores concentraciones que las iniciales de las vitaminas tiamina, ácido nicotínico y piridoxina en *P. radiata* (Hargreaves *et al.*, 2009).

Debido a la latente capacidad de los embriones somáticos de generar masas embriogénicas, podrían utilizarse para la re-iniciación de líneas en aquellas que han perdido su capacidad embriogénica, y así convertirse en “líneas inmortales” (Aderkas *et al.*, 2016).

1.2.3. Establecimiento y mantenimiento de líneas embriogénicas en medio líquido. Producción de biomasa en medio semisólido y líquido

Se considera que la embriogénesis somática es una biotecnología apropiada para la producción clonal masiva de árboles selectos para la implementación de la silvicultura multivarietal, pudiendo otorgar flexibilidad para un rápido despliegue de variedades adecuadas para hacer frente a los objetivos de mejoramiento y entornos cambiantes (Park, 2004). Generalmente esta biotecnología se ha desarrollado en medios nutritivos

semisólidos, pero la producción masiva de embriones somáticos podría mejorarse en gran medida utilizando cultivos en medio líquido, sincronizados mediante fraccionamiento por tamaño (Lelu-Walter *et al.*, 2013). El cultivo en medio líquido ofrece ventajas técnicas sobre el cultivo semisólido, como unas tasas de crecimiento más altas basadas en el consumo rápido de nutrientes por las células, un rápido escalado, y la producción de un número más alto de plantas (Gupta y Timmis, 2005; Preil, 2005).

El sistema de cultivo en suspensión en matraces agitados permitiría el estudio de los parámetros de crecimiento, consumo de nutrientes y capacidad de maduración vinculados al escalado de los cultivos (Tautorius *et al.*, 1994; Ingram y Mavituna, 2000). Además de obtenerse tasas de proliferación superiores, también se consigue mayor sincronización en el cultivo, ya que las células individuales y los agregados celulares se desarrollan como estructuras separadas y pueden separarse por tamizado o centrifugación (Arnold *et al.*, 2002). Como en el caso de *Picea abies*, las líneas embriogénicas cultivadas en medio líquido pueden caracterizarse por su morfología y capacidad para madurar (Egertsdotter y von Arnold, 1998). El análisis al microscopio de los cultivos embriogénicos en suspensión podría convertirse en una técnica factible para determinar el potencial embriogénico de los cultivos (Ibaraki y Kurata, 2001). Factores como el estrés hidrodinámico podría influir en el número, tamaño y morfología de las agrupaciones embriogénicas y podría relacionarse con el desarrollo de los embriones (Sun *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2011).

Los cultivos en suspensión influyen en las tasas de multiplicación y en la morfología de los embriones somáticos y son susceptibles de automatizar en biorreactores. Pero para que resulten eficientes es necesario un tejido inicial de calidad y unas condiciones de cultivo adecuadas; como la densidad de inoculación, aireación, agitación, concentración de reguladores del crecimiento, frecuencia de subcultivos (Ingram y Mavituna, 2000; Gupta y Timmis, 2005). Se ha conseguido la regeneración de plantas de piñonero mediante embriogénesis somática utilizando medios semisólidos (Carneros *et al.*, 2009; Carneros *et al.*, 2017). Sin embargo, se necesita desarrollar protocolos basados en el cultivo en medio líquido para producir un mayor número de plantas requerido para el establecimiento de los ensayos clonales.

1.2.4. Diferenciación-maduración de embriones somáticos

Recientes revisiones han tratado acerca de los múltiples cuellos de botella en los protocolos de regeneración de plantas por embriogénesis somática en coníferas, y especialmente en algunas especies de *Pinus*. Muchos de los esfuerzos se han centrado en la optimización de los protocolos de maduración dirigidos a solventar el bajo número de embriones generados y la baja frecuencia de conversión en planta (Stasolla y Yeung, 2003). En primer lugar, muchas de las líneas embriogénicas que se establecen no son capaces de producir embriones que puedan convertirse en plantas; y aquellas líneas que producen embriones, o son insuficientes para su utilización práctica, o pierden dicha capacidad a lo largo de su mantenimiento en cultivo (Klimaszewska *et al.*, 2016). Sin embargo, en algunas especies de *Pinus* se han alcanzado muchos progresos, mejorándose la calidad de los embriones somáticos a través de la optimización de las condiciones de cultivo y del conocimiento de los patrones de expresión génica durante el desarrollo embriogénico (Klimaszewska *et al.*, 2007). Cada una de las distintas etapas del desarrollo del embrión requiere de unos tratamientos físicos y químicos determinados, considerándose que los primeros eventos de la embriogénesis son cruciales para el completo desarrollo del programa embriogénico (Arnold *et al.*, 2002). Se precisa cierto grado de organización morfológica de las masas embriogénicas en proliferación antes de su exposición a las condiciones de maduración. Variaciones en las condiciones de proliferación y la inclusión de un medio de acondicionamiento, podrían mejorar la organización de las estructuras embriogénicas (Bozhkov *et al.*, 2002).

La optimización de las condiciones de maduración implicaría principalmente la elección del tipo y concentración de reguladores del crecimiento, principalmente el ABA, del ajuste del potencial osmótico del medio y de técnicas de desecación parcial (Stasolla y Yeung, 2003). Restricciones en la disponibilidad de agua por parte de los embriones mediante barreras físicas, como interponer papel filtro o incrementando la concentración de gelificante en el medio, o mediante la incorporación de osmóticos como los carbohidratos; podrían mejorar la maduración de los embriones somáticos. Un aumento del potencial osmótico del medio incorporando altas concentraciones de mioinositol podría simular las condiciones en las que se desarrolla el óvulo (Pullman y Johnson, 2002). Se han evaluado diferentes tipos y concentraciones de carbohidratos en relación con la producción de embriones, en base a su utilidad como fuente de carbono y energía,

como osmóticos y como moléculas de señalización (Lipavská y Konrádová, 2004). La temperatura también podría modificar la respuesta embriogénica. Se ha indicado que temperaturas más bajas (18°C) mejoraban la respuesta embriogénica en *Brassica napus* (Prem *et al.*, 2012). Por otra parte, en algunas líneas embriogénicas de *Picea abies* la temperatura óptima de crecimiento fue de 18°C mientras que en otras el crecimiento incrementaba al aumentar la temperatura a 28°C. Por otra parte, los cultivos mantenidos a 28°C produjeron mayor número de embriones maduros que los mantenidos a 18 o 23°C. (Kvaalen y Johnsen, 2008).

1.3. Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica sobre el patrón de metilación en líneas embriogénicas

Las plantas bajo condiciones de estrés muestran plasticidad lo que les confiere tolerancia a las mismas. Esta plasticidad supone fundamentalmente cambios de tipo epigenético. Los mecanismos epigenéticos regulan el desarrollo de la embriogénesis cigótica y somática a través de modificaciones del ADN (metilaciones), de las histonas en la cromatina (remodelación) y de la regulación mediada por micro-ARNs; pudiendo ser heredables pero potencialmente reversibles (Bräutigam *et al.*, 2013). Varios estreses abióticos y bióticos pueden imponer una memoria de comportamiento para hacer frente al estrés, que puede durar toda la vida de la planta (Bilichak y Kovalchuk, 2016). La adquisición de una memoria trans-generacional de estrés parece que está vinculada con el proceso de formación de semillas (Yakovlev *et al.*, 2012; y referencias incluidas). En *Picea abies* se ha descrito que el fotoperíodo y la temperatura durante la formación de la semilla cambia el programa de desarrollo del embrión, produciendo avances o retrasos de los procesos fenológicos de alto valor adaptativo en la progenie, como la brotación o el reposo de las yemas, permitiendo la adaptación a las variaciones del medio (Johnsen *et al.*, 2005).

Parece que en pináceas hay fuertes evidencias de que determinados mecanismos epigenéticos y factores de transcripción, modulan los genes relacionados con la embriogénesis en cada una de sus etapas (Lelu-Walter *et al.*, 2016). Los mecanismos epigenéticos determinan los patrones de expresión génica mediante la modulación del acceso al ADN, a través de variaciones en los niveles de metilación del ADN; lo que se traduce en la adaptación de las células a las diferentes condiciones de cultivo y de estrés. Las condiciones de cultivo impuestas por las técnicas del cultivo de tejidos vegetales pueden provocar variaciones epigenéticas, lo cual puede desencadenar en las células somáticas un cambio de desarrollo para iniciar el proceso embriogénico (Miguel y Marum, 2011). El comportamiento *ex vitro* de las plantas regeneradas mediante embriogénesis somática estaría influenciado por la acumulación de tratamientos físicos y químicos impuestos durante la fase *in vitro*. Tanto el uso del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como el cultivo prolongado pueden inducir variaciones genéticas (variación somaclonal) como epigenéticas (Arnold *et al.*, 2002).

Yakovlev y col. (2014) comprobaron que diferentes temperaturas aplicadas durante la formación de embriones producían plantas que manifestaban diferente fenología aun siendo clónicas; es decir, que las temperaturas inducían diferentes epítipos con cambios en los transcriptomas. Kvaalen y Johnsen (2008) encontraron que las temperaturas durante la embriogénesis cigótica claramente influían en la frecuencia de inducción de tejido embriogénico.

También se conoce el impacto que las modificaciones de la disponibilidad hídrica tienen sobre el desarrollo embriogénico (Klimaszewska *et al.*, 2000). La frecuencia de germinación y el número de embriones somáticos con morfología normal en *Pinus taeda* fueron más altos cuando se cultivaron en medios con concentraciones altas de gelificante; lo mismo se observó en *Larix* (Teyssier *et al.*, 2011). Se ha descrito en *Pinus pinea*, especie considerada resistente a la sequía, que las plántulas bajo condiciones de estrés hídrico expresan dehidrinas como respuesta molecular; proponiéndose que estas proteínas juegan un papel en la tolerancia la sequía (Perdiguero *et al.*, 2015).

Se han analizado los primeros eventos moleculares involucrados en el desarrollo de los embriones somáticos de *Pinus pinaster* bajo condiciones de estrés hídrico (Morel *et al.*, 2014; y referencias incluidas). Con concentraciones altas de gelificante los embriones se adaptaron a las restricciones del cultivo mediante la activación de rutas específicas de protección y respuestas moleculares mediadas por el ABA; sugiriendo que la proteína fosfatasa 2C (PP2C) podría ser un biomarcador de la respuesta adaptativa. Estos autores también indicaron una sobreexpresión de transcritos para quitinasas (involucradas en la regulación de la transición desde la proliferación de las MES al desarrollo de los embriones somáticos y masiva muerte celular programada) y de dos enzimas involucradas en la síntesis de almidón, en masas embriogénicas cultivadas en 9% de Gelrite. También sugieren que las rutas de síntesis de metabolitos secundarios protectores y la regulación del estrés oxidativo son activadas para evitar los inconvenientes relacionados con las condiciones de cultivo.

En la actualidad los enfoques más prometedores para resolver la recalcitrancia en especies o tejidos sería la determinación de aquellos factores externos como el estrés, que activaran la expresión de los genes relacionados con la embriogénesis (Bonga *et al.*, 2010). El análisis de la metilación del ADN se ha abordado con técnicas de alto

rendimiento como microarrays (Steensel y Henikoff, 2003; Martienssen *et al.*, 2005) o secuenciación directa de cromatina inmunoprecipitada (ChIP) (Barski *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2007), pero se usan sólo en organismos modelo. Extender estos estudios a nuevos organismos modelo sería beneficioso (Bonasio *et al.*, 2010). De hecho, son cada vez más los estudios genéticos en especies forestales, pese a que el tamaño de su genoma es muy grande. Los genomas de coníferas varían entre 20,000 y 30,000 Mbp; que en promedio es 200 veces más grande que el genoma de *Arabidopsis* y 6-10 veces más grande que el genoma humano (Gregory *et al.*, 2006; Zonneveld, 2012).

El método de la amplificación de fragmentos sensibles a metilación polimórficos (MSAP) puede distinguir entre los efectos genéticos y epigenéticos; permitiendo analizar genomas tan grandes sin requerir del conocimiento previo del genoma del organismo a analizar (Bossdorf *et al.*, 2008). Lo que hace idóneo a *Pinus pinea* en estudios epigenéticos es su gran plasticidad y su uniformidad genética (Fallour *et al.*, 1997; Vendramin *et al.*, 2008; Sánchez-Gómez *et al.*, 2011; Pinzaitu *et al.*, 2012; Sáez-Laguna *et al.*, 2014).

1.4. Objetivos

En *P. pinea* se ha obtenido la regeneración de plantas a partir del cultivo de megagametofitos inmaduros incluyendo el embrión cigótico, en una ventana del desarrollo entre la poliembrionía de partición y el estado precotiledonar, pero con frecuencias de iniciación muy bajas (0.5%) y muy variables entre años (Carneros *et al.*, 2009). Cultivando embriones cigóticos maduros aislados del megagametofito, aunque se indujeron cultivos con apariencia embriogénica en los cotiledones y en el hipocótilo del embrión, las estructuras proembriogénicas generadas no pudieron mantenerse con los subcultivos (Celestino *et al.*, 2015). Esta especie se ha mostrado recalcitrante a la respuesta embriogénica y como en otras especies de este grupo, podría comportarse como dependiente de las condiciones de cultivo (Li *et al.*, 1998a; Miguel *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006), y por lo tanto sería susceptible de mejorar su respuesta embriogénica. El pino piñonero ha mostrado escasa diversidad genética pero alta plasticidad fenotípica (Mutke *et al.*, 2005a; Vendramin *et al.*, 2008; Sáez-Laguna *et al.*, 2014), sin embargo se ha observado cierta variabilidad en la respuesta de iniciación de ES entre distintas familias de semillas de polinización abierta (Carneros *et al.*, 2009).

Este trabajo de investigación contempla dos ámbitos de actividad. En primer lugar, solventar las limitaciones de los actuales protocolos de regeneración por embriogénesis somática en esta especie. Entre las principales limitaciones se encuentran las bajas frecuencias de inducción y su variabilidad entre años; la producción de un número suficiente de embriones somáticos con morfología normal en todas las líneas embriogénicas generadas, a lo largo de un período de cultivo prolongado. En segundo lugar, conocer aspectos genéticos de control de expresión génica en procesos embriogénicos bajo un estrés osmótico y de temperatura.

Se abordarán unos objetivos específicos en cada área de actividad en función de las principales hipótesis a comprobar:

- La solución de los problemas que se plantean en las fases de inducción, proliferación y diferenciación-maduración de embriones somáticos podría venir a través de las características del explanto inicial, de las variaciones de las

condiciones de cultivo habituales y del conocimiento de factores anatómicos o fisiológicos que influyen en los procesos.

- Que las líneas embriogénicas de pino piñonero proliferadas y maduras bajo diferentes condiciones de temperatura y estrés hídrico, generen diferentes grados de metilación del ADN, lo que podría traducirse en diferencias en el comportamiento de las plantas regeneradas.

En cada uno de los objetivos específicos, se desarrollarán las siguientes actividades:

- Mejorar las frecuencias de inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros mediante la aplicación de reguladores del crecimiento no utilizados hasta el momento. Se evaluará el efecto de la temperatura y de la disponibilidad de agua en la inducción.
- Determinar las condiciones de cultivo necesarias para la inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos, procedentes de cultivos mantenidos en proliferación durante varios años, como sistema de reactivación de las líneas embriogénicas.
- Establecimiento y mantenimiento de cultivos en suspensión de líneas embriogénicas como sistema para incrementar la producción de embriones. Se evaluará el efecto de factores como la velocidad de agitación, medio de cultivo y procedimiento de subcultivo, en la proliferación y maduración.
- Mejorar las frecuencias de diferenciación-maduración de embriones somáticos. Se evaluará el efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración.
- Determinar el efecto de diversas condiciones de estrés abiótico durante el desarrollo de los embriones somáticos en el grado de metilación de ADN. Se evaluará el efecto de la temperatura y disponibilidad de agua en el patrón de metilación del ADN, analizado mediante la técnica de MSAP.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros

Con el fin de ampliar el espectro de genotipos ya que, en general, las respuestas embriogénicas se muestran genotipo-dependiente, se seleccionaron aquellas familias de medio-hermanos que en años anteriores mostraron capacidades embriogénicas, junto con familias nuevas. Para determinar las posibilidades de mejora del sistema embriogénico en el piñonero, se evaluará el efecto de factores como el banco clonal, la familia, la fecha de recolección, diferentes condiciones de cultivo como el tipo de regulador del crecimiento (PGR), disponibilidad de agua por parte del explanto y temperatura, y el almacenamiento en frío de las piñas en la iniciación de ES. Las piñas inmaduras se recolectaron semanalmente entre finales de junio y primeros de julio, con la finalidad de encontrar embriones cigóticos dentro de la ventana del desarrollo previamente definida como la más susceptible a la inducción de ES (Carneros *et al.*, 2009).

La recolección de piñas se realizó en tres bancos clonales de pino piñonero establecidos en el Centro Nacional de Mejora Genética Forestal “Puerta de Hierro” en Madrid (40° 27' 33" N - 3° 45' 10" O y 600 m de altitud), “El Serranillo” en Guadalajara (40° 39' 33" N - 3° 10' 24" O y 639 m de altitud), y en “Quintanilla de Onésimo” en Valladolid (41° 34' 47" N y 4° 20' 11" O y 890 m de altitud). Se recogieron semanalmente piñas pertenecientes a catorce clones de tres regiones de procedencias: Meseta Norte (10), Valles del Tiétar y Alberche (20) y Cataluña Litoral (60). Previamente, en el mes de abril se embolsaron las piñas situadas en “El Serranillo” con tela mosquitera para preservarlas del ataque de la chinche perforadora de las piñas *Leptoglossus occidentalis*. Se recolectaron 19 piñas de un mismo clon el 24 de junio en “Puerta de Hierro”. Entre 4 y 6 piñas por clon el 17 de junio (R1, primera fecha de recolección), 24 de junio (R2, segunda fecha de recolección) y 2 julio (R3, tercera fecha de recolección) en “El Serranillo”, y 5 piñas por clon el 24 de junio (R1, primera fecha de recolección), 30 de junio (R2, segunda fecha de recolección) y 7 julio (R3, tercera fecha de recolección) en “Quintanilla de Onésimo”.

Las piñas recolectadas en el banco clonal “Puerta de Hierro” pertenecieron al 2062. El material procedente de “El Serranillo” perteneció a los clones 2063, 6011, 6033, 6047, 6070, 6088 y 1030. El material procedente de “Quintanilla de Onésimo” perteneció a los clones 1007, 1026, 1042, 1062, 1075 y 1078.

2.1.1. Caracterización y almacenamiento en frío de las piñas

Se midieron una serie de parámetros cualitativos y cuantitativos a lo largo de las tres fechas de recolección semanales y después del período de almacenamiento en frío. Se caracterizó el color, el tamaño (longitud y diámetro) y el peso de cada una de las piñas procedentes de los tres bancos clonales. En cada una de las fechas de recolección, según el protocolo previamente establecido (Carneros *et al.*, 2009), las piñas se limpiaron con etanol al 70% durante 3 min, sumergiéndolas a continuación en lejía comercial (3.5% cloro activo) diluida al 10% (v/v) durante 10 min, y luego se secaron al aire. Las piñas se guardaron en bolsas de plástico para impedir que se desecaran durante el almacenamiento a 4°C por un período mínimo de 3 meses, hasta completar la introducción de los piñones en los medios de inducción.

2.1.2. Inducción de embriogénesis somática

Para la introducción en cultivo, se extrajeron los piñones de los conos verdes (Fig. 4A-C) de cada uno de los clones y se sumergieron en lejía comercial (3.5% cloro activo) diluida al 10% (v/v) y una gota de Tween 20[®] durante 15 min en agitación orbital (110 rpm) (Fig. 4D). Posteriormente, se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril en cabina de flujo laminar. En condiciones de esterilidad, se partieron las testas para la extracción de los megagametofitos (Fig. 4E-F) que se depositaron en placas Petri (90 mm de diámetro) conteniendo discos de papel de filtro humedecidos con agua destilada estéril, hasta su introducción en cultivo una vez eliminada la cubierta que envuelve al megagametofito. El número de megagametofitos completos cultivados por tratamiento dependió de la disponibilidad de piñones sanos extraídos de las piñas almacenadas entre un período de 3 a 6 meses (Fig. 4G-I).

En un primer ensayo, se evaluó el efecto de la temperatura (23 y 18°C) y de la disponibilidad de agua (4 y 2 g/l de Gelrite[®]) en la inducción. Se utilizó una mezcla de piñones procedente de los clones 2062 (“Puerta de Hierro”) y 1030 (“El Serranillo”). El medio de inducción fue el M-mLV₂ descrito por Carneros y col. (2009), compuesto de un medio nutritivo Litvay (Litvay *et al.*, 1985), con la concentración de macroelementos reducido a la mitad y los microelementos modificados, añadiendo las sales de molibdeno, cobre y yodo a la mitad de concentración y las de cobalto y níquel reducido a 0.01 mg/l

y 0.72 mg/l, respectivamente (Park *et al.*, 2006). El Fe-EDTA y las vitaminas completas según la fórmula del medio Litvay. Este medio se suplementó con 9 μ M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.5 μ M de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0.5 g/l de L-glutamina, 10 g/l de sacarosa y 4 g/l Gelrite (S); o con 2 g/l Gelrite (S2). La L-glutamina se esterilizó por filtración y se añadió al medio templado. El pH se ajustó a 5.8.

Figura 4. Extracción de los megagametofitos para su cultivo: (A) apertura de piña inmadura con torno después de 3 meses a 4°C, (B) piñones incluidos en las escamas, (C) piñones sanos, (D) esterilización con lejía en agitación, (E) ruptura de la testa en condiciones estériles, (F) extracción del megagametofito para su cultivo, (G-H) piña inmadura procedente de la R2 en “El Serranillo” después de 4 meses a 4°C, (I) piña inmadura procedente de la R2 en “Quintanilla de Onésimo” después de 4 meses a 4°C.

En conjunto, se realizaron 4 tratamientos:

1. Medio M-mLV₂ a 23°C (S23)
2. Medio M-mLV₂ a 18°C (S18)
3. Medio M-mLV₂ con 2 g/l de Gelrite a 23°C (S2-23)
4. Medio M-mLV₂ con 2 g/l de Gelrite a 18°C (S2-18)

Se cultivaron un total de 1217 megagametofitos completos mezclando el material de ambos clones (4 medios de cultivo x 5 megagametofitos por repetición x 55-63

repeticiones por tratamiento). Se consideró cada placa sellada con Parafilm[®], conteniendo 5 explantos, como una repetición.

En un segundo ensayo, se evaluó el efecto del banco clonal, de la familia de medio-hermanos, de la fecha de recolección, de la temperatura (23 y 18°C) y de los reguladores del crecimiento en la inducción. Se utilizaron megagametofitos completos de los clones procedentes de “El Serranillo” y “Quintanilla de Onésimo”, de las tres fechas de recolección, que se repartieron entre tres medios de cultivo cultivándose a 23 y 18°C. Los medios de cultivo utilizados estaban compuestos del medio nutritivo descrito anteriormente, incluyendo tres combinaciones de PGRs:

1. Auxina-citoquinina (S): M-mLV₂ (9 µM de 2,4-D, 4.5 µM de BAP)
2. Brasinólido (B): BM-mLV₂ (9 µM de 2,4-D, 4.5 µM de BAP, 0.1 µM de 24-epibrassinolide) (Pullman *et al.*, 2003b)
3. Picloram (P): PB-mLV₂ (9 µM de Picloram, 4.5 µM de BAP) (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk, 2008)

Se cultivaron un total de 6603 megagametofitos (11 familias x 3 recogidas x 3 medios de cultivo x 2 temperaturas x 5 megagametofitos por repetición x 5-7 repeticiones por tratamiento). El brasinólido se esterilizó por filtración, añadiéndolo al medio templado.

En un tercer ensayo, se evaluó el efecto de la temperatura en la inducción. Se utilizaron megagametofitos completos del clon 6088 procedentes de “El Serranillo” en una mezcla de la segunda (R2) y tercera (R3) fecha de recolección. Se cultivaron un total de 788 megagametofitos en el medio M-mLV₂ a 28, 23 y 18°C (3 temperaturas x 5 megagametofitos por repetición x 48-56 repeticiones por tratamiento).

Los cultivos se examinaron cada 1-2 semanas para registrar el número de explantos contaminados y la aparición de proliferaciones inducidas. A las 2-3 semanas de cultivo, los explantos se transfirieron al lado de la posición que ocupaban en el medio de cultivo para evitar el halo opaco formado por la emisión de exudados del megagametofito.

2.1.3. Proliferación del material embriogénico

Una vez que una extrusión de material presumiblemente embriogénico emergió fuera del extremo del micropilo del megagametofito, se procedió a su aislamiento y subcultivo en el medio M-mLV para el mantenimiento de su capacidad proliferativa. Este medio estándar se formuló con el medio nutritivo de Litvay, con la concentración de los macronutrientes reducidos a la mitad y la de los microelementos completos, 9 μM de 2,4-D, 4.5 μM de BAP, 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0.5 g/l de L-glutamina, 20 g/l de sacarosa y 4 g/l Gelrite. Se evaluó el efecto del suplemento con vitaminas diferentes del medio de mantenimiento sobre la proliferación de las masas embriogénicas inducidas. Se ensayaron 3 medios de cultivo:

1. M-mLV estándar con 0.1 mg/l de tiamina, 0.5 mg/l de ácido nicotínico y 0.1 mg/l de piridoxina
2. M-mLV-bf, añadiendo 0.05 mg/l de biotina y 0.5 mg/l de ácido fólico (Pullman *et al.*, 2005)
3. M-mLV-tnp, aportando mayor concentración de tiamina (5 mg/l), ácido nicotínico (5 mg/l) y piridoxina (0.5 mg/l) que el medio estándar (Hargreaves *et al.*, 2009)

Se realizaron 3 repeticiones (placas) por tratamiento, conteniendo 7 pequeñas masas embriogénicas por placa.

2.2. Inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos

Se evaluará la respuesta embriogénica de embriones somáticos en distintos estados de desarrollo aislados de los medios de maduración. Muestras de masas en proliferación (medio M-mLV) de las líneas embriogénicas 2F6047 y 5F2062, establecidas en distintos años (2006 y 2011, respectivamente), se subcultivaron en un medio de acondicionamiento CA- $\frac{1}{2}$ mLV (medio nutritivo de Litvay, con la concentración de macronutrientes reducidos a la cuarta parte, sin PGRs, 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0.5 g/l de L-glutamina, 10 g/l de maltosa, 10 g/l de Gelrite, 10 g/l de carbono activo), durante 2 semanas a 23°C. Posteriormente, se tomaron muestras de 50 mg de la parte superficial de las masas acondicionadas por placa, y se dispersaron en medio de mantenimiento líquido, sin PGRs ni glutamina. Estas suspensiones se filtraron a través de paquete de filtros, en cabina de flujo laminar; y el filtrado sobre el filtro se cultivó en el medio de maduración mLV2 (medio nutritivo de Litvay, con la concentración de los macronutrientes reducidos a la mitad, 1 g/l de hidrolizado de caseína, 0.5 g/l de L-glutamina, 121 μ M de ABA, 60 g/l de maltosa, 10 g/l de Gelrite). Después de 8 a 16 semanas, se aislaron embriones somáticos completamente inmaduros (transparentes, sin acumulo de sustancias de reserva), precotiledonares (con la cabeza embrionaria opaca, antes de desarrollarse los cotiledones en el domo apical) y maduros (con los cotiledones en expansión).

Con el fin de analizar las posibles diferencias morfológicas de las masas proliferativas generadas en los medios de inducción, los embriones cotiledonares se cultivaron enteros (Fig. 5A) y seccionados en la zona subcotiledonar (Fig. 5B). También se analizó la respuesta de inducción en embriones precotiledonares (Fig. 5C) e inmaduros completos (embrión unido a las células de suspensor) (Fig. 5E), y cortados por debajo del cuerpo del embrión (sin suspensor) (Fig. 5D, F).

Figura 5. Embriones somáticos en distinto estado de desarrollo introducidos en cultivo para la inducción de embriogénesis secundaria. Barras = 1 mm. (A) Cotiledonar completo. (B) Cotiledonar cortado a nivel subcotiledonar. (C) Precotiledonar completo. (D) Precotiledonar cortado a nivel del cuerpo del embrión. (E) Inmaduro completo. (F) Inmaduro cortado a nivel de la cabeza embrionaria.

Se evaluará el efecto de diferentes reguladores de crecimiento como el 2,4-D, BAP, Picloram (ácido 4-Amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic, Sigma P5575), Brasinólido (24-epibrassinolide, Sigma E1641), CPPU ([N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea], C2791, Sigma), Arabinogalactano ((+)-Arabinogalactan, A-9788 Sigma-Aldrich), y aportes de mioinositol y vitaminas en la inducción de embriogénesis secundaria sobre el embrión somático inicial. Se ensayaron los siguientes medios de inducción:

1. M-mLV (9 μ M de 2,4-D, 4.5 μ M de BAP), medio de mantenimiento estándar, conteniendo 0.1 g/l de mioinositol
2. M-mLV1, conteniendo 1 g/l de mioinositol (Pullman *et al.*, 2003a)
3. M-mLV20, conteniendo 20 g/l de mioinositol (Pullman *et al.*, 2003a)
4. M-mLV-B (9 μ M de 2,4-D, 4.5 μ M de BAP, 0.1 μ M de 24-epibrassinolide) (Pullman *et al.*, 2003b)
5. M-mLV-HB (9 μ M de 2,4-D, 4.5 μ M de BAP, 1 μ M de 24-epibrassinolide) (Pullman *et al.*, 2003b)

6. P-mLV (9 μ M de Picloram, 4.5 μ M de BAP) (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk, 2008)
7. CPPU-mLV (4 μ M de CPPU) (Park *et al.*, 2006)
8. M-mLV-A (9 μ M de 2,4-D, 4.5 μ M de BAP, 3 mg/l de Arabinogalactano) (Egertsdotter y von Arnold, 1995; Mallón *et al.*, 2013)
9. M-mLV-bf (suplemento de 0.05 mg/l de biotina y 0.5 mg/l de ácido fólico) (Pullman *et al.*, 2005)
10. M-mLV-tpn (aporte de 5 mg/l de tiamina, 5 mg/l de nicotínico, 0.5 mg/l de piridoxina) (Hargreaves *et al.*, 2009; Find *et al.*, 2014)

Durante la inducción, todos los embriones somáticos se cultivaron en condiciones de oscuridad a 23°C.

Se realizó un estudio micromorfológico de los explantos que empezaron a formar proliferaciones celulares con un esteromicroscopio Nikon SMZ 745T. Las características embriogénicas de las diferentes proliferaciones inducidas en los embriones somáticos se evaluaron mediante la tinción con acetocarmín 1% de las muestras obtenidas y de su observación con el microscopio invertido Nikon TS100.

2.2.1. *Inducción en embrión somático cotiledonar*

Se cultivaron de 30-40 embriones de la línea 2F6047, entre 14 y 16 semanas en condiciones de maduración, en un medio de mantenimiento estándar pero libre de PGRs (mLV0) durante una semana, con el fin de reducir el contenido en ABA en los tejidos y facilitar la eliminación del tejido embriogénico preexistente. Posteriormente, se transfirieron a los medios de inducción descritos arriba (excepto el CPPU-mLV). En un ensayo posterior, se cultivaron 25 embriones de las líneas 2F6047 y 5F2062 directamente en tres de los medios de inducción descritos (M-mLV, M-mLV-B, P-mLV).

2.2.2. Inducción en embrión somático precotiledonar e inmaduro

Se cultivaron 25 embriones de las líneas 2F6047 y 5F2062, entre 8 y 12 semanas en condiciones de maduración, directamente en seis de los medios de inducción descritos (M-mLV, M-mLV-B, P-mLV, CPPU-mLV, M-mLV-bf, M-mLV-tpn).

2.2.3. Diferenciación-maduración en el material generado

Se analizó la capacidad para madurar de las masas proliferativas obtenidas a partir de los embriones somáticos en los distintos medios de inducción, utilizando el protocolo de Carneros y col. (2017) y descrito en el apartado de diferenciación-maduración (Fig. 8A-C). Muestras de 50 mg de las masas con aspecto embriogénico se suspendieron en medio de mantenimiento líquido sin PGRs y suplementado con 5 g/l de carbono activo. Esta suspensión se filtró con un pulso de vacío y posteriormente el filtro exterior conteniendo las células filtradas se desecó parcialmente en cabina de flujo laminar antes de cultivarlo en condiciones de maduración (medio mLV conteniendo 121 μ M de ABA, 60 g/l de maltosa, 10 g/l de Gelrite). Se contó el número de embriones cotiledonares con morfología normal por gramo de tejido, después de 16 semanas de cultivo.

2.3. Establecimiento y mantenimiento de líneas embriogénicas en medio líquido. Producción de biomasa en medio semisólido y líquido

Se utilizaron las líneas embriogénicas 1F6011 y 7F6011 (iniciadas en 2005), 2F6047 (iniciada en 2006), 1F2062 y 5F2062 (iniciadas en 2011), obtenidas a partir de embriones cigóticos inmaduros (Carneros *et al.*, 2009), y mantenidas en proliferación activa mediante subcultivos bisemanales de pequeñas masas en el medio M-mLV, a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y oscuridad. Con el fin de determinar las condiciones de cultivo para el establecimiento y mantenimiento de cultivos en suspensión, se ha evaluado el efecto de distintos factores en la proliferación, morfología de los cultivos y capacidad de maduración de los embriones somáticos.

2.3.1. Condiciones de cultivo para el establecimiento de cultivos en suspensión

Se realizó un primer experimento para determinar la influencia de la densidad del inóculo (10, 20, 30 mg/ml) y volumen del envase (100, 200 ml) en la proliferación de los cultivos. Se iniciaron cultivos en suspensión de las líneas 2F6047 y 7F6011 mediante la transferencia de 250, 500 o 750 mg de masa embriogénica a matraces Erlenmeyer de 100 ml (ME100) y de 200 ml (ME200), conteniendo 25 ml de medio M-mLV. Se incubaron los cultivos a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ en oscuridad en un agitador orbital horizontal a 50 rpm (radio de rotación de 30 mm). Los envases ME100 se cerraron con papel aluminio doble y los ME200 con tapones de silicona (Bellco Glass, Vineland NJ). Se midió el crecimiento de los cultivos mediante el volumen celular sedimentado (SCV) y el peso seco (PS) después de la filtración y la desecación en un horno a 60°C durante 24 h. El SCV se obtuvo volcando la suspensión en un tubo calibrado de 50 ml, después de 30 min. Luego se filtró la suspensión en un embudo Büchner con un pulso de vacío utilizando un papel filtro (80 gr/m^2 y 43-48 μm de poro, Filter-Lab, ANOIA, Barcelona, España) previamente pesado para determinar el peso fresco (PF) y PS. También, se siguió la cinética de crecimiento de la línea 2F6047 establecida con una densidad de inóculo de 20 y 30 mg/ml, en envases ME200 a 50 rpm. Se midieron los parámetros del crecimiento (SCV y PS) semanalmente durante 4 semanas de cultivo. Cada tratamiento se realizó con 6 muestras independientes en cada período de cultivo, ya que las medidas del PS comprendían un método destructivo.

Se realizó un segundo experimento para determinar la influencia de la velocidad de agitación (50, 100, 150 rpm) en los parámetros de crecimiento y morfología de los cultivos en suspensión de las líneas 2F6047, 1F6011 y 7F6011. Los cultivos se iniciaron introduciendo muestras de 500 mg de PF en envases ME200 conteniendo 25 ml de medio M-mLV y se mantuvieron durante 3 semanas. Cada tratamiento se realizó con 6 muestras. El estudio morfológico se realizó en muestras de 1 ml de suspensión teñidas con acetocarmín al 1% (p/v) y observadas con un microscopio invertido Nikon TS100.

Se realizó un tercer experimento para determinar la influencia de los componentes del medio de cultivo en los parámetros del crecimiento. El establecimiento de los cultivos en suspensión se realizó como en el experimento segundo, pero a 100 rpm. Se ensayaron tres concentraciones de reguladores del crecimiento: la estándar utilizada en el medio M-mLV (M), otra más baja (B) (mLV; 4.5 μ M de 2,4-D, 2.2 μ M de BAP) y otra aún más baja (MB) (mLV; 0.24 μ M de 2,4-D, 0.22 μ M de BAP). También, se ensayó en un experimento independiente el suplemento de maltosa en lugar de sacarosa a la misma concentración estándar (20 g/l). Los parámetros del crecimiento se midieron a las 3 semanas de cultivo. Cada tratamiento se realizó con 6 muestras.

2.3.2. Procedimientos para el mantenimiento de los cultivos en suspensión

Se ensayaron dos procedimientos de subcultivo con el fin de mantener los cultivos homogéneos con crecimiento activo. Los cultivos en suspensión se establecieron introduciendo muestras de 500 mg de PF, en envases ME200 conteniendo 25 ml de medio M-mLV a 100 rpm, 23°C $\pm$ 1°C y oscuridad, durante 3 semanas (cultivo 1). Los parámetros del crecimiento se midieron después de cada período de cultivo.

En el primer procedimiento (Fig. 6A), se cultivaron las líneas 2F6047, 1F6011 y 7F6011. Alícuotas de 5 ml tomadas de la suspensión (cultivo 1), homogenizada por agitación, se resuspendieron en 20 ml de medio fresco y se cultivaron durante 3 semanas (cultivo 2). Se realizó un segundo subcultivo de la misma manera (cultivo 3). Cada tratamiento se realizó con 5 muestras, y se repitió en el tiempo.

En el segundo procedimiento (Fig. 6B), se cultivaron las líneas 1F2062 y 5F2062. La suspensión establecida de la misma manera que en el procedimiento anterior (cultivo 1) se volcó sobre papel filtro colocado en un embudo Büchner y se filtró con un pulso de vacío. Se tomaron muestras del filtrado de 250 mg que se resuspendieron en 25 ml de medio fresco. Se realizaron cuatro subcultivos (cultivo 2, 3, 4 y cultivo 5) cada tres semanas. Cada tratamiento se realizó con 4 muestras, y se repitió en el tiempo.

Figura 6. Mantenimiento de los cultivos en suspensión. (A) Subcultivo mediante el pipeteado de alícuotas de la suspensión homogenizada. (B) Subcultivo mediante la transferencia de determinadas cantidades de masa celular filtrada.

2.3.3. Escalado de los cultivos para la producción de biomasa

Se evaluó la producción de biomasa en cultivos en medio semisólido (MS) y en medio líquido (ML) durante tres períodos de cultivo (cultivo 1, 2 y cultivo 3), con transferencias bisemanales (Fig. 7). Se cultivaron en MS masas embriogénicas individuales (500 mg de PF) de las líneas 2F6047, 7F6011, 1F2062 y 5F2062 en placas Petri (90 mm), conteniendo 25 ml de medio de proliferación. En cada período de cultivo la masa individual se dividió en dos piezas y se transfirieron a medio fresco hasta obtener un total de 4 masas al final del proceso de cultivo. La producción de biomasa se midió a través del PF y PS producido en cada período de cultivo. Se realizaron 6 medidas por línea embriogénica en cada período de cultivo.

Se establecieron cultivos en suspensión de las mismas líneas en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior (500 mg de PF, envases ME200, 25 ml de medio, 100 rpm). El SCV procedente del cultivo 1 se volcó en otro envase ME200 y se resuspendió con medio fresco hasta alcanzar un volumen final de 50 ml. El tercer cultivo se inició volcando el SCV procedente del cultivo 2 en otro envase ME200 y resuspendiendo con medio fresco hasta alcanzar un volumen final de 100 ml. La

producción de biomasa se midió a través del SCV producido en cada período de cultivo, y del PF y PS al final del tercer período de cultivo. Se realizaron seis medidas por línea embriogénica en cada período de cultivo.

Figura 7. Escalado de los cultivos en medio semisólido y en medio líquido para la producción de biomasa. Se realizaron tres períodos de cultivo, con dos subcultivos bisemanales.

2.3.4. Evaluación de la capacidad de maduración de los cultivos embriogénicos generados

Se utilizó el método descrito por Carneros y col. (2017). Brevemente, 50 mg de peso fresco tomado del cultivo embriogénico filtrado se suspendió en medio de mantenimiento líquido sin PGRs suplementado con 10 g/l de carbono activo. Luego, esta suspensión se filtró con papel filtro aplicando un pulso de vacío para drenar el líquido. Las muestras se desecaron parcialmente durante cuatro horas y se cultivaron en condiciones de maduración (medio nutritivo mLV, 121 μ M de ABA, 60 g /l de maltosa and 10 g/l de Gelrite en placa Petri a $23\pm 1^\circ\text{C}$ en oscuridad durante 16 semanas). Se realizaron seis repeticiones (placas) por línea embriogénica y condición de cultivo. La capacidad de maduración se midió mediante el número de embriones cotiledonares con morfología normal por gramo de tejido fresco (EC). Las repeticiones de todas las líneas embriogénicas dentro de cada tratamiento se agruparon para evaluar el efecto de la condición de cultivo.

2.4. Diferenciación-maduración de embriones somáticos bajo distintas condiciones de cultivo

Las líneas embriogénicas 1F6011 y 7F6011 (iniciadas en 2005), 2F6047 (iniciada en 2006), 1F2062 y 5F2062 (iniciadas en 2011), 3F2062 y 4F2062 (iniciadas en 2015) obtenidas a partir de embriones cigóticos inmaduros (Carneros *et al.*, 2009); se mantuvieron en proliferación activa mediante subcultivos bisemanales de pequeñas masas en el medio de mantenimiento M-mLV a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ y oscuridad, hasta la realización de los distintos ensayos.

Previamente a las condiciones de maduración, se transfirieron pequeñas masas embriogénicas (aprox. 100 mg) desde el medio de mantenimiento al medio de acondicionamiento UL- $\frac{1}{2}$ mLV (medio mLV diluido a la mitad, $0.24\ \mu\text{M}$ de 2,4D, $0.22\ \mu\text{M}$ de BAP, 10 g/l de sacarosa, 4 g/l de Gelrite) descrito en Carneros y col. (2017). Se cultivaron durante un mes en oscuridad a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un subcultivo a medio fresco a las 2 semanas. Posteriormente, se tomaron de la superficie de las masas embriogénicas muestras de 50 mg y se suspendieron en medio de mantenimiento líquido (mLV) sin PGRs y suplementado con 5 g/l de carbono activo (CA) (Fig. 8A). La suspensión se filtró a través de papel filtro colocado en un embudo Büchner y se aplicó un pulso de vacío a baja presión para drenar el líquido (Fig. 8B). Posteriormente, el papel filtro con los agregados celulares se colocó en una placa Petri vacía (6 cm de diámetro) sin sellar y se sometió a una desecación parcial en la cabina de flujo laminar durante 4 h (aprox. 13% de pérdida de humedad) (Fig. 8C). A continuación, el papel filtro con la muestra se transfirió al medio de maduración estándar mLV2 (medio mLV, $121\ \mu\text{M}$ ABA, 60 g/l de maltosa, 10 g/l de Gelrite), cultivándose durante 16 semanas en oscuridad, realizándose un subcultivo a las 8 semanas de cultivo.

Figura 8. Preparación de las muestras antes de cultivarlas en condiciones de maduración. (A) Suspensión de las masas embriogénicas en medio con CA. (B) Filtración de la suspensión con vacío. (C) Desecación parcial en cabina de flujo laminar.

2.4.1. Efecto del suplemento con carbohidratos durante la maduración

Muestras procedentes de cuatro líneas embriogénicas mantenidas a 23°C se transfirieron a las condiciones de maduración descritas arriba. Para evaluar el efecto del suplemento con distintos carbohidratos en la maduración, al medio estándar mLV2 se le agregó 15 g/l de maltosa (mLV2-m), 15 g/l de sacarosa (mLV2-s), o 15 g/l de mioinositol (mLV2-i). Los cultivos se mantuvieron a 23°C y oscuridad. Se realizaron 10 repeticiones por línea y tratamiento. Este ensayo se repitió dos veces en el tiempo. En un ensayo complementario, muestras procedentes de la línea 2F6047 se cultivaron en los mismos medios mLV2-m y mLV2-s y uno nuevo, agregando 15 g/l de sorbitol al medio estándar (mLV2-so). Los cultivos se mantuvieron a 28°C y oscuridad. Se realizaron 10 repeticiones por tratamiento (Fig. 9).

Figura 9. Aporte de carbohidratos durante la maduración de las líneas embriogénicas.

2.4.2. Efecto de la temperatura durante la proliferación y maduración de líneas embriogénicas

Las líneas embriogénicas se cultivaron a una temperatura estándar de 23°C, a una más fría de 18°C, y en otra más caliente de 28°C, durante la proliferación y la diferenciación-maduración de las masas embriogénicas (Fig. 10). Se realizó un diseño factorial con la línea, temperatura y la fase de desarrollo, para estudiar la influencia de estos factores en la producción de embriones somáticos. Se midió el efecto de la temperatura en el crecimiento de los cultivos a través del PF y PS de cada masa embriogénica al inicio y después de 10 semanas en cultivo. El porcentaje de materia seca de los cultivos se midió con la fórmula $[(PS/PF) \times 100]$. Se subcultivaron bisemanalmente en medio de mantenimiento M-mLV ocho masas individuales (60 mg de PF) por línea embriogénica y tratamiento, a 18, 23 y 28°C en oscuridad. En cada subcultivo a medio M-mLV fresco, cada masa embriogénica se dividió en dos o cuatro nuevas masas, dependiendo del tamaño alcanzado. Se realizaron dos repeticiones de este ensayo en el tiempo (16 muestras por tratamiento y línea).

También, se midió el número de embriones somáticos normales y anormales formados en cada una de las nueve combinaciones de temperatura, después de 16 semanas en condiciones de maduración. Para ello, se recolectaron porciones de masas (100 mg de PF) de la superficie de la masa en proliferación de cada línea y condición de temperatura, y se cultivaron en el medio de acondicionamiento UL- $\frac{1}{2}$ mLV durante 4 semanas a la misma temperatura que durante la proliferación. Posteriormente, porciones de estos cultivos de cada una de las tres temperaturas ensayadas (P18, P23, P28), se transfirieron a los medios de maduración (mLV2) y se cultivaron en las tres condiciones de temperatura (por ejemplo: P18M18, P18M23, P18M28) durante 16 semanas.

Figura 10. Tratamiento con varias temperaturas durante la proliferación y maduración de las líneas embriogénicas.

Se realizó un ensayo complementario, subcultivando las líneas embriogénicas en el medio de proliferación durante un período más prolongado a menor temperatura que la utilizada durante la maduración. Los cultivos se mantuvieron durante 18 semanas a 18°C, y posteriormente se transfirieron al medio de acondicionamiento UL-½mLV a la misma temperatura durante 4 semanas. Los cultivos se transfirieron a los medios de maduración y se cultivaron a 18, 23 y 28°C. Se realizaron 10 repeticiones por línea y tratamiento. Este ensayo se repitió dos veces en el tiempo (Fig. 11).

Se tomaron muestras de las masas que proliferaron en las tres temperaturas ensayadas, para su observación con el microscopio invertido Nikon TS100. Se determinaron las morfologías de los cultivos en muestras frescas y en muestras teñidas con acetocarmín 1%.

Figura 11. Tratamiento prolongado con menor temperatura durante la proliferación y varias temperaturas durante la maduración de las líneas embriogénicas.

2.4.3. Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración

Se cultivaron tres líneas embriogénicas en condiciones que combinaban tres niveles de temperatura y dos concentraciones de gelificante, la habitual y otra superior, durante la proliferación (Fig. 12). Las líneas 2F6047, 1F2062 y 5F2062 se subcultivaron bisemanalmente en el medio de mantenimiento estándar (G4, 4 g/l de Gelrite) y en un medio conteniendo 10 g/l de Gelrite (G10); durante 8 semanas a 18, 23 y 28°C. Posteriormente, los cultivos embriogénicos se transfirieron a las condiciones de maduración descritas anteriormente, pero variando la formulación del medio de acondicionamiento y su duración. Se utilizó el medio llamado CA-½mLV, compuesto por el medio nutritivo ½mLV al que se añadió 10 g/l de maltosa en lugar de sacarosa, 10 g/l

de Gelrite en lugar de 4 g/l, y 10 g/l de CA; durante 2 semanas a la misma temperatura que en la proliferación. La maduración se realizó en el medio estándar mLV2, a 18, 23 y 28°C. Se realizaron en total 12 ensayos, con 10 repeticiones por línea y tratamiento. Este ensayo se repitió dos veces en el tiempo. Como ejemplo, el tratamiento P18G10M23 se realizó con una proliferación a 18°C, en un medio con alta concentración de gelificante, seguido de un acondicionamiento a 18°C y una posterior maduración a 23°C. Los cultivos mantenidos a 28°C se sellaron con papel para disminuir la condensación producida a esa temperatura.

Figura 12. Esquema de la combinación de tres niveles de temperatura durante la proliferación y maduración junto a dos concentraciones de gelificante durante la proliferación.

2.5. Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica sobre el patrón de metilación en líneas embriogénicas

2.5.1. *Material vegetal y condiciones de cultivo*

Se utilizaron las líneas embriogénicas 2F6047 y 5F2062 mantenidas en proliferación en el medio estándar M-mLV, con subcultivos bisemanalmente, en las condiciones de cultivo anteriormente establecidas.

Para el estudio del efecto de la temperatura y la disponibilidad hídrica en el patrón de metilación del ADN, pequeñas masas de ambas líneas embriogénicas se transfirieron a placas Petri (90 mm) conteniendo 25 ml de medio M-mLV gelificado con 4 g/l (G4), o 10 g/l (G10) de Gelrite (G1101, Duchefa); cultivándose a 18 (P18), 23 (P23) o $28 \pm 1^\circ\text{C}$ (P28) en un diseño factorial. Cada masa individual (100 mg de PF) se dividió para aumentar la tasa de crecimiento del tejido embriogénico, transfiriéndose a medio fresco cada dos semanas. Los cultivos se examinaron en cada subcultivo para observar su crecimiento. Después de 6 semanas en estas condiciones de proliferación, se extrajeron muestras de 400 mg para el análisis de amplificación de fragmentos sensibles a metilación polimórficos (MSAP). Se realizaron tres replicas por línea embriogénica y tratamiento de proliferación

En la maduración, las masas embriogénicas de ambas líneas proliferadas según las condiciones indicadas arriba, se acondicionaron mediante su subcultivo en el medio UL- $\frac{1}{2}$ mLV (reducción de nutrientes, 0.24 μM de 2,4-D y 0.22 μM de BAP, 10 g/l de sacarosa y 4 g/l de Gelrite) o UL- $\frac{1}{2}$ mLV10G (medio UL- $\frac{1}{2}$ mLV con 10 g/l de Gelrite en lugar de 4 g/l). Este subcultivo durante 3 semanas en las tres diferentes temperaturas, mantenía las mismas concentraciones de gelificante que en la proliferación. La diferenciación de embriones se estimuló preparando muestras antes de cultivarlas en condiciones de maduración como se ha descrito anteriormente para la diferenciación-maduración de embriones somáticos (Fig. 8), y transfiriéndolas a medio mLV2. Las placas se sellaron con parafilm. Después de 8 semanas en cultivo, se recogieron las muestras para su análisis. Se tomaron 3 muestras de masas en maduración, y una mezcla de embriones somáticos individualizados por línea embriogénica y tratamiento. En la Figura

13 se muestran las morfologías de las distintas masas embriogénicas proliferadas en las seis condiciones de cultivo ensayadas, de donde se tomaron las muestras a analizar.

Figura 13. Morfología de las masas embriogénicas de la línea 2F6047 proliferadas bajo tres condiciones de temperatura y dos condiciones de disponibilidad hídrica. (A) P18G4: 18°C, 4 g/l de Gelrite. (B) P23G4: 23°C, 4 g/l de Gelrite. (C) P28G4: 28°C, 4 g/l de Gelrite. (D) P18G10: 18°C, 10 g/l de Gelrite. (E) P23G10: 23°C, 10 g/l de Gelrite. (F) P28G10: 28°C, 10 g/l de Gelrite. Barras = 1 cm y 2 mm.

2.5.2 Análisis del grado de metilación del ADN (MSAP)

Estos ensayos se realizaron en coordinación con el departamento de Ecología y Genética del CIFOR-INIA. Por tanto, las muestras se transportaron desde el Centro de Investigación IMIDRA (Alcalá de Henares) hasta las instalaciones del INIA en Madrid.

La amplificación de fragmentos sensibles a metilación polimórficos (MSAP), está basada en una modificación de la técnica de AFLP, para estudiar el nivel de metilación de citosina del ADN; utilizando enzimas de restricción de corte frecuente de tipo isoesquizómeros que tienen diferente sensibilidad a la metilación. Según el protocolo descrito por Guevara y col. (2017), se utilizaron dos combinaciones de enzimas de restricción: la enzima *EcoRI*, de corte frecuente en todo el genoma a nivel del tetranucleótido 5'-AATT, con las enzimas *HpaII* o *MspI*. Estas dos últimas son isoesquizómeros porque reconocen la misma secuencia 5'-CCGG, dejando extremos cohesivos. La diferencia entre ambas radica en el tipo de metilación que reconocen. *HpaII* corta el tetranucleótido cuya citosina externa esté hemimetilada (5'-^{hm}CCGG), mientras que *MspI* corta cuando la citosina interna está completamente metilada (5'-C^mCCG).

En la Figura 14 se esquematiza todo el proceso de análisis desde la digestión de las muestras hasta el análisis de datos.

Figura 14. Representación esquemática de la técnica de MSAP descrita en Guevara y col. (2017).

Extracción y cuantificación del ADN. La selección del material en todos los estados de desarrollo se hizo bajo la lupa, dentro de una cabina de flujo laminar (Fig.

15A). Las muestras dentro de tubos eppendorf de 2 ml se pesaron en báscula de precisión (Fig. 15B). Rápidamente cada muestra se congeló en nitrógeno líquido (NL) (Fig. 15D), para mantener intacto el estado del ADN. Las muestras se transportaron inmersas en NL dentro una caja de poliespan, colocada dentro de una nevera rígida con acumuladores de frío (Fig. 15E-F) para evitar la evaporación del NL. En la extracción del ADN, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN®) siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig. 15G).

La concentración del ADN extraído se estimó mediante espectrofotometría (Thermo Scientific, Nanodrop 1000®). La pureza de las muestras se determinó a través de los índices de absorbancia $OD_{260/280}$ y $OD_{260/230}$. La integridad del ADN se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, todas las muestras se ajustaron a un volumen final de 10 μ l con una concentración de ADN de 50 ng/ μ l.

Figura 15. Toma de muestras y extracción de ADN. (A) Selección de muestras de masas embriogénicas en fase de maduración. (B) Pesado de unos 400 mg de una masa en fase de proliferación. (C) Muestras de 400 mg de masas en fase de maduración. (D) Muestras congeladas en NL. (E) Muestras listas para el transporte en nevera rígida. (F) Muestras sumergidas en NL dentro de una caja de poliespan, rodeada de acumuladores dentro en la nevera rígida. (G) Muestras homogeneizadas de masas de maduración y embriones somáticos. (H) Columnas con ADN extraído en la resina.

Digestión. El ADN extraído, primero se digirió con el enzima *HpaII* y posteriormente con *EcoRI* ya que requieren diferentes buffers. Se incubaron 500 ng de ADN en un volumen final de 25 μ l, a 37 °C durante dos horas. La mezcla de digestión *HpaII* se preparó según el esquema siguiente:

Reactivos	Volumen
<i>HpaII</i> (10unid/ μ l)	0.6 μ l
Buffer 1 NEB	2.5 μ l
H ₂ O	11.9 μ l
TOTAL	15 μ l

Posteriormente, se precipitó el ADN añadiendo 2.5 µl de acetato sódico (AcNa) 3 M y 62.5 µl de etanol absoluto, incubándolo toda la noche a -20°C. Al día siguiente se realizó un spin en una centrífuga para eliminar la mezcla de digestión. El producto de digestión se centrifugó 30 min a 4°C para la eliminación del sobrenadante; lavando luego el pellet con 1 ml de etanol al 70% a -20°C. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 4°C para retirar completamente el etanol; y el pellet se secó a 37°C un mínimo de 3 min. Luego la muestra se resuspendió en 24 µl de agua destilada.

El ADN resuspendido es entonces digerido con la mezcla de digestión *EcoRI*, preparada según el esquema siguiente:

Reactivos	Volumen
<i>EcoRI</i> (20 unid/µl)	0.5 µl
Buffer RL 10x	3.5 µl
H ₂ O	7 µl
TOTAL	11 µl

El volumen final de 35 µl de la mezcla de digestión *HpaII/EcoRI* se incubó a 37°C durante dos horas.

Una segunda batería de muestras de ADN se digirió con una mezcla de las dos enzimas de restricción *MspI/EcoRI*, preparada según el esquema siguiente:

Reactivos	Volumen
<i>EcoRI</i> (20 unid/µl)	0.5 µl
<i>MspI</i> (20 unid/µl)	0.5 µl
Buffer RL 10x	3.5 µl
H ₂ O	20.5 µl
TOTAL	25 µl

Se incubaron 500 ng de ADN en un volumen final de 35 µl de la mezcla de digestión *MspI/EcoRI*, a 37°C durante tres horas.

Ligación. Dos tipos de adaptadores se ligarán a los fragmentos de ADN después de la digestión, uno para el *EcoRI* que se une a los extremos cohesivos dejados por la enzima *EcoRI*, y otro para el *MspI/HpaII* que se une a los extremos cohesivos romos dejados por cualquiera de las dos enzimas *HpaII* o *MspI*. Se añaden 5 µl de la mezcla de ligación conteniendo el adaptador *EcoRI* y el *MspI/HpaII*, preparada según el esquema

siguiente, hasta alcanzar un volumen final de 40 µl; incubándose a 37°C durante 3 h y luego a 4°C durante la noche.

Reactivos	Volumen
Adaptador <i>Eco</i> RI (20 unid/µl)	1 µl
Adaptador <i>Msp</i> I/ <i>Hpa</i> II (20 unid/µl)	1 µl
ATP (10 mM)	0.8 µl
Buffer RL 10x	0.5 µl
T4 DNA Ligasa (20 unid/µl)	0.1 µl
H ₂ O	1.6 µl
TOTAL	5 µl

Luego la muestra se diluyó con 160 µl de agua destilada, llegando a un volumen final de 200 µl; y todas las muestras se almacenaron a -20°C.

Pre-amplificación. En esta reacción se utilizaron primers que son complementarios de las secuencias adaptadoras de *Eco*RI y *Msp*I/*Hpa*II, con un nucleótido 3' selectivo adicional; seleccionándose así 1/16 de los fragmentos digeridos. El Primer F se corresponde con el primer *Eco*RI+A, y el Primer R con el primer *Msp*I/*Hpa*II+A. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl por muestra; 5 µl de ADN más 15 µl de la mezcla de pre-amplificación preparada según el esquema siguiente:

Reactivos	Volumen
ddH ₂ O	10.32 µl
dNTPs Invitrogen 10 mM	0.4 µl
Cl ₂ Mg Invitrogen 50 mM	1 µl
Buffer Invitrogen 10x	2 µl
Primer R (50 ng/µl)	0.6 µl
Primer F (50 ng/µl)	0.6 µl
DNA polimerasa Tap Invitrogen (5 unid/µl)	0.08 µl
TOTAL	15 µl

Las amplificaciones de las PCR se realizaron en un termociclador The Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem) empleando 30 ciclos. Un ciclo de 30 s a 94°C, 28 ciclos de 1 min a 60°C y un último ciclo de 1 min a 72°C, durante los cuales se dan procesos de desnaturalización, anillamiento de primers y extensión de los fragmentos amplificados.

Para verificar la eficiencia de la pre-amplificación, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% durante 10 min a 90 mV, 400mA; para visualmente comparar las intensidades de las bandas entre las muestras amplificadas. Cada pocillo del gel se cargó con una mezcla de 3 µl de agua destilada, 1 µl de bromofenol y 2 µl de producto de la amplificación. Según su intensidad cada muestra se diluyó 1:10 en los casos que las bandas fueran muy intensas (mucho ADN), 1:7 o 1:5 para las bandas de intensidades intermedias y 1:2 para las bandas menos intensas (menos ADN).

Amplificación de MSAP. Esta amplificación selectiva consistió en una reacción PCR con primers ya ensayados en estudios de *Pinus pinea* (Sáez-Laguna et al., 2014). Estos primers son complementarios de las secuencias adaptadoras de *EcoRI* y *MspI/HpaII*, con tres nucleótidos 3' selectivos adicionales. El primer *MspI/HpaII* con los nucleótidos “AAT” (primer R) y el primer *EcoRI* (primer F) con los nucleótidos “AAC” (Eco32) o “ACA” (Eco35). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl por muestra; 2.5 µl del ADN pre-amplificado diluido más 7.5 µl de la mezcla de amplificación preparada según el esquema siguiente:

Reactivos	Volumen 1x
ddH ₂ O	5.31 µl
dNTPs Invitrogen 10 mM	0.1 µl
Cl ₂ Mg Invitrogen 50 mM	0.5 µl
Buffer Invitrogen 10x	1 µl
Primer R (50 ng/µl)	0.3 µl
Primer F (50 ng/µl)	0.25 µl
DNA polimerasa Tap Invitrogen (5 unid/µl)	0.04 µl
TOTAL	7.5 µl

Las amplificaciones de las PCR se realizaron en un termociclador The Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem), pero empleando 36 ciclos. Trece ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 65°C y 1 min a 72°C, más otros veintitrés ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 56°C y 1 min a 72°C. Para verificar la eficiencia de la amplificación, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida. La carga de 0.65 µl por muestra diluida 1:1 con el marcador Sequamrk, se analizó en un Sistema de Análisis de ADN, Li-Cor 4300 según se describió en Guevara y col. (2017).

Análisis de MSAP. Se comparó el perfil de bandas de las combinaciones *HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI* según el método “Mixed Scoring” (Schulz et al., 2013;

Guevara *et al.*, 2017); generándose matrices donde 1 representa la presencia de fragmento y 0 cuando no se visualiza fragmento. La comparación entre ambos perfiles para cada muestra permite obtener información acerca del estado de metilación de las citosinas en la secuencia 5'-CCGG analizada. Los estados de metilación posibles para la secuencia de dichos fragmentos, se corresponden con la interpretación numérica descrita en la Figura 16. La presencia de bandas en los perfiles generados por ambas combinaciones *HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI* se asocia con sitios no metilados. La presencia de bandas solo en el perfil *MspI/EcoRI* se asocia con una hemi o completa metilación de las citosinas internas. La presencia de bandas solo en el perfil *HpaII/EcoRI* se asocia con la hemimetilación externa de las citosinas. La ausencia de fragmentos en ambos perfiles indica situaciones varias de metilación o polimorfismos en los sitios de restricción.

	Banding pattern (<i>EcoRI/HpaII</i>)/(<i>EcoRI/MspI</i>)	Interpretation	Methylation scoring	Non-methylation scoring	Mixed scoring		
					Non met.	Hemi & int. Cyt met.	Hemi & ext. Cyt met.
Status I → 5'CCGG GGCC _{3'}	Non methylation	1//1	Non-methylated cytosines	0	1	1	1 0
Status II → 5' ^m CCG G G GC ^m C _{3'} 5' ^m CCGG G GCC _{3'}	Full & hemi- methylation of internal cytosine	0//1	Fully methylated & hemi-methylated internal cytosines	1	0	0	1
Status III → 5' ^m CCGG GGCC _{3'}	Hemi-methylation of external cytosine	1//0	Hemi-methylated external cytosine	1	NA 0	0	0
Status IV → 5' ^m ^m CCG G G GC ^m C _{3'} 5' CCTG GGNC _{3'} 5' ^m CCGG GGCC _{3'}	Full & hemi-methylation of both cytosines Mutation (unknown) Full-methylation of external cytosine	0//0	No information	0 NA	0	0	0

Figura 16. Esquema explicativo de la estrategia de análisis e interpretación del patrón de bandas MSAP descrito por Guevara y col. (2017).

Los marcadores MSAP se clasifican de acuerdo a sus perfiles globales en todas las muestras (Fig. 17):

✦ **Marcadores Insensibles a Metilación (MI).** Cuando no se encuentran diferencias entre los dos perfiles de digestión (bandas *HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI*) para cualquier muestra. Si estos marcadores presentan el mismo perfil de bandas en todas las muestras (Fig. 17A) se denominan marcadores Insensibles a Metilación Monomórficos (MMI). Si estos marcadores presentan diferencias entre muestras (Fig. 17B), se denominan marcadores Insensibles a Metilación Polimórficos (PMI).

✂ Marcadores Sensibles a Metilación (MS). Cuando se encuentran diferencias entre los dos perfiles de digestión para una o varias muestras. Si se muestran diferentes perfiles de bandas entre los isoesquizómeros pero no entre muestras (Fig. 17C) se denominarán marcadores Sensibles a Metilación Monomórficos (MMS). La diferencia radica en el perfil completo de *HpaII/EcoRI* frente al perfil completo de *MspI/EcoRI*. Cuando existen diferencias entre los perfiles de una banda para *HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI* y entre muestras (Fig. 17D), se denominarán marcadores Sensibles a Metilación Polimórficos (PMS).

Figura 17. Esquema de bandas presentes en los perfiles de digestión *HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI* descrito por Sáez-Laguna y col. (2014). (A) Marcador Insensible a Metilación Monomórfico. (B) Marcador Insensible a Metilación Polimórfico. (C) Marcadores Sensibles a Metilación Monomórficos. (D) Marcadores Sensibles a Metilación Polimórficos.

Análisis estadístico. El porcentaje de metilación de las citosinas se analizó con la varianza molecular (AMOVA); estimándose la proporción de varianza atribuida dentro y entre muestras (según el tratamiento, los genotipos analizados y el estado de desarrollo). Se realizó un test de significación de PhiPT y los resultados de estos análisis se visualizaron por análisis de Principales Componentes (PCoA). La interpretación final de las matrices de bandas se llevó a cabo por matrices de distancias genéticas que eran datos epigenéticos binarios analizados estadísticamente con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) permitiendo el análisis de Principales Componentes (PCoA).

III. RESULTADOS

3.1. Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros

3.1.1. Caracterización y almacenamiento en frío de las piñas inmaduras

En la Figura 18 se muestran los aspectos cualitativos de las piñas inmaduras de distintos clones procedentes de los bancos clonales “Quintanilla de Onésimo” (Valladolid) y “El Serranillo” (Guadalajara). En las piñas recolectadas en “Quintanilla de Onésimo” (C10) durante las dos últimas semanas de junio (R1, y R2,), pudo observarse una diferencia en el tamaño de las piñas dentro de cada clon y recolección; y una coloración ligeramente más parda en la R2 además de algunas señales de picaduras de la chinche *Leptoglossus occidentalis*. Hay que señalar que todas las piñas de la R2 llegaron muy húmedas. Entre las piñas recolectadas a primeros de julio (R3) pudo observarse un mayor tamaño en el conjunto de las pertenecientes a “El Serranillo” (C60) que en las pertenecientes a “Quintanilla de Onésimo”, junto con una escasa presencia de picaduras de la chinche (embolsado de la piña en el árbol).

Figura 18. Piñas inmaduras de distintos clones procedentes de los bancos clonales “El Serranillo” (Guadalajara) (C60) y “Quintanilla de Onésimo” (Valladolid) (C10). Recogida R1 (17/6/2015 y 24/6/2015, respectivamente), recogida R2 (24/6/2015 y 30/6/2015, respectivamente) y recogida R3 (2/7/2015 y 7/7/2015, respectivamente).

En las Tablas 1 y 2 se resumen los parámetros cuantitativos analizados en las piñas recolectadas en los tres bancos clonales. En las piñas procedentes de “El Serranillo” no se observó un crecimiento paulatino en los parámetros medidos (peso, longitud y diámetro) entre la primera y la tercera recolección (Tabla 1). Se observó mucha variación en el tamaño de las piñas dentro de cada recolección. Los valores medios obtenidos en las tres fechas de recolección fueron de 387 g de peso, y 10 cm tanto de longitud como de diámetro. En las piñas procedentes de “Puerta de Hierro” se obtuvo un peso medio de 196 g, 9 cm de longitud y 7 cm de diámetro en la fecha de recolección correspondiente a la R2, mostrando más resina que las procedentes de los otros bancos clonales. En las piñas recolectadas en “Quintanilla de Onésimo” se pudo observar un crecimiento paulatino en los parámetros medidos entre la R1 y la R3. Se obtuvo un incremento del 6% en el peso entre la R1 y la R2, y un 16% entre la R2 y la R3. Entre la R1 y la R3, la longitud media se incrementó un 9% y el diámetro un 7%. Los valores medios obtenidos fueron de 203 g de peso, 9 cm de longitud y 7 cm de diámetro. En todos los clones, algunas piñas presentaban manchas marrones y cicatrices de picadura (Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros cuantitativos de las piñas recolectadas de ocho clones situados en los bancos clonales (BC) “El Serranillo” (Guadalajara) y “Puerta de Hierro” (Madrid). Se indica el peso (g), longitud (cm) y diámetro (cm) medio por clon y fecha de recolección.

BC "El Serranillo"				
Clon	Recolección	Peso	Longitud	Diámetro
2063	17/06/2015	416.6±43.8	11.1±0.5	8.8±0.5
	24/06/2015	381.6±12.2	11.3±0.2	8.5±0.1
	02/07/2015	-	-	-
	Media	401.1±24.4	11.2±0.3	8.7±0.3
6011	17/06/2015	348.8±18.6	9.9±0.3	8.7±0.2
	24/06/2015	289.6±29.6	9.6±0.4	7.7±0.3
	02/07/2015	390.3±18.3	9.0±0.3	10.5±0.3
	Media	339.6±19.9	9.5±0.2	8.9±0.4
6033	17/06/2015	339.1±33.9	10.2±0.3	8.9±0.4
	24/06/2015	496.8±42.6	11.5±0.4	27.4±17.9
	02/07/2015	411.3±22.5	8.8±0.2	10.4±0.2
	Media	415.7±22.5	10.2±0.4	15.6±0.2
6047	17/06/2015	412.3±43.0	10.8±0.4	8.8±0.3
	24/06/2015	452.0±27.0	10.9±0.3	8.9±0.2
	02/07/2015	415.3±41.3	9.0±0.4	10.7±0.5
	Media	415.0±14.7	10.1±0.3	9.3±0.3
6070	17/06/2015	310.6±29.1	8.9±0.3	8.3±0.1
	24/06/2015	429.5±36.1	10.3±0.4	9.3±0.4
	02/07/2015	353.1±41.5	8.6±0.3	9.2±0.6
	Media	364.4±23.3	9.3±0.3	8.9±0.3
6088	17/06/2015	346.9±29.7	9.7±0.3	8.7±0.2
	24/06/2015	398.9±14.0	10.0±0.1	8.9±0.1
	02/07/2015	408.7±26.6	8.8±0.3	9.6±0.2
	Media	384.9±14.9	9.5±0.2	9.0±0.1
1030	24/06/2015	368.8±18.5	10.9±0.4	8.3±0.1

Cuadro resumen "El Serranillo"				
Recolección	Peso	Longitud	Diámetro	
17/06/2015	362.4±16.1	10.1±0.2	8.7±0.1	
24/06/2015	401.7±16.1	10.6±0.2	11.4±2.9	
02/07/2015	396.5±16.1	8.8±0.1	10.1±0.2	
Media	386.9±8.8	9.9±0.1	10.1±1.0	
BC “Puerta De Hierro”				
Clon	Recolección	Peso	Longitud	Diámetro
2062	24/06/2015	196.3±6.4	8.7±0.2	7.1±0.1

Tabla 2. Parámetros cuantitativos analizados en las piñas recolectadas de seis clones situados en el banco clonal (BC) "Quintanilla de Onésimo" (Valladolid). Se indica el peso (g), longitud (cm) y diámetro (cm) medio por clon y fecha de recolección.

BC "Quintanilla De Onésimo"					
Clon	Recolección	Ramet	Peso (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)
1007	24/06/2015	F30/C22	149.1±16.2	8.0±0.4	6.5±0.3
	30/06/2015	F27/C22	221±12.8	9.2±0.2	7.3±0.2
	07/07/2015	F25/C22	274.8±12.2	9.9±0.3	8.2±0.1
	Media		215.0±15.9	9.1±0.3	7.3±0.2
1026	24/06/2015	F16/C20	199.9±10.6	8.9±0.2	7.3±0.1
	30/06/2015	F15/C20	201.1±16.6	9.1±0.4	7.1±0.2
	07/07/2015	F16/C20	234.1±14.2	9.7±0.3	7.4±0.2
	Media		211.7±8.6	9.2±0.2	7.3±0.1
1042	24/06/2015	F1/C24	199.5±10.7	8.4±0.2	7.3±0.1
	30/06/2015	F3/C24	177.6±3.1	8.0±0.1	7.0±0.1
	07/07/2015	F1/C24	222.4±14.0	8.8±0.2	7.5±0.2
	Media		199.8±7.4	8.4±0.1	7.3±0.1
1062	24/06/2015	F12/C15	206±24.7	8.9±0.4	7.2±0.2
	30/06/2015	F11/C1	198.5±26.8	9.6±0.5	6.7±0.3
	07/07/2015	F10/C15-20	204.4±10.6	8.6±0.2	7.4±0.2
	Media		203.1±11.7	9.0±0.2	7.1±0.1
1075	24/06/2015	F30/C25	153.2±12.5	8.4±0.4	6.4±0.1
	30/06/2015	F26/C25	163.6±9.9	8.8±0.2	6.6±0.2
	07/07/2015	F25/C25	229.3±5.5	9.7±0.1	7.2±0.2
	Media		182.0±10.4	9.0±0.2	6.7±0.1
1078	24/06/2015	F15/C3	190.0±21.7	7.9±0.3	7.2±0.2
	30/06/2015	F14/C3	209.4±30.6	8.6±0.5	7.2±0.3
	07/07/2015	F13/C3	225.1±20.8	8.4±0.3	7.6±0.2
	Media		208.1±13.8	8.3±0.2	7.3±0.1
Cuadro resumen BC "Quintanilla De Onésimo"					
Recolección	Peso (g)	Longitud (cm)	Diámetro (cm)		
24/06/2015	183.0±7.8	8.4±0.1	7.0±0.1		
30/06/2015	195.2±8.0	8.9±0.2	7.0±0.1		
07/07/2015	231.7±6.4	9.2±0.1	7.5±0.1		
Media	203.3±4.8	8.8±0.1	7.2±0.1		

En las Tablas 3 y 4 se muestran los piñones extraídos por piña después del almacenamiento a 4°C, indicándose el número de piñones totales extraídos (E), los

piñones sanos (S) y el porcentaje de piñones infectados por hongos (%I), por clon y fecha de recolección. Al cabo de 12 semanas de almacenamiento en frío se obtuvo en el clon 2062 (“Puerta de Hierro”) un total de 1142 piñones sanos y un 7% de piñones contaminados (Tabla 3). En los procedentes de “El Serranillo”, en el conjunto de las recolecciones, se obtuvo un 34% de piñones contaminados; en un rango del 30% después de 16-19 semanas de almacenamiento en la R1, un 39% después de 18-25 semanas en la R2 y un 33% después de 16-27 semanas en la R3 (Tabla 3). Algunos clones se contaminaron menos como el 1030 (5%) y el 2063 (21%) y otros mostraron mayores porcentajes de contaminación como el 6070 (45%) y el 6011 (46%). Se pudo observar un incremento de la contaminación de los piñones (podredumbre de las piñas) con la duración del almacenamiento. En la R1, con 16 semanas en frío se obtuvo un 32% de contaminación mientras que con 19 semanas se obtuvo un 44%. En la R2, con 18 semanas en frío se obtuvo un 54% de contaminación mientras que con 25 semanas se obtuvo un 34%. Este resultado estuvo relacionado con un efecto claro del clon, ya que el 6011 se contaminó un 62% a las 18 semanas mientras que el 6033 se contaminó un 21% después de 25 semanas en frío. En la R3, con 16 semanas en frío se obtuvo un 25% de contaminación mientras que con 27 semanas se obtuvo un 41%.

Tabla 3. Piñones extraídos de piñas recolectadas en los bancos clonales (BC) “El Serranillo” (Guadalajara) y “Puerta de Hierro” (Madrid), después de un periodo de almacenamiento en frío. Los datos muestran los piñones totales extraídos (E), los piñones sanos (S) y el porcentaje de piñones infectados por hongos (% I), por clon y fecha de recolección. El periodo de extracción de los piñones se realizó desde el 30/9/2015 al 22/10/2015 (R1), desde el 26/10/2015 al 15/12/2015 (R2) y desde el 28/10/2015 al 13/1/2016 (R3).

BC "El Serranillo"												
Clon	Recolección									Total		
	R1 (17/6/2015)			R2 (24/6/2015)			R3 (2/7/2015)					
	E	S	% I	E	S	% I	E	S	% I	E	S	% I
2063	426	389	9	230	128	44	-	-	-		516	21
6011	442	279	37	466	177	62	509	302	39	1417	758	46
6033	327	172	46	318	249	21	303	177	36	948	621	34
6047	546	398	27	297	248	15	493	336	31	1336	982	26
6070	368	213	42	446	228	48	465	235	46	1279	676	45
6088	343	248	27	403	214	47	403	336	12	1149	819	29
1030	-	-	-	233	219	5	-	-	-	233	219	5
Total	2.452	1.705	30	2.393	1.463	39	2.173	1.386	33	7.017	4.631	34
BC “Puerta De Hierro”												
2062	-			1.232	1.142	7	-			8.249	5.773	30

En los clones procedentes de “Quintanilla de Onésimo”, en el conjunto de las recolecciones, se obtuvo un 27% de piñones contaminados; en un rango del 10% después de 15-17 semanas de almacenamiento en la R1, un 63% después de 18-19 semanas en la R2 y un 11% después de 18-22 semanas la R3 (Tabla 4). También se pudo observar un efecto de la duración del almacenamiento en frío en la contaminación. En la R1, con 15 semanas se obtuvo un 7% de contaminación mientras que con 17 semanas se obtuvo un 19%. En la R2, las piñas de los clones 1042, 1062 y 1075 aparecieron todas con podredumbre después de 18-19 semanas de almacenamiento, relacionado con la mayor humedad de las piñas recibidas. En la R3, con 18 semanas se obtuvo un 9% de contaminación mientras que con 22 semanas se obtuvo un 15%.

Tabla 4. Piñones extraídos de piñas recolectadas en el banco clonal (BC) “Quintanilla de Onésimo” (Valladolid) después de un período de almacenamiento en frío. Los datos muestran los piñones totales extraídos (E), los piñones sanos (S) y el porcentaje de piñones infectados por hongos (%I), por clon y fecha de recolección. El período de extracción de los piñones se realizó desde el 5/10/2015 al 23/10/2015 (R1), del 4/11/2015 al 13/11/2015 (R2) y del 5/11/2015 al 30/11/2015 (R3).

BC “Quintanilla De Onésimo”												
Clon	Recolección									Total		
	R1 (24/6/2015)			R2 (30/6/2015)			R3 (7/7/2015)					
	E	S	% I	E	S	% I	E	S	% I	E	S	% I
1007	262	198	9	149	58	44	447	388	11	858	682	16
1026	463	414	5	84	58	25	305	273	9	852	758	8
1042	348	331	5	0	0	100	313	262	7	661	593	37
1062	401	350	2	0	0	100	340	262	9	741	612	37
1075	401	310	21	0	0	100	273	223	16	674	533	46
1078	396	310	17	104	93	10	328	253	15	724	666	16
Total	2.271	1.953	10	233	219	63	2.006	1.661	11	4.510	3.831	27

En la Tabla 5 se muestra el número total de megagametofitos por clon introducidos en cultivo y los porcentajes de contaminación después de 4 semanas. De los 8605 megagametofitos cultivados se contaminaron un 15%. Los que procedían de la R1, se contaminaron en mayor proporción, posiblemente por el menor desarrollo del megagametofito. Se encontraron diferencias entre familias, la 6033 se contaminó más (50%) que la 6011 (3%), y la 1075 (32%) más que la 1007 (2%).

Tabla 5. Megagametofitos completos introducidos en cultivo (I), de las tres fechas de recolección (R1, R2, R3) y sus porcentajes de contaminación (% C) a las 4 semanas de cultivo.

Megagametofitos introducidos en cultivo				
Clon	Recolección			Total
	R1	R2	R3	
	I – (% C)	I – (% C)	I – (% C)	I – (% C)
2062	-	1017 – (7)	-	983 – (7)
1030	-	200 – (21)	-	200 – (21)
2063	379 – (4)	128 – (5)	-	507 – (4)
6011	255 – (5)	175 – (3)	300 – (0)	730 – (3)
6033	164 – (98)	248 – (13)	177 – (40)	589 – (50)
6047	357 – (30)	243 – (19)	335 – (10)	935 – (20)
6070	206 – (7)	222 – (8)	217 – (2)	645 – (6)
6088	248 – (21)	211 – (37)	329 – (32)	788 – (30)
1007	185 – (7)	58 – (0)	370 – (0)	446 – (2)
1026	213 – (5)	45 – (0)	270 – (3)	528 – (3)
1042	222 – (9)	-	259 – (36)	481 – (22)
1062	252 – (32)	-	256 – (2)	508 – (17)
1075	238 – (46)	-	219 – (18)	457 – (32)
1078	266 – (15)	91 – (0)	253 – (1)	610 – (5)
Total	2985 – (23)	2635 – (10)	2985 – (13)	8605 – (15)

Se pudo observar que los piñones extraídos de las tres recolecciones en “El Serranillo” se encontraban en un estadio del desarrollo algo más retrasado que en años anteriores (2011, dato no mostrado), mostrándose en la R1 escaso desarrollo de la región arquegonial y en la R2 un embrión muy inicial unido al suspensor en el interior de la cavidad de corrosión. En la R3 se observaron megagametofitos más opacos pero con embriones sin señales de progreso en su desarrollo (Fig. 19). Los piñones extraídos de las tres recolecciones en “Quintanilla de Onésimo” se encontraban en un estado de desarrollo menos avanzado aún que los procedentes de “El Serranillo”, observándose en la R1 megagametofitos translucidos con región arquegonial poco desarrollada (Fig. 20). En la R2, se apreció una pequeña cavidad de corrosión con una pequeña acumulación celular en la zona del micropilo. En la R3 se pudo apreciar la estructura embrión-suspensor en fase inicial en alguna familia.

Figura 19. Piñones inmaduros de distintos clones procedentes del banco clonal “El Serranillo” (Guadalajara), después del almacenamiento en frío. Aspecto de los megagametofitos introducidos *in vitro* de las recogidas R2 (últimos de junio) y R3 (primeros de julio). Barras = 5 mm.

En la Figura 20 también se muestra el aspecto de los piñones dentro de la piña después del período de almacenamiento. Se pudo observar mayor podredumbre de la piña en la R2 debido al contenido en humedad. La duración del período de almacenamiento en las R1 y R2 afectó en función de la familia. La familia F1007 se vio menos afectada en la R1 (9% I) que en la R3 (11% I), obteniéndose un 44% en la R2. La familia F1042 también, pero en menor medida, un 5% en la R1 y un 7% en la R3, obteniéndose un 100% en la R2. La familia F1075 se vio más afectada en la R1 (21% I) que en la R3 (16% I), obteniéndose también un 100% en la R2.

Figura 20. Piñas inmaduras de distintos clones procedentes del banco clonal “Quintanilla de Onésimo” (Valladolid), después del almacenamiento en frío. Aspecto de los megagametofitos de las recogidas R1, R2 y R3, introducidos *in vitro*. Barras = 1; 2 y 5 mm.

3.1.2. Inducción de embriogénesis somática

Efecto de la temperatura y de la disponibilidad hídrica. Se evaluó el efecto de la temperatura (23 y 18°C) y de la disponibilidad de agua (4 y 2 g/l de gelificante) en la inducción. Se introdujeron en cultivo 1217 megagametofitos, mezcla de las familias F2062 y F1030, de los cuales se contaminaron un 15%. Al cabo de 3 semanas en cultivo, los megagametofitos que mostraron inicio de proliferación se transfirieron a medio fresco (Fig. 21) y el resto se desplazó al lado de la posición que ocupaban dentro de la misma placa. Después de 6 semanas, de 294 megagametofitos cultivados en S23 (M-mLV₂ a 23°C) se observaron proliferaciones con aspecto embriónico en cuatro de ellos. De los 271 megagametofitos cultivados en S2-23 (M-mLV₂ con 2 g/l Gelrite a 23°C) sólo se observó una proliferación de este tipo. A los 4 meses en cultivo, se observaron extrusiones de material con estructura embriónica en dos de los 253 megagametofitos de la familia F2062 cultivados en las condiciones estándar (S23), procediéndose a su aislamiento y proliferación en el medio de mantenimiento estándar. A 18°C no se obtuvo respuesta después de las 3 semanas iniciales. Sólo se obtuvieron dos líneas embriónicas de los 1217 megagametofitos cultivados en total, no se ha podido evaluar el efecto de la temperatura y de la disponibilidad de agua en la inducción. Lo que si se ha podido confirmar es la capacidad embriónica de la familia F2062, evaluada en el 2011.

Figura 21. Proliferaciones celulares inducidas en megagametofitos de la familia F2062 (“Puerta de Hierro”, Madrid), cultivados en diferentes condiciones de inducción durante 3 semanas. Respuestas inducidas en las condiciones de cultivo estándar (S23), a menor temperatura (S18), y distinta disponibilidad de agua (S: 4 g/l de Gelrite; S2: 2 g/l de Gelrite). Barras = 2 y 5 mm.

Efecto del banco clonal, de la familia de medio-hermanos, de la fecha de recolección, de la temperatura (23 y 18°C) y de los reguladores del crecimiento. Con las familias de “El Serranillo”, se observó en muchos casos la ruptura longitudinal del megagametofito después de 3 semanas en cultivo, exhibiendo muchos de ellos proliferaciones celulares en sus paredes internas y principalmente en la zona del micropilo (Fig. 22). Esta observación fue poco frecuente en los explantos procedentes de la R1. En algún megagametofito de la R2 y la R3 se observó la extrusión de una masa celular similar en estructura a la embriogénica. Generalmente, los explantos cultivados en medio con Picloram formaron estas proliferaciones antes que con el resto de los PGRs, pero los cultivados con Brasinólido mantenían por más tiempo su capacidad proliferativa. Sin embargo, ninguna de estas proliferaciones iniciales pudo mantenerse en el tiempo, volviéndose marrones en todos los casos a partir de 6 semanas en cultivo. Posiblemente, estas proliferaciones no progresaron por no tener un origen embriogénico sobre todo las procedentes de la R2. En los megagametofitos de la R3 si se pudo observar la presencia del embrión cigótico pero en un estado muy inicial de su desarrollo, y algunas de las masas celulares extruidas que mostraban aspecto embriogénico sí podrían tener origen embrionario. Sin embargo, en ninguno de los tratamientos con PGRs realizados se obtuvo extrusiones de material embriogénico a través del micropilo, proveniente de la proliferación de las células del embrión cigótico inmaduro, que pudieran mantenerse en cultivo.

Figura 22. Proliferaciones celulares inducidas en megagametofitos procedentes de las familias F6047 y F6011 (“El Serranillo”, Guadalajara), recogidos en la última semana de junio (R2) y en la primera de julio (R3), cultivados en diferentes medios de inducción durante 3 semanas. Respuestas inducidas en los medios M-mLV₂ (S), P-mLV₂ (P) y BM-mLV₂ (B). Barras = 1cm; 1; 2 y 5 mm.

Con las familias de “Quintanilla de Onésimo”, se obtuvieron proliferaciones iniciales en todas las familias y medios de cultivo, aunque se observó cierta diferencia con la fecha de recolección. En la R1, los megagametofitos eran muy inmaduros y la mayoría tornó marrones después de 3 semanas en cultivo. Algunos formaron proliferaciones en la zona micropilar, pero se necrosaron después de 6 semanas en cultivo (Fig. 23). En la R2, los megagametofitos seguían muy inmaduros pero más opacos, no observándose tampoco el embrión incluido. Algunos de los explantos mostraron también proliferación en la zona micropilar sobre todo en los medios con Picloram y Brasinólido, pero también se necrosaron con el tiempo en cultivo. En la R3, se obtuvo mayor proporción de megagametofitos con proliferación celular, y en aquellos casos donde el megagametofito estaba partido se pudo observar, en alguno de ellos, proliferaciones con aspecto embriogénico más relacionado con su origen embrionario, puesto que ya se pudo observar la presencia de un embrión en un estado inicial de su desarrollo. Estas proliferaciones tampoco se pudieron mantener en cultivo. Aunque se cultivaron 6603 explantos, no se ha podido evaluar el efecto del banco clonal, de la familia, fecha de recolección, temperatura y PGRs en la inducción de cultivos embriogénicos.

Figura 23. Proliferaciones celulares inducidas en megagametofitos procedentes de las familias F1078, F1026 y F1075 (“Quintanilla de Onésimo”, Valladolid), recogidos en las dos últimas semanas de junio (R1 y R2) y en la primera de julio (R3), cultivados en diferentes medios de inducción. Respuestas inducidas en los medios M-mLV₂ (S), PB-mLV₂ (P) y BM-mLV₂ (B), después de 3 semanas (A, C, E-G) y 6 semanas (B, D) de cultivo. Barras =1; 2 y 5 mm.

Efecto de la temperatura en la inducción. En un total de 788 megagametofitos de una misma familia F6088 (R2, R3), apenas se observó formación de proliferación celular en la zona del micropilo. Tampoco pudo evaluarse el efecto de la temperatura (28, 23 y 18°C) en esta familia.

3.1.3. Proliferación del material embriogénico

Las dos líneas embriogénicas inducidas se subcultivaron en el medio estándar de mantenimiento M-mLV y en medios con un suplemento de las vitaminas biotina y ácido fólico (M-mLV-bf) y con un mayor aporte de tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (M-mLV-tpn) con el fin de incrementar su capacidad proliferativa. La línea 4F2062 mostró mayor capacidad de proliferación en los 3 medios de cultivo que la 3F2062 (Fig. 24). Entre los medios con vitaminas, el medio M-mLV-bf no incrementó el crecimiento de las masas embriogénicas respecto del medio estándar y además resultaron masas más mucilaginosas y coloreadas de amarillo (ácido fólico), sobre todo las correspondientes a la línea 3F2062. Tal vez, aquellas masas que crecían menos en el medio estándar, al incrementar el aporte de vitaminas (M-mLV-tpn) se observó un crecimiento ligeramente superior y con aspecto más picudo, relacionado con la presencia de embriones en un estado muy inicial del desarrollo.

Figura 24. Proliferación de las líneas embriogénicas 3F2062 y 4F2062 en distintos medios de cultivo. (A, B) Masas mantenidas en el medio estándar M-mLV, (C, D) en medio con suplemento de las vitaminas biotina y ácido fólico (M-mLV-bf) y (E, F) en medio con mayor aporte de tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (M-mLV-tpn). Barras = 2 mm.

3.2. Inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos

3.2.1. Inducción en embrión somático cotiledonar

Los embriones cotiledonares tras una semana en medio sin PGRs (mLV0) algunos pasaron de tener color amarillento a verde, aun estando en condiciones de oscuridad (Fig. 25A). Mientras que en el medio estándar (M-mLV) no se obtuvo embriogénesis secundaria, en presencia de Picloram y Brasinólido algún embrión somático mostró inducción de masas celulares con aspecto embriogénico; al igual que con la adición de las vitaminas biotina y ácido fólico (M-mLV-bf). Después de 12 semanas de cultivo, un 6% de los embriones cultivados en medio M-mLV-B formaron proliferaciones celulares con aspecto embriogénico en la zona de corte subcotiledonar (Fig. 25A). Un 11% de los embriones cultivados en medio M-mLV-bf formaron proliferaciones celulares en la zona del hipocótilo (Fig. 25B). Esporádicamente se observó la formación de masas mucilaginosas en la zona del meristemo apical (Fig. 25C), con un crecimiento más lento que las generadas en la zona del hipocótilo (Fig. 25B). En presencia de Arabinogalactano se produjo el necrosamiento de los embriones. En cualquier caso, las masas proliferativas obtenidas mostraron apariencia granular y translúcidas con la presencia de protuberancias semejantes a estructuras proembrionales (Fig. 25D). No se realizaron observaciones posteriores de las masas procedentes de la zona del meristemo apical mantenidas en proliferación.

Figura 25. Embriones somáticos cotiledonares de la línea 2F6047 precultivados en medio sin PGRs. (A) Proliferaciones celulares inducidas en la zona de corte subcotiledonar después de 4 semanas de cultivo en medio con Brasinólido. (B) Proliferaciones celulares inducidas en la zona del hipocótilo y (C) en la zona del meristemo apical en medio con biotina y ácido fólico. (D) Masas embriogénicas creciendo en medio de mantenimiento. Barras = 1 y 5 mm.

Cuando se cultivaron los embriones cotiledonares aislados directamente sobre los medios de inducción, se indujeron proliferaciones celulares con aspecto embriogénico principalmente en la zona intermedia y basal del embrión completo (Fig. 26B, D, G) y en

la zona de corte subcotiledonar (Fig. 26E, F, H, I). En los cotiledones de algunos embriones se formaron pequeñas proliferaciones de células alargadas (Fig. 26A, C, D, G, H), transcurridas 2-4 semanas de cultivo. No se observaron respuestas que fueran cualitativa y cuantitativamente diferentes entre los dos genotipos cultivados. Tampoco se encontraron diferencias entre las morfologías de las masas proliferativas inducidas en los distintos medios de inducción en función del PGR utilizado. Se indujeron masas con características embriogénicas tanto en el medio de mantenimiento (M-mLV) (Fig. 26A-F), como con Brasinólido (M-mLV-B) (Fig. 26G-I) y con Picloram (P-mLV), aunque las masas proliferativas inducidas emergieron antes en el medio con Picloram (2 semanas). Las pequeñas masas de células alargadas generadas en los cotiledones mostraron un crecimiento muy lento, con consiguiéndose suficiente masa crítica que se pudiera aislar para multiplicarlas en el medio de mantenimiento. Las masas generadas en la zona intermedia y basal del embrión completo y en las zonas de corte subcotiledonar se multiplicaron en el medio de mantenimiento generando masas de embrión-suspensor de aspecto similar a las masas embriogénicas de las líneas iniciales.

Figura 26. Embriones somáticos cotiledonares de la línea 2F6047 cultivados en distintos medios de inducción después de 2-4 semanas de cultivo. Proliferaciones celulares inducidas en embriones enteros (A, D, G) y cortados a nivel subcotiledonar (B-I), en medio de mantenimiento (A, C-F) y en medio con brasinólido (G-I). Barras = 1 mm

3.2.2. *Inducción en embrión somático precotiledonar e inmaduro*

Alrededor de un 60% de los embriones precotiledonares completos formaron masas proliferativas mucilaginosas con aspecto embriogénico, tanto en el cuerpo del embrión como en la zona del suspensor (Fig. 27). Las masas proliferativas correspondientes a la zona del suspensor crecieron más que las procedentes de la parte apical del embrión; pero en general, se mostraron más diferenciadas que las del suspensor. No se observaron respuestas que fueran diferentes entre los dos genotipos ensayados, aunque las masas proliferativas inducidas emergieron antes con el Picloram. En conjunto, se indujeron masas con características embriogénicas en un 42% en el medio de mantenimiento (M), un 35% con Brasinólido (B) y un 30% con Picloram (P). Aunque se encontraron respuestas variables entre los embriones cultivados en un mismo medio de inducción, en algunos embriones se encontraron ciertas particularidades en las morfologías de las masas proliferativas inducidas. Las masas inducidas con Picloram en la zona apical del embrión (Fig. 27P) se mostraron más diferenciadas que las inducidas en los otros medios. No se encontraron diferencias entre el medio de mantenimiento (M-mLV) y los aportes de las vitaminas tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (M-mLV-tpn). Sin embargo, el aporte de biotina y ácido fólico produjo cultivos hiperhídricos e indiferenciados. Cuando se cultivaron los embriones cortados a nivel del cuerpo del embrión se indujeron masas embriogénicas tanto en la zona de corte como en la zona de la cabeza embrionaria. Las masas generadas en la cabeza del embrión sobre todo en los medios de mantenimiento (M) y con Picloram (P) mostraron diferenciación embriones en su superficie. A las 6 semanas de cultivo se multiplicaron dando masas de embrión-suspensor con aspecto ligeramente más diferenciado que las masas embriogénicas de las líneas iniciales.

Figura 27. Embriones somáticos precotiledonares de las líneas 2F6047 y 5F2062 cultivados en distintos medios de inducción después de 2-6 semanas de cultivo. Proliferaciones celulares inducidas en embriones enteros y cortados a nivel de la cabeza embrionaria, en medio de mantenimiento (M), con Picloram (P) y con Brasinólido (B). Barras = 1; 2 y 5 mm

Cuando se cultivaron embriones somáticos inmaduros completos (Fig. 28) se observó un desarrollo irregular de las proliferaciones inducidas, al cabo de 2-4 semanas de cultivo. En algunos embriones se indujeron proliferaciones de aspecto embriogénico en la zona de la cabeza embrionaria y en la zona del suspensor, mientras que en otros embriones las masas celulares proliferaron a lo largo de todo el embrión. También se observó, en general, que las masas inducidas en la zona de la cabeza del embrión estaban más diferenciadas que el resto. Sin embargo, después de 6 semanas de cultivo no se pudo distinguir en la masa producida su origen (cabeza o suspensor).

Cuando se cultivaron los embriones cortados a nivel de la cabeza embrionaria, se observaron respuestas de inducción similares a las obtenidas con los embriones precotiledonares. Las proliferaciones celulares inducidas con Picloram (P) se mostraron más diferenciadas que las obtenidas en el medio de mantenimiento (M) y con Brasinólido (B). Es de señalar que en presencia de CPPU, se formaron embriones secundarios por gemación directa en el meristemo apical del embrión, sin la formación previa de una masa proliferativa (Fig. 28CPPU). Después de 6 semanas en cultivo, no todas las masas proliferativas generadas mantuvieron el mismo grado de diferenciación.

Figura 28. Embriones somáticos inmaduros de las líneas 2F6047 y 5F2062 cultivados en distintos medios de inducción después de 2-6 semanas de cultivo. Proliferaciones celulares inducidas en embriones enteros y cortados a nivel de la cabeza embrionaria, en medio de mantenimiento (M), con Picloram (P), con Brasinólido (B), y con CPPU. Barras = 1 y 5 mm

3.2.3. *Diferenciación–maduración en el material generado*

Las masas de aspecto embriogénico inducidas en los embriones somáticos inmaduros, tanto de la parte de la cabeza del embrión como de la zona del suspensor, se multiplicaron mediante sucesivas transferencias a medio fresco de mantenimiento. Una vez sometidas a condiciones de maduración, la capacidad para producir embriones cotiledonares con morfología normal resultó similar a las masas procedentes de los cultivos envejecidos. En la Figura 29 se muestran las morfologías de las masas generadas por embriogénesis secundaria, después de 12-16 semanas cultivadas en condiciones de maduración. Las masas generadas en el medio de mantenimiento, las procedentes de la cabeza embrionaria (M-C) diferenciaron embriones más grandes con suspensores más cortos y en mayor cantidad que los procedentes del suspensor. También en las generadas con Brasinólido, las procedentes de la cabeza embrionaria (B-C) mostraron gran cantidad de embriones grandes con suspensores largos, respecto de las masas procedentes del suspensor (B-S). Las masas generadas con Picloram, las procedentes de la cabeza embrionaria (P-C) diferenciaron menos embriones con suspensores cortos en comparación con las masas de B-C, y también en menor cantidad que las masas procedentes del suspensor (P-S). Las masas generadas con CPPU, las procedentes del suspensor (CPPU-S) diferenciaron embriones con suspensores largos similares a los obtenidos en B-S. Los cultivos procedentes del medio CPPU-C se perdieron, no pudiéndose evaluar su respuesta.

Figura 29. Diferenciación-maduración en las masas embriónicas generadas por embriogénesis secundaria en embriones somáticos inmaduros. Masas procedentes de las cabezas embrionarias (C) y de la zona de las células del suspensor (S), generadas en medios de mantenimiento (M), con Brasinólido (B), con Picloram (P), y con CPPU. Barras = 1 y 5 mm.

3.3. Establecimiento y mantenimiento de líneas embriogénicas en medio líquido. Producción de biomasa en medio semisólido y líquido

3.3.1. Condiciones de cultivo para el establecimiento de cultivos en suspensión

Se realizaron cuatro experimentos independientes para el establecimiento de líneas embriogénicas de pino piñonero en cultivo en suspensión. En el primer ensayo se utilizaron dos líneas embriogénicas cultivadas con tres densidades de inóculo iniciales en matraces Erlenmeyer de dos volúmenes. La línea 2F6047 proliferó mejor que la 7F6011. Se encontraron diferencias significativas en el ISCV y aunque se obtuvo un incremento casi del doble en el PS en la línea 2F6047 fue con baja significación estadística (Tabla 6). La tasa de crecimiento de los cultivos en suspensión medidos como ISCV se vio afectada por la densidad del inóculo inicial. Con 20 mg/ml el SCV inicial se multiplicó por 8.7 después de 3 semanas en cultivo, lo que supuso 8 veces más alto que cuando se utilizó 10 mg/ml y 3 veces más con la densidad de 30 mg/ml. El incremento en PS también fue superior con 20 mg/ml, pero no significativamente diferente de las otras densidades. La interacción entre línea e inóculo se reflejó en que con 10 mg/ml no se produjo incremento del SCV en ninguna línea, pero con 20 mg/ml la línea 2F6047 creció más que la 7F6011 (12.1 vs 4.5). Curiosamente, aunque a la menor densidad no se produjo un incremento en el SCV, el PS inicial se multiplicó por cuatro. El volumen del Erlenmeyer (100 vs 200 ml) no afectó al incremento del SCV ni en el PS. Sin embargo, cuando se utilizó el inóculo de 20 mg/ml se observó un ligero incremento del SCV en los matraces de 100 ml que en los de 200 ml (9.3 vs 7.2), lo cual se refleja en la significación de la interacción Inoculo x Envase (Tabla 6).

Las curvas de crecimiento del SCV y del PS fueron diferentes en la línea 2F6047 en función del inóculo. Con 30 mg/ml se siguió una curva sigmoidea iniciándose después de un período de latencia de una semana un crecimiento exponencial de 1 semana para el PS y de 2 semanas para el SCV. La fase estacionaria se alcanzó después de 3 y 4 semanas de cultivo para el PS y SCV, respectivamente (Fig. 30). Por el contrario, con 20 mg/ml el crecimiento exponencial medido como SCV comenzó desde el comienzo del cultivo, alcanzándose la fase estacionaria después de 3 semanas de cultivo. En ambos casos, el SCV inicial se multiplicó por 12. Por el contrario, el incremento en PS después de 4 semanas de cultivo fue diferente dependiendo del inóculo inicial. Con 30 mg/ml el PS

inicial se multiplicó por 5, mientras que con 20 mg/ml se multiplicó por 9 después de 3 semanas de cultivo (Fig. 30). No se observó degeneración de las suspensiones embriogénicas después de 4 semanas de cultivo.

Tabla 6. Establecimiento de cultivos en suspensión de *Pinus pinea*. Análisis de varianza del efecto de la línea embriogénica, densidad de inóculo (mg/ml) y volumen del envase (matraz Erlenmeyer de 100 y 200 ml con 25 ml de medio) en las tasas de crecimiento del tejido embriogénico. Las tasas de crecimiento se expresan como el incremento del volumen de células sedimentadas (ISCV), del peso fresco (IPF) y del peso seco (IPS) a 50 rpm de velocidad de agitación después de 3 semanas en cultivo. Se muestran los valores medios $\pm$ error estándar (es.) asociados a cada factor y su nivel de significación estadística con el ANOVA.

Factor	Parámetro de crecimiento		
	ISCV	IFW	IPS
Línea			
7F6011	2.6 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.5	4.7 $\pm$ 0.5
2F6047	7.4 $\pm$ 1.2	9.4 $\pm$ 1.3	8.6 $\pm$ 1.6
Densidad de inóculo			
10	1.1 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.9	4.0 $\pm$ 0.5
20	8.7 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 1.7	9.1 $\pm$ 1.8
30	3.2 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 1.0	5.4 $\pm$ 0.8
Volumen de envase			
ME100	6.0 $\pm$ 1.0	6.0 $\pm$ 1.2	6.7 $\pm$ 1.3
ME200	3.9 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 1.3	6.8 $\pm$ 1.3
Factor de significación			
Línea	0.000	0.000	0.079
Densidad de inóculo	0.000	0.004	0.160
Volumen de envase	0.276	0.319	0.425
Línea x Inóculo	0.001	0.617	0.235
Línea x Envase	0.114	0.224	0.794
Inóculo x Envase	0.024	0.924	0.865

Figura 30. Cinéticas de crecimiento de la línea embriogénica 2F6047 de *Pinus pinea* en cultivo en suspensión. El crecimiento se expresa como (A) el volumen de células sedimentadas (SCV); (B) peso fresco (PF) y (C) peso seco (PS) con 20 y 30 mg/ml de densidad de inóculo y 50 rpm de velocidad de agitación, durante 4 semanas en cultivo. Las barras representan el error estándar de la media de seis repeticiones.

En el segundo ensayo, los cultivos se sometieron a tres velocidades de agitación en matraces Erlenmeyer de 200 ml. Se obtuvieron diferencias significativas entre líneas para el SCV pero no para el PS. Las líneas 1F6011 y 7F6011 mostraron menor SCV que la línea 2F6047. En conjunto, ambos parámetros del crecimiento se redujeron significativamente conforme aumentaba la velocidad. El SCV y el PS fueron más altos a 50 rpm que a 150 rpm. Sin embargo, se encontró un efecto significativo de la interacción línea x velocidad de agitación (Tabla 7). Mientras que el SCV de la línea 1F6011 fue muy afectado por la velocidad de agitación, en la línea 2F6047 fue reducido a la mitad y la línea 7F6011 a la tercera parte cuando la velocidad aumentó de 50 a 150 rpm. Respecto al PS, las líneas siguieron el mismo patrón de crecimiento, pero la disminución del crecimiento observado en las líneas 2F6047 y 7F6011 con el aumento de la velocidad fue menor que el observado en el SCV (dato no mostrado). Es interesante notar que el PS no resultó significativamente diferente entre las líneas embriogénicas después de 3 semanas de cultivo utilizando 100 rpm.

Tabla 7. Establecimiento de cultivos en suspensión de *Pinus pinea*. Análisis de varianza del efecto de la línea embriogénica y la velocidad de agitación (rpm) en el crecimiento del tejido embriogénico. El crecimiento se expresa como el volumen de células sedimentadas (SCV, ml), peso fresco (PF, g) y peso seco (PS, mg) en el sistema de cultivo de matraz agitado (20 mg/ml de inóculo, matraz Erlenmeyer de 200 ml con 25 ml de medio) después de 3 semanas en cultivo. Se muestran los valores medios $\pm$ es. asociados a cada factor y su nivel de significación estadística con el ANOVA.

Factor	Parámetro de crecimiento		
	SCV	PF	PS
Línea			
1F6011	10,0 $\pm$ 0,5	2.06 $\pm$ 0.85	127 $\pm$ 4
7F6011	10,3 $\pm$ 0,9	2.25 $\pm$ 0.27	140 $\pm$ 10
2F6047	18,0 $\pm$ 2,0	2.24 $\pm$ 0.20	138 $\pm$ 7
Velocidad de agitación			
50	18,2 $\pm$ 2,0	2.84 $\pm$ 0.19	153 $\pm$ 8
100	11,1 $\pm$ 0,6	2.10 $\pm$ 0.12	136 $\pm$ 6
150	8,9 $\pm$ 0,7	1.58 $\pm$ 0.13	116 $\pm$ 5
Factor de significación			
Línea	0,000	0.524	0,185
Velocidad de agitación	0,000	0.000	0,000
Línea x Velocidad de agitación	0,000	0.000	0,000

Se observó una relación entre el SCV y la morfología de los cultivos, y ambos fueron afectados por la velocidad de agitación. A 50 rpm, se obtuvieron SCV mayores debido a que los sedimentos estaban menos empaquetados (Fig. 31A) ya que los tejidos embriogénicos crecían como agregaciones grandes de masas de embrión-suspensor (Fig.

31B). A 100 rpm, se obtuvo un SCV más compacto (Fig. 31C) ya que las agregaciones se deshicieron en agregaciones más pequeñas (Fig. 31D). A 150 rpm, se obtuvieron valores de SCV más pequeños ya que los sedimentos se compactaron más (Fig. 31E). Las agregaciones grandes se desagregaron en unas más pequeñas formándose también estructuras celulares libres en suspensión (Fig. 31F).

Figura 31. Morfología de la línea embriogénica 2F6047 de *Pinus pinea* cultivada en suspensión a diferentes velocidades de agitación. (A) SCV grande formado por un sedimento poco empaquetado obtenido a 50 rpm. (B) Crecimiento de los cultivos a 50 rpm mostrando acumulación de agrupamientos de masas de embrión-suspensor. (C) SCV más pequeño formado por un sedimento ligeramente compacto obtenido a 100 rpm. (D) Crecimiento de los cultivos mostrando agrupamientos más pequeños por desagregación. (E) SCV mucho más pequeño a 150 rpm formado por un sedimento compactado. (F) Crecimiento de los cultivos a 150 rpm mostrando estructuras celulares suspendidas libremente. Las muestras se tiñeron con acetocarmin para el estudio de la organización microscópica de las masas de embrión-suspensor. Barras = 1000 μ m.

A 100 rpm de velocidad de agitación, las líneas embriogénicas mostraron diferentes grados de agregación y organización de las cabezas embrionarias y células del suspensor. Se pudieron observar grupos de células meristemáticas fuertemente teñidas de diferentes tamaños, diferentes estructuras polarizadas con cabezas embrionarias y células alargadas de suspensor y estructuras celulares libres en suspensión. La línea 1F6011 mostró estructuras embrión-suspensor polarizadas (Fig. 32A) con grandes y bien definidas cabezas embrionarias y células de suspensor (Fig. 32B). La línea 7F6011 mostró agrupaciones de estructuras embrión-suspensor menos organizadas (Fig. 32C) además de pequeñas estructuras polarizadas (Fig. 32D). La línea 2F6047 se caracterizó por la presencia de estructuras embrión-suspensor polarizadas menos agregadas (Fig. 32E) y embriones tempranos bien organizados (Fig. 32F).

Figura 32. Morfología de varias líneas embriogénicas de *Pinus pinea* cultivada en suspensión a 100 rpm. (A) Línea 1F6011 mostrando estructuras de embrión-suspensor polarizadas con (B) la cabeza embrionaria grande, bien definida y células del suspensor. (C) Línea 7F6011 mostrando agrupaciones de estructuras de embrión-suspensor menos organizadas y (D) estructuras polarizadas más pequeñas. (E) Línea 2F6047 mostrando menos agregación de estructuras de embrión-suspensor polarizadas y (F) embriones tempranos bien organizados. (G) Línea 1F2062 mostrando una morfología similar a la línea 2F6047. (H) Línea 5F2062 mostrando una morfología similar a la línea 7F6011, pero con mayor agregación de estructuras de embrión-suspensor. Barras = 1000 μ m (A, C, E) y 500 μ m (B, D, F-H).

En un tercer ensayo, se analizaron en dos experimentos diferentes la aplicación de PGRs a tres concentraciones y la adición de maltosa o sacarosa al medio de cultivo. En conjunto, los parámetros de crecimiento de las líneas embriogénicas no se afectaron conforme la concentración de PGRs disminuía (Tabla 8). Se obtuvieron valores similares de SCV y PS utilizando las concentraciones media y muy-baja. Las líneas 1F6011 y 2F6047 mostraron mayores SCV y PS que la línea 7F6011. Por otra parte, la fuente de carbono afectó mucho el crecimiento, de tal forma que las líneas embriogénicas proliferaron poco utilizando maltosa en lugar de sacarosa. En este caso, no se encontraron diferencias significativas entre líneas. Tampoco se encontraron interacciones entre las líneas y los componentes del medio, tanto para los PGRs como para la fuente de carbono (Tabla 8).

Tabla 8. Establecimiento de cultivos en suspensión de *Pinus pinea*. Análisis de varianza del efecto de la línea embriogénica y componentes del medio (concentración de PGRs y tipo de fuente de carbono) en el crecimiento del tejido embriogénico. El crecimiento se expresa como el volumen de células sedimentadas (SCV, ml), peso fresco (PF, g) y peso seco (PS, mg) en el sistema de cultivo de matraz agitado (20 mg/ml de inóculo, matraz Erlenmeyer de 200 ml con 25 ml de medio, 100 rpm) después de 3 semanas en cultivo. Se muestran los valores medios $\pm$ es. asociados a cada factor y su nivel de significación estadística con el ANOVA.

Factor	Parámetro de crecimiento		
	SCV	PF	PS
1) Reguladores del crecimiento			
Línea			
1F6011	14.1 $\pm$ 0.6	2.23 $\pm$ 0.15	113 $\pm$ 5
7F6011	4.9 $\pm$ 0.7	0.84 $\pm$ 0.14	53 $\pm$ 9
2F6047	11.3 $\pm$ 1.9	1.36 $\pm$ 0.25	90 $\pm$ 17
Concentración de PGRs			
Media	10.5 $\pm$ 1.6	1.47 $\pm$ 0.21	89 $\pm$ 12
Baja	10.8 $\pm$ 1.4	1.57 $\pm$ 0.23	86 $\pm$ 14
Muy-baja	9.0 $\pm$ 1.5	1.38 $\pm$ 0.26	81 $\pm$ 14
Factor de significación			
Línea	0.000	0.000	0.006
Concentración de PGRs	0.327	0.564	0.941
Línea x Concentración de PGRs	0.450	0.315	0.316
2) Tipo de fuente de carbono			
Línea			
1F6011	8.9 $\pm$ 1.6	1.09 $\pm$ 0.24	92 $\pm$ 21
7F6011	7.7 $\pm$ 1.2	1.37 $\pm$ 0.31	78 $\pm$ 16
2F6047	9.6 $\pm$ 1.9	1.08 $\pm$ 0.28	88 $\pm$ 22
Fuente de carbono			
Maltosa	4.2 $\pm$ 0.4	0.46 $\pm$ 0.16	49 $\pm$ 19
Sacarosa	13.4 $\pm$ 0.8	1.90 $\pm$ 0.13	115 $\pm$ 7
Factor de significación			
Línea	0.675	0.415	0.621
Fuente de carbono	0.000	0.000	0.000
Línea x Fuente de carbono	0.168	0.334	0.323

3.3.2. *Procedimientos para el mantenimiento de los cultivos en suspensión*

Una vez establecidas las suspensiones en el sistema de cultivo de matraz agitado (período de cultivo 1), la proliferación del tejido embriónico se mantuvo mediante el subcultivo utilizando el pipeteado de alíquotas de 5 ml de la suspensión homogenizada o el pesado de muestras de 250 mg, a intervalos regulares de 3 semanas. En el procedimiento del pipeteado, se observaron diferencias entre las líneas para el SCV, el PF y el PS, aunque para este último apenas era significativo. De nuevo, la línea 7F6011 fue la que peor se comportó (Tabla 9). Con este procedimiento, los valores del SCV y PF al final de cada subcultivo resultaron similares; aunque se produjo una disminución significativa en el PS. Que no se obtuvieran interacciones entre la línea y el período de cultivo, significó que las líneas se comportaron de forma similar a lo largo de los subcultivos.

En el procedimiento del pesado, el crecimiento de las dos líneas ensayadas medido a través del SCV, PF y PS fue diferente. Todos los parámetros fueron también significativamente influidos por el período de cultivo (Tabla 9) aunque con distinto comportamiento. Mientras que el SCV incrementaba de forma continua a través de los subcultivos, el PS creció de forma importante en el segundo subcultivo y luego se mantuvo estable en los siguientes (Tabla 9). El PF mostró una tendencia similar. Tampoco se encontraron interacciones entre la línea y el período de cultivo, excepto para el PF. Las líneas utilizadas en este experimento mostraron morfologías diferentes en medio líquido. La línea 1F2062 (Fig. 32G) creció menos que la 5F2062, aun mostrando características morfológicas similares a la línea 2F6047 que más crecía en el otro experimento. Por otra parte, la línea 5F2062 creció mejor aunque mostrase una morfología similar pero con una mayor agregación de las estructuras embrión-suspensor (Fig. 32H) que la línea 7F6011 que creció peor en el otro experimento.

Tabla 9. Mantenimiento de cultivos en suspensión de *Pinus pinea* subcultivados utilizando dos procedimientos (pipeteado y pesado). Análisis de varianza del efecto de la línea embriogénica y período de cultivo en el volumen de células sedimentadas (SCV, ml), peso fresco (PF, g) y peso seco (PS, mg) en el sistema de cultivo de matraz agitado (20 mg/ml de inóculo, matraz Erlenmeyer de 200 ml con 25 ml de medio, 100 rpm) después de 3 semanas en cultivo. Se muestran los valores medios $\pm$ es. asociados a cada factor y su nivel de significación estadística con el ANOVA.

Factor	Procedimiento de subcultivo					
	Pipeteado			Pesado		
	SCV	PF	PS	SCV	PF	PS
Línea						
1F6011	12.9 $\pm$ 0.6	1.92 $\pm$ 0.15	217 $\pm$ 22	—	—	—
7F6011	9.1 $\pm$ 1.3	1.67 $\pm$ 0.23	147 $\pm$ 12	—	—	—
2F6047	17.4 $\pm$ 0.8	2.46 $\pm$ 0.14	231 $\pm$ 42	—	—	—
1F2062	—	—	—	5.0 $\pm$ 0.6	0.80 $\pm$ 0.16	60 $\pm$ 9
5F2062	—	—	—	9.6 $\pm$ 0.7	2.33 $\pm$ 0.19	140 $\pm$ 10
Período de cultivo						
1	13.5 $\pm$ 0.9	1.97 $\pm$ 0.15	263 $\pm$ 39	4.6 $\pm$ 0.8	0.75 $\pm$ 0.19	62 $\pm$ 10
2	14.3 $\pm$ 1.5	2.18 $\pm$ 0.25	186 $\pm$ 14	6.8 $\pm$ 0.9	1.46 $\pm$ 0.39	129 $\pm$ 25
3	11.7 $\pm$ 1.3	1.93 $\pm$ 0.21	133 $\pm$ 13	8.8 $\pm$ 1.2	2.07 $\pm$ 0.23	136 $\pm$ 7
4	—	—	—	9.6 $\pm$ 0.6	2.66 $\pm$ 0.30	132 $\pm$ 13
5	—	—	—	11.6 $\pm$ 1.6	2.39 $\pm$ 0.34	156 $\pm$ 16
Factor de significación						
Línea	0.000	0.007	0.087	0.000	0.000	0.000
Período de cultivo	0.546	0.858	0.004	0.000	0.000	0.000
Línea x Período de cultivo	0.992	0.995	0.270	0.134	0.021	0.144

3.3.3. Escalado de los cultivos para la producción de biomasa

Se encontraron diferencias significativas para el SCV entre las líneas embriogénicas cultivadas en medio líquido (ML), y para el PF y PS de las mismas líneas cultivadas en medio semisólido (MS). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para estos dos últimos parámetros del crecimiento entre las líneas cultivadas en ML (Tabla 10). La variabilidad entre repeticiones de estos parámetros fue muy alta entre líneas, mostrando un coeficiente de variación (CV) para el PS desde un 31% en la línea 1F2062 a un 171% en la línea 5F2062 (dato no mostrado). Esta variabilidad fue más alta en los cultivos en ML que en MS. En el conjunto de las líneas, mientras que el CV para el PS al final del experimento del cultivo en ML fue del 94%, en el cultivo en MS fue del 25% (dato no mostrado). Por otra parte, cuando los cultivos se realizaron en MS la variabilidad entre líneas resultó más similar que la observada cuando se cultivaron en ML, yendo del 64% en la línea 7F6011 al 77% en la línea 5F2062 (dato no mostrado). Además, la variabilidad observada a lo largo de los subcultivos fue más estable en los

cultivos en MS que en ML. El CV para el PS después del período de cultivo 1, 2 y 3 en MS fue del 32, 23 y 25%, respectivamente; mientras que para el SCV después de los mismos períodos en ML fue del 50, 82 y 82%, respectivamente (dato no mostrado).

La producción de biomasa fue mayor en los cultivos en ML que en MS. Ambos sistemas de cultivo se iniciaron con 500 mg de PF de tejido embriogénico. Estas cantidades en ML correspondieron a un SCV medio de 2.2 ± 0.1 ml, a un PF medio después de la filtración de 220 ± 11 mg y a un PS medio de 11 ± 0.5 mg. Cuando el escalado de los cultivos se realizó en ML los valores iniciales del SCV, PF y PS se multiplicaron por 19, 28 y 23 veces respectivamente al final del tercer período de cultivo. Al contrario, cuando el escalado se realizó en MS, el PF y PS inicial se incrementó 11 y 12 veces respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Escalado de cultivos embriogénicos de *Pinus pinea* cultivados en medio líquido y semisólido. Análisis de varianza del efecto de la línea embriogénica y período de cultivo en la producción de biomasa determinada por el volumen de células sedimentadas (SCV, ml), peso fresco (PF, g) y peso seco (PS, mg) después de varios períodos de subcultivos bisemanales. Se muestran los valores medios $\pm$ es. asociados a cada factor y su nivel de significación estadística con el ANOVA. Cada repetición en cada uno de los tratamientos se inició con 0.5 g de peso fresco de tejido que ha crecido en el medio de mantenimiento semisólido.

Factor	Producción de biomasa				
	Medio líquido			Medio semisólido	
	SCV	PF	PS	PF	PS
Línea					
7F6011	13.7 $\pm$ 4.1	3.95 $\pm$ 1.77	193 $\pm$ 80	2.83 $\pm$ 0.72	50 $\pm$ 8
2F6047	22.5 $\pm$ 8.1	5.74 $\pm$ 3.4	247 $\pm$ 144	3.27 $\pm$ 0.57	73 $\pm$ 13
1F2062	25.1 $\pm$ 5.1	10.45 $\pm$ 1.59	418 $\pm$ 58	3.17 $\pm$ 0.51	80 $\pm$ 13
5F2062	16.1 $\pm$ 6.1	4.23 $\pm$ 3.65	149 $\pm$ 14	2.42 $\pm$ 0.33	71 $\pm$ 13
Período de cultivo					
1	5.0 $\pm$ 0.5	—	—	0.87 $\pm$ 0.05	22 $\pm$ 1
2	12.0 $\pm$ 3.1	—	—	2.36 $\pm$ 0.14	62 $\pm$ 3
3	41.1 $\pm$ 10.0	6.10 $\pm$ 1.48	252 $\pm$ 53	5.65 $\pm$ 0.41	133 $\pm$ 7
Factor de significación					
Línea	0.015	0.171	0.221	0.005	0.000
Período de cultivo	0.000	—	—	0.000	0.000
Línea x Período de cultivo	0.962	—	—	0.102	0.125

3.3.4. Evaluación de la capacidad de maduración de los cultivos embriogénicos generados

La maduración de los embriones se realizó en medio semisólido. Las condiciones de cultivo durante la proliferación de las líneas embriogénicas cultivadas en ML influyeron en la producción de embriones cotiledonares normales. Cuando la velocidad de agitación se incrementó desde 50 a 100 o 150 rpm, el número de embriones somáticos obtenido de las líneas embriogénicas casi se dobló. Cuando la concentración de PGRs en el medio se redujo de media a muy-baja, casi se triplicó. Sin embargo, la variabilidad entre repeticiones dentro de los tratamientos impidió detectar su significación estadística (Tabla 11). Se observó un efecto significativo de la fuente de carbono en el medio durante la proliferación. Las líneas embriogénicas cultivadas en medio con sacarosa produjeron un mayor número de embriones maduros que con maltosa (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la velocidad de agitación, concentración de PGRs, fuente de carbono y procedimiento de subcultivo para el mantenimiento de las líneas embriogénicas, en la maduración de los cultivos embriogénicos de *Pinus pinea*. Se muestran los valores medios $\pm$ es. del número de embriones cotiledonares normales obtenidos por gramo de tejido (EC) agrupando los datos de las líneas embriogénicas en cada tratamiento y su nivel de significación estadística (p) con el ANOVA.

Factor	EC
Velocidad de agitación (rpm)	
50	27 $\pm$ 11
100	49 $\pm$ 19
150	41 $\pm$ 12
Valor de p	0.588
Concentración de PGRs	
Media	24 $\pm$ 13
Baja	48 $\pm$ 18
Muy-baja	60 $\pm$ 28
Valor de p	0.433
Fuente de carbono	
Sacarosa	53 $\pm$ 18
Maltosa	14 $\pm$ 6
Valor de p	0.046
Mantenimiento por pipeteado: Período de cultivo	
1	45 $\pm$ 12
2	45 $\pm$ 16
3	3 $\pm$ 2
Valor de p	0.004
Mantenimiento por pesado: Período de cultivo	
1	0
2	2
3	0
4	22 $\pm$ 8
5	18 $\pm$ 7
Valor de p	-

3.4. Diferenciación-maduración de embriones somáticos bajo distintas condiciones de cultivo

3.4.1. *Efecto del suplemento con carbohidratos durante la maduración*

Se estudió el efecto del incremento de la osmolaridad del medio de maduración en la obtención de embriones cotiledonares con morfología normal (EN) en líneas embriogénicas mantenidas durante varios años en cultivo. Las condiciones de maduración de los embriones fueron las previamente establecidas como estándar (medio mLV2, con 121 μ M de ABA, 60 g/l de maltosa, 10 g/l de Gelrite, 23°C y oscuridad). Mientras que en la condición estándar se produjo un total de 13 embriones por gramo (anormales y normales), con un suplemento de 15 g/l de maltosa (mLV2-m) se produjo un total de 50 embriones y con el suplemento de sacarosa (mLV2-s) un total de 16 embriones (Fig. 33). El suplemento con maltosa supuso que el número de embriones totales se multiplicara 3,8 veces. Se encontró un efecto del genotipo en la respuesta ya que la línea 2F6047 produjo el mayor número de embriones totales con el suplemento de maltosa (102/g), la línea 1F6011 produjo más con sacarosa (59/g), y la línea 5F2062 en el medio estándar (44/g). Del número total de embriones que se formaron en el conjunto de los tratamientos (324 embriones), sólo el 31 % (101 embriones) presentaron morfología normal.

La misma relación se encontró en cuanto a la formación de embriones normales por gramo (EN) (Fig. 33). El suplemento con maltosa supuso 5.7 veces más embriones (17 EN) que en las condiciones estándar (3 EN). La línea 2F6047 produjo un mayor número de embriones con maltosa (34 EN), la línea 1F6011 produjo más con sacarosa (17 EN), mientras que la línea 5F2062 en el medio estándar (11 EN) (Fig. 33). Hay que destacar que en el conjunto de las líneas, el suplemento con maltosa incrementó la proporción de embriones con morfología normal (34%) respecto del medio estándar (25%). El suplemento con sacarosa incrementó en un 28% la producción de EN. El suplemento con mioinositol inhibió tanto la proliferación como la maduración en todas las líneas.

Figura 33. Efecto del suplemento de los carbohidratos maltosa (m), sacarosa (s) y mioinositol (i) durante la maduración. Producción de embriones totales (normales y anormales), y cotiledonares con morfología normal, en las líneas embriónicas 1F6011, 2F6047, 1F2062 y 5F2062.

Se realizó un ensayo suplementario con la línea 2F6047 cultivándose en los medios mLV2-s, mLV2-m y mLV2-so (suplementado con 15 g/l de sorbitol) a 28°C durante la maduración. El suplemento con sorbitol supuso 34.5 veces más embriones normales (138 EN) que con el suplemento con sacarosa (4 EN). En estas condiciones de cultivo, en el medio suplementado con maltosa esta línea no produjo embriones.

3.4.2. Efecto de la temperatura durante la proliferación y maduración de líneas embriónicas

Se midió el efecto de tres temperaturas en la proliferación de las masas embriónicas de cuatro líneas mediante el PF y PS, al comienzo y al final de un período de 10 semanas en cultivo. En el conjunto de las líneas, los cultivos crecieron menos a 28°C (P28) y 18°C (P18) que a la temperatura estándar (P23) (Fig. 34). La proliferación de los cultivos a 28°C produjo 9 veces menos PF que el producido a 18°C, y 27 veces menos que el producido a 23°C. Respecto al PS, en P28 se produjo 6 veces menos que en P18, y 15 veces menos que el producido a 23°C (Tabla 12).

Figura 34. Efecto de la temperatura durante la proliferación de líneas embriogénicas en la producción de biomasa. El crecimiento se midió como peso fresco en gramos (PF) y peso seco en miligramos (PS), después de 10 semanas en cultivo. Los datos son medias $\pm$ es. de 16 repeticiones.

En el conjunto de las líneas, se produjo más biomasa cuando se cultivaron a 23°C; sin embargo, el porcentaje de materia seca producido fue superior cuando se cultivaron a 28°C (Tabla 12). Se mostraron diferencias entre las líneas. Aunque en P23, la línea que más PF y PS produjo fue la 2F6047; sin embargo fue la línea 5F2062 la que mostró mayor proporción de materia seca. En P18 también la línea 2F6047 produjo más biomasa, sin embargo fue la línea 7F6011 la que mostró mayor proporción de materia seca. En cambio en P28, fue la línea 7F6011 la que produjo más biomasa, pero con una proporción en materia seca inferior a la línea 2F6047 que creció algo menos.

Tabla 12. Efecto de la temperatura durante la proliferación de líneas embriogénicas en la producción de biomasa. El crecimiento se midió como PF (g), PS (mg) y el porcentaje en materia seca (% MS), medido como $[(PS/PF) \times 100]$, después de 10 semanas en cultivo.

Líneas	Producción de biomasa								
	P18			P23			P28		
	PF	PS	% MS	PF	PS	% MS	PF	PS	% MS
2F6047	6.1	198	3.3	17.0	476	2.8	0.2	15	6.8
7F6011	0.6	27	4.7	3.2	100	3.2	0.4	18	5.1
1F2062	2.7	95	3.5	8.4	253	3.0	0.3	14	4.6
5F2062	1.0	41	4.1	2.2	93	4.2	0.3	14	4.8
Media	2.6	90	3.9	7.7	230	3.3	0.3	15	5.3

La morfología de las masas de embrión-suspensor de la línea embriogénica 2F6047 mostró ciertas diferencias cualitativas al cultivarse a distintas temperaturas (Fig. 35). A 18°C, la masa en proliferación mostraba poca agregación de estructuras embriogénicas con embriones tempranos con cabezas pequeñas en proliferación (Fig. 35A1-2). A 23°C, la masa en proliferación mostraba mayor agregación de estructuras embriogénicas con cabezas embrionarias más desarrolladas con una morfología normal y con la estructura del suspensor interrumpida (Fig. 35B1-2). A 28°C, la masa en proliferación mostraba agregados celulares densamente empaquetados con estructuras embrionarias fusionadas por el proceso de poliembrionía de partición (Fig. 35C1-2).

Figura 35. Morfología de las masas de embrión-suspensor de la línea embriogénica 2F6047 cultivadas a distintas temperaturas. (A) Masa en proliferación a 18°C (A1), mostrando poca agregación de estructuras embriogénicas y (A2) cabezas embrionarias pequeñas. (B) Masa en proliferación a 23°C, (B1) mostrando mayor agregación de estructuras embriogénicas y (B2) cabezas embrionarias más desarrolladas. (C) Masa en proliferación a 28°C (C1), mostrando agregados celulares grandes (C2) con estructuras embrionarias con cabezas fusionadas por poliembrionía. Barras = 1cm (B, C), 2 ml (A), 500 µm (A1, B1, C1) y 100 µm (A2, B2, C2).

Aunque todas las líneas embriogénicas diferenciaron embriones mostrando estructuras tempranas, solo la línea 2F6047 completó del modelo de desarrollo embrionario. Los embriones formados en esta línea mostraron ciertas diferencias en su

desarrollo en relación a la temperatura utilizada durante la proliferación y maduración (Tabla 13). Aplicando 18°C durante todo el proceso (P18M18) no se produjeron embriones maduros, a 23°C (P23M23) se estimuló la maduración, pero sólo se formaron embriones con morfología anormal. Aplicando 28°C (P28M28) el estímulo de la maduración fue más eficiente ya que se produjo un pequeño número de embriones cotiledonares con morfología normal.

Es interesante anotar que la maduración fue estimulada por el aumento de la temperatura desde la proliferación a la maduración. Mientras que a una temperatura continua de 18°C no se produjeron embriones, en los tratamientos denominados (P18M23) y (P18M28) se obtuvieron 20 embriones cotiledonares normales en ambos casos, junto con una reducción en el número de embriones anormales en el último caso. Con una temperatura continua de 23°C solo se produjeron embriones anormales, sin embargo en el tratamiento (P23M28) se obtuvo un número igual de embriones normales que en los tratamientos anteriores.

No se encontró una relación entre la producción de biomasa a una determinada temperatura durante la proliferación con la posterior producción de embriones. A 23°C se produjo más biomasa (PF, PS) que a 28°C; sin embargo, a una temperatura constante durante las dos fases, solo se formaron embriones normales a 28°C.

Tabla 13. Efecto de la temperatura (18, 23 y 28°C) durante la proliferación (P) y maduración (M) en la producción de embriones. Se muestra el número de embriones cotiledonares con morfología normal (EN) y anormal (EA) producidos por gramo en la línea 2F6047.

Producción de embriones somáticos		
P18M18	P23M18	P28M18
0 EN + 0 EA	0 EN + 0 EA	0 EN + 20 EA
P18M23	P23M23	P28M23
20 EN + 45 EA	0 EN + 40 EA	0 EN + 30 EA
P18M28	P23M28	P28M28
20 EN + 12 EA	20 EN + 26 EA	20 EN + 20 EA

Se estudió también el efecto de un cultivo prolongado (durante 18 semanas) a menor temperatura durante la proliferación que durante la maduración en la producción total de embriones (normales y anormales) y cotiledonares con morfología normal (EN) por gramo de tejido. En condiciones estándar (P23M23) se formaron embriones normales

en dos de las cuatro líneas ensayadas. Aplicando 18°C durante todo el proceso (P18M18) no se produjeron embriones con morfología normal (Fig. 36).

Subcultivando las líneas embriogénicas a 18°C y posteriormente a 23°C durante la maduración (P18M23) se produjo mayor número de embriones totales (47 embriones normales y anormales) que en la condición estándar (P23M23) (13 embriones normales y anormales) (Fig. 36). En el conjunto de las líneas, la producción de embriones normales en P18M23 se incrementó en tres veces (9 EN/g) respecto a P23M23 (3 EN/g). Sin embargo, un 17% del total de embriones producidos a 18°C presentaron morfología normal frente a un 25% cuando se mantuvieron a 23°C. Se encontraron diferencias entre líneas. La línea 2F6047 produjo mayor número de embriones normales en la condición P18M23 (24 EN) que en la condición P23M23 (3 EN), mientras que la línea 5F2062 produjo menor número de embriones en la condición P18M23 (3 EN) que en la P23M23 (11 EN). Las otras dos líneas embriogénicas ensayadas no formaron embriones en ninguno de los tratamientos. Aplicando 28°C durante la maduración (P18M28) el estímulo de la maduración fue más eficiente en la línea 2F6047 ya que se produjo un mayor número de embriones totales (258 embriones normales y anormales) de los cuales un 12% presentaron morfología normal (31 EN/g) que en la condición P18M23.

Figura 36. Efecto del cultivo prolongado a 18°C durante la proliferación (P) de las líneas embriogénicas maduras (M) a 18, 23 y 28°C. Producción de embriones totales (normales y anormales) y cotiledonares con morfología normal por gramo de tejido, en las líneas embriogénicas 1F6011, 2F6047, 1F2062 y 5F2062. Los datos son medias de 16 repeticiones.

3.4.3. *Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración*

Subcultivando las líneas embriogénicas en las condiciones estándar de proliferación (23°C con 4 g/l de Gelrite) y maduración (acondicionamiento y maduración a 23°C) (P23G4M23), las líneas 2F6047 y 5F2062 produjeron 32 y 21 embriones normales, respectivamente, y la línea 1F2062 no produjo ninguno (Tabla 14). Cuando se redujo la disponibilidad de agua para el cultivo, mediante el incremento de la fuerza del gel al aumentar a 10 g/l su concentración (P23G10M23), se produjo una disminución en la producción de embriones en la línea 2F6047, no variando la producción en la 5F2062. Cuando la temperatura durante la maduración fue más alta que durante la proliferación (P23G4M28), se produjo una drástica disminución en la producción de embriones en ambas líneas. Sin embargo, solo en la línea 2F6047 se produjo una cierta recuperación de la capacidad de maduración al disminuir la disponibilidad de agua (P23G10M28), pasando de obtenerse 2 a 10 embriones normales por gramo de cultivo.

Subcultivando las líneas embriogénicas y madurándolas a 18°C (P18G4M18 y P18G10M18), no se produjeron embriones. Cuando la temperatura durante la maduración fue más alta que durante la proliferación (P18G4M23, P18G10M23), se produjo una reactivación en la producción de embriones sólo en la línea 2F6047. Sin embargo, cuando esta diferencia fue más amplia (P18G4M28, P18G10M28), se produjo una disminución en la producción de embriones. Se formaron más embriones en la condición P18G10M23 (74 EN) que en la P18G4M23 (15 EN); al contrario que cuando se maduraron a 28°C (2 y 9 EN, respectivamente) (Tabla 14).

Subcultivando las líneas embriogénicas y madurándolas a 28°C (P28G4M28, P28G10M28), la línea 2F6047 produjo menos embriones con menor disponibilidad de agua (16 EN) que en la condición estándar (45 EN). En la línea 5F2062, se produjeron 4 embriones normales en la estándar (P28G4M28).

Tabla 14. Efecto de la combinación de temperatura (18, 23 y 28°C) y concentración de gelificante (4 y 10 g/l de Gelrite) durante la proliferación (P) y maduración (M), en la producción de embriones. Se muestra el número de embriones cotiledonares por gramo con morfología normal en tres líneas embriogénicas.

Producción de embriones somáticos por gramo				
Tratamiento	Línea embriogénica			Media
	2F6047	1F2062	5F2062	
P18G4M18	0	0	0	0
P18G10M18	0	0	0	0
P18G4M23	15	0	0	5
P18G10M23	74	0	0	25
P18G4M28	9	1	0	3
P18G10M28	2	0	1	1
P23G4M23	32	0	21	18
P23G10M23	20	0	20	13
P23G4M28	2	0	4	2
P23G10M28	10	0	0	3
P28G4M28	45	0	4	16
P28G10M28	16	0	0	5
Media	19	0	4	8

Las líneas embriogénicas se comportaron de forma diferente según el tratamiento. La línea 2F6047 formó el mayor número de embriones en la condición P18G10M23, sin embargo la línea 5F2062 formó el mayor número de embriones en las condiciones P23G4M23 y P23G10M23.

Si nos fijamos sólo en la línea 2F6047, el efecto de la disponibilidad de agua sobre la producción de embriones dependió de la temperatura. Cuando la temperatura se mantuvo igual durante las dos fases a 23 y 28°C, la menor disponibilidad hídrica (G10) redujo la producción de embriones (de 32 a 20, y de 45 a 16 EN). Pero cuando coincidió un aumento de temperatura en la maduración respecto de la proliferación con una menor disponibilidad hídrica, se produjo una estimulación de la producción de embriones (de 15 a 74, de 2 a 10 EN). Sin embargo, no fue así cuando la diferencia de temperatura entre ambas fases fue más extrema (P18G10M28, de 9 a 2 EN).

3.5. Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica sobre el patrón de metilación en líneas embriogénicas

3.5.1. Cuantificación del ADN

La mayoría de muestras de ambos genotipos superaron los 50 ng/μl de ADN, umbral de concentración considerado el óptimo para continuar con la técnica de MSAP. Las masas embriogénicas en proliferación registraron valores más bajos de ADN, entre 5.3 – 125.38 ng/μl (Fig. 37). Estos valores fueron inferiores a los registrados para las masas embriogénicas de maduración y embriones somáticos que tenían entre 60.4 – 477.5 ng/μl (Fig. 38).

Aunque las muestras 167, 174 y 180 de las masas embriogénicas en proliferación registraron valores por debajo del umbral óptimo, se recuperaron para el análisis mediante su concentración (volumen menor de muestra). Mientras que la muestra 175 se consideraba una muestra sin ADN, pero se concentró para continuar el análisis de los MSAP.

Figura 37. Concentraciones de ADN (ng/μl) extraído de las muestras en proliferación de las líneas 2F6047 y 5F2062, que fueron cultivadas en las diferentes condiciones de cultivo de temperatura (18, 23 y 28°C) y disponibilidad hídrica (4 g/l o 10 g/l de Gelrite). Línea roja marca el umbral de 50 ng/μl.

Figura 38. Concentraciones de ADN (ng/μl) extraído de las muestras en maduración (masas embriogénicas: M y embriones somáticos: E) de las líneas 2F6047 y 5F2062, que fueron cultivadas en las diferentes condiciones de cultivo de temperatura (18, 23 y 28°C) y disponibilidad hídrica (4 g/l o 10 g/l de Gelrite). Línea roja marca el umbral de 50 ng/μl.

El ADN extraído y digerido de las muestras de la fase de proliferación y maduración se pre-amplificó, visualizando los resultados en un gel de agarosa. Las muestras de masas embriogénicas en proliferación mostraron cantidades de ADN muy variables, lo que obligó a realizar distintas diluciones para la amplificación selectiva. Diluciones 1:2 para las bandas de menos intensidad (puntos rojos, Fig. 39) y 1:7 para las bandas de mayor intensidad (puntos azules, Fig. 39). El resto de muestras se diluyeron a una relación 1:5.

Figura 39. Visualización de la pre-amplificación de marcadores de muestras de masas embriogénicas en proliferación. Puntos rojos fueron muestras diluidas 1:2 y puntos azules, muestras diluidas 1:7.

Las masas embriogénicas en maduración y los embriones somáticos presentaron cantidades de ADN superiores. Todas las muestras de la fase de maduración se diluyeron 1:10 (Fig. 40).

Figura 40. Visualización de la pre-amplificación de marcadores de muestras de masas embriogénicas en maduración y embriones somáticos. Muestras diluidas 1:10. Error de carga “>”.

Posteriormente las muestras de las fases de proliferación y maduración pasaron a la etapa de la amplificación selectiva. Antes del análisis de los marcadores MSAP, el gel de poliacrilamida mostró resultados prometedores. Cambios de intensidad relacionados con el estado de desarrollo, aumentando desde las masas en proliferación (Fig. 41P), masas en maduración (Fig. 41M) hasta los embriones somáticos (Fig. 41E) en la línea 5F2062.

Figura 41. Electroforesis en gel de poliacrilamida después de la amplificación con la combinación *EcoRI* + ACA//*HpaII* + AAT (Eco35). Secciones del gel mostrando distintas intensidades de banda (marcadas con flechas) procedentes de muestras de masas en proliferación (P), masas en maduración (M) y embriones somáticos (E); de la línea 5F2062 proliferada y madurada a 28°C con 10 g/l de Gelrite.

3.5.2. Marcadores MSAP

Los fragmentos genómicos se observan como un perfil de bandas resultado del corte diferencial de isoesquizómeros según el estado de metilación de la secuencia 5'-CCGG. La interpretación de estos fragmentos fue la siguiente:

Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación. Las masas embriogénicas en proliferación generaron un total de 247 fragmentos detectables, de los cuales 202 fueron fiables. La combinación *EcoRI* + *AAC*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco32) generó un total de 98 marcadores, y la combinación *EcoRI* + *ACA*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco35) un total de 104 marcadores.

De estos 202 marcadores, 83 se clasificaron como marcadores insensibles a metilación (MI) y 119 marcadores sensibles a metilación (MS). Dentro de los MI, se identificaron 77 monomórficos (38.11% MMI) y 6 polimórficos (2.97% PMI). Dentro de los MS, se identificaron 86 monomórficos (42.57% MMS) y 33 polimórficos (16.34% PMS). Los porcentajes de cada tipo de marcador respecto al número total de marcadores MSAP fiables se muestran en la Figura 42.

Figura 42. Tipos de marcadores MSAP identificados en masas embriogénicas en proliferación. Porcentajes asignado para cada tipo de marcador MSAP.

La metilación global de las masas en proliferación fue de un 58.91% para las citosinas de la secuencia 5'-CCGG. Este resultado está en la misma línea que lo descrito para otras especies.

Basándonos en los marcadores MS que mostraban diferencias exclusivas entre los cortes de las enzimas sensibles a metilación, se detectaron diferencias en el porcentaje de metilación entre los genotipos. El genotipo 2F6047 mostraba un porcentaje de metilación menor (46.84 – 5.26% según el marcador fuera de tipo 01 o 10 respectivamente), con un perfil de metilación uniforme entre las diferentes condiciones de cultivo, mientras que el genotipo 5F2062 (48.56 – 5.49% según el marcador fuera de tipo 01 o 10 respectivamente), tenía un mayor porcentaje de metilación y un perfil de metilación

Además, 5 marcadores PMS del genotipo 5F2062 se relacionaron con diferentes condiciones de cultivo durante la maduración. Dichos marcadores fueron:

- Marcador 27: mostraba desmetilación bajo las condiciones 18, 23 y 28°C, 10 g/l de Gelrite.
- Marcador 59: mostraba desmetilación bajo la condición 28°C, 4 g/l de Gelrite.
- Marcador 95: mostraba metilación bajo las condiciones 18 y 28°C, 10 g/l de Gelrite.
- Marcador 159: mostraba desmetilación bajo la condición 28°C, 4 g/l de Gelrite.
- Marcador 228: mostraba metilación bajo las condiciones 18 y 28°C, 10 g/l de Gelrite.

Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la maduración. En las masas embriogénicas en maduración y embriones somáticos aislados, el número de fragmentos detectables fueron 272, de los cuales 227 eran fiables. El número de marcadores MSAP aportados por cada combinación fue de 123 marcadores para la combinación *EcoRI* + *AAC*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco32) y 104 marcadores para la combinación *EcoRI* + *ACA*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco35).

Los 227 marcadores MSAP se dividieron en 94 marcadores insensibles a metilación (MI), de los cuales 87 eran MMI y 7 PMI. Y los marcadores sensibles a metilación (MS) eran un total de 133 marcadores, subclasificados en 84 MMS y 49 PMS. El porcentaje de metilación de la secuencia 5'-CCGG fue de 58.59%, muy similar al porcentaje de metilación detectado en las masas en proliferación.

Entre los marcadores para este experimento se encontraron un total de 56 marcadores MSAP polimórficos (7 PMI y 49 PMS), un número mayor de los 39 marcadores MSAP polimórficos de la fase de proliferación (6 PMI y 33 PMS). Se compararon los marcadores polimórficos de proliferación y maduración pudiendo distinguir 7 marcadores polimórficos exclusivos de proliferación y 24 marcadores polimórficos exclusivos de maduración (masas en maduración y embriones somáticos aislados). Y un total de 32 marcadores polimórficos comunes en ambas fases.

Los marcadores PMS de maduración (49 PMS) se analizaron mediante el test PhiPT para detectar marcadores significativos para cada genotipo. Tres marcadores PMS fueron significativos para el genotipo 2F6047, cuyos valores de PhiPT fueron 0,001, 0,049 y 0,05 para una $p \leq 0,05$. Y sólo un marcador fue significativo para el genotipo 5F2062, cuyo valor de PhiPT fue de 0,008, $p < 0,05$.

Finalmente, la información proporcionada por las combinaciones de enzimas en proliferación y maduración reveló que la combinación *EcoRI* + *AAC*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco32) rindió un mayor número de marcadores MSAP detectables (máximo de 123 marcadores MSAP fiables en maduración). Mientras que la combinación *EcoRI* + *ACA*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco35) rindió un número menor (104 marcadores MSAP fiables en proliferación y maduración). No obstante, *EcoRI* + *ACA*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco35) mostró siete marcadores MSAP relacionados con un incremento de la intensidad a medida que el desarrollo avanzaba (desde masas en proliferación, maduración hasta embriones somáticos aislados), frente a un solo marcador MSAP para la combinación *EcoRI* + *AAC*//*HpaII*/*MspI* + AAT (Eco32).

Un análisis principal de componentes (PCoA) en base a las distancias genéticas entre los PMS comunes en proliferación y maduración de la línea 2F6047 permitió distinguir entre los diferentes estados de desarrollo. El análisis se realizó en este genotipo por ser más estable genéticamente, con el fin de evitar las variaciones relacionadas con las condiciones de cultivo. Sin embargo, sólo se pudo visualizar en la condición de cultivo 28°C y 10 g/l de Gelrite (Fig. 45). Tanto las muestras de masas en proliferación (P) como los embriones somáticos (ES) se dispusieron agrupadas. Sin embargo, las masas en maduración no se dispusieron agrupadas. En esta última condición de cultivo se analizaron dos muestras, ya que una de ellas fue un error en la amplificación selectiva.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Inducción de embriogénesis somática en embriones cigóticos inmaduros

En los últimos años se ha venido observando una disminución en la producción de piña por toda su área de distribución, relacionada principalmente con el cambio climático y por la actividad alimenticia de la chinche *Leptoglossus occidentalis*. Se ha considerado al *L. occidentalis* como una plaga importante en los huertos semilleros de *Pinus contorta* en Canadá, haciéndose necesario la protección de las piñas con mallas para aumentar la producción (Strong, 2006). El aumento del número total de semillas vacías se ha relacionado con el daño producido por la picadura de la chinche en los óvulos antes de la fertilización y en las etapas iniciales del desarrollo del embrión.

Se han realizado estudios acerca del impacto de las precipitaciones y temperaturas en determinados períodos claves del desarrollo de la piña sobre sus rendimientos. Se ha sugerido que buena parte de los abortamientos y malformaciones detectados en el banco clonal “Puerta de Hierro” (Madrid) podrían estar relacionado con el ataque de la chinche, pero también con un verano/otoño muy seco como el acaecido en el 2011 (Sánchez *et al.*, 2013). El gran tamaño que alcanza la piña del pino piñonero (250-350 g) podría hacerla susceptible a varios estreses abióticos y bióticos durante los cuatro años que la piña necesita para su completa maduración (Mutke *et al.*, 2005a). La gran variación anual en la producción de piñas se ha relacionado principalmente con factores climáticos y con el agotamiento de los recursos naturales a lo largo del desarrollo de la piña, siendo los más limitantes el estrés hídrico relacionado con la disminución de precipitaciones y altas temperaturas a mitad del verano (Mutke *et al.*, 2005b). Se ha sugerido una potencial regulación epigenética de la expresión génica basada en el alto grado de metilación de citosinas encontrado (Sáez-Laguna *et al.*, 2014). Considerando al pino piñonero como una especie resistente a las condiciones de sequía, se ha observado un incremento en los niveles de transcripción de dehidrinas en hojas y tallo como respuesta al estrés hídrico, lo que podría indicar su función específica en la retención de agua en estos tejidos (Perdiguero *et al.*, 2015).

Los factores de estrés anteriormente descritos podrían haber influido en el desarrollo de las piñas que se han recolectado en el 2015 en los tres bancos clonales para este estudio. Las piñas procedentes de “El Serranillo” alcanzaron un peso medio de 387 g; y un número medio de 79 piñones sanos extraído por piña, después del almacenamiento

en frío. En las procedentes de “Quintanilla de Onésimo” alcanzaron un peso medio de 203 g, inferior al alcanzado en el banco anterior; y un número medio de 69 piñones sanos extraído por piña, tal vez en relación con el peso medio de las piñas. El estado de maduración de los piñones fue más temprano en “Quintanilla de Onésimo” que en “El Serranillo”.

Estos parámetros de crecimiento podrían estar relacionados con aspectos climáticos en relación a la mayor altitud en la que se sitúa “Quintanilla de Onésimo”. En general, el desarrollo del embrión entre el inicio de la poliembrionía de partición y el estado precotiledonar está ligado a la morfología del megagametofito, pasando de ser translúcido a opaco (Carneros *et al.*, 2009). En este sentido, los piñones procedentes de “Quintanilla de Onésimo” eran más inmaduros (menos opacos) que los procedentes de los otros dos bancos clonales, sobre todo los recolectados en la R1. La mayor aparición de piñas con podredumbre y piñones contaminados en la R2 de “Quintanilla de Onésimo” después de su almacenamiento en frío estuvo relacionado con una mayor humedad que presentaron estas piñas. En general, no fue conveniente el almacenamiento a 4°C de estas piñas dentro de bolsas de plástico al facilitar la podredumbre, que fue incrementando con la duración del período de almacenamiento.

Con el fin de solventar la estrecha ventana de competencia para la inducción de ES, normalmente se realizan varias recolecciones de piñas entre junio y julio, cuando el embrión se encuentra entre la poliembrionía de partición y el inicio del estado cotiledonar (Carneros *et al.*, 2009); y posteriormente se almacenan a 4°C mientras se completa la introducción en cultivo de los megagametofitos. Se tendría que determinar durante cuánto tiempo se pueden almacenar las piñas inmaduras sin detrimento de sus características morfológicas y fisiológicas. Se observó que el almacenamiento a 4°C de piñas más maduras (agosto-septiembre) de pino piñonero durante 7 meses no producía modificaciones en el aspecto de los piñones, obteniéndose entre un 65-75% de inducción de proliferaciones celulares de aspecto embriogénico en los embriones cigóticos maduros aislados de los megagametofitos (Celestino *et al.*, 2015). En *Pinus sylvestris*, un almacenamiento de las piñas inmaduras a 5°C durante 2 meses no modificó las frecuencias de iniciación; sugiriendo que podría estar relacionado con la conversión del almidón contenido en el megagametofito en azúcares (Häggman *et al.*, 1999). En *Pinus strobus*, las piñas inmaduras se pudieron almacenar durante 3 meses, pero la frecuencia

de iniciación disminuyó con la duración del almacenamiento (Park, 2002). En *Pinus radiata*, los embriones cigóticos inmaduros obtenidos de piñas verdes almacenadas en frío entre 1 y 3 meses producían mayores porcentajes de iniciación de ES que los procedentes de las piñas no almacenadas (Montalbán *et al.*, 2015). Sin embargo, estos autores mostraron que con períodos superiores a 4 meses se obtenían frecuencias de iniciación inferiores pero similares a las piñas no almacenadas. Las frecuencias de iniciación en embriones cigóticos maduros de un híbrido de *Abies alba* x *caphalonica* almacenados desde 6 meses a 1 año varió entre el 27-29 % (Salaj y Salaj, 2003). En *Pinus pinea*, se obtuvo respuesta embriogénica en la única familia ensayada procedente de “Puerta de Hierro” que había sido almacenada a 4°C durante 3 meses. En las familias procedentes de “El Serranillo” y “Quintanilla de Onésimo” no se obtuvo respuesta de inducción, y períodos de almacenamiento más largos ocasionaron principalmente la podredumbre de las piñas y piñones. Tal vez períodos superiores a 3 meses influyeran negativamente en la fisiología de unos embriones que se encuentran en un estado muy inicial de su desarrollo.

El pino piñonero se encuentra entre las especies más recalcitrantes a la regeneración mediante ES, no sólo por las muy bajas frecuencias de iniciación obtenidas, sino también por la gran variabilidad encontrada en el desarrollo del piñón entre distintos años de recolección. Tal vez relacionado con los cambios climáticos durante los cuatro años que la piña necesita para su completa maduración (Mutke *et al.*, 2005a; Mutke *et al.*, 2005b). Aunque en el año 2015 se utilizaron 14 familias de polinización abierta, 6 de ellas anteriormente confirmadas como embriogénicas, y un total de 8605 explantos, la práctica ausencia de respuesta embriogénica podría estar relacionada no sólo con la variabilidad interanual sino también con un desarrollo inapropiado del embrión dentro del megagametofito en las tres recolecciones efectuadas. Se ha propuesto como recomendable la verificación previa de la viabilidad de los piñones maduros, ya que puede ocurrir que los embriones cigóticos iniciales hayan cesado su desarrollo y aborten (Klimaszewska *et al.*, 2016). Este fenómeno también se ha constatado en el pino piñonero (Mutke *et al.*, 2005b), encontrándose que fallos en el completo desarrollo del embrión dominante medidos como persistencia de poliembrionías dentro del megagametofito, variaban de un 8% a un 14% según el año de recolección (Celestino *et al.*, 2015). Aunque antes de su introducción en cultivo se comprueba en un pequeño número de piñones el estado de desarrollo del embrión, puede variar en el resto de los explantos introducidos

en cultivo; y así condicionar la respuesta embriogénica. Otro factor a tener en cuenta sería la presencia del megagametofito, ya que podría emitir exudados al medio que interferirían con el inicio de la respuesta embriogénica (Klimaszewska *et al.*, 2016).

Ya que genética y climatología son factores de variabilidad, también la localización y el año son factores que modifican el desarrollo del embrión. Se ha descrito que, en las piñas recolectadas de un solo árbol en una fecha determinada, se encuentran piñones en múltiples estados de desarrollo (Pullman y Bucalo, 2014). Tal vez la escasa respuesta del pino piñonero a la inducción podría compensarse probando un mayor número de familias y explantos. Sin embargo, el aumento del espectro de genotipos conllevaría mayores necesidades en recursos humanos y períodos largos de almacenamiento de las piñas hasta su utilización. Ya que la iniciación de ES depende fuertemente del genotipo del explanto, como en el caso de *P. sylvestris* (Lelu-Walter *et al.*, 2008; Aronen *et al.*, 2009); esta hipótesis estaría condicionada en *P. pinea* por la existencia de familias no embriogénicas y tal vez por la mencionada escasa variabilidad genética de la especie (Mutke *et al.*, 2005a; Vendramin *et al.*, 2008; Sáez-Laguna *et al.*, 2014).

Se considera que una especie o estado de desarrollo determinado es recalcitrante a respuestas embriogénicas cuando las numerosas manipulaciones de las condiciones de cultivo no son capaces de producir la respuesta deseada (Bonga *et al.*, 2010). Estos autores sugieren que cuando el mecanismo genético que posibilita la ES no puede activarse mediante métodos convencionales, una buena solución podría ser la utilización de un gran número de genotipos para encontrar los más susceptibles.

Se ha sugerido que los resultados iniciales insatisfactorios en la iniciación de ES podrían mejorarse optimizando las condiciones de cultivo, pero para algunas especies como en *P. banksiana* a pesar de los esfuerzos realizados no se consiguió mejorar los resultados más allá del 3-4% de inducción (Park y Bonga, 2011). De igual forma, las distintas condiciones de cultivo ensayadas en el piñonero no han podido mejorar la respuesta de inducción previamente comunicada (Carneros *et al.*, 2009). La recalcitrancia de los explantos a la inducción podrían atribuirse a una ausencia de células competentes, o a un fallo de las células para adquirir dicha competencia (Ramarosandratana y van Staden, 2005). Existen evidencias de que varios mecanismos de regulación podrían operar

independientemente en la competencia celular para iniciar la ES, como por ejemplo las respuestas de estrés. La capacidad embriogénica podría estar condicionada por la presencia/ausencia de receptores específicos para los PGRs y por alteraciones en el balance endógeno de dichos reguladores (Jiménez y Bangerth, 2001; Fehér *et al.*, 2003). Rutledge y col. (2013) sugirieron que la activación de una respuesta fisiológica específica de defensa biótica podría ser antagonista de la capacidad de respuesta embriogénica. Zhang y col. (2010) identificaron cuatro familias de miRNA que son inducidas por estreses abióticos y que eran diferencialmente expresadas en tejidos embriogénicos y no embriogénicos de *Larix leptolepis*. Tal vez exista una relación entre determinados mecanismos moleculares inducidos por condiciones de estrés abiótico (sequía y temperatura) y biótico (plaga de *Leptoglossus*) que subyacen durante el desarrollo del piñón en el pino piñonero y que condicionan la capacidad embriogénica del embrión cigótico. Además, se ha descrito la existencia de mecanismos epigenéticos que modulan el programa embriogénico en las células somáticas, generalmente a través de la silenciamiento de genes. Existen evidencias de que algunos genes que controlan la metilación del ADN podrían usarse como marcadores de la competencia embriogénica (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2015).

En el pino piñonero, como en la mayoría de las pináceas, el genotipo y el estado de desarrollo del embrión cigótico es crítico para la iniciación de ES. Además, se puede confirmar la gran variabilidad en la respuesta de iniciación entre distintos años de recolección. En el pino piñonero se ha descrito cierta variabilidad entre familias de mediohermanos en la iniciación de ES, por lo que se han podido seleccionar aquellos parentales femeninos que se comportaban mejor (p.e.: F2062, F6011, F6047). Las diferencias en los comportamientos de estas familias con los años de recolección, podrían ser un reflejo de disparidades en el desarrollo de los piñones. Como indicara Park y Bonga (2011), puede que el pino piñonero sea lo suficientemente “intratable” con los protocolos habituales como para probar otras metodologías. Posiblemente, cruzamientos controlados de parentales susceptibles, la utilización como explantos de embriones cigóticos aislados del megagametofito, períodos de almacenamiento en frío no superiores a 2 meses y principalmente la activación de determinados mecanismos moleculares, podrían incrementar la competencia embriogénica de los embriones cigóticos de *Pinus pinea*.

4.2. Inducción de embriogénesis secundaria en embriones somáticos

Se ha descrito que la ES se produce a través de tres procesos diferentes: A) Iniciándose divisiones celulares asimétricas en la epidermis o sub-epidermis del hipocótilo, que delimitarán las regiones del ápice embrionario (células con citoplasma denso) y del suspensor (células vacuoladas); B) a partir de pequeñas células meristemáticas dentro del suspensor que pueden proceder de divisiones asimétricas de las células del suspensor o de las células meristemáticas embrionarias que han fallado en su elongación para integrarse en el suspensor; C) mediante un mecanismo similar a la poliembrionía de partición, con la separación inicial de la región embrionaria (Tautorus *et al.*, 1991). Las células competentes para la embriogénesis pueden reconocerse morfológicamente como pequeñas y redondeadas con citoplasma abundante y pequeñas vacuolas, similares a las células meristemáticas o cigóticas, y que son capaces de multiplicarse por divisiones asimétricas (Filonova *et al.*, 2000). La competencia para formar cultivos embriogénicos depende del estado de desarrollo del embrión cigótico, alcanzándose mayores frecuencias de inducción antes de llegar al estado precotiledonar (*Pinus* sp.) que en el estado cotiledonar (*Picea* sp.) (Tautorus *et al.*, 1991).

En general, cuando se inician cultivos embriogénicos a partir de embriones cigóticos maduros suelen originarse en la zona del hipocótilo pero en la mayoría de los casos con frecuencias muy bajas para su aplicación práctica, e incluso las masas embriogénicas generadas pueden no seguir creciendo posteriormente (Klimaszewska *et al.*, 2007). En *Picea abies*, se ha observado una disminución en la competencia embriogénica durante la transición de las fases iniciales del desarrollo del embrión cigótico hacia el estado cotiledonar (Ramarosandratana y van Staden, 2005). Además, estos autores encontraron que en los embriones cotiledonares, la capacidad embriogénica va aumentando en los cotiledones mientras que se produce una completa pérdida de competencia en el hipocótilo.

Kong y von Aderkas (2011) indicaron que el proceso embriogénico en embriones somáticos de *Picea* es similar al de los cigóticos, con la salvedad de que en el embrión somático inmaduro se inicia en el área del meristemo apical sin la formación inicial de callo; necesitándose menos tiempo para generar tejido embriogénico que en los más maduros. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la embriogénesis secundaria se origina

a partir de las células epidérmicas o sub-epidérmicas en cotiledones o hipocótilos; fenómeno asociado con la pérdida del control del crecimiento en grupo organizado de las células del embrión somático inicial (Raemakers *et al.*, 1995).

El embrión somático inicial posee una capacidad latente para dar lugar a nuevos embriones, lo cual puede ir en detrimento de la normal maduración y germinación del embrión inicial. Sin embargo, la utilidad de obtener embriogénesis secundaria a partir de embriones somáticos no solo se basa en la posibilidad de mejorar el potencial embriogénico de los cultivos con bajo rendimiento y el restablecimiento de dicho potencial de las líneas afectadas por el envejecimiento; sino también en la recuperación de tejido embriogénico en embriones somáticos después de la crioconservación. De hecho, la capacidad embriogénica podría mantenerse durante mucho tiempo mediante repetidos ciclos de embriogénesis secundaria produciendo “líneas inmortales”, con lo que se podría superar el gran problema del envejecimiento de las líneas (Aderkas *et al.*, 2016).

Se ha comunicado en *Pinus pinea*, que los embriones cigóticos inmaduros son competentes para formar cultivos embriogénicos aunque en muy baja frecuencia (Carneros *et al.*, 2009); sin embargo en embriones maduros, las masas con características embriogénicas iniciadas, no se pudieron mantener con el tiempo en cultivo (Celestino *et al.*, 2015). En el caso de los embriones somáticos generados a partir de líneas embriogénicas mantenidas durante años en cultivo (líneas envejecidas), los inmaduros y precotiledonares resultaron más susceptibles a la inducción que los cotiledonares.

En el género *Pinus*, sólo hay referencia de embriogénesis secundaria en *P. banksiana*, *P. strobus* y *P. pinaster* (Aderkas *et al.*, 2005; Klimaszewska *et al.*, 2007). En *P. banksiana* y *P. strobus* se formó embriogénesis secundaria vía formación de nódulos en cotiledones e hipocótilos (Aderkas *et al.*, 2005). En *P. pinaster*, entre un 14% y un 82% de los embriones maduros, según el genotipo, formaron embriogénesis secundaria precedida de la formación de callo y también en un 14% de los embriones en germinación (Klimaszewska *et al.*, 2009).

Los embriones somáticos cotiledonares de pino piñonero generaron masas celulares mucilaginosas surgiendo de la parte intermedia y basal del embrión primario, junto con una esporádica formación de masas de células alargadas translucidas en los

cotiledones o en el meristemo apical. Estas pequeñas masas generadas en la zona cotiledonar mostraron un crecimiento muy lento, no pudiéndose mantener en cultivo. Aunque se siguió la recomendación de eliminar cuidadosamente las células adheridas a la zona basal del embrión, capaces de proliferar y confundirse con la formación de embriogénesis secundaria (Klimaszewska *et al.*, 2009), mediante el cultivo previo en un medio sin PGRs, no se verificó posteriormente el origen secundario de las masas embriogénicas obtenidas. En los ensayos posteriores donde se suprimió este precultivo, se puso un especial interés en la eliminación de estas células, visualizándose la formación de embriogénesis secundaria a partir de la degeneración de la estructura del hipocótilo y de las señales en el lugar de iniciación en los cotiledones. Un sistema para descartar la existencia de células de origen no secundario en el hipocótilo, fue el corte del embrión a nivel subcotiledonar. Las masas generadas en la zona intermedia, basal del embrión completo y en las zonas de corte subcotiledonar se multiplicaron en el medio de mantenimiento, generando masas de embrión-suspensor de aspecto similar a las masas embriogénicas de las líneas iniciales. No se encontraron diferencias apreciables en las frecuencias de iniciación y morfologías de las masas proliferativas inducidas en los dos genotipos ensayados y en los distintos medios de inducción, aunque en presencia de Picloram emergieron antes. En *Picea* también se observó la estimulación de la embriogénesis en embriones cigóticos maduros en presencia de Picloram (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk, 2008).

En los embriones precotiledonares de pino piñonero, las masas proliferativas generadas en la parte apical del embrión se mostraron más diferenciadas que las que procedían del suspensor. Con el fin de evitar la proliferación de las células del suspensor y que se pudieran mezclar con las procedentes de la parte apical del embrión, se cultivaron los embriones seccionados a nivel del cuerpo del embrión. En presencia de los mismos PGRs utilizados en el mantenimiento de la proliferación de las masas embriogénicas iniciales y en particular con Picloram, se promovió la actividad mitótica de la zona meristemáticas de la cabeza embrionaria y la formación de proliferaciones celulares; seguido de la aparición de embriones somáticos tempranos sobresaliendo de la superficie de la masa. En estos embriones, la embriogénesis secundaria se desarrolló a partir de protuberancias semejantes a estructuras proembrionales surgiendo de la parte apical del embrión, mediante un mecanismo similar a la poliembriogénesis de partición

monocigótica para dar masas de embrión-suspensor, como se describió en *Picea abies* (Durzan, 2008).

Los embriones somáticos inmaduros, formados por una parte apical altamente meristemática sustentada por largas y vacuoladas células del suspensor, mostraron la misma competencia embriogénica que los precotiledonares; aunque destacando que en presencia de CPPU se formaron embriones secundarios en el meristemo apical, mediante un proceso de gemación sin la formación previa de una masa proliferativa, similar al descrito por Kong y von Aderkas (2011). En embriones somáticos inmaduros, la embriogénesis secundaria también podría obtenerse mediante un mecanismo similar a la poliembrionía de partición, con la separación inicial de la región embrionaria (Tautorus *et al.*, 1991; Lelu-Walter *et al.*, 2016).

En coníferas generalmente la embriogénesis secundaria se induce en embriones somáticos cotiledonares con frecuencias variables. En *Larix*, un 8% de los cotiledones formaron tejido embriogénico en la zona basal en las mismas condiciones de inducción descritas para la inducción en embriones cigóticos inmaduros (Lelu *et al.*, 1994); o entre el 1% y el 24% según el genotipo, en cotiledones elongados aislados de embrión somático en *Abies* (Salajová y Salaj, 2001). También en *Larix* se indujeron masas embriogénicas secundarias en la región del hipocótilo del embrión primario después de 4 semanas de cultivo, en las mismas condiciones utilizadas con los embriones cigóticos (Saly *et al.*, 2002). Sin embargo, observaron que las frecuencias de inducción se reducían con el estado de madurez del embrión somático inicial. Los embriones madurados durante 3 semanas alcanzaron un 98% de inducción mientras que los madurados durante 9 semanas alcanzaron un 12%. En *Abies numidica*, los embriones cotiledonares fueron susceptibles a la inducción de tejido embriogénico, así no los precotiledonares (Vooková *et al.*, 2003). El tejido embriogénico se desarrolló en un 34% de los embriones iniciales a partir de estructuras nodulares formadas en la superficie del hipocótilo, después de 5-10 semanas de cultivo. También se pudo observar que las frecuencias de inducción entre el primer ciclo de embriogénesis secundaria y el segundo variaron entre el 6% y el 7% (Vooková y Kormuták, 2006). Sin embargo, en *Picea abies* se ha descrito la obtención de 24% de inducción en embriones inmaduros y un 20% en los cotiledonares (Szczygiel *et al.*, 2007). En *Pseudotsuga menziesii* las frecuencias de inducción obtenidas en los embriones

cotiledonares variaron entre un 2% y un 25% según el genotipo, desarrollándose en la base de la región del hipocótilo sobre la caliptra del embrión (Lelu-Walter *et al.*, 2017).

Los cultivos generados por embriogénesis secundaria son capaces de producir mayor número de embriones cotiledonares que los originales y en especial en aquellas líneas menos productivas (Lelu-Walter *et al.*, 2017). En nuestro caso, no todas las masas proliferativas generadas en los embriones somáticos del pino piñonero mantuvieron el mismo grado de diferenciación en los subsiguientes subcultivos. Las masas de embrión-suspensor sometidas a condiciones de maduración, mostraron una capacidad para producir embriones cotiledonares con morfología normal similar a las masas procedentes de los cultivos envejecidos de los que procedían los embriones somáticos.

4.3. Establecimiento y mantenimiento de líneas embriogénicas en medio líquido. Producción de biomasa en medio semisólido y líquido

Condiciones de cultivo para el establecimiento de cultivos en suspensión. Se establecieron cultivos de pino piñonero en suspensiones a partir de todas las líneas ensayadas, las cuales mostraron una capacidad de proliferación diferente según se ha descrito en cultivos en suspensión de otras coníferas (Salaj *et al.*, 2007). El crecimiento celular medido como SCV fue influenciado por la densidad de inóculo inicial. El establecimiento de cultivos en suspensión de coníferas se ha descrito utilizando diferentes densidades iniciales de inóculo, que van desde 4 mg/ml en *Picea sitchensis* (Krogstrup, 1990) hasta 120 mg/ml en *Pseudotsuga menziessi* (Gupta y Timmis, 2005). La optimización de la densidad de inoculación parece ser determinante para el establecimiento exitoso de suspensiones. En *Pinus strobus*, una densidad de inóculo superior a 14 mg/ml causó una disminución de la calidad de la suspensión embriogénica (Finer *et al.*, 1989). En *Pinus kesiya*, las densidades inferiores o superiores a 10-13 mg/ml desaceleraron la proliferación de cultivos (Deb y Tandon, 2004). Las densidades de inóculo más altas (40-100 mg/ml) fueron más eficientes para el crecimiento de suspensiones en *P. nigra* (Salaj *et al.*, 2007). En el presente estudio con *P. pinea* 20 mg/ml fue mejor densidad de inóculo para la proliferación que 30 mg/ml, mientras que a una densidad de inóculo menor (10 mg/ml) el crecimiento del cultivo medido como SCV fue insignificante. En *P. nigra* la densidad más baja probada también fue inadecuada para lograr la proliferación, aunque en este caso fue de 20 mg/ml (Salaj *et al.*, 2007).

Aunque nuestros resultados con pino piñonero mostraron que el aumento del SCV fue nulo cuando las suspensiones se iniciaron con la densidad de inoculación más baja, el aumento del PS fue similar al obtenido cuando se utilizó la densidad de inoculación más alta. Se ha descrito que el PS está relacionado con el número de embriones en la etapa 1 en los cultivos (Find *et al.*, 1998a) y con una proporción de células pequeñas y densas más altas que las de células con vacuolas grandes (Find *et al.*, 1998b). Por lo tanto, la falta de aumento de SCV observada a la menor densidad de inoculación podría estar relacionada con una formación deficiente de células suspensoras en pino piñonero. En estudios con cultivos en suspensión de *Larix kaempferi* se sugirió que los factores de crecimiento liberados al medio de cultivo influirían en el desarrollo embriogénico, principalmente en la diferenciación de los suspensores (Umehara *et al.*, 2004).

Se confirmó que la densidad de 20 mg/ml era la densidad óptima de inoculación para el pino piñonero cuando se determinó la cinética de crecimiento de las células embriogénicas en cultivos en suspensión para determinar el tiempo óptimo de subcultivo (Aquea *et al.*, 2008). En las condiciones de cultivo de este ensayo, la línea inoculada con 20 mg/ml mostró un aumento lineal tanto del SCV como del PS alcanzando los valores máximos después de 21 días. Esto se corresponde con lo ya indicado para otras especies de *Pinus*. En *P. taeda*, el cultivo embriogénico mostró un aumento en el SCV hasta los 16 días de cultivo con una densidad de inóculo de 14 mg/ml (Silveira *et al.*, 2004) y en *P. nigra* las suspensiones alcanzaron el valor máximo de SCV después de 14 o 18 días de cultivo, dependiendo de la línea (Salaj *et al.*, 2007). Cuando las suspensiones de pino piñonero se iniciaron con la densidad óptima de inóculo no se observó fase de latencia, como ya se indicó en otras coníferas (Azevedo *et al.*, 2008; Choudhury y Tandon, 2014).

Dado que no se observaron diferencias significativas para el SCV y el PS entre matraces Erlenmeyer de 100 y 200 ml, fueron elegidos más tarde para posteriores experimentos. Esto se decidió porque a volúmenes iguales de medio de cultivo se puede obtener un área de transferencia de aire al líquido más grande con tanques más grandes (Jiménez *et al.*, 2011). Además, estos envases permitieron el uso de tapones de silicona. Este tipo de cierre es más estable que el papel de aluminio, por lo que se pueden obtener resultados más reproducibles (Schripsema *et al.*, 1990). La velocidad de agitación o la frecuencia de agitación es uno de los parámetros más importantes de la tecnología de agitación en biorreactores (Klöckner y Büchs, 2012). Esto junto al tipo de cierre del recipiente de cultivo, condicionan el intercambio gaseoso con el medio de cultivo. Este hecho unido a las fuerzas de cizallamiento que originan las agitaciones dentro del medio líquido es de suma importancia para el crecimiento, el grado de agregación y la diferenciación de los cultivos en suspensión (Marino *et al.*, 1995; Jiménez *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta donde sabemos, pocos artículos tratan sobre el efecto de este factor en cultivos embriogénicos en suspensión de coníferas.

El crecimiento de cultivos en suspensión de pino piñonero estuvo fuertemente influenciado por la velocidad de agitación, pero el efecto fue dependiente de la línea embriogénica. Este hecho podría estar relacionado con diferencias en las morfologías de las líneas. La línea 1F6011, que apenas se vio afectada por la agitación, mostró estructuras de embriones-suspensores agrandadas con bajo grado de agrupamiento. Los embriones

de esta línea se parecen a aquellos con una masa embrionaria en forma de cono y células suspensoras supernumerarias descritas como embriones anormales en *Pinus sylvestris* (Abrahamsson *et al.*, 2017). Dado que estos embriones muestran adhesiones, esta línea embriogénica probablemente carece de la matriz extracelular descrita en sistemas embriogénicos de otras especies, lo que puede ser importante para el desarrollo normal (Pilarska *et al.*, 2013 y referencias incluidas). Por otro lado, las líneas 7F6011 y 2F6047, cuyo crecimiento se vio afectado por el aumento de la velocidad de agitación. Mostraron diferentes grados de agrupamiento, siendo el crecimiento del más agrupado (7F6011) el más afectado por la velocidad de agitación más alta. La agitación probablemente rompió la matriz de proteínas extracelulares que fomenta la agregación de las estructuras embriogénicas (Neděla *et al.*, 2016) en estas líneas, afectando tanto a la formación de células suspensoras como a la escisión de la poliembrionía. Por tanto, la alteración de esta matriz extracelular que se ha descrito es necesaria para la proliferación normal de líneas embriogénicas de coníferas (Egertsdotter y von Arnold, 1998; Hřib *et al.*, 2015) podría estar detrás de la disminución observada del SCV y el PS en pino piñonero. Además, no se puede destacar un efecto negativo de la tensión de cizalladura hidrodinámica ejercida directamente sobre las células embriogénicas tanto en las células meristemáticas en crecimiento como en la formación de suspensores, como se demostró en *Picea abies* (Sun *et al.*, 2010). Otra posible explicación para la reducción del SCV con el aumento de la velocidad de agitación es la desintegración de las estructuras y la consiguiente mayor compactación de las células sedimentadas. Aunque se ha afirmado que el SCV es útil para la estimación rutinaria del crecimiento, así como para predecir el PF y PS en cultivos de células en suspensión en matraces agitados (Krogstrup, 1990; Tautorus *et al.*, 1992), su precisión podría ser menor que la del PS porque se vio afectado por la turgencia, el tamaño de las células y los agregados celulares del cultivo (Krogstrup, 1990; Mustafa *et al.*, 2011).

Dado que la velocidad de difusión de los PGRs a los tejidos en crecimiento es mayor cuando se cultivan en medio líquido que cuando están en medio semisólido, las concentraciones óptimas generalmente se reducen lo primero (Gupta y Timmis, 2005; Pullman y Skryabina, 2007). Sin embargo, la disminución de las concentraciones de PGRs no afectó los parámetros de crecimiento en cultivos en suspensión de pino piñonero. Estos resultados son similares a los descritos por Carneros y col. (2009), que notaron que la concentración de PGRs era menos importante que la formulación del

medio basal para la iniciación de líneas embriogénicas de la misma especie. Los requisitos de PGRs para la proliferación de líneas embriogénicas de coníferas parecen ser muy específicos de especie. El patrón de crecimiento celular de los cultivos embriogénicos de *Araucaria angustifolia* establecidos en un medio líquido sin PGRs, fue similar al de las líneas cultivadas en medio con PGRs añadidos (dos Santos *et al.*, 2010). Por el contrario, los cultivos de suspensiones embriogénicas de *Pinus taeda* que crecen en medio libre de PGRs mostraron un aumento del SCV menor que los cultivos en medios suplementados con PGRs (Silveira *et al.*, 2004).

El tipo de carbohidrato influyó fuertemente en el crecimiento de las suspensiones de pino piñonero. Lo mismo ha sido notificado para otras coníferas. Las líneas embriogénicas de *Pinus strobus* crecieron mejor en un medio que contenía maltosa en lugar de sacarosa (Kaul, 1995). En *Pinus pinaster* la maltosa se encontró que aumentaba la frecuencia de embriones somáticos tempranos bien desarrollados durante la proliferación (Breton *et al.*, 2005). Por el contrario, el presente estudio en *Pinus pinea* demuestra que el crecimiento fue mayor cuando se utilizó sacarosa en lugar de maltosa. La hidrólisis de maltosa es lenta en comparación con la de sacarosa, produciendo contenidos de hexosa endógena más bajos (Blanc *et al.*, 2002). Iraqi y Tremblay (2001) consideraron la hidrólisis de la sacarosa y el mantenimiento de un gradiente de sacarosa entre el medio de cultivo y los tejidos embriogénicos necesarios para la proliferación en *Picea*. En las suspensiones celulares, los cultivos de *Pinus pinaster* hidrolizan la sacarosa rápidamente de modo que la glucosa y la fructosa se consumieron progresivamente mostrando perfiles de tasas de consumo similares (Azevedo *et al.*, 2008). En *Araucaria angustifolia*, las suspensiones embriogénicas consumieron la fructosa preferencialmente durante la fase de crecimiento lineal y las concentraciones de glucosa disminuyeron después de la concentración de fructosa (Astarita y Guerra, 2000). Nuestros resultados sugieren que para el cultivo de tejidos embriogénicos de pino piñonero se requiere la presencia de fructosa en el medio de cultivo, que no fue proporcionada por la hidrólisis de maltosa.

Procedimientos para el mantenimiento de los cultivos en suspensión. Para mantener cultivos en suspensión embriogénica de pino piñonero, el subcultivo de 250 mg de masa embriogénica filtrada (procedimiento de pesado) fue mejor que la transferencia de alícuotas de 5 ml de la suspensión homogeneizada (procedimiento de pipeteo). En este

último, a medida que crecieron los cultivos, el PF del tejido embriogénico en las alícuotas aumentó. El período de cultivo 2 se inició con alícuotas del cultivo 1 que contenían diferentes cantidades de masas de tejido embriogénico según la línea, que variaba desde 517 mg de PF en el caso de la línea 2F6047 hasta los 238 mg de PF en la línea 7F6011. El período de cultivo 3 se inició con alícuotas de cultivo 2 que también contenían diferentes cantidades de masas de tejido embriogénico, que variaban desde los 510 mg de PF en el caso de la línea 2F6047 hasta los 382 mg de PF en la línea 7F6011. Por lo tanto, el efecto de una densidad de inóculo no óptima, ya sea por exceso o por defecto, podría explicar las reducciones observadas en el PS después del segundo y tercer subcultivo. Estos resultados señalarían que el efecto de la densidad de inoculación no solamente es importante en el establecimiento de los cultivos en suspensión, sino también a lo largo de los subcultivos sucesivos. Sin embargo, no se puede descartar un posible efecto de la heterogeneidad del inóculo (Krogstrup, 1990). En el caso de las suspensiones de *Pinus pinea* son heterogéneas y es difícil tomar alícuotas homogéneas. En contraste con el procedimiento de pipeteo, el subcultivo mediante el pesado de una cantidad fija de 250 mg de PF de masa embriogénica filtrada, dio como resultado un aumento significativo en el SCV y el PS a lo largo de cuatro subcultivos. Se observó una relación entre el crecimiento sostenible y la transferencia de un inóculo regular en cada subcultivo. La muestra compacta producida después del filtrado mostró agrupaciones de masas embriogénicas densas que podrían proporcionar una mayor homogeneidad de inóculo. Además, debe tenerse en cuenta que 250 mg de PF de masa embriogénica filtrada equivalen a 500 mg de PF de tejido recogido de la periferia de las masas embriogénicas de pino piñonero que crece en medio semisólido. Por lo tanto, los subcultivos se iniciaron con la densidad óptima de inoculación. El mantenimiento mediante el procedimiento de pesado mantuvo altas tasas de crecimiento y mejor reproductividad que el procedimiento de pipeteo en todos los subcultivos, principalmente debido a la homogeneidad del inóculo. Se ha indicado anteriormente que el procedimiento de pipeteo puede ser inadecuado porque las suspensiones generalmente comprenden diferentes tamaños de agregados celulares y, por tanto, la reproducibilidad puede verse comprometida (Mustafa *et al.*, 2011).

El análisis de imágenes de las estructuras macroscópicas se ha propuesto como una forma de evaluar la calidad de los cultivos embriogénicos, y así estimar la productividad del proceso embriogénico (Ibaraki y Kurata, 2001). En el presente estudio,

la línea 7F6011 mostró una morfología similar a la de la línea 5F2062, así como una tasa de crecimiento similar. Sin embargo, las líneas 1F2062 y 7F6011, que crecieron mal, difieren morfológicamente. Y la línea 2F6047 con mejores rendimientos mostró una morfología similar a la línea 1F2062. Por lo tanto, no se encontró una relación clara entre la morfología y el crecimiento de pino piñonero en masas embriogénicas cultivadas en suspensiones.

Escalado de los cultivos para la producción de biomasa. El objetivo de la amplificación es obtener la mayor cantidad de tejido embriogénico en el menor tiempo posible, y simplificar los procedimientos de cultivo para la producción en masa de embriones somáticos. El cultivo en suspensiones con envases más grandes y mayores volúmenes de medio puede conducir a la amplificación del sistema, así como requerir menos trabajo y espacio que el cultivo en medio semisólido (Gupta y Timmis, 2005). En el pino piñonero, el PS aumentó después de seis semanas de cultivo, siendo el doble en medio líquido que en medio semisólido. Además, el cultivo en medio semisólido requirió el fraccionamiento de masas embriogénicas quincenalmente y la transferencia a un número creciente de placas Petri con un mayor riesgo de contaminación. La absorción rápida de nutrientes por las células y su fácil reemplazo en la superficie celular que ocurre en el medio líquido, en contraposición a los gradientes de concentración generados en medio semisólido, pueden ser las principales razones del mayor crecimiento en los primeros (Gupta y Timmis, 2005; Kubeš *et al.*, 2014). Además, el cultivo en suspensión produce tejidos con características diferentes en comparación con los producidos en medio semisólido. En contraste con la desagregación de masas embriogénicas que ocurre en medio líquido, en medio semisólido las masas embriogénicas de coníferas crecen formando aglomeraciones que muestran una organización interna muy específica con diferentes funcionalidades. Usualmente están compuestos por células embrionarias localizadas en la región interna que muestran actividad metabólica reducida, y una región externa formada por embriones somáticos con alta actividad metabólica y mayor capacidad de crecimiento (Petrek *et al.*, 2015). Esta estructuración de los grupos hace necesario fraccionarlos en cada subcultivo para mantener la capacidad de proliferación, que es una tarea que requiere mucho tiempo.

Al final del período de cultivo de seis semanas, se observó una mayor variabilidad entre las réplicas en las líneas embriogénicas de pino piñonero cultivadas en medio

líquido que en medio semisólido. Este hecho podría atribuirse a una menor homogeneidad de inóculo en el primer procedimiento de cultivo que en el segundo. Aunque ambos sistemas de cultivo se iniciaron con el mismo tipo y cantidad de masas embriogénicas, se originó una variabilidad creciente en las suspensiones, pero no en el medio semisólido con los subcultivos consecutivos. También se ha observado una variación en el patrón de crecimiento entre las réplicas en cultivos en suspensión de otras coníferas (dos Santos *et al.*, 2010). La agrupación de réplicas antes de cada subcultivo se ha sugerido como una forma de minimizar esta variabilidad (Krogstrup, 1990; Ingram y Mavituna, 2000; Choudhury y Tandon, 2014).

Evaluación de la capacidad de maduración de los cultivos embriogénicos generados. Se obtuvieron embriones somáticos cotiledonares normales en medio de maduración semisólido a partir de líneas embriogénicas de pino piñonero proliferadas en medio líquido. Pocos estudios informan de la maduración de embriones somáticos de coníferas en medio líquido (Gorbatenko y Hakman, 2001). Esto puede deberse a que, para el correcto desarrollo y maduración de los embriones somáticos tempranos, la reducción del potencial osmótico y la disponibilidad de agua para las células se requiere en la mayoría de las especies (Klimaszewska *et al.*, 2016). La regeneración de plantas por ES implica una serie de etapas en las cuales las condiciones de cultivo en la etapa anterior pueden condicionar la siguiente (Lipavská y Konrádová, 2004). El objetivo del experimento de maduración en este estudio fue determinar los posibles efectos de arrastre de las condiciones utilizadas durante la proliferación en medio líquido en la producción de embriones cotiledonares normales en medio semisólido. Aunque no se registraron diferencias estadísticas significativas para el efecto de la agitación, probablemente debido a la alta variabilidad intra-grupo, el número de embriones casi se duplicó cuando la velocidad de agitación se incrementó de 50 a 100 rpm. El estrés causado por las fuerzas de corte puede explicar este aumento en la capacidad de maduración. Se informó que un estrés cortante moderado, además de promover el crecimiento celular meristemático, modificó la respuesta de las células embriogénicas de *Picea abies* a diferentes osmóticos añadidos al medio de cultivo (Sun *et al.*, 2011). Es posible que la tensión hidrodinámica causada por la velocidad de 100 rpm “condicionó” las células de pino piñonero para responder mejor a las condiciones osmóticas del medio de maduración requerido para el desarrollo embrionario adecuado a la etapa cotiledonar.

Los componentes del medio durante la proliferación también influyeron en la producción de embriones cotiledonares normales durante la maduración. Aunque de nuevo no fue estadísticamente significativa, la producción de embriones casi se triplicó cuando las líneas proliferaron en medio líquido con la concentración más baja de PGRs. Este resultado está en consonancia con la eliminación requerida de auxinas y citoquininas informada para la maduración de embriones somáticos de la mayoría de las especies de coníferas (Klimaszewska *et al.*, 2016). También se informó que el acondicionamiento de líneas embriogénicas de pino piñonero en medio con concentraciones ultra bajas de 2,4-D y BAP antes de la maduración fue beneficioso cuando se llevó a cabo la proliferación en medio semisólido (Carneros *et al.*, 2009; Carneros *et al.*, 2017).

El carbohidrato utilizado durante la proliferación tuvo un efecto significativo en la maduración de los embriones somáticos de pino piñonero. La maduración realizada en medio que contenía maltosa fue mejor cuando las masas embriogénicas procedían de medio líquido que contenía sacarosa en lugar de medio líquido que contenía maltosa. La maltosa en lugar de sacarosa se ha utilizado ampliamente en los medios de maduración de varias especies de *Pinus* (Lelu-Walter *et al.*, 2016). Los primeros resultados con pino piñonero indicaron que también podría ser adecuado para esa especie (Carneros *et al.*, 2009). En *Pinus taeda*, la maltosa combinada con polietilenglicol (PEG) no sólo aumentó la producción de embriones maduros, sino que también influyó en el desarrollo de embriones y suspensores somáticos que evolucionaron de forma diferente a cuando crecieron en sacarosa más PEG (Li *et al.*, 1998b). Estas respuestas pueden atribuirse a un efecto osmótico diferente ejercido por la maltosa con respecto a la sacarosa porque la hidrólisis de la primera es mucho más lenta que la de la última (Lipavská y Konrádová, 2004) causando una disminución más lenta del potencial hídrico medio durante la maduración. Este efecto de la maltosa también podría ocurrir en los cultivos de pino piñonero del presente estudio. Sin embargo, para mejor producción de embriones, la sacarosa en lugar de la maltosa tenía que estar presente en el medio líquido durante la fase de proliferación previa. Los tejidos embriogénicos probablemente acumularon sacarosa durante la proliferación, tanto por absorción directa como por resíntesis endógena (Lipavská y Konrádová, 2004), que luego fue necesario para una maduración embrionaria adecuada. En *Picea abies*, la sacarosa se acumuló en embriones somáticos incluso cuando maduraron en medios sin sacarosa, y también la disponibilidad de sacarosa aumentó su producción (Kubeš *et al.*, 2014). Los resultados descritos aquí con

pino piñonero están de acuerdo con el papel sugerido para la sacarosa como regulador del desarrollo embrionario (Iraqi y Tremblay, 2001). Algunos embriones somáticos de cultivos en suspensión de *Pinus pinea* se germinaron y se convirtieron en plantas (datos no mostrados) siguiendo los métodos informados previamente (Carneros *et al.*, 2009, 2017).

4.4. Diferenciación-maduración de embriones somáticos bajo distintas condiciones de cultivo

Efecto del suplemento con carbohidratos durante la maduración. Un fenómeno generalmente observado en cultivos embriogénicos, sobre todo en pinos, es la pérdida de la capacidad para producir embriones maduros con el tiempo en cultivo (Breton *et al.*, 2005). Este es el caso de las líneas embriogénicas de pino piñonero estudiadas, el número de embriones somáticos con morfología normal que se genera después de varios años en cultivo es muy bajo o incluso nulo. En general, la eficacia de cada una de las fases de la maduración para la obtención de embriones de calidad, depende de la optimización de factores como la morfología del tejido embriogénico y las condiciones de cultivo; siendo uno de los principales factores la disponibilidad hídrica, determinada por el balance osmótico del medio y la dureza del gel (Stasolla y Yeung, 2003). La disminución del potencial hídrico del medio de cultivo puede resultar en una disminución del contenido hídrico en el tejido cultivado, lo cual beneficia la maduración de los embriones (Stasolla *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la composición específica en carbohidratos del medio de maduración afectaba la acumulación de sustancias de reserva en los embriones somáticos de *Picea abies* (Businge *et al.*, 2013). La sacarosa es la fuente de carbono y energía más ampliamente utilizada, observándose que las concentraciones recomendadas variaban según los diferentes cultivos embriogénicos desde un 3% hasta alcanzar generalmente un óptimo del 6%, en muchas ocasiones conjuntamente con un 0.9% de gelificante (Lipavská y Konrádová, 2004; y referencias incluidas). Sin embargo, en algunas especies se han alcanzado mejores resultados con otros carbohidratos alternativos como la glucosa, fructosa, maltosa, sorbitol y mioinositol. Se ha sugerido que, la superioridad de la maltosa comparado con la sacarosa es atribuible a su más bajo metabolismo (Ramarosandratana *et al.*, 2001). En algunos sistemas embriogénicos podría explicarse por la hipótesis de la necesidad de mantener un contenido en hexosas bajo (Blanc *et al.*, 2002); además de que la absorción de los carbohidratos puede disminuirse por las altas concentraciones de gelificante en el medio, al reducirse su movilidad (Ramarosandratana *et al.*, 2001). Se ha especulado que la maltosa es superior como carbohidrato/osmótico porque produce un ambiente osmótico más natural durante el desarrollo tardío del embrión (Pullman y Johnson, 2002). Además, la osmolaridad del medio tiende a elevarse utilizando sacarosa,

mientras que la maltosa permite que los niveles osmóticos permanezcan estáticos o disminuyan lentamente (Pullman *et al.*, 2003a).

En el pino piñonero, se han ensayado diferentes suplementos de carbohidratos en un medio con alto contenido de gelificante (1%) con el fin de estimular la maduración en las líneas embriogénicas. En el conjunto de las líneas, al añadir 15 g/l de maltosa a los ya existentes en el medio de maduración estándar (60 g/l) se incrementó la proporción de embriones con morfología normal respecto al total de embriones maduros formados. Este incremento de la concentración de maltosa a 75 g/l, produjo 5.7 veces más embriones cotiledonares con morfología normal. Sin embargo, el suplemento de 15 g/l de sacarosa, no varió apenas la producción de embriones normales. En un ensayo adicional con la línea 2F6047 utilizando 28°C durante la maduración, el medio suplementado con maltosa no produjo embriones y con un suplemento de sacarosa se produjo una ligera estimulación de la maduración. Sin embargo, el suplemento con sorbitol (60 g/l de maltosa y 15 g/l sorbitol) produjo una clara activación de la maduración, al obtenerse un mayor número de embriones normales en relación al suplemento con sacarosa o maltosa. Los datos indicaron un efecto del genotipo en la respuesta y un posible efecto de una interacción entre la temperatura durante la maduración y el suplemento de carbohidratos.

En *Pinus taeda*, el medio con maltosa al 4% resultó ser superior a la sacarosa y los embriones cotiledonares mostraron la cofia de la raíz mejor definida. La sacarosa inhibía el desarrollo del embrión, como consecuencia de un crecimiento excesivo de las células de suspensor alrededor del embrión; mientras que la maltosa ejercía un efecto inhibitorio del crecimiento del suspensor (Li *et al.*, 1998b). Se ha propuesto el cultivo de determinadas líneas de *Pinus pinaster* en medio con maltosa, con el fin de preservar la capacidad para formar embriones tempranos (Breton *et al.*, 2005). Maruyama y Hosoi (2012), también obtuvieron en tres especies de pinos altas tasas de maduración en medios con 50 g/l de maltosa.

Al igual que lo obtenido en *P. pinea* en este estudio, se ha indicado que para la obtención de embriones cotiledonares en *P. nigra* se necesitaron altas concentraciones de maltosa (6 ó 9%, dependiendo de la línea embriogénica) en medios con alta concentración de gelificante (Salaj *et al.*, 2005). En *P. pinaster*, en medios con 0.9% de gelificante, la mejor fuente de carbohidratos también varió con la línea embriogénica (Tereso *et al.*,

2007). Sacarosa o maltosa a 263 mM (90 g/l) produjo más estructuras desorganizadas en los embriones que con 175 mM (60 g/l), indicando que el efecto de la fuente de carbohidrato fue parcialmente osmótico.

El sorbitol no es utilizable como fuente de carbono, al no metabolizarse en los tejidos vegetales, por lo que generalmente se emplea como osmótico para modificar el potencial hídrico del medio de cultivo. El mioinositol se ha clasificado como una vitamina utilizada en los medios de cultivo de tejidos vegetales generalmente a una concentración de 100 mg/ml (George, 1993), y cuyo efecto beneficioso en el crecimiento de los tejidos depende de su participación en distintas rutas biosintéticas (Loewus y Murthy, 2000). Sin embargo, también se ha considerado su papel como carbohidrato suplementario. En cultivos en suspensión de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus taeda*, el mioinositol (60 g/l) añadido al medio resultó esencial en la regeneración de embriones a partir de protoplastos (Gupta *et al.*, 1988). Pullman y col. (2003) desarrollaron un medio de cultivo en *Pinus taeda* añadiendo 15 g/l de maltosa y 20 g/l de mioinositol, con el fin elevar el nivel osmótico y simular parcialmente el ambiente donde la maduración del embrión cigótico está acompañada de la pérdida de agua (dsecación).

En este mismo sentido, la composición en carbohidratos en medios con alta concentración de gelificante (1%) influyó en la producción de embriones en *Pinus strobus* (Garin *et al.*, 2000). Dependiendo de la línea embriogénica, la mayor producción de embriones se obtuvo incrementando la concentración de sacarosa (263 mM, 90 g/l); o sustituyendo parte de la sacarosa (88 mM, 30 g/l) con sorbitol (175 mM, 32 g/l), produciéndose mayor número de embriones que con sólo sacarosa. Se considera que el efecto beneficioso de una concentración elevada de sacarosa es en parte osmótico, ya que reemplazando la mitad de su concentración por otro osmótico como el sorbitol o el mioinositol no afectaba la producción de embriones en *Picea* (Tremblay y Tremblay, 1991). Inexplicablemente, en el caso de *P. pinea*, el suplemento con 15 g/l de mioinositol inhibió la maduración.

Efecto de la temperatura durante la proliferación y maduración de líneas embriogénicas. Se ha tomado como modelo la embriogénesis somática en *Picea abies* para determinar la influencia de la temperatura durante el crecimiento de los cultivos y la maduración de los embriones somáticos, en la supervivencia de las plantas generadas

(Kvaalen y Johnsen, 2008). Reduciendo la temperatura de 23 a 18°C se redujo el crecimiento de los tejidos, pero resultó similar a los cultivos crecidos a 28°C. Sin embargo, los cultivos mantenidos a 28°C tendieron a producir mayor número de embriones y en menor tiempo que los cultivos mantenidos a 18 ó 23°C. Estos autores observaron también gran variabilidad genética en las respuestas de crecimiento; mientras unos clones crecían mejor a 18°C, otros lo hacían a 28°C.

Los cultivos embriogénicos de *Pinus radiata* incubados a 28°C crecieron menos que los incubados a 23°C; pero no se encontraron diferencias entre 18 y 23°C (García-Mendiguren *et al.*, 2016). Estos autores no encontraron efectos diferentes en la maduración de los embriones cuando los cultivos proliferaron a distintas temperaturas.

Los resultados obtenidos en *Pinus pinea* difirieron en cierta medida con los anteriormente expuestos. El máximo crecimiento de los cultivos se obtuvo a 23°C, reduciéndose dicho crecimiento tanto a 18 como a 28°C. Sin embargo, se produjo 6 veces más PS a 18°C que a 28°C. Los resultados mostraron una relación inversa entre crecimiento y formación de embriones. Sólo una de las cuatro líneas produjo embriones normales cuando se mantuvo la temperatura de 28°C durante la proliferación y maduración, similar a lo observado por (Kvaalen y Johnsen, 2008).

Como resultado interesante, se observó una estimulación de la maduración cuando la temperatura durante la maduración era superior a la mantenida durante la proliferación. Estos resultados sugieren que podría mediar una respuesta de estrés por temperatura como mecanismo promotor de la reprogramación celular (Bonga *et al.*, 2010; Neilson *et al.*, 2010).

Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación y maduración. Los resultados obtenidos por Kvaalen y Johnsen (2008), al observar que los cultivos mantenidos a 28°C producían más embriones que los cultivos mantenidos a 18 ó 23°C, sólo se confirmó en una línea embriogénica de pino piñonero.

Stasolla y Yeung (2003) indicaron que las etapas iniciales de la embriogénesis somática son cruciales para el éxito del proceso en general, y que se requieren técnicas

de desecación eficientes que permitan completar el programa de maduración. La estimulación de un estrés hídrico en el cultivo estaba relacionada con la promoción del desarrollo embrionario. Basándonos en los resultados en otras especies de pinos donde altas concentraciones de gelificante en el medio favorecían el desarrollo de los embriones (Klimaszewska *et al.*, 2000; Lelu-Walter *et al.*, 2008), estudiamos el impacto de estas condiciones durante la proliferación en la maduración de los embriones de pino piñonero. Los resultados obtenidos en *P. pinea* indicaron que la restricción en la disponibilidad hídrica del medio (10 g/l de Gelrite) durante la proliferación de la línea embriogénica más productiva afectó negativamente en la producción de embriones en un medio de maduración con concentraciones altas de osmótico y gelificante (10 g/l de maltosa y 10 g/l de Gelrite), aplicando 23 ó 28°C durante las dos fases del desarrollo embrionario. Se ha descrito que, con el estrés hídrico impuesto por las condiciones de cultivo (9 g/l de Gelrite) durante la maduración, se activaban mecanismos moleculares específicos en la etapa temprana del desarrollo de los embriones de *P. pinaster* (Morel *et al.*, 2014).

En *Larix*, se ha indicado que la reducción de la disponibilidad hídrica en el medio de maduración por una mayor concentración de gelificante, mejoró en lugar de limitar el desarrollo de los embriones (Teyssier *et al.*, 2011). Estos autores sugieren que los embriones desarrollados en medio con 8 g/l de gelificante sufrieron menos estrés que los desarrollados en medios con 4 g/l.

Sin embargo, la aplicación conjunta de una restricción en la disponibilidad hídrica del medio y una temperatura de proliferación (18 ó 23°C) inferior a la de maduración (23 ó 28°C), estimuló la producción de embriones. La mejor condición de cultivo en la línea más productiva resultó ser la aplicación de una temperatura más baja (18°C) y menor disponibilidad hídrica del medio (10 g/l de Gelrite) durante la proliferación y una temperatura más alta (23°C) durante la maduración. Dicha línea mostró menos tolerancia al incremento más brusco de la temperatura entre la proliferación (18°C) y maduración (28°C). García-Mendiguren y col. (2016) observaron una mayor disponibilidad hídrica cuando la proliferación se realizó a 18°C respecto a 23 ó 28°C en *Pinus radiata*. En microsporas de *Brassica napus*, la aplicación de una temperatura baja (18°C) favorecía la embriogénesis a través de la vía de las primeras divisiones asimétricas de las células, el establecimiento de la polaridad y la formación de estructuras de tipo suspensor (Prem *et al.*, 2012).

El resultado obtenido de la aplicación conjunta de distintas temperaturas y disponibilidad hídrica durante la proliferación de los cultivos embriogénicos de pino piñonero, nos sugiere la existencia de una relación compleja entre el contenido hídrico de las células y la temperatura durante el desarrollo de los embriones somáticos, como indicaron Klimaszewska y col. (2000).

Generalmente, la maduración de los embriones somáticos en *Pinus* sp. requiere medios con altas concentraciones de gelificante (Klimaszewska *et al.*, 2007). Durante la maduración en medios con disponibilidad hídrica reducida, se ha caracterizado el estado hídrico de los embriones (Teyssier *et al.*, 2011; Morel *et al.*, 2014). El hipotético ajuste del potencial hídrico del tejido embriogénico a la disponibilidad de agua podría explicar el aspecto más deshidratado observado en los cultivos de *P. pinea* proliferados en 10 g/l de Gelrite. El incremento de la concentración de gelificante a 10 g/l no solamente mejoraba la producción de embriones en *Pseudotsuga menziesii* sino también la morfología; mediada por una reducción de la proliferación de los cultivos y una apariencia seca (Lelu-Walter *et al.*, 2018).

También, se ha descrito el impacto en la maduración de la combinación de diferentes temperaturas (18, 23 y 28°C) y disponibilidad hídrica (3.5, 4.5 y 5.5 g/l de Gelrite) durante la proliferación de tejido embriogénico de *Pinus radiata* (García-Mendiguren *et al.*, 2016). Considerando el efecto de estos factores en la producción de embriones; ni la temperatura, ni la concentración de gelificante, ni su interacción resultaron significativos.

4.5. Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica sobre el patrón de metilación en líneas embriogénicas

Cuantificación del ADN. La extracción de ADN genómico de ambas etapas de la ES, mostraron diferentes cantidades de ADN. Sin embargo, las diferentes cantidades de ADN extraído podían deberse, en primer lugar, a la falta de tener un protocolo completamente optimizado para este tipo de muestras o en segundo lugar, a la morfología misma de las muestras. Estas podrían determinar cambios en la cantidad de ADN a igual cantidad de muestras recogida para su análisis. Por tanto, las masas en proliferación que se constituían por células meristemáticas pequeñas y células alargadas altamente vacuoladas (Arnorld *et al.*, 2016) tendría una cantidad inferior de ADN extraído al compararlas a las masas en maduración con mayor número de embriones con células compactas y globulares en la parte apical junto a suspensores de células alargadas en la parte inferior (Park, 2014; Bonga, 2016). Además, los embriones que se constituyen por células compactadas pesaban menos que las masas en proliferación y maduración. Sin embargo, presentaron cantidades altas de ADN extraído, demostrando que la estructura celular de la muestra es más importante que la cantidad de muestra seleccionada. Estos resultados se visualizaron en los geles de agarosa, donde masas embriogénicas en maduración y embriones aislados mostraron bandas de mayor intensidad que las equivalentes en proliferación. Esto influyó en la elección de las diluciones para continuar con el análisis de MSAP, obligando a elegir valores de dilución menores (1:2 y 1:7) frente a los valores de dilución habituales (1:5 y 1:10) del protocolo de Guevara y col. (2017).

Marcadores MSAP. Las secuencias 5'-CCGG están distribuidas en todo el genoma de los organismos, tanto en animales como en plantas, siendo ricas en regiones promotoras que controlan la expresión de los genes próximos (Valledor *et al.*, 2010). Son secuencias susceptibles de ser metiladas a través de enzimas distintas, adicionando grupos metilo. En plantas hay más enzimas de este tipo que en animales y su funcionamiento junto a otros factores controlan la expresión génica (Finnegan *et al.*, 1998). Esa mayor variedad de enzimas en plantas permite realizar estudios epigenéticos en especies como las coníferas. Además, se ha descrito que los procesos de metilación y desmetilación determinan la expresión génica que controla el desarrollo de las plantas y su respuesta a las condiciones en las que se encuentran (Tariq y Paszkowski, 2004; Valledor *et al.*, 2007;

Chen *et al.*, 2010). Por tanto, es posible conocer el efecto de las diferentes condiciones de cultivo, temperatura y disponibilidad hídrica, en el desarrollo de líneas embriogénicas estudiando la metilación de las secuencias 5'-CCGG. Para ello, las especies carentes de variación genética, pero con gran plasticidad fenotípica son las más adecuadas (Bossdorf *et al.*, 2008). Esto caracteriza a la especie de *Pinus pinea*, convirtiéndola en una especie idónea para este tipo de estudios como ya describieron otros autores anteriormente (Sánchez-Gómez *et al.*, 2011; Sáez-Laguna *et al.*, 2014).

Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la proliferación. Estos estudios epigenéticos se realizaron basándonos en los cambios del perfil de metilación en la secuencia 5'-CCGG del ADN genómico extraído de líneas embriogénicas de *Pinus pinea*. La técnica de MSAP permitió distinguir entre genotipos, a diferencia de otros marcadores moleculares que no lo habían conseguido hasta ahora, como por ejemplo los microsatélites de cloroplasto (Vendramin *et al.*, 2008) o microsatélites nucleares (Pinzauti *et al.*, 2012). El análisis de estos marcadores MSAP, incluso permitió distinguir en las condiciones de cultivo ensayadas (28°C y 10 g/l de Gelrite), diferentes estados de desarrollo (masas en proliferación, masas en maduración y embriones somáticos aislados). Estos análisis fueron posible porque Schulz y col. (2013) consideraba que la técnica de MSAP evaluada con un análisis de tipo Mixto es adecuada para analizar plantas cuyo genoma no es conocido, como el de *Pinus pinea*. No obstante, varios autores han descrito que esta técnica subestimaba el porcentaje global de metilación del genoma. Se analiza sólo la metilación a nivel de las secuencias 5'-CCGG, y hay que tener en cuenta las limitaciones de las combinaciones de enzimas empleadas (*HpaII/EcoRI* y *MspI/EcoRI*). Algunos de los posibles estados de metilación que sufren las secuencias 5'-CCGG son indetectables (Chakrabarty *et al.*, 2003; Salmon *et al.*, 2008; Rico *et al.*, 2014). Aun así, la técnica de MSAP sigue considerándose una huella epigenética rápida para los patrones de metilación global (Schulz *et al.*, 2013; Rico *et al.*, 2014).

Los resultados de metilación global para nuestras líneas embriogénicas fueron de 58.91% en la fase de proliferación y 58.59% en la fase de maduración. Estos porcentajes no están muy alejados de los descritos para esta especie en árboles adultos, 64.36% según Sáez-Laguna y col. (2014). Pero son porcentajes hipermetilados, según planteaba Nystedt

y col. (2013) en coníferas. De hecho, los porcentajes de metilación que obtuvimos en *Pinus pinea* lo alejan de los bajos porcentajes de metilación de otras especies como *Quercus ilex* con un 22.6% (Rico *et al.*, 2014), *Laguncularia racemosa* 14.6-32.1% (Lira-Medeiros *et al.*, 2010), *Gossypium hirsutum* 32% (Keyte *et al.*, 2006), *Brassica oleracea* 30-41% (Salmon *et al.*, 2008) o *Arabidopsis thaliana* 35-43% (Cervera *et al.*, 2002).

Comparando el porcentaje de metilación que nosotros encontramos en las etapas de ES (58.91-58.59%) respecto a los porcentajes descritos en árbol adulto para esta misma especie (64.36%) por Sáez-laguna y col. (2014), el aumento en la metilación global está en consonancia con lo observado en *Pinus radiata*. Fraga y col. (2002) encontraron un aumento de los porcentajes de metilación al avanzar en el desarrollo de esta especie. No obstante, los leves cambios en el grado de metilación entre las etapas de proliferación y maduración, están íntimamente relacionados con las cantidades de cada tipo de marcador MSAP. Encontramos marcadores MS y MI, que se subclasifican en marcadores según su polimorfismo. Fueron los marcadores monomórficos sensibles a metilación (MMS) mayoritarios en la fase de proliferación, mientras que los marcadores monomórficos insensibles a metilación (MMI) lo fueron en la fase de maduración. Esto puede explicar los leves cambios en los porcentajes de metilación global en cada etapa, y relacionarse con controles genéticos diferenciales de programación y reprogramación de genes específicos de cada etapa de la ES (Valledor *et al.*, 2010). De hecho, cambios en el perfil de metilación se han relacionado con una mayor o menor pluripotencia de las células analizadas (Zhao *et al.*, 2008).

La técnica de MSAP se ha descrito como una técnica de análisis capaz de discriminar entre poblaciones de *Pinus pinea* (Sáez-Laguna *et al.*, 2014). Esto es equiparable a los resultados que obtuvimos en estos ensayos. Diferenciamos entre dos grupos de muestras, donde cada grupo se correspondía con una línea embriogénica distinta según el análisis de marcadores MSAP en la etapa de proliferación. Los marcadores que permitieron distinguir entre genotipos fueron los sensible a metilación (MS). Este tipo de marcadores MSAP engloban marcadores PMS cuyo perfil sensible a metilación cambia y se comportan de forma polimórfica entre muestras. El genotipo 5F2062 se dividió en dos subgrupos de muestras según la disponibilidad hídrica en las

que habían sido cultivadas las muestras de dicho genotipo. Sin embargo, la separación observada en los análisis de componentes principales según la condición de la temperatura no pareció ser tan determinante. Hasta donde sabemos, no se han hecho análisis de significación que determinen la influencia de las condiciones aquí ensayadas respecto a los perfiles de metilación. Pero en poblaciones de *Quercus ilex* el análisis de MSAP pudo distinguir grupos de árboles según la disponibilidad de agua con la que se cultivaron (Rico *et al.*, 2014). Además, como se indicaba antes, el estudio de estos marcadores PMS detectados en el genotipo 5F2062 permitió encontrar 5 marcadores PMS cuyo patrón de bandas podía relacionarse con las condiciones de cultivo. Estos marcadores PMS mostraron estados de metilación o desmetilación en función del tratamiento. Por tanto, la ausencia o presencia de banda desenmascaraba procesos epigenéticos que pueden estar mediados por genes promotores, en los cuales la secuencia 5'-CCGG es abundante, determinando un control distinto según las condiciones de cultivo ensayadas. De hecho, Valledor y col. (2007) no sólo indicaron que el ADN no codificante tiene especial importancia en la regulación de genes, sino también los niveles de metilación del ADN están relacionados con la competencia de las plantas.

Dentro de los marcadores MSAP, el análisis de los marcadores MMS cuyo perfil cambia según la sensibilidad a los isoesquizómeros (*HapII* y *MspI*), mostró que el genotipo 5F2062 tenía un nivel de metilación superior y mayor variación molecular que el genotipo 2F6047. Por tanto, la variación molecular que se observa en el genotipo 5F2062 como respuesta a las condiciones de cultivo que ejercen un estrés térmico e hídrico, pueden ser causante de variación somaclonal mediada por una metilación diferencial en la secuencia 5'-CCGG. Esto está en consonancia con la idea de Kaeppler y col. (2000) que indicaron que las modificaciones epigenéticas pueden ser responsables de variación somaclonal. Además, porcentajes elevados de metilación, como los observados en el genotipo 5F2062, se han relacionado con estrategias defensivas ante el estrés en especies como *Pinus sylvestris* en respuesta a contaminantes en el medio (Kovalchuk *et al.* 2003) o *Quercus ilex* frente a la sequedad (Rico *et al.*, 2014). Por el contrario, el genotipo 2F6047 mostró una metilación inferior que además de diferenciarle del genotipo 5F2062, permitió distinguir una variación molecular uniforme. Este genotipo ha mostrado una mayor capacidad de formar embriones en este ensayo aportando un número mayor de embriones aislados al estudio. Por tanto, podemos concluir que la capacidad de

producir embriones somáticos y un menor porcentaje de metilación en el genotipo 2F6047 está en consonancia con lo descrito en otras especies. En *Eleuterococcus senticosus* (Chakrabarty *et al.*, 2003) y coníferas como *Pinus nigra* (Noceda *et al.*, 2009) o *Pinus radiata* (Bravo *et al.*, 2017) las líneas embriogénicas capaces de formar embriones por ES poseían niveles más bajos de metilación.

Efecto de la temperatura y disponibilidad hídrica durante la maduración. Los marcadores MSAP relacionados con las etapas de proliferación y maduración, ponen de manifiesto la existencia de una fuente de variabilidad inexplorada. Tanto por la posibilidad de distinguir distintos marcadores MSAP, como por la posibilidad de distinguir marcadores MSAP significativos para cada etapa de la ES. Este tipo de análisis en la fase de maduración, dio como resultado un loci significativo para el genotipo 5F2062 y 3 loci significativos para el genotipo 2F6047. Esto confirma lo ya indicado por otros autores, que la información epigenética permite distinguir una variabilidad no encontrada por técnicas genéticas (Valledor *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Estos marcadores aquí encontrados podrían ser considerados como una aproximación de caracterización epigenética en líneas embriogénicas de *Pinus pinea*. Incluso podrían constituir marcadores potenciales relacionados con el estado ontogénico de las líneas embriogénicas.

Las diferencias informativas ofrecidas por cada combinación de enzimas Eco32 y Eco35 respalda la necesidad de ampliar el número de combinaciones de enzimas analizadas con el objetivo de conocer más marcadores potenciales discriminatorios según planteaban Sáez-Laguna y col. (2014). De hecho, nuestros resultados indicaron que la combinación Eco32 rindió un mayor número de marcadores MSAP totales al comparar las etapas de proliferación y maduración. Mientras que la combinación Eco35 proporcionó mayor número de marcadores PMS de gran relevancia para poder profundizar en la variabilidad epigenética mostrada por las líneas embriogénicas. Fueron los marcadores PMS los que permitieron discriminar entre genotipos, además de identificar marcadores relacionados con las condiciones de cultivo en la fase de proliferación. Los PMS comunes en las etapas de proliferación y maduración se emplearon para realizar un análisis del genotipo con menos variación molecular

(2F6047), lo cual permitió discriminar entre los diferentes estados de desarrollo. Hasta ahora sólo se habían relacionado cambios de intensidad de marcadores MSAP entre células con diferente estado de desarrollo, debidos a cambios en los estados de metilación (Guevara *et al.*, 2017). Sin embargo, el análisis de estos marcadores PMS entre las etapas de proliferación y maduración nos permitió distinguir diferentes estados de desarrollo. El análisis de todos los marcadores PMS comunes entre ambas etapas y bajo las distintas condiciones de cultivo, no siempre dieron datos concluyentes. La visualización gráfica de la distribución de muestras según su estado de desarrollo (PCoA), sólo fue discriminatorio entre muestras bajo la condición 28°C y 10 g/l de Gelrite. La condición 23°C y 10 g/l de Gelrite, no separó las muestras de forma clara; y la condición 18°C y 10 g/l de Gelrite, a falta de más de una muestra de embriones limitó poder realizar este análisis. Por tanto, aunque no se puede descartar que la falta de réplicas mínimas para llegar a conclusiones más robustas es un inconveniente para discutir en profundidad nuestros resultados. No obstante, poder distinguir entre muestras de masas en proliferación, masas en maduración y embriones aislados en la condición 28°C y 10 g/l, es un logro no realizado antes. Distinguir entre estados de desarrollo bajo esta condición de cultivo, puede que esté en relación con lo descrito en *Arabidopsis thaliana* transgénica por Mlynárová y col. (2007). Estos autores indicaron que los factores, sequía y calor, aplicados de forma conjunta tienen un gran efecto en los genes que controlan la remodelación de la cromatina. Por tanto, los marcadores MSAP que analizamos en muestras bajo condiciones de elevada temperatura y baja disponibilidad hídrica, podrían estar en relación con genes que controlan la diferenciación de las líneas embriónicas.

En conjunto, todos los resultados descritos en el análisis de marcadores MSAP siguieron lo sugerido por Sáez-Laguna y col. (2014). Desde el análisis de marcadores MSAP en muestras diferentes de árbol adulto de *Pinus pinea* hasta el empleo de diferentes condiciones de cultivo, permiten conocer mejor la plasticidad fenotípica de esta especie y abordarla desde un punto de vista epigenético. Estudios en profundidad de marcadores epigenéticos podrían relacionarse con marcadores que permitan la selección de futuros individuos selectos, puesto que las líneas embriónicas aquí estudiadas son líneas procedentes de árboles de *Pinus pinea* seleccionados en bancos clonales.

V. CONCLUSIONES

Con referencia a los objetivos específicos en cada área de actividad de esta tesis, podemos concluir:

1.- Se confirma la recalcitrancia de esta especie a la respuesta embriogénica. Aunque se han utilizado varias familias de semillas de polinización abierta y diferentes condiciones de cultivo, no se han podido mejorar las frecuencias de inducción previamente descritas. El genotipo y el estado de desarrollo del megagametofito y el embrión cigótico incluido, son críticos para la iniciación de ES. Además, se ha confirmado la variabilidad en la respuesta de iniciación de las familias seleccionadas de aquellos parentales femeninos que se comportaban mejor, entre distintos años de recolección.

2.- Se ha inducido embriogénesis secundaria sobre embrión somático en distinto estado de desarrollo. Las masas con apariencia embriogénica generadas en cotiledones, no progresaron con los subcultivos. Las masas embriogénicas generadas en la cabeza del embrión somático precotiledonar e inmaduro mostraron mayor diferenciación de embriones iniciales que las procedentes de las células del suspensor. Se obtuvo embriogénesis somática directa en el meristemo apical del embrión inicial con CPPU. Las masas generadas se multiplicaron dando masas de embrión-suspensor con una capacidad de producir embriones en condiciones de maduración similar a las masas procedentes de los cultivos envejecidos.

3.- Los cultivos en suspensión pueden ser adecuados para incrementar la producción de embriones en las líneas embriogénicas de *Pinus pinea*. Se obtuvo una mayor producción de biomasa utilizando medio líquido que medio semisólido. La densidad del inóculo fue el principal factor que influyó en la proliferación, no solo en el establecimiento de la suspensión sino también para el mantenimiento de cultivos. Un estrés hidrodinámico leve podría mejorar la producción de embriones cotiledonares, así como la menor concentración de PGR requerida durante la proliferación. Para la maduración apropiada en medio conteniendo maltosa, se requirió la recarga previa de sacarosa de los tejidos embriogénicos durante la proliferación.

4.- Se ha obtenido una ligera mejora en la producción de embriones cotiledonares con morfología normal en medios suplementados con determinados carbohidratos,

aunque con diferentes efectos según la línea. En el conjunto de las líneas, un aporte de 75 g/l de maltosa supuso 5.7 veces más embriones que en las condiciones estándar (60 g/l). La línea 1F6011 produjo más embriones con un suplemento de sacarosa. La línea 2F6047, con un suplemento de sorbitol durante la maduración a 28°C, produjo más embriones que en las condiciones anteriores.

5.- El aumento de la temperatura desde la fase de proliferación a la de maduración estimuló la producción de embriones cotiledonares con morfología normal. En el conjunto de las líneas, la producción de embriones se incrementó tres veces cuando se mantuvieron los cultivos durante un largo período en proliferación a 18°C y luego a 23°C durante la maduración. Aplicando 28°C durante la maduración, el estímulo de la maduración fue más eficiente en la línea más productiva.

6.- El efecto combinado de la temperatura y la disponibilidad hídrica durante las fases de proliferación y maduración tuvieron efectos diferentes en la capacidad de maduración de las líneas embriogénicas. Los cultivos mantenidos a 28°C en ambas fases produjeron un mayor número de embriones que a 23°C. A igualdad de temperatura en ambas fases, la menor disponibilidad hídrica redujo la producción de embriones. Sin embargo, se obtuvo una estimulación de la capacidad de producir embriones cuando los cultivos proliferaron con menor disponibilidad hídrica a 18°C y maduraron a 23°C.

7.- Se confirma la utilidad de los MSAP para diferenciar genotipos en el pino piñonero, lo cual no puede hacerse con otros marcadores genéticos moleculares. Diferentes condiciones de temperatura y disponibilidad hídrica indujeron cambios en los perfiles de metilación del ADN, pero dependen del genotipo. El genotipo más estable mostró un menor nivel de metilación que el genotipo variable. La frecuencia de polimorfismo detectada inducida por las condiciones de cultivo, estuvo en la línea de otros estudios. Algunos de los marcadores MSAP mostraron un aumento de intensidad de bandas desde las masas en proliferación a los embriones somáticos aislados, lo cual sugiere un mayor grado de desmetilación asociado con el proceso de diferenciación.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abellanas, B., Pardos, J.A. (1989) Seasonal development of female strobilus of stone pine (*Pinus pinea* L.). *Ann. Sci. Forest.*, EDP Sciences, 46:51s-53s. Disponible en: www.afs-journal.org/articles/forest/pdf/1989/05/AFS_0003-4312_1989_46_Suppl_ART0008.pdf
- Abellanas, B. (1990) Estudios básicos para la mejora genética del pino piñonero (*Pinus pinea* L.): Comportamiento Reproductivo. *Tesis (Doctoral) Escuela Técnica Superior de Ingeniero de Montes*, Universidad Politécnica de Madrid, España, 249
Disponible en: www.researchgate.net/publication/307863992_Estudios_basicos_para_la_mejora_genetica_del_pino_pinonero_Pinus_pinea_L_Comportamiento_reproductivo
- Abrahamsson, M., Valladares, S., Merino, I., Larsson, E., von Arnold, S. (2017) Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 53(2):86–96. Doi 10.1007/s11627-016-9797-y
- Achrem, M., Skuza, L., Kalinka, A., Szućko, I., Filip, E., Słominska-Walkowiak, R., Rogalska, S.M. (2012) Role of epigenetic mechanisms in plant response to low temperature. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 54:7-15. Doi 10.2478/v10182-012-0014-y
- Adams, K.L., Cronn, R., Percifield, R., Wendel, J.F. (2003) Genes duplicated by polyploidy show unequal contributions to the transcriptome and organ-specific reciprocal silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8):4649–4654. Doi 10.1073/pnas.0630618100
- Aderkas, P. von, Coulter, A., White, L., Wagner, R., Robb, J., Rise, M., Temmel, N., MacEacheron, I., Park, Y-S., Bonga, J.M. (2005) Somatic embryogenesis via nodules in *Pinus strobus* L. and *Pinus banksiana* Lamb. – Dead ends and new beginnings. *Propag. Ornam. Plants* 5:3-13
- Aderkas, P. von, Kong, L., Prior, N.A. (2016) In vitro techniques for conifer embryogenesis. Park, Y-S., Bonga, J.M., Moon, H-K. (eds). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, 335-350. Disponible en: <http://www.iufro20902.org/Publications/index.html>
- Ália Miranda, R., García del Barrio, J.M., Iglesias Sauce, S., Mancha Núñez, J.A., de Miguel y del Ángel, J., Peragón, J., Nicolás Peragón, J.L., Pérez Martín, F., Sánchez de Ron, D. (2009) Regiones de procedencia de especies forestales en España. *Organismo Autónomo Parques Nacionales. Madrid*. Disponible en:

- http://www.mapama.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/politica-forestal/Publicaci%C3%B3n_Regiones_de_procedencia_tcm7-285956.pdf
- Aquea, F., Poupin, M.J., Matus, J.T., Gebauer, M., Medina, C., Arce-Johnson, P. (2008) Synthetic seed production from somatic embryos of *Pinus radiata*. *Biotechnol. Lett.* 30(10):1847–1852. Doi 10.1007/s10529-008-9754-x
- Arnold, S. von, Larsson, E., Moschou, P.N., Zhu, T., Uddenberg, D., Bozhkov, P.V. (2016) Norway Spruce as a model for studying regulation of somatic embryo development in conifers. Park, Y-S., Bonga, J.M., Moon, H-K. (eds). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, 351-372. Disponible en: <http://www.iufro20902.org/Publications/index.html>
- Arnold, S. von, Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 69(3):233–249. Doi 10.1023/A:1015673200621
- Aronen, T., Pehkonen, T., Ryyänänen, L. (2009) Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris*. *Scand. J. Forest. Res.* 24(5):372-383. Doi 10.1080/02827580903228862
- Astarita, L.V., Guerra, M.P. (2000) Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). *In Vitro Cell. Dev.-Pl.* 36(3):194–200. Doi: 10.1007/s11627-000-0036-0
- Azevedo, H., Dias, A., Tavares, R.M. (2008) Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 93(1):115–121. Doi 10.1007/s11240-008-9349-1
- Blanc, G., Lardet, L., Martin, A., Jacob, J.L., Carron, M.P. (2002) Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *J. Exp. Bot.* 53(373):1453–1462. Doi 10.1093/jexbot/53.373.1453
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4):823-837. Doi 10.1016/j.cell.2007.05.009
- Becwar, M.R., Nagmani, R., Wann, S.R. (1990) Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Can. J. For. Res.* 20(6):810-817. Doi 10.1139/x90-107

- Becwar, M.R., Pullman, G.S. (1995) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Springer, Dordrecht, 287-301. Doi 10.1007/978-94-011-0960-4_18
- Bilichak, A., Kovalchuk, I. (2016) Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding. *J. Exp. Bot.* 67(7):2081-2092. Doi 10.1093/jxb/erw066
- Bonasio, R., Tu, S., Reinberg, D. (2010) Molecular signal of epigenetic states. *Science* 330(6004): 612–616. Doi 10.1126/science.1191078
- Bonga, J.M. (2016) Conifer clonal propagation in tree improvement programs. Park, Y-S., Bonga, J.M., Moon, H-K. (eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, 3-31. Disponible en: <http://www.iufro20902.org/Vegetative%20Propagation%20of.pdf>
- Bonga, J.M., Klimaszewska, K., von Aderkas, P. (2010) Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100(3):241-254. Doi 10.1007/s11240-009-9647-2
- Borrero Fernández, G. (2004) El pino piñonero (*Pinus pinea* L.) en Andalucía: Ecología, distribución y silvicultura. Consejería de Medio Ambiente, Sevilla. Disponible en: <http://www.juntadeandalucia.es/servicios/publicaciones/detalle/45543.html>
- Bossdorf, O., Richards, C.L., Pigliucci, M. (2008) Epigenetics for ecologists. *Ecol.lett.* 11(2):106-115. Doi 10.1111/j.1461-0248.2007.01130.x
- Bozhkov, P.V., Ahn, I.S., Park, Y.G. (1997) Two alternative pathways of somatic embryo origin from polyembryonic mature stored seeds of *Pinus koraiensis* Sieb et Zucc. *Can. J. Bot.* 75(3):509-512. Doi 10.1139/b97-055
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F. (2005) Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 67: 135–179. Doi 10.1016/S0070-2153(05)67004-4
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., von Arnold, S. (2002) A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnol. Bioeng.* 77(6):658–667. Doi 10.1002/bit.10228
- Bozhkov, P.V., von Arnold, S. (1998) Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos. *Physiol. Plant.* 104(2):211-224. Doi 10.1034/j.1399-3054.1998.1040209.x
- Bräutigam, K., Vining, K.J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C.G., Mirouze, M., Gutiérrez Marcos, J., Fluch, S., Fernández Fraga, M., Guevara, M.A., Abarca, D., Johnsen,

- Ø., Maury, S., Strauss, S.H., Campbell, M.M., Rohde, A., Díaz-Sala, C., Cervera, M.T. (2013) Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecol. Evol.* 3(2):399-415. Doi 10.1002/ece3.461.
- Bravo, S., Bertín, A., Turner, A., Sepúlveda, F., Jopia, P., Parra, M.J., Castillo, R., Hasbún, R. (2017) Differences in DNA methylation, DNA structure and embryogenesis-related gene expression between embryogenic and non embryogenic lines of *Pinus radiata* D. don. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 130(3):521-529. Doi 10.1007/s11240-017-1242-3
- Breton, D., Harvengt, L., Trontin, J.F., Bouvet, A., Favre, J.M. (2005) High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in maritime pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 41(4):494-503. Doi 10.1079/IVP2005671
- Buitrago Esquinas, M., Abellanas, B., Martín Martín, L.M. (2001) Caracterización de la variabilidad genética, para caracteres métricos en *Pinus pinea* L. *Congreso Forestal Español*, Granada, 633–639. Disponible en: <http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos/article/view/6038/5965>
- Businge, E., Bygdell, J., Wingsle, G., Moritz, T., Egertsdotter, U. (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiol. Plantarum* 149(2):273-285. Doi 10.1111/ppl.12039
- Calama, R., Puértolas, J., Manso, R., Pardos, M. (2015) Defining the optimal regeneration niche for *Pinus pinea* L. through physiology-based models for seedling survival and carbon assimilation. *Trees-Struct. Funct.* 29(6):1761–1771. Doi 10.1007/s00468-015-1257-5
- Carneros, E., Celestino, C., Klimaszewska, K., Park, Y-S., Toribio, M., Bonga, J.M. (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 98(2):165-178. Doi 10.1007/s11240-009-9549-3
- Carneros, E., Toribio, M., Celestino, C. (2017) Effect of ABA, the auxin antagonist PCIB and partial desiccation on stone pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 131(3):445-458. Doi 10.1007/s11240-017-1296-2
- Carrión, J.S., Yll, E.I., Walker, M.J., Legaz, A.J., Chaín, C., López, A. (2003) Glacial refugia of temperate, Mediterranean and Ibero-North African flora in south-

- eastern Spain: new evidence from cave pollen at two Neanderthal man sites. *Ecology*, 12(2):119–129. Doi 10.1046/j.1466-822X.2003.00013.x
- Celestino, C., Carneros, E., Alegre, J., Ruiz-Galea, M., Toribio, M. (2015) Formation of embryogenic-like tissues from mature zygotic embryos of stone pine. Park, Y-S., Bonga, J.M. (eds.) *Proceeding of the 3rd international conference of the IUFRO unit 2.09.02 on Woody plant production integrating genetic and vegetative propagation technologies*, Septiembre 8-12, 2014, Vitoria-Gasteiz, España, 11-21. Disponible en: <http://www.iufro20902.org>
- Cervera, M.T., Ruiz-García, L., Martínez-Zapater, J. (2002) Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Mol. Genet. Genomics* 268(4):543–552. Doi 10.1007/s00438-002-0772-4
- Chakrabarty, D., Yu, K.W., Paek, K.Y. (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Sci.* 165(1):61-68. Doi 10.1016/S0168-9452(03)00127-4
- Cheliak, W.M., Rogers, D.L. (1990) Integrating biotechnology into tree improvement programs. *Can. J. For. Res.* 20(4):452-463. Doi 10.1139/x90-062
- Chen, M., Lv, S., Meng, Y. (2010) Epigenetic performers in plants. *Dev. Growth Differ.* 52(6):555-566. Doi 10.1111/j.1440-169X.2010.01192.x
- Choudhury, H., Tandon, P. (2014) Non-destructive assessment of growth performance of embryogenic suspension culture of *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.) in shake-flask and self-designed bubble bioreactor and successful regeneration of plantlets from the culture systems. *P. Natl. A. Sci. India B* 84(3):771-777. Doi 10.1007/s40011-013-0253-z
- Deb, C.R., Tandon, P. (2004) Establishment of an embryogenic suspension culture of *Pinus kesiya* (Khasi pine) from various explants. *Indian J. Biotechnol.* 3:445–448. Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/5882/1/IJBT%203%283%29%20445-448.pdf>
- dos Santos, A.L.W., Silveira, V., Steiner, N., Maraschin, M., Guerra, M.P. (2010) Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. *Braz Arch Biol Techn.* 53(3):497–504. Doi 10.1590/S1516-89132010000300001

- Durzan, D.J. (2008) Monozygotic cleavage polyembryogenesis and conifer tree improvement. *Cytol. Genet.* 42(3):159–173. Doi 10.3103/S0095452708030031
- Egertsdotter, U., von Arnold, S. (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.* 93(2):334-345. Doi 10.1111/j.1399-3054.1995.tb02237.x
- Egertsdotter, U., von Arnold, S. (1998) Development of somatic embryos in Norway spruce. *J. Exp. Bot.* 49(319):155-162. Doi 10.1093/jxb/49.319.155
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A. (2013) Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 49(6):631-642. Doi 10.1007/s11627-013-9547-3
- Evaristo, I., Batista, D., Correia, I., Correia, P., Costa, R. (2010) Chemical profiling of portuguese *Pinus pinea* L. nuts. *J. Sci. Food Agr.* 90(6):1041–1049. Doi 10.1002/jsfa.3914
- Evaristo, I., Seabra, R.C., Baeta, J., Pais, M.S. (2002) Caracterização molecular de proveniências de *Pinus pinea* L. por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) *Silva Lus.* 10(1):53–61. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/slu/v10n1/10n1a03.pdf>
- Fallour, D., Fady, B., Lefevre, F. (1997) Study of isozyme variation in *Pinus pinea* L.: evidence for low polymorphism. *Silvae Genet.* 46(4):201-207. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/291076890_Study_on_isozyme_variation_in_Pinus_pinea_L_Evidence_for_low_polymorphism
- Fehér, A., Pasternak, T.P., Dudits, D. (2003) Transition to somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74(3):201-228. Doi 10.1023/A:1024033216561
- Filonova, L.H., Bozhkov, P.V., von Arnold, S. (2000) Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J. Exp. Bot.* 51(343):249-264. Doi 10.1093/jexbot/51.343.249
- Find, J.I., Hargreaves, C.L., Reeves, C.B. (2014) Progress towards initiation of somatic embryogenesis from differentiated tissues of radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) using cotyledonary embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 50(2):190-198. Doi 10.1007/s11627-013-9581-1
- Find, J.I., Kristensen, M.M., Nørgaard, J.V., Krogstrup, P. (1998a) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic

- suspension cultures of Norway Spruce and Sitka spruce. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 53(1):27–33. Doi 10.1023/A:1006070729489
- Find, J.I., Nørgaard, J.V., Krogstrup, P. (1998b) Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *J. Plant. Physiol.* 152(4-5):510–517. Doi 10.1016/S0176-1617(98)80271-X
- Finer, J.J., Kriebel, H.B., Becwar, M.R. (1989) Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep.* 8(4):203–206. Doi 10.1007/BF00778532
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J., Dennis, E.S. (1998) DNA methylation in plants. *Annu. Rev. Plant Phys.* 49(1):223-247. Doi 10.1146/annurev.arplant.49.1.223
- Fraga, M.F., Rodríguez, R., Cañal, M.J. (2002) Genomic DNA methylation–demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiol.* 22(11):813–816. Doi 10.1093/treephys/22.11.813
- García, J.P., Navarro-Cerrillo, R.M., Nicolás Peragón, J.L., Prada Sáez, M.A., Serrada Hierro, R. (2012) Series forestal producción y manejo de semillas y plantas forestales. Tomo I. Alimentación y Medio Ambiente. Ministerio de Agricultura. (ed.). Madrid: Organismo autónomo Parques Nacionales, ISBN 978-84-8014-837-5 Disponible en: <http://biblioteca.oapn.es/cgi-bin/koha/opac-MARCdetail.pl?biblionumber=12633>
- García-Mendiguren, O., Montalbán, I.A., Goicoa, T., Ugarte, D., Moncaleán, P. (2016) Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Trees* 30(3):949-958. Doi 10.1007/s00468-015-1336-7
- Garin, E., Bernier-Cardou, M., Isabel, N., Klimaszewska, K., Plourde, A. (2000) Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell Tiss. Organ. Cult.* 62(1):27–37. Doi 10.1023/A:1006402215457
- Garin, E., Isabel, N., Plourde, A. (1998) Screening of large numbers of seed families of *Pinus strobus* L. for somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos. *Plant Cell Rep.* 18(1–2):37–43. Doi 10.1007/s002990050528
- George, E.F. (1993) Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Exegetics Limited, Edington, UK. 322-331. ISBN 0-9509325-4-X

- Gómez, A., Aguiriano, E., Alía, R., Bueno, M.A. (2002) Análisis de los recursos genéticos de *Pinus pinea* L. en España mediante microsatélites del cloroplasto. *For. Syst.* 11(1):145–154. Disponible en: <http://www.inia.es/IASPF/2002/vol11/GOMEZ.PDF>
- Gómez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., García-Barrera, T. (2006) Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A* 1121(2):191–199. Doi 10.1016/j.chroma.2006.04.025
- Gorbatenko, O., Hakman, I. (2001) Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. *Int. J. Plant Sci.* 162(6):1211–1218. Doi 10.1086/323416
- Gordo, F.J. (2004) Selección de grandes productores de fruto de *Pinus pinea* L. en la meseta norte. *Tesis (Doctoral) E.T.S.I. Montes (UPM)*. Disponible en: http://oa.upm.es/179/1/Tesis_Javier_Gordo_Alonso.pdf
- Gordo, J., Mutke, S., Gil, L. (2007) Ausencia de diferenciación ecotípica entre rodales selectos de pino piñonero en la cuenca del Duero. *For. Syst.* 16(3):253–61. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Sven_Mutke/publication/277990004_Ausencia_de_diferenciacion_ecotipica_entre_rodales_selectos_de_pino_pinonero_en_la_cuenca_del_Duero_Absence_of_ecotypic_differentiation_in_Mediterranean_stone_pine_in_a_Spanish_inland_region/links/559e787808aeab53f8fd2f93/Ausencia-de-diferenciacion-ecotipica-entre-rodales-selectos-de-pino-pinonero-en-la-cuenca-del-Duero-Absence-of-ecotypic-differentiation-in-Mediterranean-stone-pine-in-a-Spanish-inland-region.pdf
- Gregory, T.R., Nicol, J.A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I.J., Murray, B.G., Kapraun, D.F., Greilhuber, J., Bennett, M.D. (2006) Eukaryotic genome size databases. *Nucleic acids Res.* 35(suppl_1):D332–D338. Doi 10.1093/nar/gkl828
- Guadaño, C., Iglesias, S., León, D., Arribas, S., Gordo, J., Gil, L., Montero, G., Mutke, S. (2016) Establecimiento de plantaciones clonales de *Pinus pinea* para la producción de piñón mediterráneo. *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria*. Madrid. ISBN: 9788474985658
- Guevara, M.A., de María, N., Sáez-Laguna, E., Vélez, M.D., Cervera, M.T., Cabezas, J.A. (2017) Analysis of DNA cytosine methylation patterns using methylation-

- sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Epigenetics*. Humana Press, Boston, MA. 99-112. Doi 10.1007/978-1-4899-7708-3_9
- Gupta, P.K., Dandekar, A.M., Durzan, D.J. (1988) Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in Douglas fir and loblolly pine protoplasts. *Plant Sci.* 58(1):85-92. Doi 10.1016/0168-9452(88)90157-4)
- Gupta, P.K., Timmis, R. (2005) Mass propagation of conifer trees in liquid cultures-progress towards commercialization. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 81(3):339-346. Doi 10.1007/s11240-004-6654-1
- Häggman, H., Jokela, A., Krajnakova, J., Kauppi, A., Niemi, K., Aronen, T. (1999) Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *J. Exp. Bot.* 50(341):1769-1778. Doi 10.1093/jxb/50.341.1769
- Hakman, I., Fowke, L.C., von Arnold, S., Eriksson, T. (1985) The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway Spruce). *Plant Sci.* 38(1):53–59. Doi 10.1016/0168-9452(85)90079-2
- Hargreaves, C.L., Reeves, C.B., Find, J.I., Gough, K., Josekutty, P., Skudder, D.B., van der Maas, S.A., Sigley, M.R., Menzies, M.I., Low, C.B., Mullin, T.J. (2009) Improving initiation, genotype capture, and family representation in somatic embryogenesis of *Pinus radiata* by a combination of zygotic embryo maturity, media, and explant preparation. *Can. J. For. Res.* 39(8):1566-1574. Doi 10.1139/X09-082
- Hazubska-Przybyl, T., Bojarczuk, K. (2008) Somatic embryogenesis of selected spruce species (*Picea abies*, *P. omorika*, *P. pungens* “glauca” and *P. breweriana*). *Acta Soc. Bot. Poloniae* 77(3):189-199 Disponible en: <https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/article/download/asbp.2008.023/256>
- Helmersson, A., von Arnold, S. (2009) Embryogenic cell lines of *Juniperus communis*; easy establishment and embryo maturation, limited germination. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96(2):211-217. Doi 10.1007/s11240-008-9477-7
- Henderson, I.R., Jacobsen, S.E. (2007) Epigenetic Inheritance in Plants. *Nature* 447(7143):418–424. Doi 0.1038/nature05917

- Hohtola, A. (1995) Somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) Jain, S., Gupta, P.K., Newton, R.J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants. For. Sci.* 44-46:269-285. Doi 10.1007/978-94-011-0960-4_17
- Hřib, J., Vooková, B., Neděla, V. (2015) Imaging of native early embryogenic tissue of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by ESEM. *Open Life Sci.* 10(1):285–290. Doi 10.1515/biol-2015-0028
- Humánez, A., Blasco, M., Brisa, C., Segura, J., Arrillaga, I. (2012) Somatic embryogenesis from different tissues of Spanish populations of maritime pine. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 111(3):373-383. Doi 10.1007/s11240-012-0203-0
- Ibaraki, Y., Kurata, K. (2001) Automation of somatic embryo production. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 65(3):179-199. Doi 10.1023/A:1010636525315
- Iglesias, S., León, D., Guadaño, C., Gordo, J., Mutke, S. (2015) Nuevas perspectivas en los aprovechamientos del pino piñonero. Plantaciones con clones obtenidos en el programa de mejora genética forestal para la producción de piñón. *Foresta*, 18–23. Disponible en: <http://www.forestales.net/Canales/Ficha.aspx?IdMenu=B6947309-987F-4BFF-808D-4E7E974CCAF8&Cod=84A4A7E2-FE6C-4580-AF5C-DAE54AFF7BA9&Idioma=es-ES>
- Ingram, B., Mavituna, F. (2000) Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 61(2):87-96. Doi10.1023/A:1006333907907
- Iraqi, D., Tremblay, F.M. (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J. Exp. Bot.* 52(365):2301–2311. Doi 10.1093/jexbot/52.365.2301
- Jiménez, J.A., Alonso-Blázquez, N., López-Vela, D., Celestino, C., Toribio, M., Alegre, J. (2011) Influence of culture vessel characteristics and agitation rate on gaseous exchange, hydrodynamic stress and growth of embryogenic cork oak (*Quercus suber* L.) cultures. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 47(5):578-588. Doi 10.1007/s11627-011-9399-7
- Jiménez, V.M. (2005) Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47(2-3):91-110. Doi 10.1007/s10725-005-3478-x

- Jiménez, V.M., Bangerth, F. (2001) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol. Plantarum* 111(3):389- 395. Doi 10.1034/j.1399-3054.2001.1110317.x
- Johnsen, Ø., Dæhlen, O.G., Østreng, G., Skråppa, T. (2005) Daylength and temperature during seed production interactively affect adaptive performance of *Picea abies* progenies. *New Phytol.* 168(3):589-596. Doi 10.1111/j.1469-8137.2005.01538.x
- Kaeppler, S., Kaeppler, H.F., Rhee, Y. (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol. Biol.* 43(2-3):179-188. Doi 10.1023/A:1006423110134
- Kaul, K. (1995) Somatic embryogenesis in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). Jain, S., Gupta, P., Newton, R. (eds). *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 3:257–268. Doi 10.1007/978-94-011-0960-4_16
- Keyte, A.L., Percifield, R., Liu, B., Wendel, J.F. (2006) Intraspecific DNA methylation polymorphism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Hered.* 97(5):444-450. Doi 10.1093/jhered/esl023
- Klimaszewska, K., Bernier-Cardou, M., Cyr, D.R., Sutton, B.C.S. (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(4):279-286. Doi 10.1007/s11627-000-0051-1
- Klimaszewska, K., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M.A., Trontin, J.F. (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. *In vitro embryogenesis in higher plants*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, 1359:131-166. Doi: 10.1007/978-1-4939-3061-6-7
- Klimaszewska, K., Noceda, C., Pelletier, G., Label, P., Rodriguez, R., Lelu-Walter, M.A. (2009) Biological characterization of young and aged embryogenic cultures of *Pinus pinaster* (Ait.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 45(1):20-33. Doi 10.1007/s11627-008-9158-6
- Klimaszewska, K., Trontin, J.F., Becwar, M., Devillard, C., Park, Y-S., Lelu-Walter, M.A. (2007) Recent progress on somatic embryogenesis in four *Pinus* spp. *Tree For Sci Biotechnol.* 1(1):11-25. Disponible en: <http://www.cfs.nrcan.gc.ca/pubwarehouse/pdfs/28122.pdf>
- Klößner, W., Büchs, J. (2012) Advances in shaking technologies. *Trends Biotechnol.* 30(6):307–314. Doi 10.1016/j.tibtech.2012.03.001

- Kong, L., Attree, S.M., Fowke, L.C. (1997) Changes in endogenous hormone levels in developing seeds, zygotic embryos and megagametophytes in *Picea glauca*. *Physiol. Plant.* 101(1):23-30. Doi 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01815.x
- Kong, L., von Aderkas, P. (2011) A novel method of cryopreservation without a cryoprotectant for immature somatic embryos of conifer. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106(1):115-125. Doi 10.1007/s11240-010-9899-x
- Kovalchuk, O., Burke, P., Arkhipov, A., Kuchma, N., James, S.J., Kovalchuk, I., Pogribny, I. (2003) Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of Chernobyl – a mechanism for radiation adaptation? *Mutat. Res.* 529(1):13–20. Doi 10.1016/S0027-5107(03)00103-9
- Krogstrup, P. (1990) Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. *Plant Sci.* 72(1):115–123. Doi 10.1016/0168-9452(90)90193-R
- Kubeš, M., Drážná, N., Konrádová, H., Lipavská, H. (2014) Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 50(1):45–57. Doi 10.1007/s11627-013-9589-6
- Kvaalen, H., Johnsen, Ø. (2008) Timing of bud set in *Picea abies* is regulated by a memory of temperature during zygotic and somatic embryogenesis. *New Phytol.* 177(1):49-59. Doi 10.1111/j.1469-8137.2007.02222.x
- Lara-Chavez, A., Egertsdotter, U., Flinn, B.S. (2012) Comparison of gene expression markers during zygotic and somatic embryogenesis in pine. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 48(3):341-354. Doi 10.1007/s11627-012-9440-5
- Lelu, M.A., Bastien, C., Dugeault, A., Gouez, M.L., Klimaszewska, K. (1999) Somatic embryogenesis and plantlet development in *Pinus sylvestris* and *Pinus pinaster* on medium with and without growth regulators. *Physiol. Plantarum*, 105(4):719-728. Doi 10.1034/j.1399-3054.1999.105417.x
- Lelu, M.A., Klimaszewska, K., Charest, P.J. (1994) Somatic embryogenesis from immature and mature zygotic embryos and from cotyledons and needles of somatic plantlets of *Larix*. *Can. J. Forest. Res.* 24(1):100-106. Doi 10.1139/x94-015
- Lelu-Walter, M.A., Bernier-Cardou, M., Klimaszewska, K. (2008) Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.)

- through somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92(1):31-45. Doi 10.1007/s11240-007-9300-x
- Lelu-Walter, M.A., Gautier, F., Eliášová, K., Sanchez, L., Teyssier, C., Lomenech, A.M., Le Metté, C., Hargreaves, C., Trontin, J.F., Reeves, C. (2018) High gellan gum concentration and secondary somatic embryogenesis: two key factors to improve somatic embryo development in *Pseudotsuga menziesii* [Mirb.]. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 132(1):137-155. Doi 10.1007/s11240-017-1318-0
- Lelu-Walter, M.A., Klimaszewska, K., Miguel, C., Aronen, T., Hargreaves, C., Teyssier, C., Trontin, J.F. (2016) Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus* spp.: bottlenecks and recent advances. Loyola, V., Ochoa-Alejo, N. (eds). *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Springer, Cham. 319-365. Doi 10.1007/978-3-319-33705-0_19
- Lelu-Walter, M.A., Thompson, D., Harvengt, L., Sanchez, L., Toribio, M., Pâques, L.E. (2013) Somatic embryogenesis in forestry with a focus on Europe: state-of-the-art, benefits, challenges and future direction. *Tree Genet. Genomes* 9(4):883-899. Doi 10.1007/s11295-013-0620-1
- Li, X., Huang, F., Gbur, E. (1998a) Effect of basal medium, growth regulators and Phytigel concentration on initiation of embryogenic cultures from immature zygotic embryos of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Cell Rep.* 17(4):298-301. Doi 10.1007/s002990050396
- Li, X.Y., Huang, F.H., Murphy, J.B., Gbur, E.E. (1998b) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 34(1):22-26. Doi 10.1007/BF02823118
- Li, Y., Shan, X., Liu, X., Hu, L., Guo, W., Liu, B. (2008) Utility of the methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker for detection of DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*). *Ecol. Res.* 23(5):927-930. Doi 10.1007/s11284-007-0459-8
- Linacero, R., Rueda, J., Esquivel, E., Bellido, A., Domingo, A., Vázquez, A.M. (2011) Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 47(5):618-628. Doi 10.1007/s11627-011-9407-y

- Lipavská, H., Konrádová, H. (2004) Invited review: somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40(1):23-30. Doi 10.1079/IVP2003482
- Lira-Medeiros, C.F., Parisod, C., Fernandes, R.A., Mata, C.S., Cardoso, M.A., Ferreira, P.C.G. (2010) Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PLoS One* 5(4):e10326. Doi 10.1371/journal.pone.0010326
- Litvay, J.D., Verma, D.C., Johnson, M.A. (1985) Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep.* 4(6):325-328. Doi 10.1007/BF00269890
- Loewe, M.V., Delard, R.C. (2012) Un nuevo cultivo para Chile, el pino piñonero (*Pinus pinea* L.) Santiago de Chile: Instituto Forestal. ISBN: 9789563180671
- Loewe, M.V., Delard, R.C. (2016) Producción de piñón mediterráneo (*Pinus pinea* L.) Santiago de Chile: INFOR-FONDEF. ISBN: 9789563181210
- Loewus, F.A., Murthy, P.P.N. (2000) *myo*-Inositol metabolism in plants. *Plant Sci.* 150(1):1-19. Doi 10.1016/S0168-9452(99)00150-8
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S., Terzi, M. (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.* 77(3):325–331 Doi 10.1007/BF00305823
- MacKay, J.J., Becwar, M.R., Park, Y-S., Cordero, J.P., Pullman, G.S. (2006) Genetic control of somatic embryogenesis initiation in loblolly pine and implications for breeding. *Tree Genet. Genomes* 2(1):1-9. Doi 10.1007/s11295-005-0020-2
- Mahdavi-Darvari, F., Noor, N.M., Ismanizan, I. (2015) Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 120(2):407-422. Doi 10.1007/s11240-014-0615-0
- Mallón, R., Martínez, T., Corredoira, E., Vieitez, A.M. (2013) The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees* 27(5):1285-1296. Doi 10.1007/s00468-013-0877-x
- Marino, G., Berardi, G., Ancherani, M. (1995) The effect of the type of closure on the gas composition of the headspace and the growth of GF 677 peach × almond

- rootstock cell suspension cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 31(4):207–210. Doi 10.1007/BF02632023
- Martienssen, R.A., Doerge, R.W., Colot, V. (2005) Epigenomic mapping in *Arabidopsis* using tiling microarrays. *Chromosome Res.* 13(3):299-308. Doi 10.1007/s10577-005-1507-2
- Martínez, F., Montero, G. (2004) The *Pinus pinea* L. woodlands along the coast of southwestern Spain: data for a new geobotanical interpretation. *Plant Ecol.* 175(1):1–18. Doi 10.1023/B:VEGE.0000048087.73092.6a
- Maruyama, T.E., Hosoi, Y. (2012) Post-maturation treatment improves and synchronizes somatic embryo germination of three species of Japanese pines. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 110(1):45-52. Doi 10.1007/s11240-012-0128-7
- Miguel, C., Gonçalves, S., Tereso, S., Marum, L., Maroco, J., Oliveira, M. (2004) Somatic embryogenesis from 20 open-pollinated families of Portuguese plus trees of maritime pine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76(2):121-130. Doi 10.1023/B:TICU.00000007253.91771.e3
- Miguel, C., Marum, L. (2011) An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. *J. Exp. Bot.* 62(11):3713–3725. Doi 10.1093/jxb/err155
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T-K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., Bernstein, B.E. (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448(7153):553-560. Doi 10.1038/nature06008
- Mlynárová, L., Nap, J.P., Bisseling, T. (2007) The SWI/SNF chromatin-remodeling gene AtCHR12 mediates temporary growth arrest in *Arabidopsis thaliana* upon perceiving environmental stress. *The Plant Journal* 51(5):874-885. Doi 10.1111/j.1365-313X.2007.03185.x
- Montalbán, I.A., de Diego, N., Moncaleán, P. (2012) Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustments. *Acta Physiol. Plant.* 34(2):451–460. Doi 10.1007/s11738-011-0841-6

- Montalbán, I.A., García-Mendiguren, O., Goicoa, T., Ugarte, M.D., Moncaleán, P. (2015) Cold storage of initial plant material affects positively somatic embryogenesis in *Pinus radiata*. *New Forest* 46(2):309-317. Doi 10.1007/s11056-014-9457-1
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C. (2013) Tabla de composición de alimentos 16ª Edición Pirámide. ISBN: 9788436829037
- Morel, A., Trontin, J.F., Corbineau, F., Lomenech, A.M., Beaufour, M., Reymond, I., Le Metté, C., Ader, K., Harvengt, L., Cadene, M., Label, P., Teyssier, C., Lelu-Walter, M.A. (2014) Cotyledonary somatic embryos of *Pinus pinaster* Ait. most closely resemble fresh, maturing cotyledonary zygotic embryos: biological, carbohydrate and proteomic analyses. *Planta* 240(5):1075-1095. Doi 10.1007/s00425-014-2125-z
- Mustafa, N.R., de Winter, W., van Iren, F., Verpoorte, R. (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc.* 6(6):715–742. Doi 10.1038/nprot.2010.144
- Mutke, S. (2000) Fenología de *Pinus pinea* L. en un banco clonal (Valladolid). *Tesis (Doctoral) Universidad de Valladolid*. Disponible en: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/13253>
- Mutke, S., Calama, R., Nasrallah Neaymeh, E., Roques, A. (2017) Impact of the dry cone syndrome on commercial kernel yield of stone pine cones. Carrasquinho, I., Correia, A.C., Mutke, S. (eds.). *Mediterranean pine nuts from forests and plantations*. Zaragoza: CIHEAM, 79-84 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 122) Disponible en: <http://om.ciheam.org/om/pdf/a122/00007245.pdf>
- Mutke, S., Gordo, J., Chambel, M.R., Prada, M.A., Álvarez, D., Iglesias, S., Gil, L. (2010) Phenotypic plasticity is stronger than adaptative differentiation among mediterranean stone pine provenances. *Forest Syst* 19(3):354–66. Doi 10.5424/fs/2010193-9097
- Mutke, S., Gordo J., Gil, L. (2005a) Cone yield characterization of a stone pine (*Pinus pinea* L.) clone bank. *Silvae Genet.* 54(1-6):189–197. Doi 10.1515/sg-2005-0028
- Mutke, S., Gordo, J., Gil, L. (2005b) Variability of Mediterranean Stone pine cone production: Yield loss as response to climate change. *Agr. Forest. Meteorol.* 132(3-4):263-272. Doi 10.1016/j.agrformet.2005.08.002
- Mutke Regneri, S., Sada Arias, B., Iglesias Sauce, S., Gil Sánchez, L. (2003) Evaluación de la producción individual de piña en un banco clonal de pino piñonero (*Pinus*

- pinæ* L.) en Madrid. *Invest. Agrar.:Sist. Recur. For.* 12(1):149-157. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Sven_Mutke/publication/28061991_Evaluacion_de_la_produccion_individual_de_pina_en_un_banco_clonal_de_pino_pino_nero_Pinus_pinæ_L_en_Madrid/links/02bfe50f2629914b17000000.pdf
- Nasri, N., Khaldi, A., Fady, B., Triki, S. (2005) Fatty acids from seeds of *Pinus pinæ* L.: composition and population profiling. *Phytochemistry* 66(14):1729–1735. Doi 10.1016/j.phytochem.2005.05.023
- Neděla, V., Hřib, J., Havel, L., Hudec, J., Runštuk, J. (2016) Imaging of Norway spruce early somatic embryos with the ESEM, Cryo-SEM and laser scanning microscope. *Micron* 84:67–71. Doi 10.1016/j.micron.2016.02.011
- Nehra, N.S., Becwar, M.R., Rottman, W.H., Pearson, L., Chowdhury, K., Ghang, S.J., Wilde, H.D., Kodrzycki, R.J., Zhang, C.S., Gause, K.C., Parks, D.W., Hinchey, M.A. (2005) Forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41(6):701-717. Doi 10.1079/IVP2005691
- Neilson, K.A., Gammulla, C.G., Mirzaei, M., Imin, N., Haynes, P.A. (2010) Proteomic analysis of temperature stress in plants. *Proteomics* 10(4):828–845. Doi 10.1002/pmic.200900538
- Niskanen, A.M., Lu, J., Seitz, S., Keinonen, K., von Weissenberg, K., Pappinen, A. (2004) Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Tree Physiol.* 24(11):1259-1265. Doi 10.1093/treephys/24.11.1259
- Noceda, C., Salaj, T., Pérez, M., Viejo, M., Cañal, M.J., Salaj, J., Rodríguez, R. (2009) DNA methylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees* 23(6):1285-1293. Doi 10.1007/s00468-009-0370-8
- Nystedt, B., Street, N.R., Wetterbom, A., Zuccolo, A., Lin, Y.C., Scofield, D.G., Vezzi, F., Delhomme, N., Giacomello, S., Alexeyenko, A., Vicedomini, R., Sahlin, K., Sherwood, E., Elfstrand, M., Gramzow, L., Holmberg, K., Hällman, J., Keech, O., Klasson, L., Koriabine, M., Kucukoglu, M., Käller, M., Luthman, J., Lysholm, F., Niittylä, T., Olson, Å., Rilakovic, N., Ritland, C., Rosselló, J.A., Sena, J., Svensson, T., Talavera-López, C., Theißen, G., Tuominen, H., Vanneste, K., Wu, Z-Q., Zhang, B., Zerbe, P., Arvestad, L., Bhalerao, R., Bohlmann, J., Bousquet, J., Garcia Gil, R., Hvidsten, T.R., de Jong, P., MacKay, J., Morgante, M., Ritland, K., Sundberg, B., Lee Thompson, S., Van de Peer, Y., Andersson, B., Nilsson, O.,

- Ingvarsson, P.K., Lundeberg, J., Jansson, S. (2013) The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* 497:579-584. Doi 10.1038/nature12211
- Owens, L.D., Wozniak, C.A. (1991) Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 26(2):127-133. Doi 10.1007/BF00036116
- Park, Y-S. (2002) Implementation of conifer somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirements and deployment considerations. *Ann. For. Sci.* 59(5-6):651-656. Doi 10.1051/forest:2002051
- Park, Y-S. (2004) Commercial implementation of multi-varietal forestry using conifer somatic embryogenesis. *Proc. IUFRO joint Conf. of Div. 2, Forest Genetics and Tree breeding in the Age of Genomics: Progress and future*. Canadian Forest Service, Atlantic Forestry Centre. Charleston, SC. Nov. 1-5, 139
- Park, Y-S. (2014) Challenges and opportunities for the World's forests in the 21st Century Trevor Fenning (ed). 81:425–439. Doi 10.1007/978-94-007-7076-8
- Park, Y-S., Bonga, J.M. (2011) Application of somatic embryogenesis in forest management and research. Park, Y-S., Bonga, J.M., Park, S.Y., Moon, H.K. (eds). *Advances in somatic embryogenesis in trees and its application for the future forests and plantations. Proc. IUFRO Working Party 2.09.02 conference*. August 19-21, Suwon, Republic of Korea. 3-8. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jesus_Alegre2/publication/269333361_Propagation_of_Cork_Oak_Selected_Trees_by_Somatic_Embryogenesis_from_Solid_to_Liquid_Medium/links/5486f4530cf268d28f06f465.pdf#page=16
- Park, Y-S., Lelu-Walter, M.A., Harvengt, L., Trontin, J.F., MacEachern, I., Klimaszewska, K., Bonga, J.M. (2006) Initiation of somatic embryogenesis in *Pinus banksiana*, *P. strobus*, *P. pinaster* and *P. sylvestris* at three laboratories in Canada and France. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86(1):87-101. Doi 10.1007/s11240-006-9101-7
- Peakall, R., Smouse, P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539. Doi 10.1093/bioinformatics/bts460
- Percy, R.E., Klimaszewska, K., Cyr, D.R. (2000) Evaluation of somatic embryogenesis for clonal propagation of western white pine. *Can. J. For. Res.* 30(12):1867-1876. Doi 10.1139/x00-115

- Perdiguero, P., Soto, A., Collada, C. (2015) Comparative analysis of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* dehydrins under drought stress. *Tree Genet. Genomes* 11(4):70. Doi 10.1007/s11295-015-0899-1
- Petrek, J., Zitka, O., Adam, V., Bartusek, K., Anjum, N.A., Pereira, E., Havel, L., Kizek, R. (2015) Are early somatic embryos of the Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) organised? *Plos One* 10(12):e0144093. Doi 10.1371/journal.pone.0144093
- Pilarska, M., Knox, J.P., Konieczny, R. (2013) Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 115(1):35–44. Doi 10.1007/s11240-013-0337-8
- Pinzauti, F., Sebastiani, F., Budde, K.B., Fady, B., González-Martínez, S.C., Vendramin, G.G. (2012) Nuclear microsatellites for *Pinus pinea* (*Pinaceae*), a genetically depauperate tree, and their transferability to *P. halepensis*. *Am. J. Bot.* 99(9). Doi 10.3732/ajb.1200064
- Prada, M., Gordo, J., Miguel, J. de, Mutke, S., Catalán-Bachiller, G., Iglesias, S., Gil, L. (1997) Las regiones de procedencia de *Pinus pinea* L. en España. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid: *Organismo Autónomo Parques Nacionales*, 109 ISBN, 84-8014-193-X
- Preil, W. (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. Hvoslef-Eide, A.K., Preil, W. (eds). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant propagation*. Springer, Dordrecht, 1-18. Doi 10.1007/1-4020-3200-5_1
- Prem, D., Solís, M-T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueño, M.C., Testillano, P.S. (2012) A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biol.* 12(1):127. Doi 10.1186/1471-2229-12-127
- Pullman, G. S., Bucalo, K. (2011) Pine somatic embryogenesis using zygotic embryos as explants. *Plant Embryo Culture*. Methods in Molecular Biology. Humana Press. 710:267-291. Doi 10.1007/978-1-61737-988-8_19
- Pullman, G.S., Bucalo, K. (2014) Pine somatic embryogenesis: analyses of seed tissue and medium to improve protocol development. *New Forest.* 45(3):353-377. Doi 10.1007/s11056-014-9407-y

- Pullman, G.S., Buchanan, M. (2003) Loblolly pine (*Pinus taeda* L.): stage-specific elemental analyses of zygotic embryo and female gametophyte tissue. *Plant Sci.* 164(6):943-954. Doi 10.1016/S0168-9452(03)00080-3
- Pullman, G.S., Johnson, S. (2002) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Ann. For. Sci.* 59(5-6):663-668. Doi 10.1051/forest:2002053
- Pullman, G.S., Johnson, S., Peter, G., Cairney, J., Xu, N. (2003a) Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Rep.* 21(8):747-758. Doi 10.1007/s00299-003-0586-9
- Pullman, G.S., Johnson, S., van Tassel, S., Zhang, Y. (2005) Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda*) and Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*): improving culture initiation and growth with MES pH buffer, biotin, and folic acid. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 80(1):91-103. Doi 10.1007/s11240-004-9099-7
- Pullman, G.S., Skryabina, A. (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep.* 26(7):873-887. Doi 10.1007/s00299-006-0296-1
- Pullman, G.S., Zhang, Y., Phan, B.H. (2003b) Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Rep.* 22(2):96-104. Doi 10.1007/s00299-003-0674-x
- Quiroz-Figueroa, F.R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R.M., Loyola-Vargas, V.M. (2006) Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 86(3):285-301. Doi 10.1007/s11240-006-9139-6
- Raemarkers, C.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. (1995) Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica* 81(1):93-107. Doi 10.1007/BF00022463
- Rai, M.K., Shekhawat, N. S., Gupta, A. K., Phulwaria, M., Ram, K., Jaiswal, U. (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106(2):179-190. Doi 10.1007/s11240-011-9923-9
- Ramarosandratana, A., Harvengt, L., Bouvet, A., Calvayrac, R., Pâques, M. (2001) Effects of carbohydrate source, polyethylene glycol and gellan gum concentration on embryonal-suspensor mass (ESM) proliferation and maturation of maritime

- pine somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37(1):29-34. Doi 10.1007/s11627-001-0006-1
- Ramarosandratana, A., Van Staden, J. (2005) Changes in competence for somatic embryogenesis in Norway spruce zygotic embryo segments. *J. Plant Physiol.* 162(5):583-588. Doi 10.1016/j.jplph.2004.10.014
- Rapp, R.A., Wendel, J.F. (2005) Epigenetics and Plant Evolution. *New Phytol.* 168(1):81–91. Doi 10.1111/j.1469-8137.2005.01491.x
- Richards, C.L., Bossdorf, O., Verhoeven, K.J.F. (2010) Understanding natural epigenetic variation. *New Phytol.* 187(3):562–564. Doi 10.1111/j.1469-8137.2010.03369.x
- Rico, L., Ogaya, R., Barbeta, A., Peñuelas, J. (2014) Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biol.* 16(2):419–27 Doi 10.1111/plb.12049
- Robinson, R.A., Dauwe, R., Ukrainetz, N.K., Cullis, I.F., White, R., Shawn, D., Mansfield, S.D. (2009) Predicting the regenerative capacity of conifer somatic embryogenic cultures by metabolomics. *Plant Biotech. J.* 7(9):952-963. Doi 10.1111/j.1467-7652.2009.00456.x
- Rutledge, R.G., Stewart, D., Caron, S., Overton, C., Boyle, B., MacKay, J., Klimaszewska, K. (2013) Potential link between biotic defense activation and recalcitrance to induction of somatic embryogenesis in shoot primordial from adult trees of white spruce (*Picea glauca*). *BMC Plant Biol.* 13(1):116. Doi 10.1186/1471-2229-13-116
- Sáez-Laguna, E., Guevara, M.A., Díaz, L.M., Sánchez-Gómez, D., Collada, C., Aranda, I., Cervera, M.T. (2014) Epigenetic variability in the genetically uniform forest tree species *Pinus pinea* L. *PLOS one* 9(8):e103145. Doi 10.1371/journal.pone.0103145
- Salaj, T., Blehova, A., Salaj, J. (2007) Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiol. Plant* 29(3):225–231. Doi 10.1007/s11738-007-0028-3
- Salaj, T., Moravcikova, J., Salaj, J. (2005) Somatic Embryogenesis in *Pinus nigra* Arn.: Some Physiological, Structural and Molecular Aspects. Mujib, A., Šamaj, J. (eds). *Somatic Embryogenesis*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2:141-156 Doi 10.1007/7089_023

- Salaj, T., Salaj, J. (2003) Somatic embryos formation on mature *Abies alba* x *Abies cephalonica* zygotic embryo explants. *Biol. Plantarum* 47(1):7-11. Doi 10.1023/A:1027312410957
- Salajová, T., Salaj, J. (2001) Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cotyledon explants isolated from embling and seedlings of hybrid firs. *J. Plant Physiol.* 158(6):747-755. Doi 10.1078/0176-1617-00278
- Salajová, T., Salaj, J., Jasik, J., Kormutak, A. (1995) Somatic embryogenesis in *Pinus nigra* Arn. Jain, S., Gupta, P.K., Newton, R.J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants. For. Sci.* 44-46:207-220. Doi 10.1007/978-94-011-0960-4_13
- Salmon, A., Clotault, J., Jenczewski, E., Chable, V., Manzanares-Dauleux, M.J. (2008) *Brassica oleracea* displays a high level of DNA methylation polymorphism. *Plant Sci.* 174(1):61-70. Doi 10.1016/j.plantsci.2007.09.012
- Saly, S., Joseph, C., Corbineau, F., Lelu, M.A., Côme, D. (2002) Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. *Plant Growth Regul.* 37(3): 287-294. Doi 10.1023/A:1020856112765
- Sánchez, G., Herrero, N., Aguado, A., León, D., Pérez, F., González, E. (2013) Seguimiento de *Leptoglossus occidentalis* (Heidemann, 1910) en la Red de Centros Nacionales de Recursos Genéticos Forestales del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 6º Congreso Forestal Español. Sociedad Española de Ciencias Forestales. Abstract book 2-12, 6CFE01-388. Vitoria-Gasteiz, Disponible en: <http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos/article/download/10708/10612>.
- Sánchez-Gómez, D., Velasco-Conde, T., Cano-Martín, F.J., Guevara, M.A., Cervera, M.T., Aranda, I. (2011) Inter-clonal variation in functional traits in response to drought for a genetically homogeneous Mediterranean conifer. *Environ. Exp. Bot.* 70(2-3), 104-109. Doi 10.1016/j.envexpbot.2010.08.007
- Santos, D., Fevereço, P. (2002) Loss of DNA methylation affects somatic embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 70(2):155–161. Doi 10.1023/A:1016369921067
- Schripsema, J., Meijer, A.H., van Iren, F., ten Hoopen, H.J.G., Verpoorte, R. (1990) Dissimilation curves as a simple method for the characterization of growth of plant cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 22(1):55–64. Doi 10.1007/BF00043699

- Schulz, B., Eckstein, R.L., Durka, W. (2013) Scoring and analysis of methylation-sensitive amplification polymorphisms for epigenetic population studies. *Mol. Ecol. Resour.* 13(4):642-653. Doi 10.1111/1755-0998.12100
- Silveira, V., Floh, E.I.S., Handro, W., Guerra, M.P. (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. Organ Cult.* 76(1):53–60. Doi 10.1023/A:102584751
- Stasolla, C., Bozhkov, P.V., Chu, T-M., van Zyl, L., Egertsdotter, U., Suarez, M.F., Craig, D., Wolfinger, R.D., von Arnold, S., Sederoff, R.D. (2004) Variation in transcript abundance during somatic embryogenesis in gymnosperms. *Tree Physiol.* 24(10):1073–1085. Doi 10.1093/treephys/24.10.1073
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E.C., Thorpe, T.A. (2002) Maturation of somatic embryos in conifers: morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 38(2):93-105. Doi 10.1079/IVP2001262
- Stasolla, C., Yeung, E.C. (2003) Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74(1):15-35. Doi 10.1023/A:1023345803336
- Steensel, B. van, Henikoff, S. (2003) Epigenomic profiling using microarrays. *Biotechniques* 35(2):346-357. Disponible en: www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/03352rv01_11650a.pdf
- Strong, W.B. (2006) Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can. Entomol.* 138(6):888-896. Doi 10.4039/n05-092
- Sun, H., Aidun, C.K., Egertsdotter, U. (2010) Effects from shear stress on morphology and growth of early stages of Norway spruce somatic embryos. *Biotechnol. Bioeng.* 105(3):588-598. Doi 10.1002/bit.22554
- Sun, H., Aidun, C.K., Egertsdotter, U. (2011) Possible effect from shear stress on maturation of somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). *Biotechnol. Bioeng.* 108(5):1089–1099. Doi 10.1002/bit.23040
- Sung, S., Amasino, R.M. (2004) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(1):4-10 Doi 10.1016/j.pbi.2003.11.010
- Sutton, B. (2002) Commercial delivery of genetic improvement to conifer plantations using somatic embryogenesis. *Ann. For. Sci.* 59(5-6):657-66. Doi 10.1051/forest:2002052

- Szczygiel, K., Hazubska-Przybyl, T., Bojarczuk, K. (2007) Somatic embryogenesis of selected coniferous tree species of the genera *Picea*, *Abies*, and *Larix*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 76(1):7-15. Disponible en: <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-article-6260fe36-84dc-4e85-b07d-71e9021f3649>
- Tang, W., Guo, Z., Ouyang, F. (2001) Plant regeneration from embryogenic cultures initiated from mature loblolly pine zygotic embryos. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 37(5): 558-563. Doi 10.1007/s11627-001-0097-8
- Tariq, M., Paszkowski, J. (2004) DNA and histone methylation in plants. *Trends Genet.* 20(6):244-251. Doi 10.1016/j.tig.2004.04.005
- Tautorus, T.E., Fowke, L.C., Dunstan, D.I. (1991) Somatic embryogenesis in conifers. *Can. J. Bot.* 69(9):1873-1899. Doi 10.1139/b91-237
- Tautorus, T.E., Lulsdorf, M.M., Kikcio, S.I., Dunstan, D.I. (1992) Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. (black spruce) and the species complex *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38(1): 46–51. Doi 10.1007/BF00169417
- Tautorus, T.E., Lulsdorf, M.M., Kikcio, S.I., Dunstan, D.I. (1994) Nutrient utilization during bioreactor culture, and maturation of somatic embryo cultures of *Picea mariana* and *Picea glauca-engelmannii*. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 30(1):58-63. Doi 10.1007/BF02632121
- Tereso, S., Zoglauer, K., Milhinhos, A., Miguel, C., Oliveira, M.M. (2007) Zygotic and somatic embryo morphogenesis in *Pinus pinaster*: comparative histological and histochemical study. *Tree Physiol.* 27(5):661-669. Doi 10.1093/treephys/27.5.661
- Teyssier, C., Grondin, C., Bonhomme, L., Lomenech, A.M., Vallance, M., Morabito, D., Label, P., Lelu-Walter, M.A. (2011) Increased gelling agent concentration promotes somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix x eurolepsis*): a 2-DE proteomic analysis. *Physiol. Plantarum* 141(2):152-165. Doi 10.1111/j.1399-3054.2010.01423.x
- Timmis, R. (1998) Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnol. Prog.* 14(1):156-166. Doi 10.1021/bp970143y
- Tremblay, L., Tremblay, F.M. (1991) Carbohydrate requirements for the development of black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) and red spruce (*P. rubens* Sarg.)

- somatic embryos. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 27(1):95-103. Doi 10.1007/BF00048213
- Trontin, J.F., Klimaszewska, K., Morel, A., Hargreaves, C., Lelu-Walter, M.A. (2016a) Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: a review of genome-wide approaches and recent insights. Germana, M., Lambardi, M. (eds). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Methods in Molecular Biology 1359:167-207. Doi 10.1007/978-1-4939-3061-6_8
- Trontin, J.F., Teyssier, C., Morel, A., Harvengt, L., Lelu-Walter, M.A. (2016b) Prospects for new variety deployment through somatic embryogenesis in maritime pine. Park, Y-S., Bonga, J.M., Moon, H.K. (eds). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea, 572-606. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Marie_Anne_Lelu-Walter/publication/299471268_Prospects_for_new_variety_deployment_through_somatic_embryogenesis_in_maritime_pine/links/56fa7a8508aeb8947e82a22c.pdf
- Turner, B.M. (2000) Histone acetylation and an epigenetic code. *Bioessays*. 22(9):836-845. Doi 10.1002/1521-1878(200009)22:9<836::AID-BIES9>3.0.CO;2-X
- Umehara, M., Ogita, S., Sasamoto, H., Kamada, H. (2004) Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of Japanese larch (*Larix leptolepis* GORDON). *Plant Biotechnol.* 21(2):87–94. Doi 10.5511/plantbiotechnology.21.87
- Valdivieso, T., Pimpão, M., Trindade, C.S., Varela, M.C. (2017) Reproductive phenology of *Pinus pinea*. Carrasquinho, I., Correia, A.C., Mutke, S. (eds). *Mediterranean pine nuts from forests and plantations*. Zaragoza CIHEAM. 63-68 (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 122) Disponible en: <http://om.ciheam.org/om/pdf/a122/00007243.pdf>
- Valledor, L., Meijón, M., Hasbún, R., Cañal, M.J., Rodríguez, R. (2010) Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *J. Plant Physiol.* 167(5):351–57. Doi 10.1016/j.jplph.2009.09.018
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J.L., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M.F., Cañal, M.J., Rodríguez, R. (2007) Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 91(2):75-86. Doi 10.1007/s11240-007-9262-z

- Vendramin, G.G., Fady, B., González-Martínez, S.C., Hu, F.S., Scotti, I., Sebastiani, F., Soto, A., Petit, R.J. (2008) Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic mediterranean pine. *Evolution* 62(3):680-688. Doi 10.1111/j.1558-5646.2007.00294.x
- Vooková, B., Kormuták, A. (2006) Comparison of induction frequency, maturation capacity and germination of *Abies numidica* during secondary somatic embryogenesis. *Biol. Plantarum* 50(4):785-788. Doi 10.1007/s10535-006-0132-z
- Vooková, B., Matúšová, R., Kormuták, A. (2003) Secondary somatic embryogenesis in *Abies numidica*. *Biol. Plantarum* 46(4):513-517. Doi 10.1023/A:1024899124774
- Vuosku, J., Sutela, S., Tillman-Sutela, E., Kauppi, A., Jokela, A., Sarjala, T., Häggman, H. (2009) Pine embryogenesis: many licences to kill for a new life. *Plant signaling & behavior* 4(10):928-932. Doi 10.4161/psb.4.10.9535
- Yagüe, S. (1997) Selvicultura mediterránea para una especie mediterránea: El pino piñonero (*Pinus Pinea* L.) en la provincia de Ávila. *Actas del II Congreso Forestal Español y II Congreso Forestal Español IRATI-97, IV*, 571-576. Disponible en: <http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos/article/viewFile/4356/4285>
- Yakovlev, I.A., Asante, D.K., Fossdal, C.G., Junttila, O., Johnsen, Ø. (2011) Differential gene expression related to an epigenetic memory affecting climatic adaptation in Norway spruce. *Plant Sci.* 180(1):132-139. Doi 10.1016/j.plantsci.2010.07.004
- Yakovlev, I.A., Carneros, E., Lee, Y., Olsen, J.E., Fossdal, C.G. (2016) Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta* 243(5):1237-1249. Doi 10.1007/s00425-016-2484-8
- Yakovlev, I., Fossdal, C.G., Skråppa, T., Olsen, J.E., Jahren, A.H., Johnsen, Ø. (2012) An adaptive epigenetic memory in conifers with important implications for seed production. *Seed Sci. Res.* 22(02):63-76. Doi 10.1017/S0960258511000535
- Yakovlev, I.A., Lee, Y., Rotter, B., Olsen, J.E., Skråppa, T., Johnsen, Ø., Fossdal, C.G. (2014) Temperature-dependent differential transcriptomes during formation of an epigenetic memory in Norway spruce embryogenesis. *Tree Genet. Genomes* 10(2):355–366. Doi 10.1007/s11295-013-0691-z
- Zhang, S., Zhou, J., Han, S., Yang, W., Li, W., Wei, H., Li, X., Qi, L. (2010) Four abiotic stress-induced miRNA families differentially regulated in the embryogenic and

- non-embryogenic callus tissues of *Larix leptolepis*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 398(3):355-360. Doi 10.1016/j.bbrc.2010.06.056
- Zhao, X.Y., Su, Y.H., Cheng, Z.J., Zhang, X. (2008) Cell fate during *in vitro* plant organogenesis. *J. Integr. Plant Biol.* 50(7):816–24. Doi 10.1111/j.1744-7909.2008.00701.x
- Zhou, J., Wang, X., He, K., Charron, J.B.F., Elling, A.A., Deng, X.W. (2010) Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in *Arabidopsis* reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol. Biol.* 72(6):585–595. Doi 10.1007/s11103-009-9594-7
- Zoglauer, K., Behrendt, U., Rahmat, A., Ross, H., Taryono (2003) Somatic embryogenesis – the gate to biotechnology in conifers. Laimer, M., Rücker, W. (eds). *Plant tissue culture*. Springer, Vienna 175-202. Doi 10.1007/978-3-7091-6040-4_11
- Zonneveld, B.J.M. (2012) Conifer genome sizes of 172 species, covering 64 of 67 genera, range from 8 to 72 picogram. *Nord. J. Bot.* 30(4):490-502. Doi 10.1111/j.1756-1051.2012.01

VII. AGRADECIMIENTOS

Y llegamos al final o al principio, según se mire. Este apartado es un resumen de todas las experiencias vividas en esta etapa de mi vida. La tesis llega a su fin, pero también es el inicio de una nueva andadura. Por este motivo quiero echar la vista atrás y dedicar unas palabras a aquellas personas que me han acompañado.

A Jesús Alegre, porque si no me hubieras introducido en el mundo de la embriogénesis somática, mientras aún estaba en la carrera, nunca hubiera llegado hasta aquí.

A Cristina Celestino y Mariano Toribio, porque sin vuestra dedicación en cuerpo y alma a la embriogénesis somática, nunca habría existido esta tesis. De hecho, no la hubiera empezado ni finalizado; ya que vuestros conocimientos han guiado el camino que he seguido durante este largo proceso. A César Pérez Ruiz, porque ha sido mi representante y el representante de este gran trabajo en la universidad.

A mis compañeros de batalla en el laboratorio. Empezando por Celina, que me enseñó a manejar casi desde cero en el arduo trabajo con el pino piñonero, desde las actividades más básicas, hasta la organización más compleja. A Araceli, cuyo trabajo fue la base de muchos de mis experimentos a posteriori. A Loli, que su ayuda sacó adelante otra infinidad de cosas que se me escapaban. A Mar e Inma, cuyo apoyo teórico y emocional han sido una constante en la tesis. A mis compañeros de la sala de becarios: Marina, Noelia y Pablo, con los que he compartido el día a día. Ya sea sacándome una sonrisa entre cafés y dulces de Araceli o solucionando otras actividades más rutinarias como una calefacción eternamente mal regulada. A Gabi, a quien conocí mientras aún era una estudiante, y aunque hace tiempo que deje de ser su “preferida”, nunca olvidaré las charlas que teníamos mientras preparábamos material de laboratorio o medios de cultivo durante horas y horas. A otros tantos que han hecho más agradable mi experiencia en el Encín como Alfredo, Nieves o los chicos de prácticas. Y en especial a Elena, aunque no trabajamos mucho tiempo codo con codo, tus conocimientos han sido el preludio de esta tesis, y nadie mejor que tú sabe lo que es trabajar con el pino piñonero. Gracias a todos por vuestra paciencia, porque a veces puedo llegar a ser un torbellino.

Al IMIDRA (Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario) por concederme tanto la beca predoctoral que ha permitido que se llevara a cabo gran parte de los trabajos realizados, como la financiación del master en biotecnología forestal que me requería el doctorado. Este trabajo se ha financiado gracias a los Proyectos del Plan Nacional de I+D+I, AGL2010-22292-C03-01 y AGL2013-47400-C4-1R.

A la Red de Centros Nacionales de Recursos Genéticos Forestales “Puerta de Hierro”, “El Serranillo” y “Quintanilla de Onésimo” del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, por proporcionarnos el material vegetal selecto utilizado en este trabajo de tesis. A Sven Mutke por su ayuda en la recolección de las piñas.

A M^a Teresa Cervera, por concederme la oportunidad de trabajar con su equipo en el Centro de Investigación Forestal del INIA. Esta oportunidad me permitió conocer una técnica nueva y tener una visión diferente de la embriogénesis somática. Al equipo, Mariló, Nuria y Luis,

por su trabajo junto a mí. Pero en especial a M^a Ángeles Guevara, que ha sido mi mayor instructora en el entendimiento de una técnica tan compleja y bonita dentro del mundo de la epigenética. El tiempo que has empleado conmigo y tus enseñanzas me permitieron desarrollar mis propias ideas y eso es algo que siempre valoraré.

A mis amigos, los que no tienen nada que ver con mi mundo laboral pero sí mucho con mi vida personal. Ellos han sido mi apoyo, mi paño de lágrimas, los que me han ayudado a descargar tensiones, desilusiones o, todo lo contrario. Muy en especial, a Ana, que parece de mi familia. El cariño compartido con ella nos ha hecho evolucionar a diario desde la infancia. A mis dos científicos de la universidad, Antonio y Óscar, eternos compañeros de todo tipo de batallas. A Rocío y Dani, que siempre están ahí de una forma u otra. A la gente de mi mundo fotográfico, que habéis sido inyección de energía de mil formas diversas, en las que entra un número de gente tan variado y grande que me faltaría espacio para dedicarles unas palabras a cada uno.

Por último, pero no por ello menos importante, a los que más cosas debo agradecer de todo corazón, a mi familia. A mi madre que, sin su cariño, ánimo y apoyo no podría haber hecho esta tesis jamás. Su positividad y fuerza desgarradora por luchar, me la ha transmitido en momentos muy diversos a lo largo de la vida. A mi padre, aunque no esté, determinó tanto mi carácter, que sin él no sería la persona que soy ahora. Mi familia, en resumen, es la que más confianza ha depositado en mí y lo sigue haciendo con su cariño, comprensión y eterna paciencia, sois un gran motor de mi vida.

VIII. ANEXO

Growth, morphology and maturation ability of *Pinus pinea* embryogenic suspension cultures

Nuria González-Cabrero^{1,2} · Mar Ruiz-Galea¹ · Jesús Alegre¹ · Mariano Toribio¹ · Cristina Celestino¹

Received: 8 February 2018 / Accepted: 2 August 2018
 © Springer Nature B.V. 2018

Abstract

Stone pine (*Pinus pinea* L.) is a Mediterranean forest species used for the commercial harvesting of its edible seeds, known as pine nuts. Plant regeneration by somatic embryogenesis on semi-solid medium has been achieved in stone pine, but suspension culture systems for the large-scale production of somatic embryos need to be developed. Suspension cultures were established from several embryogenic lines. Growth parameters as settled cell volume (SCV) and dry weight (DW) in suspension cultures were influenced by genotype, initial inoculum density, orbiting speed and type of carbohydrate in the culture medium. A higher linear growth (DW) up to week four was obtained using 20 mg mL⁻¹ inoculum. The orbiting speed affected the SCV as well as the morphology of embryogenic cultures. Growth parameters decreased when orbiting speed was increased from 50 rpm to 150 rpm. Cultures at 50 rpm most commonly grew as clusters of embryonal cell masses, whereas at 150 rpm there were large numbers of single cells. Cultures grew slowly in medium with maltose instead of sucrose, but growth was not affected when plant growth regulators (PGRs) concentration was decreased. A sustainable suspension culture could be maintained by transferring 250 mg of filtered cell mass to 25 mL of liquid medium at 3-week intervals. Culture scaling-up in liquid medium resulted in a 23-fold DW increase in 6 weeks, compared with 12 fold increase on semi-solid medium. Cotyledonary embryos were obtained on semi-solid maturation medium from lines proliferated in suspension cultures. Increased somatic embryo production was obtained when proliferation was performed at 100 rpm orbiting speed in liquid medium with low PGRs concentration and sucrose instead of maltose.

Keywords Conifers · Forest biotechnology · Liquid culture · *Pinus pinea* · Somatic embryogenesis

Introduction

Stone pine (*Pinus pinea* L.) is an economically important species of the Mediterranean region because their seeds known as pine nuts are one of the most expensive dried fruits

with increasing demand in the world (Awan and Pettenella 2017). The stone pine cone production is decreasing as a consequence of climate change (Mutke et al. 2005) and the rise of new plagues and diseases such as the western conifer seed bug *Leptoglossus occidentalis* (Strong 2006; Awan and Pettenella 2017). The Spanish breeding program of *P. pinea* is mainly focused on the improvement of seed yield (Mutke et al. 2000). Cones are harvested commercially from natural forests, but increasing efforts are dedicated to the domestication of this species as a “fruit tree” cultivated in grafted orchards. The culture of stone pine in plantation forestry for improved cone production might require the development of clonal rootstocks adapted to different environmental conditions. In addition, the uniformity and the improvement in the performance of the scion provided by the clonal rootstocks could also be important (Jayawickrama et al. 1997; Warschefsky et al. 2016). Therefore the development of vegetative propagation techniques is required for this species.

Communicated by Sergio J. Ochatt.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1467-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Cristina Celestino
cristina.celestino@madrid.org

¹ IMIDRA, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario, Finca “El Encín”. Apdo. 127, 28800 Alcalá de Henares, Spain

² Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal. E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Published online: 17 August 2018

Springer

Somatic embryogenesis (SE), coupled with cryo-preservation, is considered the most suitable vegetative propagation technology for the mass clonal production of selected trees required for implementing multivarietal forestry (MVF). This technology confers flexibility for rapid deployment of suitable varieties to cope with changing breeding goals and environments (Park 2014). Progress has been made in SE development for improvement programs of several *Pinus* species such as *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. strobus* and *P. taeda*, but the efficiency of SE protocols affects the implementation of MVF with other pines (Klimaszewska et al. 2016). Plant regeneration of stone pine by SE and cryopreservation of embryogenic lines have been reported (Carneros et al. 2009, 2017a, b), but methods to increase somatic embryo production are needed for the mass production of clonal plants.

Plant regeneration by SE is usually carried out on semi-solid medium (SM), but the mass production of somatic embryos can be improved by culturing in liquid medium (LM) (Lelu-Walter et al. 2013). Cultures in LM offer technical advantages over those on SM such as faster growth rate due to the rapid uptake of nutrients, a quick scale-up, and the subsequent production of large number of plants (Gupta and Timmis 2005). Conifer embryogenic tissues cultured in LM have been used to study different kinds of growth parameters and growth kinetics, to analyze the effect of medium on the morphology of embryogenic cultures, and to determine the type of bioreactor suitable for growth and maturation capacity linked to the scaling-up of cultures (Tautorius et al. 1992; Egertsdotter and von Arnold 1998; Ingram and Mavituna 2000). Embryogenic suspensions in LM have also been used in transgenesis experiments with *Agrobacterium* because of the higher transformation efficiency using this technology (Andrade et al. 2009; Le-Feuvre et al. 2013).

Although the industrial production of somatic embryos will require the development of techniques for the culture of embryogenic tissues in large-scale bioreactors (Trontin et al. 2016), currently the proliferation of conifer cultures in LM is mostly carried out using Erlenmeyer flasks on rotary shakers (Adams et al. 2016). Suspension cultures are usually initiated from tissues growing on SM. The amount of tissue used to inoculate the LM frequently determines the success of suspension establishment. The inoculum density may be critical for achieving true suspensions and for determining the fate of cultures (Ducos et al. 2007; Salaj et al. 2007). Many other factors influence the growth and development of embryogenic tissues in shaking suspension cultures. Among them the vessel volume and orbiting speed affect the gas and mass exchange, and the hydrodynamic stress in liquid media (Klößner and Büchs 2012). These factors can determine the amount, size and morphology of embryogenic clusters in the suspension cultures, and they are also associated with

somatic embryo development (Sun et al. 2010; Jiménez et al. 2011).

The availability of nutrients and plant growth regulators (PGRs) to cells growing in LM can be very different with respect to that of the SM. Therefore, the concentrations of many of the medium components—mainly PGRs—when gelling agents are used, are typically reduced in LM (Gupta and Timmis 2005). Therefore their effects at lower concentrations on growth and morphogenesis have to be tested. Among media components carbohydrates are of most importance for SE. Sucrose is the most frequently used saccharide in plant tissue culture (Lipavská and Konrádová 2004). However maltose has also been used in conifer SE both at the proliferation stage (Gupta 1996; Breton et al. 2005) and the maturation stage (Lelu-Walter et al. 2016).

The present study aimed at finding the culture conditions required for the establishment and maintenance of embryogenic suspension cultures of stone pine. Preliminary experiments to scale-up embryogenic cultures were also attempted. Effects of embryogenic line, initial inoculum density, vessel volume, orbiting speed, PGRs concentration, type of carbohydrate, and subculture procedure on biomass production were evaluated. Culture morphology and maturation ability of the embryogenic lines proliferated in LM were examined as well.

Materials and methods

Plant material

Embryogenic lines were initiated from immature zygotic embryos and maintained as reported by Carneros et al. (2009). Embryonal masses (EM) were subcultured as clumps on SM medium (M-mLV) that consisted of modified LV medium (Litvay et al. 1985) containing 9.5 μM 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 4.5 μM benzylaminopurine (BAP), 20 g L^{-1} sucrose and 4 g L^{-1} gelatin gum (Gelrite®, ref. G1910, Sigma-Aldrich, USA). They proliferated at 23 ± 1 °C in darkness and were subcultured biweekly. Experiments were conducted with 2-year-old 1F62 and 5F62, 7-year-old 2F47, and 8-year-old 1F11 and 7F11 embryogenic lines.

Establishment of suspension cultures

Inoculum density and vessel volume

In the first experiment, the effect of inoculum density (10, 20 and 30 mg mL^{-1}) and vessel volume (100 and 200 mL) on the growth rate of lines 2F47 and 7F11 in suspension culture was evaluated. Samples of 250, 500 and 750 mg fresh weight (FW) of tissue collected at the periphery of

EM were suspended in 25 mL of liquid M-mLV medium and poured into 100 (EF100) and 200 mL (EF200) Erlenmeyer flasks. The EF100 flasks were capped with a double layer of aluminium foil and the EF200 flasks with silicone closure (Bellco Glass, Vineland NJ, USA). The suspensions were cultured on horizontal orbital shakers (rotation radius of 30 mm) at 50 rpm and 23 ± 1 °C in darkness. After 3 weeks of culture, the content of each flask was poured into 50 mL graduated tubes and let settle for 30 min to measure the sedimented cell volume (SCV). Then, the suspension was filtered onto a pre-weighed filter paper disk (Filter-Lab, 50 mm diameter, 80 g m^{-2} , 43–48 μm pore; ANOIA, Barcelona, Spain) in a Büchner funnel under low-pressure pulse, and oven dried at 60 °C for 24 h to determine the dry weight (DW). A complete factorial design including genotype, inoculum density and vessel volume was carried out. The experiment comprised three replicates per treatment and was repeated twice. The growth rate of cultures was expressed as the SCV and DW increase (ISCV and IDW), calculated by the final value divided by initial value—e.g., DW_f/DW_i in which DW_i was the initial dry weight of the sample and DW_f was the dry weight at the end of the growth period. Also, the growth kinetics of line 2F47 was followed by collecting SCV and DW data at weekly intervals for 4 weeks of culture. For this purpose, cultures were initiated at an inoculum density of both 20 and 30 mg mL^{-1} , and carried out in 200 mL Erlenmeyer flasks. As DW measurement required a destructive methodology, each datum was collected from three independent replicates at each 1-week time point, and it was repeated twice.

Shaker orbiting speed

In the second experiment, the effect of orbiting speed (50, 100 and 150 rpm) was tested. The growth rate and the morphological characteristic of lines 2F47, 1F11 and 7F11 in suspension culture were evaluated. Suspension cultures were initiated with 20 mg mL^{-1} inoculum cultured in 200 mL Erlenmeyer flasks with 25 mL of liquid M-mLV medium. The SCV and DW parameters were determined after 3 week of culture, at 23 ± 1 °C in darkness. The effects of genotype and orbiting speed were tested in a complete factorial design. Each treatment was performed with three replicates and was repeated twice.

Medium components

In the third experiment, the suspension cultures of lines 2F47, 1F11 and 7F11 were initiated as in the second experiment and cultured at 100 rpm orbiting speed. Three PGRs concentrations were tested: the standard one used in the maintenance medium (M-mLV), a lower (L-mLV; 4.5 μM 2,4-D, 2.2 μM BAP), and an ultra-low concentration

(UL-mLV; 0.24 μM 2,4-D, 0.22 μM BAP). In addition, the effect of sucrose vs maltose at the standard concentration (20 g L^{-1}) in the M-mLV medium on growth parameters was also tested in an independent experiment. The SCV and DW parameters were measured after 3 weeks of culture. Each measurement was performed in triplicate and was repeated twice.

Maintenance of suspension cultures

Two different subculture procedures were tested for maintaining the cultures in LM. In the first procedure, suspension cultures were initiated with 500 mg FW EM tissue from SM medium inoculated into 200 mL Erlenmeyer flasks, filled with 25 mL of liquid M-mLV medium, cultured at 100 rpm orbiting speed and 23 ± 1 °C in darkness for 3 weeks. After that time (culture period 1) SCV of each replicate was determined as described above. Then the cell suspension was homogenized by continuous gentle vortexing of the tubes and from which two 5 mL samples were pipetted from each one. One of the samples was used to estimate the DW produced per flask in that culture period, and the other was resuspended in 20 mL of fresh proliferation medium to start the next culture period. One additional 1 mL sample was collected for performing the maturation assays described below. Suspension cultures were maintained for two additional 3-week periods (culture periods 2 and 3) following the same culture procedure and data collection. A complete factorial design to test the effect of genotype (EM tissue samples from embryogenic lines 2F47, 1F11 and 7F11) and culture period was carried out. Each treatment comprised five replicates (flasks) and was repeated twice.

In the second procedure, lines 1F62 and 5F62 were cultured into 200 mL Erlenmeyer flasks with the same culture medium and under the same culture conditions of the first procedure. The established cell suspension of each flask (culture period 1) was poured onto a filter-paper disk and filtered under low pressure. Then, from the filtered cell mass produced in the one or two flasks that showed the highest proliferation 250 mg FW samples were collected and resuspended in 25 mL of fresh medium to start the next maintenance cycle. Four 3-week subcultures were made (culture periods 2, 3, 4 and 5) repeating the same procedure. DW and SCV were determined as above. A complete factorial design comprising genotype and culture period was arranged. Each treatment was performed with a minimum of four replicates and was repeated twice.

Culture scale-up for biomass production

Embryogenic cultures were scaled-up in LM and biomass production was evaluated over three 2-week culture periods (culture periods 1, 2 and 3). Control cultures on SM were

also accomplished. Embryogenic lines 2F47, 7F11, 1F62 and 5F62 were established in the shaking culture system described above (500 mg FW inoculum, 25 mL of liquid M-mLV medium, 200 mL Erlenmeyer flasks, 100 rpm orbiting speed) as the starting plant material for the scaling-up. The biomass production was determined by SCV at the end of each culture period, and by FW and DW at the end of the experiment. The FW produced was determined by weighing the filtered cell mass obtained under low-pressure. To measure SCV the content of each flask was poured into a 100 mL graduated tube and sedimented for 30 min. Then the supernatant was discarded and the settled EM was poured into a new flask and was resuspended in fresh medium up to a 50-mL final volume to start the second culture period. The third culture period was started again by pouring the settled EM produced after the culture period 2 in each flask into a new flask, and it was resuspended in fresh medium until reaching the final volume of 100 mL. The complete factorial design of genotype and culture period included 6 replicates (flasks) per treatment.

Control cultures (SM) consisted of individual EM clumps (500 mg FW) from the same embryogenic lines that were cultured in 90 mm diameter Petri dishes containing 25 mL of semi-solid M-mLV medium. After culture period 1 each individual clump was divided in two pieces and subcultured onto fresh medium. At the end of culture period 2 each individual clump was again divided in two pieces to start the culture period 3. In all cases one piece (clump) per Petri dish was placed, and they were cultured at 23 ± 1 °C in darkness for 2 weeks. The biomass production was determined by FW and DW at the end of each culture period. Since the FW and DW measurement was a destructive method, 18 clumps per line were cultured at the beginning of the experiment. Therefore data of six replicates per embryogenic line were taken at the end of each culture period.

Somatic embryo maturation

Maturation ability of somatic embryos from suspension cultures was tested using the method described in Carneros et al. (2017b). Embryogenic tissues were collected after filtering the suspensions from different treatments. From them, samples of 50 mg FW tissue were taken from the top of the tissue mass remaining on the filter, and then they were suspended in liquid maintenance medium without PGRs supplemented with 10 g L^{-1} activated charcoal (C6289; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Next, this suspension was poured onto a filter-paper disk and the liquid was drained-off under low pressure. Samples were subjected to partial desiccation by placing the filter paper disks with embryogenic tissues into unsealed empty Petri dishes (60 mm diameter), which were maintained under laminar hood flux for 4 h. Then, filters were placed on maturation

medium (mLV nutrient medium, $121 \mu\text{M}$ ABA, 60 g L^{-1} maltose and 10 g L^{-1} Gelrite®) in Petri dishes and cultured at 23 ± 1 °C in darkness for 16 weeks. Six replicates (Petri dishes) per embryogenic line and previous culture condition in LM were arranged. Maturation ability was recorded as the number of morphologically normal cotyledonary somatic embryos obtained per gram FW of tissue (CE). Replicates of all embryogenic lines within treatments were pooled to evaluate the effect of culture condition.

Morphological observation

Embryogenic lines were examined under inverted microscope Nikon TS100 equipped with imaging software (NIS-Elements-NIKON). One ml of the suspension was pipetted into Petri dish (55 mm in diameter) and stained with 1% (w/v) acetocarmine.

Statistical analysis

The effects of factors were evaluated by ANOVA, using IBM SPSS Statistics version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Growth data were subjected to the logarithmic transformation and the counted data to the square root transformation prior to statistical analysis. The variability among replicates within treatments was analyzed by means of the coefficient of variation (CV), calculated as the percentage of the ratio of standard deviation to mean (Sokal and Rohlf 1969).

Results

Establishment of suspension culture

Inoculum density and vessel volume

Four independent experiments were performed for establishing embryogenic lines of *Pinus pinea* in suspension culture. The first experiment involved the use of EM from two lines cultured at three initial inoculum densities in Erlenmeyer flasks of two vessel volumes. Line 2F47 proliferated better than line 7F11. Significant differences were recorded for ISCV and the increase in DW of line 2F47 was almost double that of the other line, but with low statistical significance (Table 1).

Growth rate of suspension cultures measured as ISCV was affected by the inoculum density. Overall when cultures were initiated with EM at 20 mg mL^{-1} the SCV increased by 8.7 fold after 3 weeks in culture. That increase was eight times higher than when the cultures were started with 10 mg mL^{-1} , and almost three times higher than when they were initiated with 30 mg mL^{-1} . The DW increase was also higher when the initial

Table 1 Establishment of embryogenic suspension cultures of *Pinus pinea*

Factor	Growth parameter		
	ISCV	IFW	IDW
Line			
7F11	2.6 ± 0.5	3.0 ± 0.5	4.7 ± 0.5
2F47	7.4 ± 1.2	9.4 ± 1.3	8.6 ± 1.6
Inoculum density			
10	1.1 ± 0.1	3.5 ± 0.9	4.0 ± 0.5
20	8.7 ± 1.1	7.5 ± 1.7	9.1 ± 1.8
30	3.2 ± 0.5	7.4 ± 1.0	5.4 ± 0.8
Vessel volume			
EF100	6.0 ± 1.0	6.0 ± 1.2	6.7 ± 1.3
EF200	3.9 ± 1.0	6.9 ± 1.3	6.8 ± 1.3
Significance of factor			
Line	0.000	0.000	0.079
Inoculum density	0.000	0.004	0.160
Vessel volume	0.276	0.319	0.425
Line × inoculum	0.001	0.617	0.235
Line × vessel	0.114	0.224	0.794
Inoculum × vessel	0.024	0.924	0.865

Analysis of variance of the effect of line, inoculum density (mg mL^{-1}) and vessel volume (100 and 200 mL Erlenmeyer flasks with 25 mL of liquid medium) on the growth rate, after 3 weeks of culture at 50 rpm orbiting speed. Growth rate was expressed as increase in settled cell volume (ISCV), increase in fresh weight (IFW) and increase in dry weight (IDW)

Mean values ± SE associated to each factor level from ANOVA, showing the statistical significance of each factor

inoculum was at 20 mg mL^{-1} density, but no significant differences were detected with respect to the other two densities (Table 1). No SCV increase happened when cultures of both lines were initiated at 10 mg mL^{-1} density, but when they were initiated at 20 mg mL^{-1} the increase of the fast growing line 2F47 was much higher than that of the other line (12.1 vs. 4.5), which is reflected in the

significant interaction Line × Inoculum density. Interestingly, although the ISCV was null after a 3-week culture period when cultures were initiated at 10 mg mL^{-1} density, the initial DW increased fourfold after the same culture period. No significant effect of the volume of the Erlenmeyer flasks used (100 vs. 200 mL) was observed, both on the ISCV and on the IDW. The ISCV was the same in both vessel volumes when they were inoculated at an initial density of both 10 and 30 mg mL^{-1} . However when the density of inoculation was at 20 mg mL^{-1} the increase was slightly greater in the 100 than in the 200 mL flasks (9.3 vs. 7.2) which is reflected in the significant interaction Inoculum × Vessel (Table 1).

The growth kinetics of both SCV and DW were determined in the line 2F47 that performed better. Growth curves were different depending on the inoculation density. When the initial density of inoculation was 30 mg mL^{-1} both SCV and DW followed a sigmoid growth curve. The lag phase lasted a week and then there was an exponential growth phase lasting 1 week for the DW and 2 weeks for the SCV, followed by a transition phase prior to a stationary phase that was reached after 3 weeks of culture for the DW and after 4 weeks for the SCV (Fig. 1). In contrast, when an initial inoculum of 20 mg mL^{-1} was used, the growth measured as SCV was exponential from the beginning of the culture, reaching a transition phase after 2 weeks of culture and the stationary phase after 3 weeks. In both cases the initial SCV increased 12-fold at the plateau. On the contrary, the increase in DW at the end of the 4 weeks of culture was different depending on the initial inoculum density. When culture was started with 30 mg mL^{-1} the initial weight increased fivefold after 3 weeks, whereas when it was started with 20 mg mL^{-1} the initial weight increased almost ninefold (Fig. 1). Browning of medium or other symptoms of tissue degradation were not observed in the embryogenic suspensions after 4 weeks of culture.

Fig. 1 Growth kinetics of *Pinus pinea* embryogenic line 2F47 in suspension culture. Growth was determined as **a** settled cell volume (SCV); **b** fresh weight (FW); and **c** dry weight (DW). Density

of inoculation was 20 or 30 mg mL^{-1} . Suspensions were cultured at 50 rpm orbiting speed for 4 week. Bars represent SE from the mean of six replicates

Shaker orbiting speed

The second experiment involved the culture in 200 mL Erlenmeyer flasks at three orbiting speeds. Significant differences among lines were recorded for SCV but not for DW. Lines 1F11 and 7F11 showed lower SCV than line 2F47. Overall, both growth parameters were significantly reduced as the speed increased. SCV and DW were higher at 50 rpm than at 150 rpm. However, a significant effect of the interaction of line with orbiting speed was also found (Table 2). Regarding SCV, while the growth of the 1F11

line was hardly affected by agitation speed that of the line 2F47 was reduced by half and that of the line 7F11 by a third when the speed increased from 50 to 150 rpm. With respect to FW and DW the lines followed the same growth pattern, but the decreases observed in lines 2F47 and 7F11 with the increasing speed were lower than that displayed by the SCV, mainly in the latter (Fig. 2). It should be noted that when embryogenic lines were cultured at 100 rpm no significant differences in DW were observed among them at the end of the 3-week period.

A relationship between SCV and morphology of cultures was observed, and both were affected by the orbiting speed. Higher SCV values were obtained at 50 rpm due to the fact that sediments were loosely packed (Fig. 3a) because embryogenic tissues grew as large clusters of embryo-suspensor masses (Fig. 3b). More compact SCV were obtained at 100 rpm (Fig. 3c) because clusters were disaggregated into smaller ones (Fig. 3d). Lower SCV values were obtained at 150 rpm because sediments were tightly packed (Fig. 3e). The larger clusters were disaggregated into smaller ones and many freely suspended cell structures were observed (Fig. 3f).

At 100 rpm orbiting speed, proliferating embryogenic lines of different stone pine genotypes showed different degrees of aggregation and organization of embryo-heads and suspensor cells. Intensely stained meristematic cell groups of different sizes, polarized structures with embryo-heads and elongated suspensor cells showing different degrees of organization and single cells were observed. Line 1F11 showed barely aggregated polarized structures (Fig. 4a) formed by enlarged and well defined embryo-head and suspensor cells (Fig. 4b). Line 7F11 showed clusters of few organized embryonal-suspensor structures (Fig. 4c) composed of embryos with smaller embryonic regions (Fig. 4d). Line 2F47 was characterized by the occurrence of polarized embryonal-suspensor structures loosely aggregated (Fig. 4e) and well-organized early embryos (Fig. 4f).

Table 2 Establishment of embryogenic suspension cultures of *Pinus pinea*

Factor	Growth parameter		
	SCV	FW	DW
Line			
1F11	10.0 ± 0.5	2.06 ± 0.85	127 ± 4
7F11	10.3 ± 0.9	2.25 ± 0.27	140 ± 10
2F47	18.0 ± 2.0	2.24 ± 0.20	138 ± 7
Orbiting speed			
50	18.2 ± 2.0	2.84 ± 0.19	153 ± 8
100	11.1 ± 0.6	2.10 ± 0.12	136 ± 6
150	8.9 ± 0.7	1.58 ± 0.13	116 ± 5
Significance of factor			
Line	0.000	0.524	0.185
Orbiting speed	0.000	0.000	0.000
Line × orbiting speed	0.000	0.000	0.000

Analysis of variance of the effect of line and orbiting speed (rpm) on the growth of embryogenic tissue. Growth was determined as settled cell volume (SCV, mL), fresh weight (FW, g) and dry weight (DW, mg), in the shaking flask culture system (20 mg mL⁻¹ inoculum density, 200 mL Erlenmeyer flask with 25 mL liquid medium), after 3 weeks of culture

Mean values ± SE associated to each factor level from ANOVA, showing the statistical significance of each factor

Fig. 2 Depiction of the significant interaction Line × Orbiting speed described in Table 2. Growth was determined as settled cell volume (SCV), fresh weight (FW) and dry weight (DW) in the shaking flask

culture system (20 mg mL⁻¹ inoculum density, 200 mL Erlenmeyer flask with 25 mL liquid medium), after 3 weeks of culture

Fig. 3 Morphology of *Pinus pinea* embryogenic line 2F47 growing in liquid medium cultured at different orbiting speeds. **a** Large settle cell volume (SCV) formed by a loosely packed sediment obtained at 50 rpm. **b** Cultures grown at 50 rpm showing accumulation of clusters of embryo-suspensor masses. **c** Smaller SCV formed by a slightly compact sediment obtained at 100 rpm. **d** Cultures grown at 100 rpm displaying disaggregation of clusters into smaller ones. **e** Much smaller SCV formed by a compacted sediment recorded at 150 rpm. **f** Cultures grown at 150 rpm showing freely suspended cell structures. Samples were stained with acetocarmine to study the microscopic organization of the embryo-suspensor masses. Bars 1000 μ m

Medium components

Two separate experiments involved the application of PGRs at three concentrations and the addition of maltose or sucrose in the LM. Overall, growth parameters of embryogenic lines were not affected as the PGRs concentration was decreased (Table 3). Similar SCV and DW values were obtained using both the standard (M) and the ultra-low concentration (UL). Again significant differences among lines were observed.

Lines 1F11 and 2F47 showed higher SCV and DW than line 7F11. On the other hand, a strong effect on growth by the type of carbohydrate was noted. The embryogenic lines proliferated slower when using maltose instead of sucrose, and differences among lines were not significant in this case. There were no interactions between the lines and the tested media components, both in the case of the PGRs concentrations and in the case of the carbohydrate (Table 3).

Maintenance of suspension cultures

After suspension establishment (culture period 1), the proliferation of embryogenic tissue was maintained by using two different subculture procedures at regular 3-week intervals. In the first one, named the pipetting procedure, differences among lines were observed for SCV, FW and DW although in the latter case the difference was not quite significant. Once again the line 7F11 was the worst performer (Table 4). Using this subculture procedure resulted in similar SCV and FW values at the end of each subculture. However a significant decrease in DW was observed with the successive subcultures (Table 4). All embryogenic lines performed similarly through the subcultures as indicated by the non-significant interaction line $\times$ culture period.

In the second subculture procedure, named the weighing procedure, there was a very significant effect of the line, both for the SCV and FW as for the DW. All these growth parameters were also significantly influenced by the culture period (Table 4). However they followed a different pattern. While SCV values steadily increased throughout the subcultures, DW values had an abrupt increase after the second subculture (end of the culture period 2) but then they remained stable (Table 4). FW showed a similar trend. Again no significant interaction between embryogenic lines and culture period was observed, except for FW. The lines used in this experiment exhibited different morphologies. The line of lower growth 1F62 (Fig. 3g) showed morphological characteristics similar to those of line 2F47, which was the one that grew the most in other experiments. On the other hand, the best-growing 5F62 line (Fig. 3h) showed a morphology similar to that of 7F11 line that grew poorly in other experiments, although with a greater clustering of embryo-suspensor structures.

Culture scale-up for biomass production

Significant differences were noted for SCV values among embryogenic lines growing in LM, and for FW and DW values of the same lines growing on SM. However no significant differences were recorded for FW and DW values when the lines were grown in LM (Table 5). The variability among replicates of these parameters was very high within lines, the coefficient of variation for DW ranging from 31%

Fig. 4 Morphology of several *Pinus pinea* embryogenic lines in suspension culture grown at 100 rpm. **a** Line 1F11 showing polarized embryonal-suspensor structures and **b** large and well-defined embryo-head and suspensor cells. **c** Line 7F11 showing clusters of less organized embryonal-suspensor structures and **d** smaller polarized structures. **e** Line 2F47 showing less aggregation of polarized embryonal-suspensor structures and **f** well organized early embryos. **g** Line 1F62 showing a morphology similar to that of line 2F47. **h** Line 5F62 showing a morphology similar to that of line 7F11, but with greater clustering of embryonal suspensor structures. Bars 1000 μ m (**a**, **c**, **e**) and 500 μ m (**b**, **d**, **f**–**h**)

of line 1F62 to 171% of line 5F62 (data not shown). This variability was higher when cultures were carried out in LM than on SM. For all the lines, while the CV for DW at the end of the experiment of cultures grown in LM was 94%, the one of cultures grown on SM was 25% (data not shown). On the other hand, when cultures were performed on SM the

variability within lines was much more similar among lines than when they were grown in LM, with CV ranging from 64% for line 7F11 to 77% for line 5F62 (data not shown). In addition, the variability observed throughout subcultures was more stable on semi-solid than in LM. The CV for DW after the 1, 2 and 3 culture period on SM were 32, 23 and

Table 3 Establishment of embryogenic suspension cultures of *Pinus pinea*

Factor	Growth parameter		
	SCV	FW	DW
1. Plant growth regulators			
Line			
1F11	14.1 ± 0.6	2.23 ± 0.15	113 ± 5
7F11	4.9 ± 0.7	0.84 ± 0.14	53 ± 9
2F47	11.3 ± 1.9	1.36 ± 0.25	90 ± 17
PGR concentration			
Medium	10.5 ± 1.6	1.47 ± 0.21	89 ± 12
Low	10.8 ± 1.4	1.57 ± 0.23	86 ± 14
Ultra-low	9.0 ± 1.5	1.38 ± 0.26	81 ± 14
Significance of factor			
Line	0.000	0.000	0.006
PGR concentration	0.327	0.564	0.941
Line × PGR concentration	0.450	0.315	0.316
2. Type of carbohydrate			
Line			
1F11	8.9 ± 1.6	1.09 ± 0.24	92 ± 21
7F11	7.7 ± 1.2	1.37 ± 0.31	78 ± 16
2F47	9.6 ± 1.9	1.08 ± 0.28	88 ± 22
Carbohydrate			
Maltose	4.2 ± 0.4	0.46 ± 0.16	49 ± 19
Sucrose	13.4 ± 0.8	1.90 ± 0.13	115 ± 7
Significance of factor			
Line	0.675	0.415	0.621
Carbohydrate	0.000	0.000	0.000
Line × carbohydrate	0.168	0.334	0.323

Analysis of variance of the effect of line and media components (PGR concentration and type of carbohydrate) on the growth of embryogenic tissue. Growth was determined as settled cell volume (SCV, mL), fresh weight (FW, g) and dry weight (DW, mg) in the shaking flask culture system (20 mg mL⁻¹ inoculum density, 200 mL Erlenmeyer flask with 25 mL liquid medium, 100 rpm), after 3 weeks of culture

Mean values ± SE associated to each factor level from ANOVA, showing the statistical significance of each factor

25% respectively, while that for SCV after the same culture periods in LM were 50, 82 and 82% respectively (data not shown).

Biomass production was higher in cultures growing in LM than on SM. Each replicate in each of the treatments was initiated in liquid and on SM with 500 mg FW of embryogenic tissue. This amount of tissue corresponded to a mean SCV of 2.2 ± 0.1 mL, a mean FW after filtering of 220 ± 11 mg and a mean DW of 11 ± 0.5 mg. When the culture scale-up was carried out in LM the initial SCV, FW and DW values increased about 19, 28 and 23-fold respectively at the end of the three 2-week culture periods. By contrast, when the scale-up was performed on SM the initial FW and

DW values increased by about 11 and 12-fold, respectively (Table 5).

Somatic embryo maturation

Maturation of somatic embryos was carried out on SM. Culture conditions during proliferation of embryogenic lines in LM influenced the production of normal cotyledonary embryos. When orbiting speed was increased from 50 to 100 or 150 rpm the number of somatic embryos obtained from embryogenic lines was almost doubled.

When the PGRs concentration in the LM was lowered from 9.5 µM 2,4-D plus 4.5 µM BAP to 0.24 µM 2,4-D plus 0.22 µM BAP, the amount of mature embryos almost tripled. However, the variability among replicates within treatments precluded to detect statistical significance in these cases (Table 6). A significant effect of the type of carbohydrate in the culture medium during proliferation was observed. Embryogenic lines cultured in medium with sucrose produced a higher number of mature embryos than when they were proliferated with maltose (Table 6).

Discussion

Establishment of suspension cultures

Embryogenic suspension cultures of stone pine were established from all tested lines. Their proliferation ability measured as SCV was influenced not only by the initial inoculum but also by the culture morphology. The establishment of conifer suspension cultures has been reported using different initial inoculum densities, ranging from 4 mg mL⁻¹ in *Picea sitchensis* (Krogstrup 1990) to 120 mg mL⁻¹ in *Pseudotsuga menziesii* (Gupta and Timmis 2005). The optimization of the density of inoculation seems to be critical for the successful establishment of suspensions. In *Pinus strobus*, a density of inoculation higher than 14 mg mL⁻¹ caused a decline in the quality of the embryogenic suspension (Finer et al. 1989). In *Pinus kesiya*, densities lower or higher than 10–13 mg mL⁻¹ slowed the proliferation of cultures (Deb and Tandon 2004). Higher inoculum densities (40–100 mg mL⁻¹) were more efficient for the growth of suspensions in *Pinus nigra* (Salaj et al. 2007). In the present study with *Pinus pinea* 20 mg mL⁻¹ was a better inoculum density for proliferation than 30 mg mL⁻¹; whereas at a lower inoculum density (10 mg mL⁻¹) tissue growth measured as SCV increase was negligible. In *Pinus nigra* the lowest tested density (20 mg mL⁻¹) was also inadequate for achieving proliferation (Salaj et al. 2007). Although our results with stone pine showed that the SCV increase was null when suspensions were initiated with the lowest inoculation density, the DW increase was similar to that obtained

Table 4 Maintenance of embryogenic suspension culture of *Pinus pinea* subcultured using two procedures (pipetting or weighing)

Factor	Subculture procedure					
	Pipetting			Weighing		
	SCV	FW	DW	SCV	FW	DW
Line						
1F11	12.9 ± 0.6	1.92 ± 0.15	217 ± 22	–	–	–
7F11	9.1 ± 1.3	1.67 ± 0.23	147 ± 12	–	–	–
2F47	17.4 ± 0.8	2.46 ± 0.14	231 ± 42	–	–	–
1F62	–	–	–	5.0 ± 0.6	0.80 ± 0.16	60 ± 9
5F62	–	–	–	9.6 ± 0.7	2.33 ± 0.19	140 ± 10
Culture period						
1	13.5 ± 0.9	1.97 ± 0.15	263 ± 39	4.6 ± 0.8	0.75 ± 0.19	62 ± 10
2	14.3 ± 1.5	2.18 ± 0.25	186 ± 14	6.8 ± 0.9	1.46 ± 0.39	129 ± 25
3	11.7 ± 1.3	1.93 ± 0.21	133 ± 13	8.8 ± 1.2	2.07 ± 0.23	136 ± 7
4	–	–	–	9.6 ± 0.6	2.66 ± 0.30	132 ± 13
5	–	–	–	11.6 ± 1.6	2.39 ± 0.34	156 ± 16
Significance of factor						
Line	0.000	0.007	0.087	0.000	0.000	0.000
Culture period	0.546	0.858	0.004	0.000	0.000	0.000
Line × culture period	0.992	0.995	0.270	0.134	0.021	0.144

Analysis of variance of the effect of embryogenic line and culture period on settled cell volume (SCV, mL), fresh weight (FW, g) and dry weight (DW, mg) in the shaking flask culture system (20 mg mL⁻¹ inoculum density, 200 mL Erlenmeyer flask with 25 mL liquid medium, 100 rpm), after several 3-week culture periods

Mean values ± SE associated to each factor level from ANOVA, showing the statistical significance of each factor

Table 5 Culture scale-up of *Pinus pinea* embryogenic tissues cultured in liquid and on semisolid medium

Factor	Biomass production				
	Liquid medium			Semisolid medium	
	SCV	FW	DW	FW	DW
Line					
7F11	13.7 ± 4.1	3.95 ± 1.77	193 ± 80	2.83 ± 0.72	50 ± 8
2F47	22.5 ± 8.1	5.74 ± 3.4	247 ± 144	3.27 ± 0.57	73 ± 13
1F62	25.1 ± 5.1	10.45 ± 1.59	418 ± 58	3.17 ± 0.51	80 ± 13
5F62	16.1 ± 6.1	4.23 ± 3.65	149 ± 14	2.42 ± 0.33	71 ± 13
Culture period					
1	5.0 ± 0.5	–	–	0.87 ± 0.05	22 ± 1
2	12.0 ± 3.1	–	–	2.36 ± 0.14	62 ± 3
3	41.1 ± 10.0	6.10 ± 1.48	252 ± 53	5.65 ± 0.41	133 ± 7
Significance of factor					
Line	0.015	0.171	0.221	0.005	0.000
Culture period	0.000	–	–	0.000	0.000
Line × culture period	0.962	–	–	0.102	0.125

Analysis of variance of the effect of line and culture period on biomass production determined as settled cell volume (SCV, mL), fresh weight (FW, g) and dry weight (DW, mg), after several 2-week culture periods. Each replicate in each of the treatments was initiated with 0.5 g FW of tissue growing on semisolid maintenance medium (see “Material and methods” section for details)

Mean values ± SE associated to each factor level from ANOVA, showing the statistical significance of each factor

Table 6 Effect of the orbiting speed, PGR concentration and carbohydrate on the maturation ability of *Pinus pinea* embryogenic cultures

Orbiting speed	CE	PGR concentration	CE	Carbohydrate	CE
50 rpm	27 ± 11	M	24 ± 13	Sucrose	53 ± 18
100 rpm	49 ± 19	L	48 ± 18	Maltose	14 ± 6
150 rpm	41 ± 12	UL	60 ± 28		
p value ^a	0.588	p value ^a	0.433	p value ^a	0.046

Data are means ± SE of the number of normal cotyledonary somatic embryos obtained per gram of tissue (CE) pooling data of the tested embryogenic lines within treatments

^aOne-way ANOVA was carried out for each factor

when the highest inoculation density was used. The DW has been reported to be related to the number of stage 1 embryos in the cultures (Find et al. 1998a) and with a proportion of small dense cells higher than those of large vacuolated cells (Find et al. 1998b). Therefore the observed lack of SCV increase at the lowest density of inoculation could be related to a deficient formation of suspensor cells in stone pine. In studies with *Larix kaempferi* suspension cultures it was suggested that growth factors released to culture medium would influence the embryogenic development, mainly the differentiation of suspensors (Umehara et al. 2004).

When the growth kinetics of stone pine line 2F47 was determined, 20 mg mL⁻¹ was again the optimal density of inoculation. Studies on the growth kinetics of embryogenic cells in suspension cultures are needed in order to determine the optimal subculture time (Aquea et al. 2008). In the cultural conditions of this study, this line inoculated at 20 mg mL⁻¹ showed a linear increase of both SCV and DW reaching the maximum values after 21 days. This time point is similar to that reported for other *Pinus* species. In *P. taeda* the embryogenic culture showed an increase in the SCV up to 16 days of culture using 14 mg mL⁻¹ inoculum density (Silveira et al. 2004), and in *P. nigra* the suspensions reached the maximum SCV after 14 or 18 days of culture, depending on the line (Salaj et al. 2007). When stone pine suspensions were initiated with the optimal inoculum density no lag phase was observed, as was reported in other conifers (Azevedo et al. 2008; Choudhury and Tandon 2014).

The growth of stone pine suspension cultures was strongly influenced by orbiting speed, but the effect was dependent on the embryogenic line. This fact could be related to differences in the morphologies of the lines. Line 1F11, which was hardly affected by shaking, displayed enlarged embryo-suspensor structures with low degree of clustering. The embryos of this line resemble those with a cone-shaped embryonal mass and supernumerary suspensor cells described as abnormal embryos in *Pinus sylvestris* (Abrahamsson et al. 2017). Since these embryos do not show adhesion the line probably lacks the extracellular matrix described in other species, which may be important for the normal development of the embryogenic process (Pilarska et al. 2013 and ref. therein). On the opposite side are lines

7F11 and 2F47 whose growth was affected by increasing orbiting speed. They showed a different degree of clustering, and the growth of the most clustered one (7F11) was the most affected by the highest orbiting speed. Shaking likely disrupted the matrix of extracellular proteins that fosters the aggregation of the embryogenic structures (Neděla et al. 2016), affecting both the formation of suspensor cells and the cleavage polyembryony. Therefore, the disturbance of this extracellular matrix that has been reported to be necessary for the normal proliferation of conifer embryogenic lines (Egertsdotter and von Arnold 1998; Hřib et al. 2015) might be behind the observed decrease of SCV and DW in stone pine. In addition, a negative effect of the hydrodynamic shear stress exerted directly on the embryogenic cells on both the growth of meristematic cells and the formation of suspensors as was reported in *Picea abies* (Sun et al. 2010) cannot be ruled out. Another possible explanation for the SCV decrease with the increase of orbiting speed is the observed disintegration of the structures and the consequent greater compaction of the sedimented cells. Although SCV has been claimed to be useful for the routine estimation of growth as well as to predict fresh and dry weight in shake-flask suspension cultures (Krogstrup 1990; Tautorius et al. 1992), its accuracy could be lower than that of DW because it was affected by the turgidity as well as the size of cells and cells aggregates in the culture (Krogstrup 1990; Mustafa et al. 2011).

Optimal PGRs concentrations are usually lower when tissues are cultured in LM than when they are on SM because their diffusion rates to growing tissues are higher in the former (Gupta and Timmis 2005; Pullman and Skryabina 2007). Reduced PGRs concentrations did not affect growth parameters in stone pine suspension cultures. These results are similar to those reported by Carneros et al. (2009), who noticed that PGRs concentration was less important than basal medium formulation in the initiation of embryogenic lines of the same species. PGRs requirements for proliferation of conifer embryogenic lines seem to be very species-specific. The cell growth pattern of embryogenic cultures of *Araucaria angustifolia* established in a PGR-free LM was similar to that of lines cultured in medium with added PGRs (dos Santos et al. 2010). Conversely, embryogenic

suspension cultures of *Pinus taeda* growing in PGR-free medium showed lower SCV increase than those cultured in PGR supplemented media (Silveira et al. 2004).

The type of carbohydrate strongly influenced the growth of stone pine suspensions, as reported for other conifers. Embryogenic lines of *Pinus strobus* grew better on medium containing maltose instead sucrose (Kaul 1995). In *Pinus pinaster* maltose was found to increase the frequency of well-developed early somatic embryos during proliferation (Breton et al. 2005). By contrast, present data with *Pinus pinea* showed that tissues proliferated better when sucrose was used instead of maltose. Hydrolysis of maltose is slow compared to that of sucrose, producing lower endogenous hexose contents (Blanc et al. 2002). Iraqi and Tremblay (2001) considered sucrose hydrolysis and the maintenance of a sucrose gradient between the culture medium and the embryogenic tissues necessary for proliferation in spruce. In cell suspension cultures of *Pinus pinaster* sucrose was rapidly hydrolyzed and glucose and fructose were progressively consumed showing similar consumption rate profiles (Azevedo et al. 2008). In *Araucaria angustifolia* embryogenic suspensions fructose was preferentially consumed during the linear growth phase and glucose concentrations decreased following those of fructose (Astarita and Guerra 2000). Our results suggest that the presence of fructose in the culture medium is required for growing stone pine embryogenic tissues, which was not provided by maltose hydrolysis.

Maintenance of suspension cultures

For maintaining embryogenic suspension cultures of stone pine the subculture of 250 mg of the filtered cell mass (weighing procedure) was better than the transfer of 5-mL aliquots of the homogenized suspension (pipetting procedure). In the latter, as the cultures grew the FW of EM in the aliquots increased. The culture period 2 was started with aliquots from culture 1 that contained different amounts of EM depending on the line, which ranged from 517 mean mg FW in the case of line 2F47 to 238 mean mg FW in line 7F11. The culture period 3 was initiated with aliquots from culture 2 that also contained different amounts of tissue mass, ranging from 510 mg mean FW in the case of line 2F47 to 382 mg mean FW in line 7F11. Therefore, the effect of a non-optimal inoculum density, either by excess or by defect, might explain the observed reductions in DW after the second and the third subcultures. These results would point out that the effect of the density of inoculation on growth is not only exerted when cultures are initiated but it is also maintained along the successive subcultures. However a possible effect of the heterogeneity of inoculum cannot be ruled out (Krogstrup 1990). In the case of *Pinus pinea*, suspensions are heterogeneous and therefore it is

difficult to take homogeneous aliquots. In contrast with the pipetting procedure, subcultivation by weighing the fixed amount of 250 mg FW of the filtered cell mass resulted in a significant increase in SCV and DW along four subcultures. A relationship between sustainable growth and the transfer of a regular inoculum at each subculture was observed. The compact sample produced after filtering showed dense EM clusters which could provide greater inoculum homogeneity. In addition, it should be noted that 250 mg FW of the filtered cell mass are equivalent to 500 mg FW of tissue collected from the periphery of stone pine EM growing on SM. Hence subcultures were initiated with the optimal density of inoculation. Maintenance by the weighing procedure kept high growth rates and better reproducibility than the pipetting procedure throughout the subcultures mainly because the homogeneity of the inoculum. The pipetting procedure may be unsuitable when suspensions comprise different sizes of cell aggregates and therefore the reproducibility may be jeopardized (Mustafa et al. 2011).

The image analysis of macroscopic structures has been proposed as a way to evaluate the quality of embryogenic cultures, and so to estimate the productivity of the embryogenic process (Ibaraki and Kurata 2001). In the present study, line 7F11 showed a morphology similar to that of line 5F62 as well as similar growth rate. However lines 1F62 and 7F11, which grew poorly, differed morphologically. On the other hand, the best performer line 2F47 displayed similar morphology as line 1F62. Hence, no clear relationship was found between morphology and growth of stone pine EM cultured in suspension.

Culture scale-up for biomass production

The mass production of somatic embryos is the goal of the scaling-up, which is achieved by obtaining the highest amount of embryogenic tissue in the shortest time, and simplifying culture procedures. The scaling-up of embryogenic cultures is usually carried out in LM with both larger culture vessels and higher volumes of medium, which requires less labor and space than culture on SM (Gupta and Timmis 2005). In stone pine the DW increase after 6 weeks of culture was the double in LM than on SM. Moreover, the culture on SM required the bi-weekly EM fractionation and the transfer to an increasing number of Petri dishes with a higher risk of contamination. The quick uptake of nutrients by cells and their easy replacement at the cell surface that happens in LM as opposed to the gradients of concentrations generated on semi-solid media may be the main reasons for the increased growth in the former (Gupta and Timmis 2005; Kubeš et al. 2014). Besides, suspension culture produces tissues with different characteristics compared to those produced on SM. In contrast to the EM disaggregation that occurs in LM, on SM the conifer EM grow forming clumps that show a very

specific internal organization with different functionality. Usually they are composed by embryonal cells localized in the inner region that show reduced metabolic activity, and an outer region formed by somatic embryos with high metabolic activity and higher growth ability (Petrek et al. 2015). This structuring of the clumps makes necessary to fractionate them at each subculture to maintain the proliferation capacity, which is a high time-consuming task.

Variability among replicates at the end of the 6-week culture period was higher in stone pine embryogenic lines cultured in LM than on SM. A lesser inoculum homogeneity in the former than in the latter might explain this observation. Although both culture systems were started with the same type and amount of EM, an increasing variability arose in LM but not on SM with the consecutive subcultures. Variation in growth pattern among replicates has been also observed in suspension cultures of other conifers (dos Santos et al. 2010). Pooling of replicates before each subculture has been suggested as a way to minimize this variability (Krogstrup 1990; Ingram and Mavituna 2000; Choudhury and Tandon 2014).

Somatic embryo maturation

Normal cotyledonary somatic embryos were obtained on semi-solid maturation medium from stone pine embryogenic lines proliferated in LM. Few studies report the maturation of conifer somatic embryos in LM (Gorbatenko and Hakman 2001). This may be because for proper development and maturation of early somatic embryos the reduction of osmotic water potential and water availability to the cells is required in most species (Klimaszewska et al. 2016). Plant regeneration by somatic embryogenesis involves a series of stages in which the culture conditions in the previous one can condition the following (Lipavská and Konrádová 2004). The aim of the maturation experiment in this study was to determine possible carry-over effects of the conditions used during proliferation in LM on the production of normal cotyledonary embryos on SM. Although not statistically significant differences were recorded for the effect of shaking, likely due to the high intra-group variability, the number of embryos almost doubled when the orbiting speed was increased from 50 to 100 rpm. The stress caused by shear forces may explain this increase in maturation ability. It was reported that a moderate shear stress, in addition to promoting meristematic cell growth, modified the response of *Picea abies* embryogenic cells to different osmotica added to culture medium (Sun et al. 2011). It is conceivable that the hydrodynamic stress caused by the 100-rpm speed “conditioned” the stone pine cells to respond better to the osmotic conditions of the maturation medium required for proper embryo development to the cotyledonary stage.

Media components during proliferation also influenced the production of normal cotyledonary embryos during maturation. Although again not statistically significant, embryo production was almost tripled when lines were proliferated in LM with the lowest PGRs concentration. This result is in concordance with the required auxin and cytokinin withdrawal reported for maturation of somatic embryos of most conifer species (Klimaszewska et al. 2016). The preconditioning of stone pine embryogenic lines on medium with ultra-low 2,4-D and BAP concentrations previous to maturation was also reported to be beneficial when proliferation was carried out on SM (Carneros et al. 2009, 2017b).

The carbohydrate used during proliferation had a significant effect on the maturation of stone pine somatic embryos. Maturation carried out on maltose-containing medium was better when EM came from sucrose-containing LM rather than from maltose-containing LM. Maltose instead of sucrose has been widely used in maturation media of several *Pinus* species (Lelu-Walter et al. 2016). First results with stone pine indicated that it could also be suitable for that species (Carneros et al. 2009). In *Pinus taeda* maltose combined with PEG not only increased the production of mature embryos but also influenced the development of somatic embryos and suspensors that evolved differently from when they were grown in sucrose plus PEG (Li et al. 1998). These responses might be ascribed to a different osmotic effect exerted by maltose with respect to sucrose, because the hydrolysis of the former is much slower than that of the latter (Lipavská and Konrádová 2004) causing a slower decrease of the medium water potential during maturation. This effect of maltose could be also happened in the stone pine cultures of the present study. However, sucrose instead of maltose in the LM during the previous proliferation phase was required for a better embryo production. Likely embryogenic tissues accumulated sucrose during proliferation, both by direct uptake or endogenous re-synthesis (Lipavská and Konrádová 2004), that then was necessary for proper embryo maturation. In *Picea abies* sucrose accumulated in somatic embryos even when they were matured on sucrose-free media, and also sucrose availability increased their production (Kubeš et al. 2014). The results reported here with stone pine are in agreement with the suggested role for sucrose as regulator of embryo development (Iraqi and Tremblay 2001). Some somatic embryos from suspension cultures of *Pinus pinea* were germinated and converted into plants (Fig. s1) following methods previously reported (Carneros et al. 2009, 2017b).

Conclusions

The development of embryogenic suspension cultures in conifer species has aroused interest for the automation of the clonal plant production process reducing labor costs.

Forest companies have granted several patents for the practical application of these techniques (Gupta and Timmis 2005). The high propagation rates that offer suspension cultures make the technique very attractive for mass production of plants at reasonable costs. However, lack of reproducibility of the techniques and loss of competence for embryo differentiation during subcultivation condition their practical application in many embryogenic cultures. In several species cultures in LM are used as part of the propagation protocol, mainly in the scaling up of EM, and then embryo development is achieved on SM or temporary immersion systems (Preil 2005). Hargreaves (2017) pointed out that the potential for automation of culture via liquid culture and robotics is proving difficult with *Pinus radiata*, but she foreseen that some combination of liquid culture for cell line proliferation and other technologies of vegetative propagation may improve the economics of the clonal production process.

In stone pine higher biomass production was obtained using LM than SM, and the produced EM had the ability to mature when they were transferred to SM. The inoculum density was the major factor that influenced proliferation, not only at the suspension establishment but also in the maintenance of cultures. The higher variability among samples that occurred in LM compared to that on SM could be reduced by recurrent pooling of samples. Culture conditions during proliferation in LM have to be taken into account for proper embryo development and maturation on SM. A mild hydrodynamic stress might improve cotyledonary embryo production, as well as the lower PGRs concentration required during proliferation. The role of sucrose is important for embryo development. For appropriate maturation on maltose-containing medium, the previous sucrose reloading of embryogenic tissues during proliferation is required. This study shows that suspension cultures can be suitable for the bulking-up of *Pinus pinea* embryogenic lines.

Acknowledgements Funds were provided by the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2010-22292-C03-01); the Madrid Regional R&D program S2009AMB-1668 (REGENFOR-CM) and IMIDRA grant to N. Gonzalez Cabrero. The participation of Dr. D. López-Vela and Dr. N. Alonso-Blázquez in some experiments is highly appreciated. Authors thank the comments and suggestions of two anonymous reviewers, which served to improve the manuscript. This work is part of the requirements to fulfill the N. Gonzalez-Cabrero Ph.D. degree.

Author contributions NG-C and MR-G participated in the experimental design, conducted experiments and helped to draft the manuscript. JA performed the statistical analyses and helped to draft the manuscript. MT wrote the final version of the manuscript. CC conceived the study, designed the experiments and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abrahamsson M, Valladares S, Merino I, Larsson E, von Arnold S (2017) Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. *Vitro Cell Dev Biol—Plant* 53:86–96. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9797-y>
- Adams GW, Kunze HA, McCartney A, Millican S, Park YS (2016) An industrial perspective on the use of advanced reforestation stock technologies. In: Park YS, Bonga JM, Moon HK (eds) Vegetative propagation of forest trees. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, pp 323–334. <https://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/> Online Edition:
- Andrade GM, Nairn CJ, Le HT, Merkle SA (2009) Sexually mature transgenic American chestnut trees via embryogenic suspension-based transformation. *Plant Cell Rep* 28:1385–1397. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0738-7>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9754-x>
- Astarita LV, Guerra MP (2000) Conditioning of the culture medium by suspension cells and formation of somatic proembryo in *Araucaria angustifolia* (Coniferae). *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 36:194–200. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0036-0>
- Awan HUM, Pettenella D (2017) Pine Nuts: a review of recent sanitary conditions and market development. *Forests* 8(10):367. <https://doi.org/10.3390/f8100367>
- Azevedo H, Dias A, Tavares RM (2008) Establishment and characterization of *Pinus pinaster* suspension cell cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 93:115–121. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9349-1>
- Blanc G, Lardet L, Martin A, Jacob JL, Carron MP (2002) Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). *J Exp Bot* 53:1453–1462. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.373.1453>
- Breton D, Harvengt L, Trontin JF, Bouvet A, Favre JM (2005) High subculture frequency, maltose-based and hormone-free medium sustained early development of somatic embryos in Maritime pine. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 41:494–504. <https://doi.org/10.1079/IVP2005671>
- Carneros E, Celestino C, Klimaszewska K, Park Y-S, Toribio M, Bonga JM (2009) Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98:165–178. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9549-3>
- Carneros E, Hernández I, Toribio M, Díaz-Sala C, Celestino C (2017a) Effect of different cryoprotectant procedures on the recovery and maturation ability of cryopreserved *Pinus pinea* embryogenic lines of different ages. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 53:469–477. <https://doi.org/10.1007/s11627-017-9833-6>
- Carneros E, Toribio M, Celestino C (2017b) Effect of ABA, the auxin antagonist PCIB and partial desiccation on stone pine somatic embryo maturation. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 131:445–458. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1296-2>
- Choudhury H, Tandon P (2014) Non-destructive assessment of growth performance of embryogenic suspension culture of *Pinus kesiya* (Royle ex. Gord.) in shake-flask and self-designed bubble bioreactor and successful regeneration of plantlets from

- the culture systems. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci* 84:771–777. <https://doi.org/10.1007/s40011-013-0253-z>
- Deb CR, Tandon P (2004) Establishment of an embryogenic suspension culture of *Pinus kesiya* (Khasi pine) from various explants. *Indian J Biotech* 3:445–448
- dos Santos ALW, Silveira V, Steiner N, Maraschin M, Guerra MP (2010) Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. *Braz Arch Biol Technol* 53:497–504. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300001>
- Ducos JP, Lambot C, Pétiard V (2007) Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *Int J Plant Dev Biol* 1:1–12.
- Egertsdotter U, von Arnold S (1998) Development of somatic embryos in Norway spruce. *J Exp Bot* 49:155–162. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.319.155>
- Find JJ, Kristensen MM, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998a) Effect of culture period and cell density on regrowth following cryopreservation of embryogenic suspension cultures of Norway Spruce and Sitka spruce. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 53:27–33. <https://doi.org/10.1023/A:1006070729489>
- Find JJ, Nørgaard JV, Krogstrup P (1998b) Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *J Plant Physiol* 152:510–517. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80271-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80271-X)
- Finer JJ, Kriebel HB, Becwar MR (1989) Initiation of embryogenic callus and suspension cultures of eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Plant Cell Rep* 8:203–206. <https://doi.org/10.1007/BF00778532>
- Gorbatenko O, Hakman I (2001) Desiccation-tolerant somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*) can be produced in liquid cultures and regenerated into plantlets. *Int J Plant Sci* 162:1211–1218. <https://doi.org/10.1086/323416>
- Gupta PK (1996) Method for reproducing conifers by somatic embryogenesis using a maltose enriched maintenance medium. US Patent No 5,563,061, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Gupta PK, Timmis R (2005) Mass propagation of conifer trees in liquid cultures—progress towards commercialization. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:339–346. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6654-1>
- Hargreaves C (2017) The development and application of conifer tissue culture and somatic embryogenesis protocols in New Zealand: The *Pinus radiata* D. Don story. In: Bonga JM, Park Y-S, Trontin J-F (eds). In *Proc 4th Int Conf IUFRO Unit 2.09.02 on "Development and application of vegetative propagation technologies in plantation forestry to cope with a changing climate and environment"*. September 19–23, 2016. La Plata, Argentina, pp 235–244. <http://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>
- Hřib J, Vooková B, Neděla V (2015) Imaging of native early embryogenic tissue of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) by ESEM. *Open Life Sci* 10:285–290. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0028>
- Ibaraki Y, Kurata K (2001) Automation of somatic embryo production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 65:179–199. <https://doi.org/10.1023/A:1010636525315>
- Ingram B, Mavituna F (2000) Effect of bioreactor configuration on the growth and maturation of *Picea sitchensis* somatic embryo cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 61:87–96. <https://doi.org/10.1023/A:1006333907907>
- Iraqi D, Tremblay FM (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52:2301–2311. <https://doi.org/10.1093/jxb/52.365.2301>
- Jayawickrama KJ, McKeand SE, Jett JB (1997) Rootstock effects on scion growth and reproduction in 8-year-old grafted loblolly pine. *Can J For Res* 27:1781–1787. <https://doi.org/10.1139/x97-152>
- Jiménez JA, Alonso-Blázquez N, López-Vela D, Celestino C, Toribio M, Alegre J (2011) Influence of culture vessel characteristics and agitation rate on gaseous exchange, hydrodynamic stress and growth of embryogenic cork oak (*Quercus suber* L.) cultures. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 47:578–588. <https://doi.org/10.1007/s11627-011-9399-7>
- Kaul K (1995) Somatic embryogenesis in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic embryogenesis in woody plants*, vol 3. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 257–268. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0960-4_16
- Klimaszewska K, Hargreaves C, Lelu-Walter M-A, Trontin J-F (2016) Advances in conifer somatic embryogenesis since year 2000. In: Germanà MA, Lambardi M (eds) *In vitro embryogenesis in higher plants. Methods in molecular biology*, vol 1359. Springer, New York, pp 131–166. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3061-6_7
- Klöckner W, Büchs J (2012) Advances in shaking technologies. *Trends Biotechnol* 30:307–314. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.03.001>
- Krogstrup P (1990) Effect of culture densities on cell proliferation and regeneration from embryogenic cell suspensions of *Picea sitchensis*. *Plant Sci* 72:115–123. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90193-R](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90193-R)
- Kubeš M, Drážná N, Konrádová H, Lipavská H (2014) Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 50:45–57. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9589-6>
- Le-Feuvre R, Triviño C, Sabja AM, Bernier-Cardou M, Moynihan MR, Klimaszewska K (2013) Organic nitrogen composition of the tissue culture medium influences *Agrobacterium tumefaciens* growth and the recovery of transformed *Pinus radiata* embryonal masses after cocultivation. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 49:30–40. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9492-1>
- Lelu-Walter M-A, 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 Genet Genomes* 9:883–899. doi: s11295-013-0620-1
- Lelu-Walter MA, Klimaszewska K, Miguel C, Aronen T, Hargreaves C, Teyssier C, Trontin JF (2016) Somatic embryogenesis for more effective breeding and deployment of improved varieties in *Pinus* spp.: bottlenecks and recent advances. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds) *Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications*. Springer, Cham, pp 319–365. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_19
- Li XY, Huang FH, Murphy JB, Gbur EE (1998) Polyethylene glycol and maltose enhance somatic embryo maturation in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 34:22–26. <https://doi.org/10.1007/BF02823118>
- Lipavská H, Konrádová H (2004) Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell Dev Biol—Plant* 40:23–30. <https://doi.org/10.1079/IVP2003482>
- Litvay JD, Verma DC, Johnson MA (1985) Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Rep* 4:325–328. <https://doi.org/10.1007/BF00269890>
- Mustafa NR, de Winter W, van Iren F, Verpoorte R (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nat Protoc* 6:715–742. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.144>
- Mutke S, Gordo J, Gil L (2000) The stone pine (*Pinus pinea* L.) breeding programme in Castile-León (Central Spain). *FAO—CIHEAM Nucleus Newsllett* 9:50–55

- Mutke S, Gordo J, Gil L (2005) Variability of Mediterranean Stone pine cone production: yield loss as response to climate change. *Agric For Meteorol* 132:263–272. <https://doi.org/10.1016/j.agrfor.2005.08.002>
- Neděla V, Hřib J, Havel L, Hudec J, Runštuk J (2016) Imaging of Norway spruce early somatic embryos with the ESEM, Cryo-SEM and laser scanning microscope. *Micron* 84:67–71. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.02.011>
- Park Y-S (2014) Conifer somatic embryogenesis and multi-varietal forestry. In: Fenning T (ed) Challenges and opportunities for the world's forests in the 21st century. *Forests sciences*, vol 81. Springer, Netherlands, pp 425–439. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7076-8_17
- Petrek J, Zitka O, Adam V, Bartusek K, Anjum NA, Pereira E, Havel L, Kizek R (2015) Are early somatic embryos of the Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) organised? *PLoS ONE* 10(12):e0144093. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144093>
- Pilarska M, Knox JP, Konieczny R (2013) Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* Viv. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 115:35–44. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0337-8>
- Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. In: Hvoslef-Eide AK, Preil W (eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer, Dordrecht, pp 1–18. https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_1
- Pullman GS, Skryabina A (2007) Liquid medium and liquid overlays improve embryogenic tissue initiation in conifers. *Plant Cell Rep* 26:873–887. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0296-1>
- Salaj T, Blehova A, Salaj J (2007) Embryogenic suspension cultures of *Pinus nigra* Arn.: growth parameters and maturation ability. *Acta Physiol Plant* 29:225–231. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0028-3>
- 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 Organ Cult* 76:53–60. <https://doi.org/10.1023/A:102584751>
- Sokal RR, Rohlf FJ (1969) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman, San Francisco
- Strong WB (2006) Seasonal changes in seed reduction in lodgepole pine cones caused by feeding of *Leptoglossus occidentalis* (Hemiptera: Coreidae). *Can Entomol* 138:888–896. <https://doi.org/10.4039/n05-092>
- Sun H, Aidun CK, Egertsdotter U (2010) Effects from shear stress on morphology and growth of early stages of Norway spruce somatic embryos. *Biotechnol Bioeng* 105:588–598. <https://doi.org/10.1002/bit.22554>
- Sun H, Aidun CK, Egertsdotter U (2011) Possible effect from shear stress on maturation of somatic embryos of norway spruce (*Picea abies*). *Biotechnol Bioeng* 108:1089–1099. <https://doi.org/10.1002/bit.23040>
- Tautorus TE, Lulsdorf MM, Kikcio SI, Dunstan DI (1992) Bioreactor culture of *Picea mariana* Mill. (black spruce) and the species complex *Picea glauca-engelmannii* (interior spruce) somatic embryos. Growth parameters. *Appl Microbiol Biotechnol* 38:46–51. <https://doi.org/10.1007/BF00169417>
- Trontin JF, Teyssier C, Morel A, Harvengt L, Lelu-Walter MA (2016) Prospects for new variety deployment through somatic embryogenesis in maritime pine. In: Park Y-S, Bonga JM, Moon H-K (eds) Vegetative propagation of forest trees. National Institute of Forest Science (NIFoS), Seoul, pp 572–606. Online Edition: <https://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>
- Umehara M, Ogita S, Sasamoto H, Kamada H (2004) Inhibitory factor(s) of somatic embryogenesis regulated suspensor differentiation in suspension culture of Japanese larch (*Larix leptolepis* GORDON). *Plant Biotechnol* 21:87–94. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.87>
- Warschewsky EJ, Klein LL, Frank MH, Chitwood DH, Londo JP, von Wettberg EJ, Miller AJ (2016) Rootstocks: diversity, domestication, and impacts on shoot phenotypes. *Trends Plant Sci* 21:418–437. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.11.008>