

## MEJORA DE ESPECIES FORESTALES MEDIANTE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

por M<sup>a</sup> BELÉN PASCUAL, M<sup>a</sup> TERESA LLEBRES, RAFAEL CAÑAS, FERNANDO DE LA TORRE

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

BPASCUAL@UMA.ES

*Palabras clave:* coníferas, *Pinus pinaster*, transformación genética, embriogénesis somática

*Keywords:* conifers, *Pinus pinaster*, genetic transformation, somatic embryogenesis

Enviado: 25 de noviembre de 2016

Aceptado: 13 de diciembre de 2016

Los bosques son componentes esenciales del ecosistema y desempeñan un papel fundamental en el cambio climático. El pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es la especie más extendida en el mediterráneo occidental y actualmente forma parte de numerosos programas de reforestación. Nuevas herramientas biotecnológicas para la mejora del pino marítimo, tales como la embriogénesis somática (ES), ofrecen nuevas oportunidades en el campo de la propagación *in vitro* e ingeniería genética. La ES proporciona una de las vías principales para la mejora genética de especies forestales y una poderosa herramienta para incrementar la producción y calidad de la madera.

*Forest are essential components of the ecosystem and play a key role in climate change. Maritime pine (Pinus pinaster Ait.) is the most widely planted softwood species in the western mediterranean forming part of reforestation programmes. Biotechnological approaches for the improvement of maritime pine, such as somatic embryogenesis (ES), offer new opportunities in the field of in vitro propagation and genetic engineering. Somatic embryogenesis is one of the main methods for the genetic improvement of forest species and may provide a powerful tool for rapid increase in yield and wood quality.*

Los bosques son componentes esenciales del ecosistema y desempeñan un papel fundamental en la regulación del ciclo global del carbono, el cambio climático, el control de la erosión y el mantenimiento de la biodiversidad. La adaptación del sector forestal al cambio climático es necesaria. Esto significa integrar lo que sabemos sobre el cambio climático en la sostenibilidad de la gestión, planificación y prácticas en el bosque para mantener la integridad del ecosistema y el conjunto de beneficios sociales, económicos y ambientales que derivan de él.

Los árboles proporcionan un recurso renovable único, la madera, uno de los recursos más importantes de la historia de la civilización humana. En los últimos años existe la necesidad de satisfacer la creciente demanda de madera como consecuencia del aumento de la población, al tiempo que se preservan los bosques naturales. Una forma eficaz de lograr este objetivo es mejorar la productividad y la calidad de la madera mediante la selección y mejora de árboles de élite conducida por la especie humana. En contraste con los cultivos tradicionales, las especies de árboles forestales que se emplean como fuente de madera no han sido «domesticados» debido a ca-

racterísticas recalcitrantes como ciclos de vida muy largos. En la actualidad, las mejoras en las herramientas biotecnológicas modernas brindan un gran potencial para este fin. Las coníferas están entre los árboles más productivos en términos de generación anual de biomasa lignocelulósica (la lignocelulosa es la fuente orgánica más económica, abundante y renovable del mundo) y son la materia prima preferida para gran parte de la industria de productos forestales (madera para la construcción, pulpa para elaboración de papel, resinas, barnices, etc.)

A muchas especies forestales se las considera recalcitrantes para ser transformadas genéticamente y regeneradas mediante cultivo *in vitro*, aunque el desarrollo de herramientas biotecnológicas durante los últimos años está permitiendo que esto se convierta en una realidad. La embriogénesis somática (ES) proporciona una de las vías principales para la mejora genética de especies forestales. Se trata de un proceso de micropropagación clonal en el que a partir de una o varias células somáticas se genera una planta igual a la de partida vía cultivo *in vitro*. Consta de cuatro etapas principales: inducción, proliferación, maduración y regeneración (Figura 1).



**Figura 1.** Proceso de generación de embriones somáticos y transformación genética de *P. pinaster*.

Aunque han sido numerosas las especies de coníferas que se han transformado genéticamente<sup>[1]</sup>, el género *Pinus* resulta más difícil de transformar de forma estable y de micropropagar, encontrándose muchos obstáculos durante todo el proceso, principalmente en la selección de las líneas transgénicas y el establecimiento del cultivo embriogénico. En general, la transformación de coníferas es una tarea larga y tediosa. Cada una de las fases de la ES duran de media entre 2 y 4 meses haciendo que, en el caso de *Pinus pinaster*, la obtención de líneas transgénicas suponga como mínimo un año de trabajo. Por este motivo, los estudios funcionales en estas plantas han utilizado muy frecuentemente el uso de aproximaciones experimentales en otras plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana benthamiana*. Sin embargo, este tipo de aproximaciones entraña una serie de desventajas como la dificultad de estudiar la función de un determinado gen que interviene en un proceso cuantitativamente importante en árboles, como es el caso de los genes implicados en la formación de madera en coníferas, usando otra especie como *Arabidopsis*, en la que este proceso no es tan importante. Por ello, en coníferas, la ES es una técnica imprescindible en estudios de transformación genética y de genómica funcional a fin de validar genes relacionados con procesos concretos<sup>[2]</sup>.

Actualmente no se dispone de un protocolo de ES estandarizado para trabajar con especies leñosas,

sino que es necesario optimizarlo para cada una de ellas. Además, los métodos de regeneración de especies forestales mediante la producción de embriones somáticos sólo son eficientes en un número muy reducido de genotipos, siendo muy dependientes del estado de maduración del embrión cigótico o explanto a partir del cual se va a establecer la masa embriogénica. Sin embargo, la ES, además de una importante vía de propagación clonal, proporciona un material idóneo para la transformación genética de coníferas y lo más importante, permite la criopreservación de las líneas obtenidas.

El pino resinero o marítimo (*Pinus pinaster* Ait.) es una especie de alto interés ecológico y económico en el mediterráneo occidental y una especie modelo para la investigación genómica en Europa. Esta especie ha sido elegida por el consorcio Sustainpine, (<http://www.scbi.uma.es/sustainpine/index.html>), que lidera nuestro grupo de investigación BIO 114 (Biología Molecular y Biotecnología de Plantas), para el estudio de genes candidatos implicados en desarrollo, crecimiento y respuestas a estrés. La mejora genética del pino marítimo va orientada fundamentalmente a obtener árboles con características mejoradas en cuanto a mayor producción de biomasa y metabolitos secundarios, así como, el desarrollo de cultivos forestales como fuente de materiales renovables para la producción de biocombustibles, papel y de productos químicos biodegradables.

Hay muy pocos trabajos publicados hasta la fecha que hayan implicado la generación de plantas transgénicas de pino marítimo y en todos ellos usan *Agrobacterium tumefaciens* como ingeniero molecular<sup>[1,3,4,5]</sup>. Una de las ventajas que ofrece este método frente a otros, como la biobalística, es que permite la integración de una o muy pocas copias del transgén en el genoma de la planta, disminuyendo la probabilidad de silenciamiento génico. El hecho de que la eficiencia de transformación sea relativamente baja en muchas coníferas puede deberse a una serie de parámetros como son: el genotipo y edad de la línea embriogénica (la tasa de transformación y posterior regeneración se ve negativamente afectada por la edad de la línea celular), la cepa de *Agrobacterium*, la fase de co-cultivo entre la bacteria y las células de la planta (ratios de densidad celular, duración, temperatura, etc), el control del crecimiento bacteriano con bactericidas (es importante eliminar *Agrobacterium* una vez finalizada la transformación), así como la selección de las líneas transgénicas. Se han usado distintos antibióticos para realizar la selección (higromicina, kanamicina y Basta) con diferentes resultados. Por ejemplo, muchas especies de pino son extremadamente sensibles a la kanamicina o a la higromicina<sup>[1,4,5]</sup>, mientras que un aumento en la tasa de maduración y posterior germinación se ha obtenido usando Basta para la selección de líneas transgénicas de pino<sup>[1]</sup>. En cualquier caso, la concentración del agente selectivo debe ser optimizada en función de la especie de pino a transformar y de la línea embriogénica usada, ya que el antibiótico debe permitir seleccionar aquellas células transformadas y al mismo tiempo, preservar su potencial regenerativo.

Una de las principales ventajas que ofrece la ES sobre otros métodos de regeneración es que la masa embrionaria transformada puede ser fácilmente criopreservada, sin que esto tenga ningún efecto negativo sobre el posterior crecimiento de la línea celular y expresión del transgén<sup>[5]</sup>. Esto es crítico porque los cultivos embriogénicos van perdiendo progresivamente su capacidad de formación de embriones maduros como consecuencia del rápido envejecimiento celular. La criopreservación del tejido permite mantener la masa embriogénica «joven» mientras se realizan todos los análisis moleculares correspondientes para confirmar la presencia del transgén, así como los en-

sayos en campo de las líneas que derivan del cultivo *in vitro*. La generación de embriones maduros y con capacidad de generar una planta nueva representa un cuello de botella en el proceso de embriogénesis somática para el género *Pinus* y aunque se ha optimizado mucho esta etapa en los últimos años, en el caso de *P. pinaster*, la tasa de maduración en muchos casos sigue siendo baja. El éxito de la ES está en obtener plantas viables que puedan crecer en suelo y esto va a depender, en gran medida, de la calidad de los embriones somáticos obtenidos y de las condiciones utilizadas en etapas anteriores.

Durante la próxima década asistiremos con toda seguridad a una potente expansión de los «cultivos forestales». Dado el potencial que puede llegar a tener la ES para la regeneración de plantas, la transformación genética puede ser considerada como un potente generador de productos comerciales con características mejoradas y aunque los costes económicos a la hora de automatizar el proceso siguen siendo muy altos, la industria forestal está apostando claramente por las especies con mayor potencial económico<sup>[6]</sup>. Como un ejemplo diremos que, en Canadá, país que posee la tercera extensión de bosque del mundo, la industria forestal genera 22,1 billones de dólares. La buena gestión de los bosques ha supuesto en este país que, apuesta por una silvicultura sostenible, una reducción del 44 % de las emisiones de carbono, ya que la bioenergía proveniente de la biomasa forestal produce menos emisiones de gases con efecto invernadero que las producidas por la energía de los combustibles tradicionales.

## Referencias

- <sup>1</sup>Trontin JF y otros. Recent progress in genetic transformation of four *Pinus* spp. *Transgenic Plant Journal* 1: 314-329, 2007.
- <sup>2</sup>Campbell MM y otros. Forestry's fertile crescent: the application of biotechnology to forest trees. *Plant Biotech J* 1: 141-154, 2003.
- <sup>3</sup>Trontin JF y otros. Towards genetic engineering of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait). *Annals of Forest Science* 59: 687-697, 2002.
- <sup>4</sup>Álvarez JM y Ordás RJ. Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maritime pine based on kanamycin selection. *Scientific World Journal* doi:10.1155/2013/681792.
- <sup>5</sup>Tereso S y otros. Stable *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic tissues from *Pinus pinaster* Portuguese genotypes. *Plant Growth Regulation* 50: 57-68, 2006.
- <sup>6</sup>Cyr DR y Klimaszewska K. Conifer somatic embryogenesis: II Applications. *Dendrobiology* 48: 41-49, 2002.