



PROCESOS DE CLONACIÓN *IN VITRO* APLICABLES AL GENERO *PINUS* PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO Y PROPAGACIÓN MASIVA

Carlos Ramírez Serrano* y Leticia Aguilera Robledo. *Laboratorio de Biotecnología, CUCBA, Universidad de Guadalajara. Km 15.5 Carretera a Nogales, Las Agujas, Nextipac, Zapopan Jal. 45101, México. Tel. +33 37 77 11 92. Fax. +33 36 82 00 03. cramirez@cucba.udg.mx*

Palabras clave: Mejoramiento genético, propagación masiva, género Pinus.

Introducción. La limitación de los procesos de clonación *in vitro* para el mejoramiento genético es la baja eficiencia. Se requiera de una elevada producción y buena calidad de embriones somáticos, a fin de cuantificar valores entre genotipos y árboles selectos. Opcionalmente se puede aplicar la transformación genética a fin de transferir a genotipos deseable los genes de importancia económica. Por lo anterior, el uso de la propagación vegetativa *in vitro* ofrece ventajas significativas para el mejoramiento genético y propagación masiva de material seleccionado. Varias innovaciones y ajustes se han aplicado en la clonación *in vitro* de diferentes especies de *Pinus*. Los objetivos de este proyecto fueron: desarrollar un método de producción de tejido embriogénico (TE) aplicable al género *Pinus*, determinar la competencia genética de la embriogénesis somática en el pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.), y finalmente desarrollar un método de regeneración para utilizarlo en la transformación genética de *P. sylvestris* vía biobalística.

Metodología. El Proceso 1 se desarrolló para producir TE en dos especies filogenéticamente distantes (*P. sylvestris* y *P. maximartinezii*) se colectaron semillas por árbol en diferente estado de maduración, y se utilizaron diferentes medios de cultivo simultáneamente (1); Proceso 2 fue para evaluar la competencia genética del proceso en *P. sylvestris*, vía maduración de embriones en un medio modificado con una relación de amonio a nitrato 10:90, maltosa, ABA y como gelificante Phytigel, dicho medio es aplicable a diferentes genotipos, aún los emparentados (familias) (2); finalmente el Proceso 3 fue el protocolo base para la transformación genética de *P. sylvestris* donde se utilizaron cultivos en suspensión previamente conservados a 4° C (3) para la maduración. Se evaluó la producción de tejido embriogénico por árbol seleccionado, así como el establecimiento método apto para el Género *Pinus*; la producción de embriones maduros por genotipos, la germinación y desarrollo en plántulas; y la regeneración vía cultivos en suspensión de embriones conservados a 4° C (ambos métodos aplicados a *P. sylvestris*).

Resultados. En el proceso 1, la iniciación en *P. sylvestris* en embriones cigóticos inmaduros varió de 0.5 a 11% entre árboles; en *P. maximartinezii* la producción de tejido embriogénico se logró en embriones precotiledonares y embriones cotiledonares. El establecimiento se alcanzó en el 100% de los genotipos que proliferaron en ambas especies por medio de diferentes medios basales e intercambio de masas embriogénicas entre ellos. Proceso 2, en *P. sylvestris* se produjeron 4881 embriones maduros con capacidad de convertirse en plántulas (Fig. 1), donde se incluyen genotipos

considerados productores de embriones aberrantes; después de una disección parcial se lograron plantas con raíces en más del 80% de los genotipos pertenecientes a más del 95% de los árboles estudiados. Igualmente se obtuvieron 50 embriones maduros por gramo de TE vía proceso 3. En el Cuadro 1 se presenta la eficiencia.



Figura 1. Proceso de germinación en *P. sylvestris* (embriones esc. = 1 mm, plántulas esc. = 1 cm).

Cuadro 1. Eficiencia en los procesos de regeneración *in vitro* y su aplicabilidad.

Proceso 1	Proceso 2	Proceso 3
TE suficiente/árbol, 100% establecimiento, Para el Género <i>Pinus</i> .	5-1500 embriones maduros/genotipo, >80 genotipos, >95% árboles, Sólo <i>P. sylvestris</i> .	Conservación a 4° C y suspensión eficaz para todos los pinos. Maduración para <i>P. sylvestris</i> .

Conclusiones. En el Proceso 1, la producción de TE es variable pero suficiente por árbol selecto; el establecimiento del 100% de los genotipos es fundamental para el mejoramiento genético. Vía Proceso 2, se puede hacer mejoramiento genético y propagación masiva. Respecto al Proceso 3, la conservación de embriones a 4° C y el cultivo en suspensión son aplicable al género *Pinus*, sin embargo la transformación genética es posible sólo para *P. sylvestris*.

Agradecimientos. CONACYT y PROMEP por las becas y apoyos otorgados.

Bibliografía

- Ramírez-Serrano, C.; González, V.; Pelayo, C. 2006. Method of producing and establishing embryogenic tissue for multiple pine genotypes (Genus *Pinus*). Journal of Intellectual Patent Office of New Zealand Patent NZ535553: <http://www.iponz.govt.nz>
- Ramírez-Serrano, C. 2004. Method for producing mature somatic embryos of Scotch pine (*P. sylvestris*). Journal of Intellectual Patent Office of New Zealand Patent NZ 521630. <http://www.iponz.govt.nz>
- Ramírez-Serrano, C. 2004. Method for producing somatic embryos of pine trees (Genus *Pinus*) Journal of Intellectual Patent Office of New Zealand Patent NZ521144. <http://www.iponz.govt.nz>