



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Forestales - Programa de Magister en Ciencias Forestales



**Efecto de la criopreservación en la respuesta morfo-
fisiológica del tejido embriogénico para la producción de
embriones somáticos de *Pinus radiata* D. Don.**

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Forestales

YENNY ANABELA LINEROS FUENTEALBA
CONCEPCIÓN-CHILE
2018

Profesor Guía: Darcy Ríos Leal
Dpto. de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales
Universidad de Concepción

Efecto de la criopreservación en la respuesta morfo-fisiológica del tejido embriogénico para la producción de embriones somáticos de *Pinus radiata* D. Don.

Comisión Evaluadora:

Darcy Ríos Leal (Profesor guía)

Prof. Biología y Química, Dra. _____

Manuel Sánchez Olate (Comisión evaluación)

Ing. Forestal, Dr. _____

María Paz Jofré Vásquez (Comisión evaluación externa)

Bióloga, Dr(a). _____

Director de Postgrado:

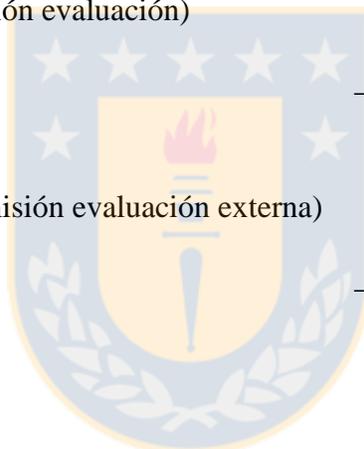
Regis Teixeira Mendoca

Ingeniero químico, Dr. _____

Decano Facultad de Ciencias Forestales:

Jorge Cancino Cancino.

Ingeniero Forestal, Dr. _____



AGRADECIMIENTOS

A mi esposo Mauricio y a mis hijos Emilia y Sebastián por entenderme en los momentos difíciles y por ser mi pilar fundamental para seguir adelante.

A mi equipo de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología de Bioforest, por apoyarme en todo durante la duración de mis estudios, por las ausencias y el trabajo extra.

A mis amigas Mónica Guiñez, Ingrid Galaz, Ximena Muñoz y Karina Crisóstomo por darme apoyo técnico y emocional.

A mi profesora, Darcy Ríos, por su apoyo y motivación.

A mis padres Bridie y Nolberto por creer siempre en mis capacidades personales y profesionales.

A Bioforest S.A por el apoyo en la realización de mis estudios de Magister.

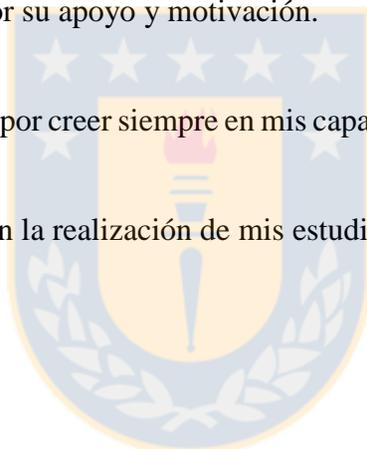


TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. ESTADO DEL ARTE	1
1.2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
1.2.1. Hipótesis	8
1.2.2. Objetivos	8
2. CAPÍTULO I: Efecto de diferentes tratamientos crioprotectores en la recuperación y capacidad madurativa de tejido embriogénico criopreservado de <i>Pinus radiata</i>	10
2.1. RESUMEN	10
2.2. INTRODUCCIÓN	11
2.3. METODOLOGÍA	14
2.3.1. Material Vegetal	14
2.3.2. Criopreservación y reactivación de tejido embriogénico	15
2.3.3. Microscopía óptica	15
2.3.4. Microscopía electrónica	16
2.3.5. Maduración de embriones somáticos	16
2.3.6. Germinación de embriones somáticos	17
2.3.7. Análisis estadístico	17
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
2.4.1. Recuperación del tejido criopreservado	17
2.4.2. Caracterización morfológica	21
2.4.3. Capacidad madurativa	23
2.4.4. Conversión a plantas	26

2.5. CONCLUSIONES.....	28
2.6. AGRADECIMIENTOS.....	29
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
3. CAPÍTULO II: Caracterización de parámetros bioquímicos de tejido embriogénico de <i>Pinus radiata</i> sometido a distintos pretratamientos crioprotectores.....	35
3.1. RESUMEN	35
3.2. INTRODUCCIÓN.....	36
3.3. METODOLOGÍA.....	37
3.3.1. Material Vegetal.....	37
3.3.2. Evaluación de parámetros bioquímicos	37
3.3.3. Análisis estadístico.....	39
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
3.4.1. Carbohidratos solubles totales	39
3.4.2. Proteínas totales	40
3.4.3. Prolina.....	42
3.5. CONCLUSIONES.....	43
3.6. AGRADECIMIENTOS.....	43
3.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
4. CAPÍTULO III: Efecto de la densidad celular inicial de criopreservación en la capacidad madurativa de tejido embriogénico de <i>Pinus radiata</i>	47
4.1. RESUMEN	47
4.2. INTRODUCCIÓN.....	47
4.3. METODOLOGÍA.....	49
4.3.1. Material Vegetal.....	49
4.3.2. Criopreservación	50
4.3.3. Descongelación y reactivación del tejido post-criopreservación.....	51
4.3.4. Maduración de embriones somáticos.....	51
4.3.5. Análisis estadístico.....	52
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52

4.4.1. Evaluación de tejido embriogénico.....	52
4.4.2. Descongelación y reactivación del tejido	53
4.4.3. Maduración de embriones somáticos.....	56
4.5. CONCLUSIONES.....	58
4.6. AGRADECIMIENTOS.....	59
4.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
5. DISCUSIÓN GENERAL	63
6. CONCLUSIONES GENERALES	67
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Efecto de 5 pretratamientos crioprotectores en la recuperación de tejido embriogénico (TE) <i>P. radiata</i> recuperado luego de la criopreservación	20
Figura 1.2	Efecto del tiempo de enfriamiento (almacenamiento a -80°C) previo a la inmersión en nitrógeno líquido.	21
Figura 1.3	Tejido embriogénico (TE) de <i>P. radiata</i> criopreservado con tratamiento DMSO5, visto en microscopía electrónica de barrido (SEM).	22
Figura 1.4	Morfología de los complejos proembriogénicos (CPEs) de <i>P. radiata</i> observados en microscopía óptica en el tejido criopreservado luego de 4 semanas en subcultivo.....	23
Figura 1.5	Efecto de 5 pretratamientos crioprotectores en el número de embriones maduros (capacidad madurativa) por gramo de peso fresco (No. Es/g PF) de tejido embriogénico (TE) de <i>P. radiata</i> recuperado luego de la criopreservación.	24
Figura 1.6	Microplantas de <i>P. radiata</i> obtenidas de embriones somáticos (Es) cotiledonares provenientes de tejido embriogénico (TE) criopreservado.....	27
Figura 2.1	Contenido de carbohidratos solubles totales (CST) en tejido embriogénico (TE) de 4 genotipos de <i>P. radiata</i> sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.	40
Figura 2.2	Contenido de proteínas totales en tejido embriogénico (TE) de 4 genotipos de <i>P. radiata</i> sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.	41
Figura 2.3	Contenido de prolina en tejido embriogénico (TE) de 4 genotipos de <i>P. radiata</i> sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.	42
Figura 3.1	Método de criopreservación “Slow cooling” o enfriamiento lento.	50
Figura 3.2	Tejido embriogénico (TE) generado de semillas inmaduras de <i>P. radiata</i> desde su generación hasta después de ser criopreservado.....	52

Figura 3.3 Curva de crecimiento celular de las líneas celulares embriogénicas (LCEs) de <i>P. radiata</i>	53
Figura 3.4 Efecto de 4 densidades celulares iniciales en la recuperación de tejido embriogénico (TE) de <i>P. radiata</i> luego de ser criopreservado.....	54
Figura 3.5 Recuperación de crecimiento (%) de tejido embriogénico (TE) observado en 5 líneas celulares de <i>P. radiata</i> (Gen A, B, C, D y E) criopreservadas con 4 densidades celulares iniciales.	56
Figura 3.6 Efecto de 4 tratamientos de densidad inicial en el número de embriones maduros (capacidad madurativa) por gramo de peso fresco (No. Es/g PF) de tejido embriogénico (TE) de <i>P. radiata</i> recuperado luego de la criopreservación.	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.1 Líneas celulares embriogénicas (LCEs) de <i>P. radiata</i> recuperadas luego de ser criopreservadas con distintos pretratamientos crioprotectores.	18
Cuadro 1.2 Número de embriones somáticos (Es) cotiledonares de 14 líneas celulares embriogénicas (LCEs) de <i>P. radiata</i> sometidas a 5 pretratamientos crioprotectores.	25
Cuadro 3.1 Número de embriones somáticos (Es) cotiledonares de 5 Líneas celulares (LCEs) de <i>P. radiata</i> sometidas a 4 densidades iniciales de criopreservación.	58

RESUMEN

La criopreservación es una técnica utilizada frecuentemente para preservar materiales vegetales de alto valor, sin embargo, existe poca evidencia científica de cómo ésta técnica biotecnológica afecta tejidos embriogénicos en coníferas una vez que se requiere producirlos en forma masiva para obtener plantas. El objetivo principal de este estudio fue evaluar morfo-fisiológicamente el efecto de la criopreservación de tejido embriogénico de *Pinus radiata* en el número de embriones somáticos regenerados (capacidad madurativa).

En el trabajo de investigación se evaluó la respuesta del tejido embriogénico de *P. radiata* criopreservado con distintos pretratamientos crioprotectores y distintas densidades celulares iniciales. Para ambos estudios se evaluó el porcentaje de reactivación del tejido embriogénico y el potencial embriogénico mediante microscopía, para luego determinar la capacidad madurativa de las líneas celulares utilizadas. Los principales resultados obtenidos con relación a la tasa de reactivación, en ambas variables, fueron significativamente menores que el control, destacando que para el caso de los pretratamientos crioprotectores la combinación de 0.4 M de sorbitol, 5% (p/v) dimetilsulfóxido y 0.09 M de L-prolina pareciera ser la más beneficiosa. Además, se observó que las densidades celulares menores (7 y 14%) disminuyeron significativamente el número de muestras recuperadas con relación al tejido no criopreservado y las densidades celulares mayores (21 y 28%) no presentaron diferencias significativas con el control.

No se observaron daños post-criopreservación ni alteración en la morfología de los complejos proembriogénicos al ser evaluados con microscopía óptica. Con respecto a la capacidad madurativa, esta se vio afectada por el pretratamiento crioprotector, pero no así por la densidad celular inicial. Se observó interacción entre los tratamientos y las líneas celulares evaluadas. Una vez recuperado el tejido proveniente del estudio de crioprotectores, se realizaron mediciones de carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina durante 4 semanas. Para el caso de las proteínas totales y prolina no se observaron diferencias significativas entre las semanas posteriores a la descongelación y los valores iniciales observados antes de

criopreservar el tejido. Para el caso de los carbohidratos solubles totales se observaron diferencias significativas sólo la primera semana de subcultivo.

Se concluye que existe una disminución en la capacidad madurativa de las líneas celulares utilizadas producto de la criopreservación, sin embargo, esto puede minimizarse detectando pretratamientos con crioprotectores adecuados y densidades celulares óptimas para las líneas celulares de interés, permitiendo así sustentar la ganancia de estos genotipos por largos periodos de tiempo.



ABSTRACT

Cryopreservation is a technique frequently used to preserve high value plant materials, however, there is little scientific evidence of how this biotechnological technique affects embryogenic tissues in conifers once it is required a large-scale of plant production. The main objective of this study was to evaluate morpho-physiologically the effect of cryopreservation of embryogenic tissue of *Pinus radiata* on the number of regenerated somatic embryos (maturation ability).

In the research work, the cryopreserved embryogenic tissue response of cryopreserved *P. radiata* with different cryoprotective pretreatments and different initial cellular densities was evaluated. For both studies, the percentage of embryogenic tissue recovery and embryogenic potential was evaluated by microscopy, to then determine the maturation ability of the cell lines used. The main results obtained in relation to the recovery rate, in both variables, were significantly lower than the control, highlighting that for the case of cryoprotective pretreatments the combination of 0.4 M sorbitol, 5% (v/v) dimethyl sulfoxide and 0.09 M L-proline seems to be the most beneficial. In addition, it was observed that the lower cell densities (7 and 14%) significantly decreased the number of samples recovered in relation to the non-cryopreserved tissue and the higher cell densities (21 and 28%) did not present significant differences with the control.

No damage was observed post-cryopreservation or alteration in the morphology of the proembryogenic complexes when evaluated with optical microscopy. Regarding the maturation ability, this was affected by the cryoprotective pretreatment, but not by the initial cell density. Interaction was observed between the treatments and the cell lines evaluated. Once the tissue from the study of cryoprotectants was recovered, measurements of total soluble carbohydrates, total proteins and proline were made for 4 weeks. In the case of total proteins and proline, no significant differences were observed between the weeks after thawing and the basal values observed before tissue cryopreservation. In the case of total soluble carbohydrates, significant differences were observed only during the first week of subculture.

It is concluded that there is a decrease in the maturation ability of the cell lines used as a result of cryopreservation, however, this can be minimized by detecting pretreatments with adequate cryoprotectants and optimal cell densities for the cell lines of interest, thus allowing us to sustain the gain of these genotypes for long periods of time.



1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ESTADO DEL ARTE

El sector forestal, particularmente asociado con las plantaciones comerciales de especies exóticas, ha jugado un rol clave en el crecimiento económico de Chile, siendo ésta la tercera actividad económica más importante del país. Durante las últimas dos décadas el sector forestal ha tenido un crecimiento sostenido en términos de productividad, lo que lo ha posicionado como un sector exportador importante luego de la industria de la minería. Esto ha sido en parte consecuencia de la mejora continua en términos de la productividad y calidad de las plantaciones forestales, situación basada en los altos niveles tecnológicos aplicados por un reducido número de grandes y medianas empresas que disponen de la capacidad económica para esto.

Pinus radiata es la especie forestal con mayor superficie plantada en Chile. Su distribución va desde la V a la X región, siendo así la de mayor importancia económica para el país con 1.391.039 ha plantadas (INFOR, 2017). Es por esto que el desarrollo genético de la especie ha tenido grandes avances en las últimas décadas, debido a la inyección de recursos por parte de las principales empresas forestales del país. Este mejoramiento está basado en la obtención de individuos de alto valor, los cuales deben ser validados previamente en terreno por un periodo no menor a 6 años.

La propagación vegetativa de especies forestales, como método de producción de plantas, se ha incrementado considerablemente en programas de mejoramiento. La progenie vegetativa es obtenida de dos formas: mediante la macropropagación o propagación *ex vitro*, utilizando distintos métodos de propagación de árboles, tales como el enraizamiento de esquejes o injertos, donde la eficacia de estos métodos depende a menudo de la edad y el estado fisiológico de la planta donante; por otra parte, la micropropagación o propagación *in vitro* mediante la multiplicación de brotes axilares, la organogénesis o la embriogénesis somática (Hazubska-Przybyl y Bojarczuk 2016).

La embriogénesis somática es el último y potencialmente más eficiente método para micropropagación vegetativa de plantas. Es un proceso de desarrollo en el que una célula somática vegetal puede desdiferenciarse a una célula madre embrionaria totipotente que tiene la capacidad de dar origen a un embrión en condiciones apropiadas y este nuevo embrión puede convertirse en una planta entera. En plantas leñosas, la embriogénesis somática desempeña un papel crítico en la propagación clonal y es una poderosa herramienta para la producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma y criopreservación (Guan *et al.* 2016).

La embriogénesis somática es un valioso método *in vitro* para propagar vegetativamente coníferas en programas de mejoramiento genético y en silvicultura clonal. El procedimiento completo de regeneración de plantas en coníferas a través de embriogénesis somática comprende varias etapas, las que incluyen; inducción, proliferación o multiplicación de tejido embriogénico, diferenciación de embriones tempranos y desarrollo de embriones cotiledonares tardíos (Von Arnold *et al.* 2016). Varios autores han desarrollado protocolos de trabajo en coníferas, donde se ha utilizado principalmente semillas inmaduras como explanto (Park 2002). Los tejidos embriogénicos contienen estructuras embrionarias somáticas de fase temprana, que en su mayoría son análogas a las etapas particulares de embriones zigóticos presentes en semillas normales. La propagación vía embriogénesis somática es un método efectivo para generar plantas *elite* cuando se combinan con otras tecnologías tales como la criopreservación de tejido embriogénico y la selección de clones *elite* en ensayos de campo (García-Mendiguren *et al.* 2016).

La criopreservación es una técnica efectiva que permite almacenar a ultra-bajas temperaturas (-196°C) tejido biológico viable por largos periodos de tiempo (incluso años), usualmente en nitrógeno líquido (Kantha *et al.* 1988, Martínez-Montero y Harding 2015). A esta temperatura criogénica, se entiende que la división celular y todos los procesos metabólicos están detenidos y que el germoplasma vegetal puede ser mantenido indefinidamente sin alteración genética (Ozudogru y Lambardi 2016). Sin embargo, hay algunas evidencias teóricas que sugieren que los procesos bioquímicos y moleculares no pueden ser completamente detenidos a temperaturas ultra-bajas. El requisito clave es que el contenido de agua de las células se

mantenga lo suficientemente bajo como para evitar la formación de cristales de hielo, asegurando que las células puedan recuperarse fácilmente después del almacenamiento. En contraste con la inmersión directa en nitrógeno líquido en un solo paso, el método de enfriamiento lento, desarrollada por Withers y King (1980), es el método más utilizado para la criopreservación de cultivos embrionarios somáticos en coníferas y árboles de hoja ancha. (Gupta *et al.* 1987, Kartha *et al.* 1988, Lainé *et al.* 1992, Norgaard *et al.* 1992, Kristensen *et al.* 1994, Ford *et al.* 2000, Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2003, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2011, Latutrie y Aronen 2013, Salaj *et al.* 2016 y *et al.* Carneros *et al.* 2017)

La integración de la embriogénesis somática y la criopreservación en programas de selección clonal de coníferas, ha sido usado en Nueva Zelanda, Canadá, USA, Francia, Suecia y Chile. Se estima que alrededor de 8.000 a 10.000 genotipos, predominantemente representados por especies de piceas y pinos han sido criopreservados (Cyr 1999). Esta tecnología permite mantener la juvenilidad y regenerabilidad de cultivos embriogénicos, hasta que los resultados de las evaluaciones en terreno estén disponibles (Hargreaves *et al.* 2002). Por lo tanto, cualquier genotipo seleccionado puede ser fácil y masivamente desarrollado del stock de material criopreservado. Sin embargo, en un estudio de líneas celulares embriogénicas (LCEs) de *Pinus roxburghii*, que fueron mantenidas y subcultivadas por largo periodos, se han observado diferencias morfológicas y pérdida de potencial embriogénico. Por otra parte, se ha reportado que la habilidad de los cultivos embriogénicos de tolerar la criopreservación puede ser genotipo dependiente (Mathur *et al.* 2003).

Es esencial para cualquier protocolo de criopreservación la optimización de pretratamientos con sustancias crioprotectoras, ya que gracias a sus efectos hacen posible que los cultivos embriogénicos sean capaces de tolerar el congelamiento lento y el crioalmacenamiento por largos periodos de tiempo o en forma indefinida (Häggman *et al.* 1998).

La criopreservación tiene riesgos principalmente en el manejo del material, por lo que se debe cuidar minuciosamente la estabilidad térmica del material almacenado (Sakai 2000). Aunque la criopreservación tiene ventajas estratégicas evidentes, la congelación-descongelación y enfriamiento-recalentamiento pueden causar lesiones en la estructura de las membranas,

funciones celulares y pérdida de la totipotencia, las que reducen la viabilidad del tejido y su recuperación para la formación de plantas completas (Benson 2008).

La criopreservación de cultivos embriogénicos es un proceso de múltiples pasos. Por esto, para el desarrollo exitoso de protocolos de criopreservación se deben tener en consideración: el tipo de explanto y condición fisiológica, el pre-acondicionamiento o precultivo, los tipos de osmoprotectores y crioprotectores, la técnica de criopreservación, la velocidad de enfriamiento, descongelación y recalentamiento (Martínez-Montero y Harding 2015). Un error en cualquiera de estos pasos podría ser perjudicial para el futuro desarrollo de plantas del material almacenado.

Diversas investigaciones han mostrado protocolos exitosos de criopreservación en distintas especies del género *Pinus*, donde se ha observado que la técnica no tiene un efecto en el porcentaje de líneas regeneradas post descongelación. Sin embargo, existen reportes que indican que no existe una correlación entre el crecimiento del tejido post-descongelación (recuperación o criotolerancia) y el número de embriones somáticos (Es) producidos (capacidad de maduración) (Salaj *et al.* 2012). Así como también, algunos autores han reportado una disminución en el número de embriones globulares en líneas criopreservadas, pero no así en embriones en estado cotiledonar, llegándose a observar hasta un 7% de disminución de Es en algunas líneas de alta producción (Álvarez *et al.* 2012).

Protocolos adecuados de criopreservación implican el pretratamiento del tejido junto con el uso de una combinación óptima de crioprotectores (Ford *et al.* 2000). La mayoría de los pretratamientos comunes para la criopreservación de células embriogénicas son la utilización de azúcares (sacarosa, maltosa, glucosa) o azúcar-alcoholes (manitol, sorbitol). Para los tejidos embrionarios de coníferas, la incubación con pretratamientos en sorbitol se ha aplicado con frecuencia (Toivonen *et al.* 1989, Norgaard *et al.* 1993, Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2003, Walter *et al.* 2003). Para el caso de especies del género *Pinus*, el pretratamiento con sacarosa ha dado lugar a la criopreservación exitosa. (Lainé *et al.* 1992, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2007). Los cultivos embriogénicos de *Pinus sylvestris* dieron los mejor

resultados después de la criopreservación cuando el tratamiento con polietilenglicol-6000 se combinó con 10 % de glucosa y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Hägman *et al.* 1998).

Para que un protocolo de criopreservación sea ampliamente aplicable, este debe ser probado en diversas líneas de genotipos celulares. LCEs analizadas mostraron diferente criotolerancia y las frecuencias individuales de recuperación alcanzaron entre 10-100 %. La respuesta de la línea celular hacia la formación de Es puede explicarse, en parte, por las características citológicas de los tejidos. Esta composición heterogénea de células (juveniles y adultas) puede diferencialmente afectar la respuesta del tejido al pretratamiento osmótico y la criopreservación (Gale *et al.* 2007). Salaj *et al.* (2012) observaron en tejidos embriogénicos de *Pinus nigra* que la capacidad de maduración es dependiente de la línea celular, lo que está relacionado a la estructura final del embrión somático.

Por otra parte, diversos resultados confirman que la criotolerancia no puede ser predicha por la morfología de los complejos proembriogénicos (CPEs), así como la competencia de producir embriones maduros (Norgaard *et al.* 1993). La criopreservación elimina las células suspensoras y solo las células meristemáticas sobreviven, dando lugar a nuevas estructuras proembriogénicas en el periodo post congelación (Kristensen *et al.* 1994).

Durante el precultivo con azúcares o azúcar-alcoholes los tejidos están sujetos a un moderado estrés osmótico, el cual actúa para inducir respuestas que permiten incrementar la tolerancia a la deshidratación provocando un aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA) y proteínas LEA (Marum *et al.* 2004). Crowe *et al.* (1986) encontraron que durante la deshidratación en frío los disacáridos se encuentran en mayor cantidad que otros azúcares, y la trehalosa y maltosa fueron más efectivas en estabilizar membranas, mientras que la sacarosa proporcionó una menor estabilidad. DMSO ha sido ampliamente usado como crioprotector tanto en cultivos celulares animales y vegetales, incluidas coníferas. Estudios clásicos de criobiología sugieren que el uso de DMSO u otros aditivos similares protegen de manera eficiente los daños por congelación a través de efectos coligativos, penetrando la pared celular y la membrana plasmática de células vegetales. Cuando los aditivos crioprotectores son añadidos al medio extracelular antes del congelamiento, se produce un flujo acoplado de agua

y dichos crioprotectores (Marum *et al.* 2004). Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la aplicación exógena de prolina mejora la sobrevivencia en células vegetales que han sido criopreservadas, sin embargo, hay poca evidencia del modo de acción de este osmolito y como éste podría actuar en forma conjugada con otros crioprotectores (Burrit 2012).

Ha sido demostrado para *Picea sitchensis* e híbridos de *Abies* que, durante la criopreservación, las células alargadas del suspensor se rompen y se forman nuevas. Es a partir de pequeñas células meristemáticas de la parte embrional (Salaj *et al.* 2010, Kristensen *et al.* 1993). Es necesario destacar que la recuperación del tejido después de la descongelación no puede ser el único criterio para evaluar una criopreservación exitosa, y por esta razón se debe realizar un análisis de crecimiento luego de un cierto número de subcultivos post criopreservación. En la mayoría de los casos el aumento de biomasa del tejido durante el ciclo de crecimiento no fue negativamente influenciado por la criopreservación, incluso en algunas líneas celulares, promueve la proliferación celular con relación al control. La acumulación de biomasa fresca reforzada podría ser el resultado del proceso de selección, es decir, la eliminación de células no embriogénicas de los cultivos, o puede reflejar el aumento de la sincronía de desarrollo a partir de células embrionarias (Salaj *et al.* 2011).

Para una óptima recuperación de células viables después de la criopreservación es necesario tener material inicial altamente embriogénico. Cuando se utilizan suspensiones celulares adecuadas es posible recuperar el 100% de las muestras congeladas, si no es así o se utilizan cultivos de baja calidad embriogénica será muy difícil obtener crecimiento una vez descongelados (Lainé *et al.* 1992).

Find *et al.* (1998) demostraron en *Picea abies* y *Picea sitchensis*, que el crecimiento de tejido embriogénico post criopreservación estaba fuertemente influenciado por el periodo de subcultivo previo a la criopreservación, es decir, el ciclo de crecimiento en el cual se encuentran las células al momento de ser congeladas en nitrógeno líquido tiene una fuerte relación con las tasas de recuperación al momento de ser descongeladas. Otro factor importante a considerar es que la morfología del cultivo celular tiene un efecto en la

criotolerancia del tejido. Se ha observado que solo las células pequeñas y densas sobreviven a la criopreservación mientras que células alargadas altamente vacuoladas tiene una alta probabilidad de ser dañadas (Kartha *et al.* 1988).

Desde el punto de vista fisiológico existen diferentes herramientas analíticas que permiten determinar el daño de los tejidos durante la criopreservación. Varias técnicas bioquímicas e histo-citológicas están disponibles para este propósito, las cuales permiten detectar en qué etapa de los protocolos utilizados se pudieran estar generando un mayor daño celular (Dhindsa *et al.* 1998).

Uno de los principales objetivos de numerosos eventos de estrés, incluida la criopreservación, es la membrana celular. Varios marcadores, tales como el flujo de electrolitos, carbohidratos totales y el contenido de proteínas reflejan la integridad estructural y funcional de las membranas luego de la exposición a tales eventos de stress (Harding 2004, Panis y Lambardi 2005).

En cultivos de *Sacharum sp.* y *Vitis vinífera* se observó un aumento en la concentración de electrolitos y proteínas totales en muestras criopreservadas inmediatamente después de la descongelación (Martínez-Montero *et al.* 2002, Lazo-Jalavera *et al.* 2015), lo que indicaría un daño a nivel de sistemas de membranas. En cultivos embriogénicos de *Picea abies* se observó diferencias en el contenido de carbohidratos totales entre cultivos con alta capacidad de producción respecto de aquellos que no produjeron Es cotiledonares (Find *et al.* 1998).

En la mayoría de los estudios relacionados al efecto de la criopreservación de tejido embriogénico de coníferas, los parámetros más frecuentemente estudiados han sido las características de recuperación del crecimiento una vez descongelados, y la estabilidad genética. La capacidad de maduración es el parámetro menos estudiado, principalmente en especies del género *Pinus*. Recientes estudios en abetos híbridos pretratados con sorbitol muestran un daño en la organización estructural de los Es, donde se dañaron no solo células suspensoras, sino también células meristemáticas (Salaj *et al.* 2016).

Existen a la fecha pocos registros de criopreservación de tejido embriogénico en *P. radiata*, y se ha reportado que no se ha observado una disminución en las tasas de recuperación del tejido post criopreservación (Hargreaves y Smith 1992). Hargreaves *et al.* (2002) utilizaron tejido nodriza para aumentar la tasa de recuperación post descongelación, aumentando la tasa de recuperación de genotipos que sólo respondieron a esta técnica. Sin embargo, no existen reportes sobre el comportamiento de metabolitos protectores y la capacidad de maduración de las líneas estudiadas en esta especie.

1.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.2.1 Hipótesis

La criopreservación de tejido embriogénico de *Pinus radiata* reduce la capacidad madurativa una vez que éste es descongelado y reactivado, lo que depende del tipo de crioprotector utilizado y la densidad celular inicial. Además, se genera un aumento en las concentraciones de los parámetros bioquímicos; carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina producto del estrés por congelamiento afectando así su metabolismo.

1.2.2 Objetivos

Objetivo general

- ✓ Evaluar el efecto del tipo de crioprotector utilizado y la densidad celular inicial utilizada en criopreservación sobre la capacidad madurativa de tejido embriogénico de *Pinus radiata*, una vez que éste ha reactivado su crecimiento.

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto del uso de dimetilsulfóxido y prolina como pretratamientos crioprotectores en la capacidad madurativa de tejido embriogénico de *P. radiata*.
- ✓ Evaluar el efecto de la densidad celular inicial al momento de criopreservar en la capacidad madurativa de tejido embriogénico de *P. radiata*.

- ✓ Determinar la concentración de carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina en tejido embriogénico de *P. radiata* después de la criopreservación.



2. CAPITULO I

Efecto de diferentes tratamientos crioprotectores en la recuperación y capacidad madurativa de tejido embriogénico criopreservado de *Pinus radiata*.

Yenny Lineros F, Ximena Muñoz R, Manuel Sánchez O, Claudio Balocchi L, Darcy Ríos L.

- (Manuscrito enviado para revisión a la revista *Plant Cell Tissue and Organ Culture*)

2.1 RESUMEN

Con el objetivo de caracterizar la respuesta del tejido embriogénico de *Pinus radiata* criopreservado con distintos pretratamientos crioprotectores y determinar el efecto de éstos en la capacidad madurativa, se evaluaron 14 , con 5 pretratamientos crioprotectores con base de 0,4 M de sorbitol, los tratamientos fueron: dimetilsulfóxido 5% (v/v); dimetilsulfóxido 10% (v/v); dimetilsulfóxido 5% (v/v) y 0,09 M de L-prolina; dimetilsulfóxido 10% (v/v) y 0,09 M de L-prolina y 0,09 M de L-prolina en ausencia de dimetilsulfóxido. El tratamiento control fue tejido embriogénico no criopreservado. Luego de permanecer en nitrógeno líquido las líneas celulares embriogénicas fueron descongeladas a 37°C. Se evaluó el porcentaje de reactivación del TE y el potencial embriogénico a través de microscopía, para luego determinar su capacidad madurativa y germinación. Los resultados con relación a la tasa de reactivación de crecimiento fueron significativamente menores que el control, observándose que el tratamiento 0,09 M de L-prolina mostró los niveles más bajos. Con respecto, al número de embriones, se observó interacción entre los tratamientos y las líneas celulares embriogénicas evaluadas; además de diferencias morfológicas en las microplantas de 2 líneas celulares de los tratamientos con mayor concentración de dimetilsulfóxido. Microscópicamente no se observó daño post criopreservación ni alteración en la morfología de los complejos proembriogénicos. El mejor pretratamiento fue 0,4 M de sorbitol con dimetilsulfóxido al 5% (v/v) suplementado con 0,09 M de L-prolina, ya que permitió la reactivación de crecimiento de un mayor número de muestras de tejido embriogénico una vez descongeladas y un mayor número de embriones cotiledonares (capacidad madurativa). Las respuestas evaluadas con relación a los crioprotectores fueron

genotipo dependiente existiendo líneas celulares resistentes a la congelación independiente del pretratamiento utilizado.

2.2 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática es el método más eficiente para micropropagar y muy utilizado para propagar vegetativamente especies de coníferas en programas de mejoramiento y en silvicultura clonal (Von Arnold *et al.* 2016). La propagación vía embriogénesis somática es un método efectivo para generar plantas *elite* cuando se combinan con otras tecnologías tales como la criopreservación de tejido embriogénico (TE) y la selección de clones *elite* en ensayos de campo (García-Mendiguren *et al.* 2016).

La criopreservación es una técnica efectiva que permite almacenar a ultra-bajas temperaturas (-196°C) tejido biológico viable por largos periodos de tiempo (Kartha *et al.* 1988, Martínez-Montero y Harding 2015). A esta temperatura criogénica, se cree que todos los procesos metabólicos están detenidos y que los tejidos vegetales pueden ser mantenidos indefinidamente sin alteración genética (Ozudogru *et al.* 2016). El requisito clave es que el potencial hídrico celular se mantenga lo suficientemente bajo como para evitar la formación de cristales de hielo, asegurando que las células puedan recuperarse fácilmente después del descongelamiento. En contraste con la inmersión directa en nitrógeno líquido en un solo paso del TE, el método de enfriamiento lento, desarrollada por Withers y King (1980), es el método más exitoso utilizado en la actualidad para la criopreservación. (Gupta *et al.* 1987, Kartha *et al.* 1988, Lainé *et al.* 1992, Norgaard *et al.* 1992, Kristensen *et al.* 1994, Ford *et al.* 2000, Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2003, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2011, Latutrie y Aronen 2013, Salaj *et al.* 2016, Carneros *et al.* 2017).

La integración de la embriogénesis somática y la criopreservación en programas de selección clonal de coníferas, ha sido usado en Nueva Zelanda, Canadá, USA, Francia, Suecia y Chile. Esta tecnología permite mantener la juvenilidad y regenerabilidad de cultivos embriogénicos, hasta que los resultados de las evaluaciones en terreno estén disponibles (Hargreaves 2002). Por lo tanto, cualquier genotipo seleccionado puede ser masivamente desarrollado desde material

criopreservado. Sin embargo, en un estudio de LCEs de *Pinus roxburghii*, que fueron mantenidas en criopreservación y subcultivadas por largo periodos, se han observado diferencias morfológicas y pérdida de potencial embriogénico. Se señala además en el mismo estudio que la habilidad de los cultivos embriogénicos de tolerar la criopreservación puede ser genotipo dependiente (Mathur *et al.* 2003).

Es esencial para cualquier protocolo de criopreservación la optimización de pretratamientos con sustancias crioprotectoras, ya que gracias a sus efectos hacen posible que los cultivos embriogénicos sean capaces de tolerar el congelamiento lento y el crioalmacenamiento por largos periodos de tiempo o en forma indefinida (Häggman *et al.* 1998). Aunque la criopreservación tiene ventajas estratégicas evidentes, la congelación-descongelación y enfriamiento-recalentamiento pueden causar lesiones en la estructura de las membranas, funciones celulares y pérdida de la totipotencia, las que reducen la viabilidad del tejido y su recuperación afectando la formación de plantas completas (Benson 2008). Algunas especies vegetales toleran este estrés mediante la síntesis de sustancias crioprotectoras tales como azúcares, prolina y proteínas, que disminuyen el punto de congelación en las células vegetales (Panis y Lambardi 2005).

Protocolos adecuados de criopreservación implican el pretratamiento del tejido junto con el uso de una combinación óptima de crioprotectores (Ford *et al.* 2000). La mayoría de los pretratamientos comunes para la criopreservación de células embriogénicas son la utilización de azúcares (sacarosa, maltosa, glucosa) o azúcar-alcoholes (manitol, sorbitol). Para los tejidos embrionarios de coníferas, la incubación con pretratamientos en sorbitol se ha aplicado con frecuencia (Toivonen *et al.* 1989, Norgaard *et al.* 1993, Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2003, Walter *et al.* 2005). Dimetilsulfóxido (DMSO) ha sido ampliamente usado como crioprotector tanto en cultivos celulares animales y vegetales, entre ellas las coníferas. Estudios clásicos de criobiología sugieren que el uso de DMSO u otros aditivos similares protegen de manera eficiente los daños por congelación a través de efectos coligativos, penetrando la pared celular y la membrana plasmática de células vegetales. Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que la aplicación exógena de prolina mejora la sobrevivencia en células vegetales

que han sido criopreservadas, sin embargo, hay poca evidencia del modo de acción de este osmolito y como éste podría actuar en forma conjugada con otros crioprotectores (Burrit 2012).

Diversas investigaciones han mostrado protocolos exitosos de criopreservación en distintas especies del género *Pinus*, donde se ha observado que la técnica no tiene un efecto en el porcentaje de líneas regeneradas post descongelación (Häggman *et al.* 1998, Ford *et al.* 2000, Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2003, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2011, Salaj *et al.* 2012, Latutrie y Aronen 2013, Montalbán y Moncaleán 2017). Sin embargo, algunos autores han reportado una disminución en el número de embriones de líneas criopreservadas (Álvarez *et al.* 2012, Nunes *et al.* 2017). Por otra parte, Salaj *et al.* (2012) señalaron que no existe una correlación entre el crecimiento del tejido post-descongelación (criotolerancia) y el número de embriones somáticos (Es) producidos (capacidad de maduración).

En la mayoría de los estudios relacionados al efecto de la criopreservación de TE de coníferas, los parámetros más frecuentemente estudiados han sido las características de recuperación (Ford *et al.* 2000, Touchell *et al.* 2002, Salaj *et al.* 2011, Salaj *et al.* 2016), crecimiento del TE una vez descongelado y su estabilidad genética evaluada a través del uso de microsatélites (Häggman *et al.* 2000, Harding 2004, Hazubska-Przybyl y Dering 2017). La capacidad madurativa de Es es el parámetro menos estudiado, principalmente en especies del género *Pinus*. Estudios recientes en abetos híbridos pretratados con sorbitol muestran un daño en la organización estructural de los Es, donde se dañaron no solo células suspensoras, sino también células meristemáticas (Salaj *et al.* 2016).

Los pocos registros de criopreservación de TE en *P. radiata*, que se han reportado indican que no se ha observado una disminución en las tasas de recuperación del tejido post-criopreservación (Hargreaves y Smith 1992). Hargreaves *et al.* (2002) utilizaron tejido nodriza al momento de poner a crecer TE recién descongelado. Con esto lograron aumentar la tasa de recuperación y observaron la recuperación de genotipos que sólo respondieron a esta técnica (Hargreaves *et al.* 2002).

Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la respuesta de TE de *Pinus radiata* criopreservado con distintos pretratamientos crioprotectores y determinar el efecto de éstos en la capacidad madurativa de las líneas celulares embriogénicas (LCEs) utilizadas.

2.3 MÉTODOLOGÍA

2.3.1 Material Vegetal

Conos inmaduros de *Pinus radiata* fueron seleccionados para la inducción de las LCEs. Los cruzamientos controlados fueron realizados en el año 2015 en un Huerto Semillero de propiedad de la empresa Forestal Arauco S.A (Chile), ubicado en la Provincia de Arauco en la región del Bío-Bío, Chile (Coordenadas UTM WGS84 H18: Este 639,471 y Oeste 5.823.723).

Los conos colectados fueron desinfectados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% (v/v) por 3 minutos, las semillas fueron disectadas en forma manual y desinfectadas en cámara de flujo laminar con una solución de peróxido de hidrogeno al 10% (v/v) por 5 minutos en agitación y lavadas 3 veces con agua destilada estéril.

Las semillas sin su testa fueron puestas en placa petri de 94 x 16 mm con 30 ml de medio de cultivo Litvay (LM) modificado (Litvay 1981) suplementado con 4,5 μM de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) and 2,7 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L⁻¹ sacarosa y 3 g L⁻¹ de Phytigel®. El pH fue ajustado a 5,6 antes de autoclavar a 121°C y 1 ATM de presión. Al cabo de 12 semanas en cultivo, se cambiaron a placa de petri individual con medio de cultivo fresco. Las semillas que presentaron una proliferación celular friable, característica de un crecimiento de ET y que ésta fue igual o mayor a 50 mm de diámetro se le asignó el código del nuevo genotipo. Para la proliferación del tejido se utilizó el mismo medio de cultivo, realizando cambio a medio fresco cada 7 días. El material embriogénico se mantuvo en condiciones de oscuridad a una temperatura de 22±2 °C.

2.3.2 Criopreservación y reactivación de tejido embriogénico (TE)

Para la criopreservación de ET se utilizó el protocolo de congelación lenta descrito por Hargreaves *et al.* (2002) modificado. Tras 7 días del último subcultivo el ET de 14 LCEs fue resuspendido en medio líquido de multiplicación que corresponde a LM modificado. Se probaron 5 pretratamientos crioprotectores: dimetilsulfóxido 5% (v/v) (DMSO5), dimetilsulfóxido 10% (v/v) (DMSO10), dimetilsulfóxido 5% (v/v) y 0,09 M de L-prolina (DMSO5P), dimetilsulfóxido 10% (v/v) y 0,09 M de L-prolina (DMSO10P) y finalmente solo 0,09 M de L-prolina en ausencia de dimetilsulfóxido (DMSO0P). Para todos los casos el tejido fue pretratado con 0,4 M de sorbitol por 48 horas y mantenido en agitación en un agitador orbital a 80 rpm a 22-24 °C bajo condiciones de oscuridad. Posterior a esto para el caso de los pretratamientos DMSO5, DMSO10, DMSO5P y DMSO10P el dimetilsulfóxido fue aplicado gradualmente en 10 alícuotas.

Alícuotas de 1 ml de esta suspensión fueron dispensadas en crioviales Nalgene de 2 ml. Los crioviales fueron almacenados en contenedores Mr Frosty Nalgene en un freezer de -80°C por 120 min. Al cabo de este tiempo los crioviales fueron sumergidos en nitrógeno líquido (-196° C), por aproximadamente 2-4 semanas.

Para reactivar el crecimiento del tejido criopreservado, los crioviales fueron sumergidos en agua estéril a 37°C en un baño termorregulado durante 1 a 2 minutos, hasta observarse el tejido completamente descongelado. Luego fueron desinfectados externamente con 70% (v/v) etanol. El contenido de cada criovial fue puesto sobre un papel filtro (Fisher Scientific, grado P5) previamente depositado sobre papel absorbente hasta drenar por completo la muestra. El filtro con el tejido descongelado se depositó en una placa petri con medio de multiplicación LM modificado y se realizaron cambios de medios de cultivo semanalmente, durante 1 mes. Al finalizar este periodo se evaluó la sobrevivencia de las 14 líneas criopreservadas considerando el porcentaje de reactivación de crecimiento del ET una vez que fue descongelado.

2.3.3 Microscopia óptica

Para la determinación del potencial embriogénico de las líneas celulares obtenidas se realizaron preparaciones de 20 mg de tejido fresco a las que se le agregó 10 µl de tinción de 2% (p/v) de

aceto-carmín por 4 minutos, seguido de 2 lavados de agua destilada y luego 10 μ l de tinción de 5% (p/v) de Evans blue por 15 segundos, seguido de 3 lavados con agua destilada (Salaj *et al.* 2011). El tejido teñido fue puesto sobre un portaobjeto cubierto con un cubreobjeto y fue observado con un microscopio óptico Carl Zeiss, Axiostar Plus. Se consideró que la LCEs no perdió su potencial embriogénico si al descongelarse se observaban las 3 categorías de complejos proembriogénicos (CPEs) descritas por Filonova *et al.* 2000.

2.3.4 Microscopia electrónica

Las muestras fueron fijadas en una solución de 4% (p/v) paraformaldehído y 2,5% (v/v) glutaraldehído por 24 horas. Después de ser lavadas con 0,1 M Buffer fosfato se les realizó una postfijación con 1% (p/v) tetróxido de osmio por 2 horas para finalmente ser lavadas nuevamente en Buffer fosfato. La deshidratación se realizó con 30, 50, 70, 80, 90 y 100% (v/v) etanol con intervalos de 15 a 30 minutos. Finalmente se completó con óxido de propileno. La infiltración se realizó con resina Araldita por 24 horas en moldes para polimerizar a 60°C por 48 horas.

Los moldes fueron tallados y cortados con Ultra micrótopo Dupont Instruments, Sorvall MT2-B. Los cortes fueron puestos en grillas de cobre con una película de acetato de celulosa y secados al ambiente. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6380 LV, año 2005 con sistema de análisis EDS.

2.3.5 Maduración de embriones somáticos (Es)

Una vez que el tejido entró nuevamente en fase de multiplicación, fue resuspendido y puesto sobre papel filtro en medio LM modificado suplementado con 90 μ M de ácido abscísico, 60 g L⁻¹ sacarosa y 10 g L⁻¹ de Phytigel®, a una concentración de 80 mg de tejido por placa petri. Las placas fueron incubadas durante 4 a 5 meses hasta la completa maduración de sus embriones, en condiciones de oscuridad a una temperatura de 22 \pm 2 °C y 60% de humedad relativa. La capacidad de maduración de las LCEs se expresó como el número de Es cotiledonares por gramo de peso fresco de ET (No. Es/g PF) obtenido de las LCEs que presentaron crecimiento postcriopreservación. Esto fue comparado con la capacidad madurativa previa a la criopreservación del ET de cada LCE.

2.3.6 Germinación de embriones somáticos (Es)

Los embriones generados fueron colectados a los 4 meses luego de la maduración, posterior a eso se realizaron 2 evaluaciones a las 2 y 4 semanas siguientes para colectar aquellos embriones que aún no se encontraban completamente maduros en la primera evaluación. Luego fueron puestos a germinar en envases de polipropileno con medio Pullman N°55 modificado (Pullman, 2003) suplementado con 20 g L⁻¹ sacarosa, 0.6 g L⁻¹ carbono activado y 4 g L⁻¹ de Phytigel®. El pH fue ajustado a 5,8. Los embriones fueron cultivados con un fotoperiodo de 16 horas luz entre 40 y 70 μmol m⁻² s⁻¹ a una temperatura de 22±2 °C.

2.3.7 Análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados. Cada tratamiento fue repetido 3 veces con 15 muestras cada uno. Los datos obtenidos en observaciones cuantitativas se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza del 95% (P≤0,05) usando el software estadístico “Statistica”, Data Analysis Software System, versión 913, 2015.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Recuperación del tejido criopreservado

La técnica utilizada de congelación lenta fue efectiva con relación a la respuesta del tejido criopreservado de *Pinus radiata* tal como reportó Hargreaves (2002) y otros autores en especies del género *Pinus* (Mathur *et al.* 2003, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2011, Salaj *et al.* 2012, Alvarez *et al.* 2012, Latutrie y Aronen 2013, Carneros *et al.* 2017, Nunes *et al.* 2017). El periodo de recuperación mínimo para las LCEs con buena tasa de multiplicación fue de 2 semanas y para las LCEs con una menor tasa de multiplicación fue de 8 semanas luego de una fase de latencia (datos no mostrados), evidenciando un efecto del genotipo en la duración de la fase de latencia. Las líneas que no presentaron evidencia de crecimiento a las 8 semanas post descongelación fueron eliminadas. El tejido descongelado no fue lavado antes de depositarlo sobre filtro de celulosa y drenarlo, tal como indican varios autores, lo cual no afectó negativamente en la recuperación de las muestras. Esto resulta beneficioso, en términos de mano

de obra, cuando se requiere determinar la criotolerancia de un alto número de muestras. Por otra parte, al evaluar la recuperación de ET pretratado y sin inmersión en LN, no se observaron efectos tóxicos de los pretratamientos utilizados.

En general, en cuanto a crecimiento y apariencia, el ET presentó las mismas características que antes de ser criopreservado; tasas activas de crecimiento celular y aspecto blanco translúcido. La recuperación de las líneas criopreservadas fue dentro de lo esperado de acuerdo con lo reportado para otras especies de coníferas (Hägman *et al.* 1998, Ford *et al.* 2000, Mathur *et al.* 2003, Latutrie y Aronen 2013). El 73,4% de las líneas utilizadas respondieron a lo menos a uno de los pretratamientos crioprotectores (Cuadro 1.1). En el estudio realizado todos los pretratamientos crioprotectores utilizados disminuyeron significativamente el número de LCEs recuperadas con relación al tejido no criopreservado (NC). No se observaron diferencias significativas entre los pretratamientos con 0,4 M sorbitol y 5% DMSO (DMSO5); 0,4 M sorbitol y 10% DMSO (DMSO10); 0,4 M sorbitol y 5% DMSO suplementado con 0,09 M prolina (DMSO5P) y 0,4 M sorbitol con 10 % DMSO suplementado con 0,09 M prolina (DMSO10P), por lo que no hay evidencia de un efecto positivo en el suplemento del aminoácido prolina para esta variable evaluada. El pretratamiento 0,4 M sorbitol y solo suplementado con 0,09 M de prolina fue significativamente el con menor LCEs recuperadas (Figura 1.1), en contraste por lo obtenido por Ogawa *et al.* (2012) en células de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en suspensión.

Cuadro 1.1 Líneas celulares embriogénicas (LCEs) de *P. radiata* recuperadas luego de ser criopreservadas con distintos pretratamientos crioprotectores. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

Tratamiento crioprotector	Recuperación de LCEs (%)
NC	100 a
DMSO05	73,8 b
DMSO10	69,0 b
DMSO05P	66,7 b
DMSO10P	57,1 b
DMSO0P	9,5 c

Fuente: Elaboración propia

Al evaluar el total de muestras recuperadas por tratamiento a partir de muestras criopreservadas, se observa una disminución significativa en la recuperación del crecimiento de ET con respecto al control (NC), independiente del pretratamiento crioprotector utilizado (Figura 1.1). Los mejores resultados obtenidos fueron el uso de 0,4 M sorbitol y DMSO al 5 y 10% (DMSO5, DMSO10) y sorbitol 0,4 M y DMSO al 5 y 10% suplementado con prolina (DMSO5P, DMSO10P), donde no presentaron diferencias significativas entre ellos. A pesar de que todos los tratamientos afectaron negativamente la recuperación, se observó que dos LCEs (A y B) fueron capaces de recuperarse y generar embriones en todos los pretratamientos (Cuadro 1.2), e incluso en el suplementado sólo con 0,4 M sorbitol y 0,09 M prolina, en ausencia de DMSO (DMSO0P), con niveles de recuperación mayores al 30%. Estos resultados fueron contrarios con lo señalado por Mathur *et al.* (2003) en su estudio en *Pinus roxburghii*, donde señala que el uso de DMSO previo a la inmersión en LN es limitante para la recuperación del tejido. A pesar de esto se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con DMSO y aquel sin el crioprotector (DMSO0P) evidenciando la importancia de este compuesto en la recuperación de las muestras pretratadas (Figura 1.1). La acción protectora de este compuesto se atribuye principalmente a su habilidad de prevenir la acumulación de electrolitos durante la congelación, evitando la formación de cristales de hielo que puedan producir daño mecánico a nivel de membranas. El DMSO, debido a su bajo peso molecular tiene una rápida acción incrementando la permeabilidad de membrana y ayudando a la remoción del agua al interior de la célula, facilitando la protección durante la deshidratación en estadíos tempranos de congelación (Schumacher *et al.* 2015).

Por otra parte, se observó que LCEs más sensibles al daño por criopreservación como las C y G respondían mejor a tratamientos específicos (DMSO5), confirmando un efecto importante de las características del genotipo utilizado (Norgaard *et al.* 1993, Hågman *et al.* 1998, Salaj *et al.* 2012). No se observó un efecto significativo en la recuperación con el uso de prolina, por lo que se sugieren estudios más acabados para evaluar el efecto de distintas concentraciones de esta sustancia crioprotectora.

Fuente: Elaboración propia

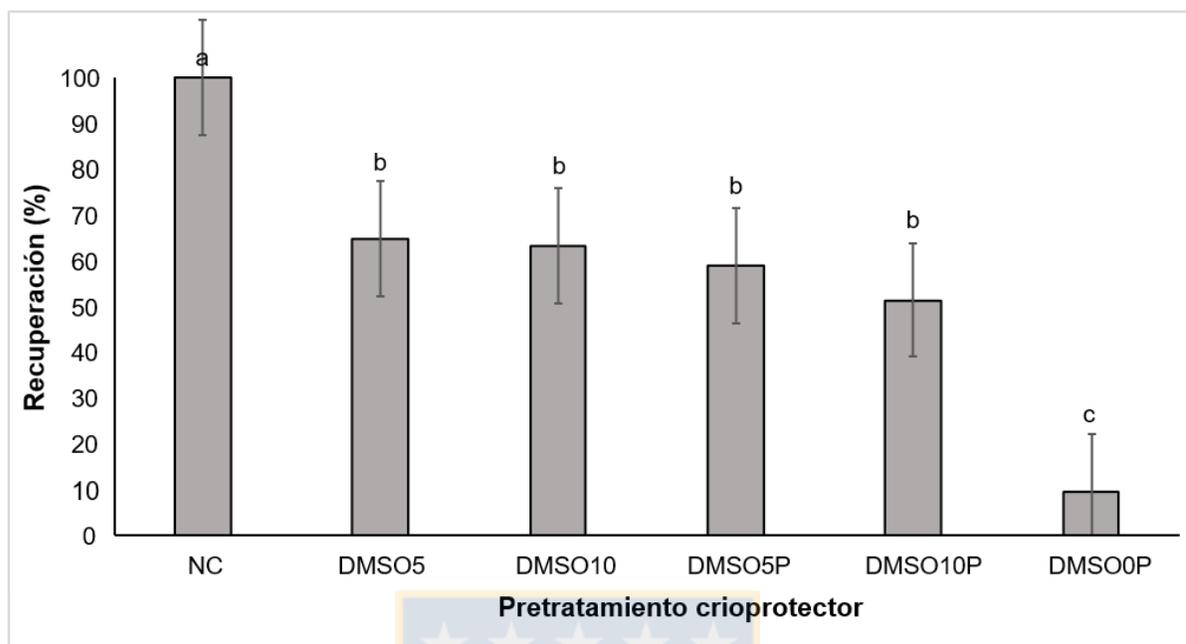


Figura 1.1 Efecto de 5 pretratamientos crioprotectores en la recuperación de tejido embriogénico (TE) *P. radiata* recuperado luego de la criopreservación. Se muestran barras de error estándar. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

Una de las interrogantes en la recuperación de tejido criopreservado es cuál de todas las variables involucradas es la limitante para un exitoso protocolo de criopreservación. El primer paso es trabajar con tejido fresco y vigoroso en la fase logarítmica de crecimiento, ya que el contenido de agua en las células es relativamente bajo, no así al final de la curva de crecimiento, donde éste aumenta considerablemente dejando a las células más susceptibles a daños por congelación (Schumacher *et al.* 2015, Varis *et al.* 2017). Lambardi *et al.* (2018) sugieren en su estudio con *Cupressus sempervirens*, que el daño celular se produce en la fase de enfriamiento lento, lo cual concuerda con estudios preliminares realizados por nuestro equipo de trabajo, donde se observó que tiempos cortos (menores a 60 min) y excesivamente largos (mayores a 24 horas) son perjudiciales para la recuperación de TE criopreservado (Figura 1.2).

Fuente: Elaboración propia

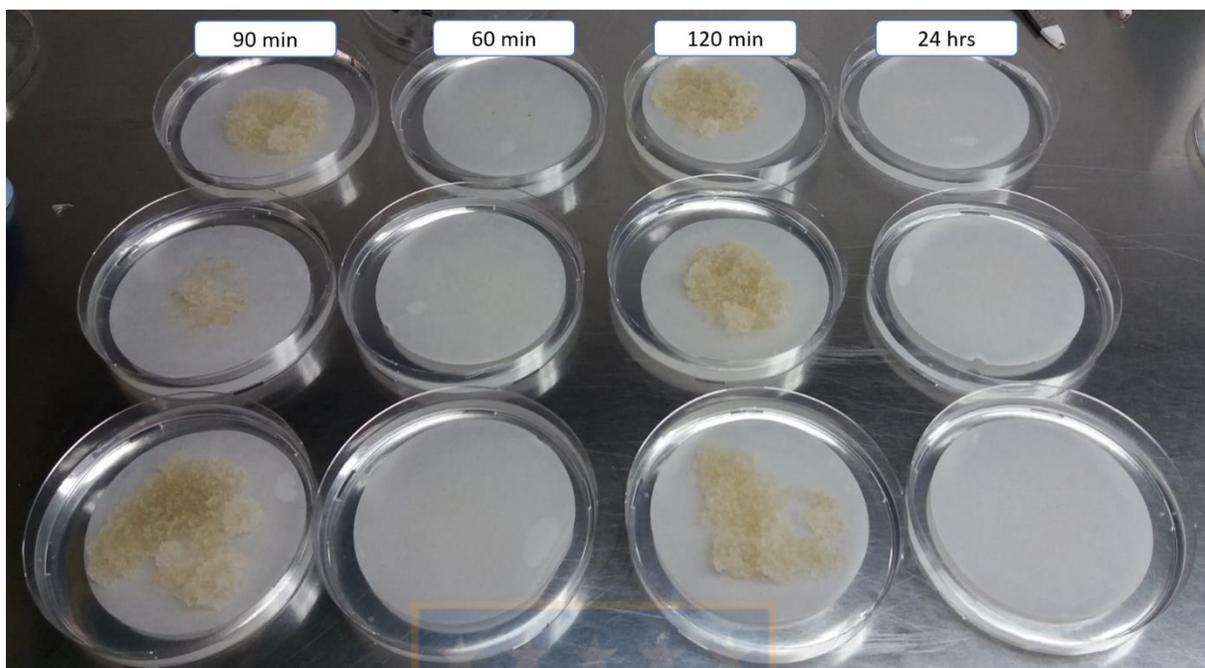


Figura 1.2 Efecto del tiempo de enfriamiento (almacenamiento a -80°C) previo a la inmersión en nitrógeno líquido.

2.4.2 Caracterización morfológica

El estudio de microscopía electrónica indicó que en muestras de ET no criopreservadas se observaron sólo células altamente vacuoladas aisladas con pequeñas porciones con evidencia de algún daño mecánico. Las células meristemáticas que darán origen a los Se presentaban células redondeadas y de tamaño pequeño, agrupadas en *clusters* compactos de variados tamaños, mientras que las células vacuoladas presentaban una forma alargada, observándose de un color más translúcido (Figura 1.3 a, c y e). Para el caso de líneas con menores tasas de recuperación se observó daño por criopreservación en grandes extensiones de cada CPE observada, (Figura 1.3 b y d). Por otra parte, en líneas con 100% de recuperación en todos los pretratamientos no se observó daño en las muestras post criopreservación (Figura 1.3 f). A pesar de estos hallazgos estas líneas recuperaron su tasa de crecimiento no observándose diferencias una vez reactivada la multiplicación de sus células. Lo cual son solo observaciones macro-morfológicas, ya que en esta etapa no se realizaron nuevas observaciones microscópicas.

Fuente: Elaboración propia

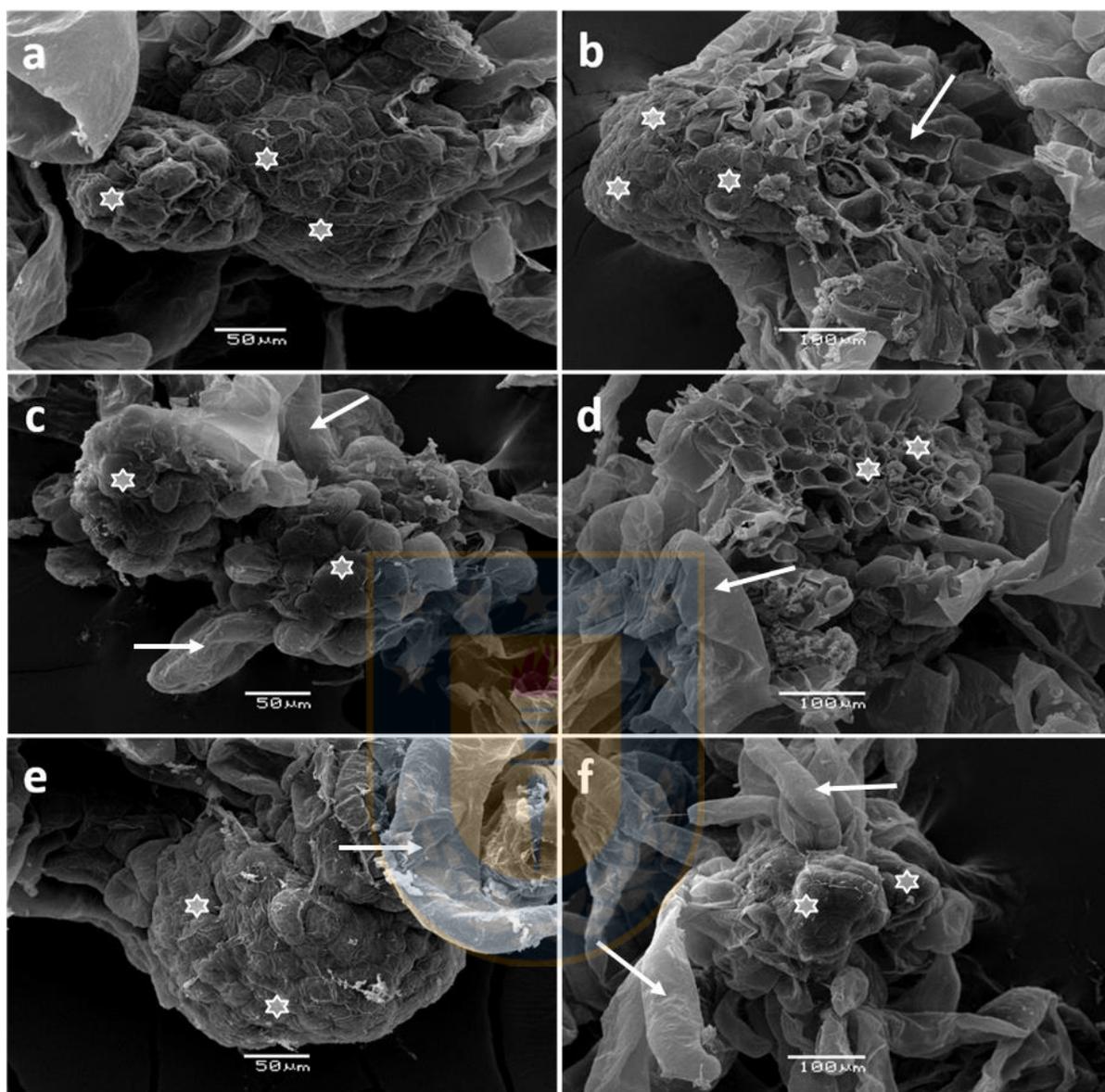


Figura 1.3 Tejido embriónico (TE) de *P. radiata* criopreservado con tratamiento DMSO5, visto en microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron tomadas directamente de los crioviales recién descongelados. **a** y **c** LCEs susceptibles de daño por criopreservación antes de ser criopreservadas. **b** y **d** LCEs susceptibles a daño por criopreservación luego de ser criopreservadas. **e** LCE no susceptible a daño por criopreservación antes de ser criopreservada. **f** LCE no susceptible a criopreservación luego de ser criopreservada. Tamaño de barra está indicado en cada imagen. Estrellas indican células embriónicas y flechas células vacuoladas.

Después de 4 semanas posteriores a la descongelación, no se observaron alteraciones en la morfología de los CPE (Figura 1.3), encontrándose en mayor proporción las del tipo II. Se observó una mayor proporción de células meristemáticas en la composición del tejido, lo que se asocia con un mayor daño en aquellas células vacuolizadas presente en las CPEs previo a la congelación (Lainé *et al.* 1992, Häggman *et al.* 1998, Salaj *et al.* 2011, Salaj *et al.* 2012). Según Filonova *et al.* (2000), tres son los estadios de los CPEs, basados en su morfología: CPE I, CPEII y CPE III. En el estadio CPE I se observa un agregado celular compuesto por un grupo compacto de pequeñas células con un citoplasma denso unido a una célula vacuolada (Figura 1.4 a). En el estadio CPE II se observan similares agregados celulares los cuales poseen más de una célula vacuolada (Figura 1.4 b). En el estadio CPE III se observa un gran grupo de células con citoplasma denso que aparecen poco compactas (Figura 1.4 c).

Fuente: Elaboración propia

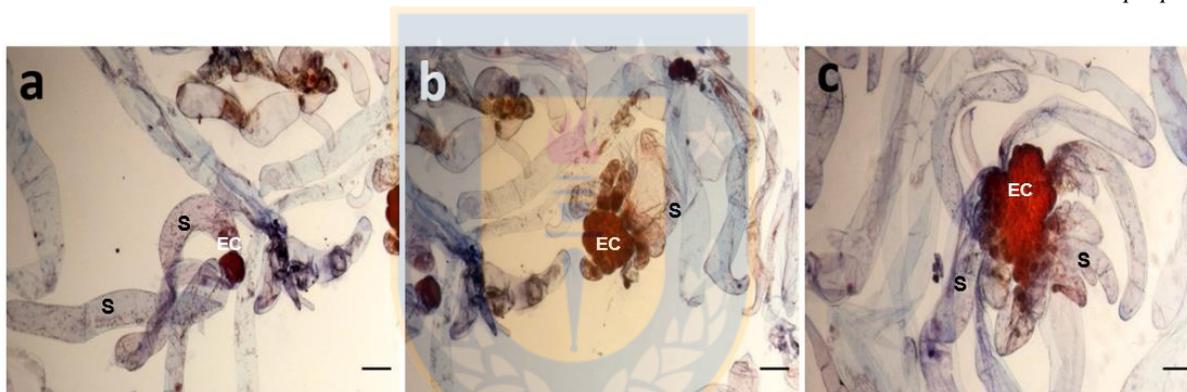


Figura 1.4 Morfología de los complejos proembriogénicos (CPEs) de *P. radiata* observados en microscopía óptica en el tejido criopreservado luego de 4 semanas en subcultivo. **a** CPEs tipo I con una pequeña porción de tejido meristemático unida a 1 célula alargada. **b** CPEs tipo II con una porción de tejido meristemático mayor que la CPE tipo I, donde se observan un mayor número de células alargadas. **c** CPEs tipo III con un complejo meristemático de gran tamaño rodeado de un alto número de células alargadas. Bar 100 μm en a, b y c. EC: Células embriogénicas, S: Células suspensoras.

2.4.3 Capacidad madurativa

El efecto de los pretratamientos crioprotectores en la capacidad madurativa se observa en la Figura 1.5. La capacidad madurativa de las LCEs estudiadas fue afectada negativamente con todos los pretratamientos crioprotectores utilizados. Los pretratamientos que contenían DMSO

en su composición no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero si presentaron diferencias con el control NC, a excepción de DMSO5P. Este pretratamiento crioprotector permitió generar un mayor número de embriones cotiledonares maduros, no presentando diferencias significativas con el control NC. Por otra parte, el pretratamiento con el que se obtuvo el menor número de embriones fue DMSO0P (Figura 1.5).

Fuente: Elaboración propia

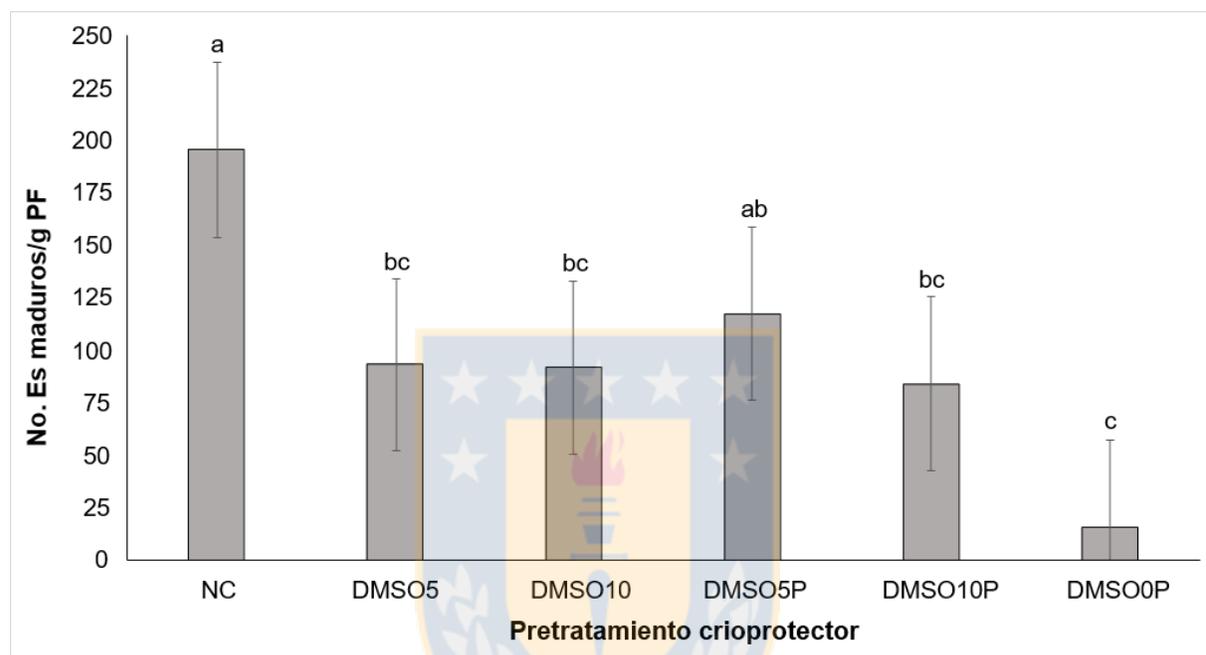


Figura 1.5 Efecto de 5 pretratamientos crioprotectores en el número de embriones maduros (capacidad madurativa) por gramo de peso fresco (No. Es/g PF) de tejido embriogénico (TE) de *P. radiata* recuperado luego de la criopreservación. Se muestran barras de error estándar. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el Test de Tukey a $P \leq 0,05$.

Al observar el comportamiento por genotipo en el Cuadro 1.2, sólo dos LCE presentaron formación de embriones cotiledonares maduros independiente del pretratamiento aplicado (A y B). En los pretratamientos con presencia de DMSO se observó un aumento en el número de embriones luego de la criopreservación en las LCEs D, I y M. La LCE D aumentó el número de embriones postcriopreservación indistintamente del pretratamiento utilizado, mientras que las líneas I y M aumentaron considerablemente el número de embriones postcriopreservación con aquellos pretratamientos donde se combinó sorbitol, DMSO y prolina. Para el caso de la LCE

N se observó un aumento en el número de embriones postcriopreservación sólo en los tratamientos DMSO10 y DMSO10P. En las LCEs restantes se observó una disminución en el número de embriones obtenidos del ET criopreservado con relación al control NC. Si bien el pretratamiento DMSO5P se observa como el mejor en cuanto a número de embriones maduros obtenidos, y la mayoría de las LCEs recuperan su crecimiento una vez descongeladas, se deben considerar ciertos aspectos. Las líneas C, G y K no se recuperaron con este pretratamiento luego de la criopreservación y la LCE N, que si se recuperó, no fue capaz de formar embriones maduros. Lo que confirma que ciertos genotipos responden positivamente a tratamientos específicos siendo de importancia identificarlos cuando se requiere conservar LCEs de alto valor, donde no siempre un protocolo operacional va a ser exitoso para la totalidad del material.

Cuadro 1.2 Número de embriones somáticos (Es) cotiledonares de 14 líneas celulares embriogénicas (LCEs) de *P. radiata* sometidas a 5 pretratamientos crioprotectores. Casilleros sin datos corresponden a pretratamientos donde la LCE no se recuperó postcriopreservación. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

LCE	NC	DMSO5	DMSO10	DMSO5P	DMSO10P	DMSO0P
A	577,4 a	117,8 a	97,0 a	219,4 a	53,1 a	78,5 a
B	381,1 a	168,6 a	252,1 a	237,9 a	197,1 a	144,7 a
C	268,7 a	67,0 a	-	-	-	-
D	219,4 a	366,8 a	343,3 a	368,0 a	320,2 a	-
E	203,2 a	62,4 b	76,0 b	92,4 ab	50,0 b	-
F	196,3 a	11,5 a	0,0 a	152,4 a	-	-
G	166,3 a	115,5 a	-	-	-	-
H	162,4 a	55,4 b	30,8 b	54,7 b	34,6 b	-
I	153,2 a	170,9 a	277,9 a	358,0 a	291,0 a	-
J	150,9 a	26,9 ab	22,3 ab	5,4 b	39,3 ab	-
K	97,0 a	24,2 a	20,8 a	-	9,2 a	-
L	91,6 a	18,5 b	26,9 b	22,3 b	0,0 b	-
M	36,2 a	89,3 ab	77,8 ab	133,9 b	133,9 b	-
N	30,0 a	9,2 a	60,0 a	0,0 a	46,2 a	-

Fuente: Elaboración propia

*NC: tejido embriogénico no pretratado y sin inmersión en LN, DMSO5: dimetilsulfóxido 5% (v/v), DMSO10: dimetilsulfóxido 10% (v/v), DMSO5P: dimetilsulfóxido 5% (v/v) + 0,09 M de L-prolina, DMSO10P: dimetilsulfóxido 10% (v/v) + 0,09 M de L-prolina, DMSO0P: 0,09 M de L-prolina.

Diversos autores en estudios de coníferas han señalado no haber observado efectos negativos significativos, a causa de la criopreservación, en la capacidad madurativa de sus LCEs. (Kantha *et al.* 1988, Norgaard *et al.* 1993, Touchell *et al.* 2002, Vondrakova *et al.* 2010, Alvarez *et al.* 2012). Latutrie y Aronen (2013) señalaron que obtuvo una mejor respuesta en la generación de Se en tejido criopreservado, sin embargo, también señala que esto pudo deberse a que los protocolos de maduración utilizados fueron más eficientes que los utilizados cuando el material fue criopreservado. Por su parte Gupta *et al.* (1987) observaron una disminución en la capacidad madurativa de ET provenientes de líneas criopreservadas de *Picea abies* y *Loblolly pine*.

La producción de plantas embriogénicas es el objetivo final del uso de la embriogénesis somática en programas de establecimiento de plantaciones operacionales de coníferas, por lo que es esencial evaluar cómo se ve afectada la capacidad madurativa en las distintas fases de los protocolos desarrollados, ya que no se puede inferir un resultado exitoso sólo con conocer la tasa de recuperación del material criopreservado. Un buen ejemplo de esto es el resultado obtenido por Salaj *et al.* (2012) donde no se observó una correlación entre la tasa de recuperación post criopreservación y el número de Se producidos.

2.4.4 Conversión a plantas

La tasa de germinación fue en promedio de un 85% para todas las líneas utilizadas, lo que corresponde a los parámetros habituales observados en la producción de plantas embriogénicas. Sólo en 2 LCEs (K y N) de los 14 genotipos estudiados se observó una mayor proporción de plantas con morfologías aberrantes en los tratamientos con mayor concentración de DMSO (DMSO10 y DMSO10P) (Figura 1.6 a, b y c). La aparición de este tipo de morfología puede deberse al efecto tóxico que tiene este crioprotector en la generación de morfologías aberrantes (DeVerno *et al.* 1999, Aronen *et al.* 1999). Los demás genotipos presentaron una morfología normal, una baja tasa de hiperhidricidad y buen desarrollo de sus acículas (Figura 1.6 d), concordante con lo observado por Latutrie y Aronen (2013) en *P. sylvestris*.

Fuente: Elaboración propia

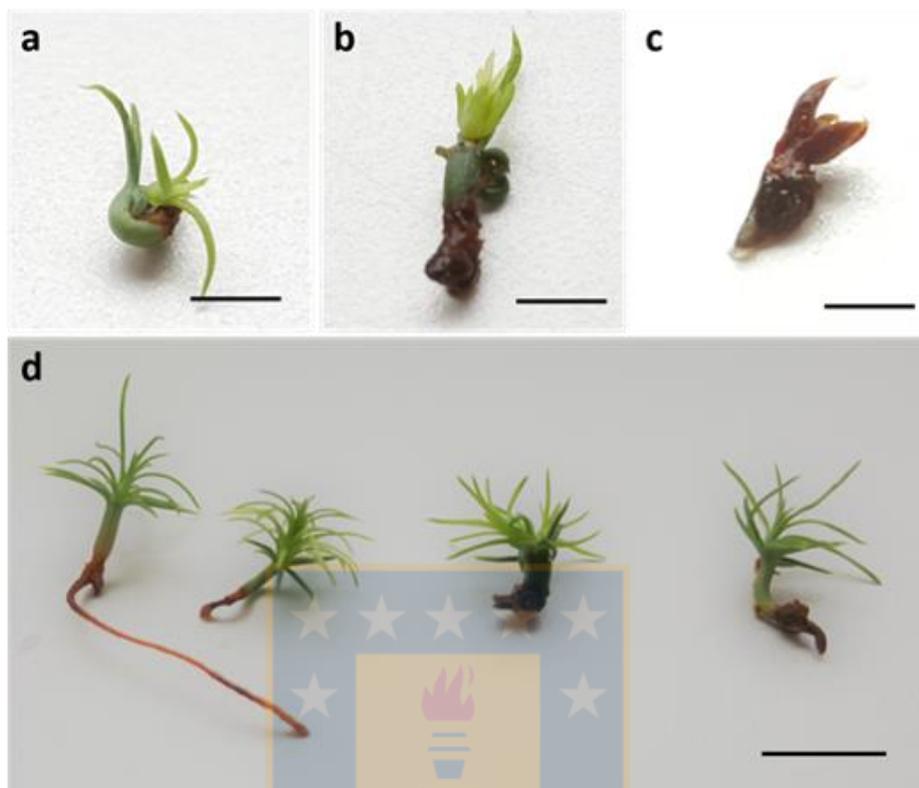


Figura 1.6 Microplantas de *P. radiata* obtenidas de embriones somáticos (Es) cotiledonares provenientes de tejido embriogénico (TE) criopreservado. a, b y c morfologías de plantas generadas de los tratamientos DMSO10 y DMSO10P de las LCEs K y N. **a:** Planta con leve desarrollo apical torcida. (Bar 0,5 cm), **b:** Planta con signos de hiperhidricidad. (Bar= 0,5 cm), **c:** Embrión somático germinado y necrosado. (Bar 0,3 cm), **d:** Plantas con morfología normal obtenidas con la mayoría de los pretratamientos (LCEs A y D) (Bar= 1 cm).

El presente trabajo ha contribuido en entregar información relevante dentro de una fase crítica en la producción masiva de plantas *in vitro* de *P. radiata* a través de embriogénesis somática. Ha quedado demostrado una vez más el efecto determinante que tiene el genotipo utilizado al momento de elegir el mejor tratamiento, por lo que es este el momento cuando debe valorarse la ganancia obtenida versus la aplicación de tratamientos particulares, a veces más costosos, en genotipos más susceptibles.

Si bien se generan daños mecánicos a nivel celular en el LCEs criopreservado, se observó que las estructuras embriogénicas no se ven alteradas y son muy pocas las LCEs que no son capaces de recuperarse y volver a la tasa de crecimiento que tenían antes de ser congeladas.

Nuestros resultados demuestran que existe una disminución en la capacidad madurativa de las LCEs, sin embargo, esto puede minimizarse detectando pretratamientos con crioprotectores adecuados para nuestras LCEs de interés, permitiendo así sustentar la ganancia de estos genotipos por largos periodos de tiempo. Si bien este estudio nos entrega información con relación a la criopreservación de TE de *P. radiata*, también abre una línea de investigación poco estudiada con relación a cuáles son los factores determinantes al momento de criopreservar.

2.5 CONCLUSIONES

- ✓ Es factible criopreservar de manera exitosa tejido embriogénico de *P. radiata* y con esto asegurar la producción masiva de plantas de genotipos de alto valor utilizados en silvicultura clonal.
- ✓ Las observaciones microscópicas ratifican que el tejido mantiene su capacidad embriogénica a pesar de los daños mecánicos que sufren las células producto de la formación de hielo intracelular.
- ✓ El mejor pretratamiento utilizado fue el uso de 0,4 M de sorbitol con DMSO al 5% y suplementado con 0,09 M de L-prolina, ya que permitió la recuperación de crecimiento de un mayor número de muestras una vez descongeladas, y permitió obtener un mayor número de embriones cotiledonares.
- ✓ Las respuestas evaluadas a la presencia de crioprotectores, fueron genotipo dependiente existiendo líneas celulares resistentes a la congelación independiente del pretratamiento utilizado.

2.6 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el financiamiento y material vegetal proveniente de la empresa de investigación forestal Bioforest S.A. Los autores agradecen al Dr. Mauricio Ramírez por la revisión del manuscrito y la colaboración en el análisis estadístico.

2.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez J, Cortizo M, Ordás R. 2012. Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. *CryoLetters* 33: 476-484.

Aronen T, Krajnakova J, Häggman H, Ryynänen L. 1999. Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Sci* 142: 163-172.

Benson E. 2008. Cryopreservation theory. *In*: Reed B (ed), *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York. pp 15-32.

Burrit D. 2012. Proline and the cryopreservation of plant tissue: Functions and practical applications. *In*: Katkov I (ed), *Current frontiers in Cryopreservation*. Intech, Croatia. pp 415-430.

Carneros E, Hernández I, Toribio M, Díaz-Sala C, Celestino C. 2017. 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.

DeVerno L, Park Y, Bonga J, Barret J. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). *Plant Cell Rep* 18: 948-953.

Filonova L, Bozhkov P, Von Arnold S. 2000. Development pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *J Exp Bot* 51: 249-264.

Ford C, Jones N, Van Staden J. 2000. Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 366-369.

García-Mendiguren O, Montalbán I, Goicoa T, Ugarte M, Moncaleán P. 2016. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. *Tress Struct Funct.* 30: 949-958.

Gupta P, Durzan D, Finkle B. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can J Forest Res* 17: 1130-1134.

Hazubska-Przybyl T, Dering M. 2017. Somaclonal variation during *Picea abies* and *P. omorika* somatic embryogenesis and cryopreservation. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 59/1: 93–103.

Häggman H, Ryyänen L, Aronen T, Krajnakova J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 45-53.

Häggman H, Aronen T, Ryyänen L. 2000. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers. In: Jain S, Gupta P, Newton R (eds) *Somatic Embryogenesis and Woody Plants*. Public Academic Publishers, Dordrecht. pp 707-727.

Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters* 25: 3-22.

Hargreaves C, Smith D. 1992. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue. *Int Plant Propagators Soc Comb Proc* 42: 327-333.

Hargreaves C, Grace L, Holden D. 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep.* 21: 40-45.

Kartha K, Fowke L, Leung N, Caswell K, Hakman I. 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 132: 529-539.

Kristensen M, Find J, Floto F, Moller J, Norgaard J, Krogstrup P. 1994. The origin and development of somatic embryos following cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis*. *Protoplasma* 182: 65-70.

Lainé E, Bade P, David A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell-suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11: 295-298.

Lambardi M, Ozudogru E, Barberini S, Danti R. 2018. Strategies for Fast Multiplication and Conservation of Forest Trees by Somatic Embryogenesis and Cryopreservation: a Case Study with Cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Not Bot Horti Agrobo* 46(1): 32-38.

Latutrie M, Aronen T. 2013. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scand J For Res*, 28(2): 103-109.

Litvay J, Verma D, Johnson M. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports* 4:325-328.

Martínez-Montero M, Harding K. 2015. Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation. *In: Barh D, Sarwar M (eds), PlantOmics: The Omics of Plant Science, Springer India, pp 655-682.*

Marum L, Estevao C, Oliveira M, Amancio S, Rodrigues L, Miguel C. 2004. Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine-effect of cryoprotectant and suspension density. *CryoLetters* 25: 363-374.

Mathur G, Alkutkar V, Nadgauda R. 2003. Cryopreservation of embryogenic culture of *Pinus roxburghii*. *Biol. Plant.* 46: 205-210.

Montalbán I, Moncaleán P. 2017. Long term conservation at -80°C of *Pinus radiata* embryogenic cell lines: recovery maturation and germination. *CryoLetters* 38 (3): 202-209.

Nørgaard J, Duran V, Johnsen O, Krogstrup P, Baldursson S, Von Arnold S. 1993. Variation in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Can J For Res* 23: 2560-2567.

Nunes S, Marum L, Farinha N, Tolentino V, Almeida T, Dias M, Santos C. 2017. Plant regeneration from ploidy-stable cryopreserved embryogenic lines of the hybrid *Pinus elliottii* x *P. caribaea*. *Ind Crops Prod* 105: 215–224.

Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, Kai K, Morishita Y, Mori K, Moriya K, Fujii F, Aoki K, Suzuki H, Ohta D, Kazuki S, Shibata D. 2012. High-Throughput Cryopreservation of Plant Cell Cultures for Functional Genomics. *Plant Cell Physiol* 53(5): 943–952.

Ozudogru E, Lambardi M. 2016. Cryotechniques for the Long-Term Conservation of Embryogenic Cultures from Woody Plants. *In: Germana M, Lambardi M (eds), In Vitro Embryogenesis in Higher Plants, Methods in Molecular Biology. Springer Science-Business Media, New York. pp 537-550.*

Panis B, Lambardi M, 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). *In: The Role of Biotechnology, Villa Guarino, Turin, Italy. pp. 43-54.*

Pullman G, Johnson S, Peter G, Cairney J, Xu N. 2003. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression. *Plant Cell Rep* 21:747–758.

Salaj T, Matusikova I, Fraterova L, Pirslova B, Salaj J. 2011. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 106: 55-61.

Salaj, T, Matusikova I, Swennen R, Panis B, Salaj J. 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiolog Plant* 34: 227-233.

Salaj T, Matusova R, Swennen R, Panis B, Salaj J. 2016. Tissue regeneration of *Abies* embryogenic cell lines after 1 year storage in liquid nitrogen. *Biologia* 71 (1): 93-99.

Schumacher H, Westphal M, Heine-Dobbernack E. 2015. Cryopreservation of Plant Cell Lines. *In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols: Methods in Molecular Biology*, Springer Science Business Media, New York. 423-429.

Toivonen P, Kartha K. 1989. Cryopreservation of cotyledons of nongerminated white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) embryos and subsequent plant regeneration. *J Plant Physiol* 134(6): 766-768.

Touchell D, Chiang V, Tsai C. 2002. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Rep* 21: 118-124.

Varis S, Ahola S, Jaakola L, Aronen T. 2017. Reliable and practical methods for cryopreservation of embryogenic cultures and cold storage of somatic embryos of Norway spruce. *Cryobiology* 76: 8-17.

Von Arnold S, Larsson E, Panagiotis N, Moschou P, Zhu T, Uddenberg D, Bozhkov P. 2016. Norway spruce as a model for studying regulation of somatic embryo development in conifers.

In: Park Y, Bonga J, Moon H. (eds) Vegetative Propagation of Forest Trees, Seoul, Korea. pp 351-372.

Vondrakova Z, Cvikrova M, Eliasova K, Martincova O, Vagner M. 2010. Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiology* 30: 1335-1348.

Walter C, Find J, Grace L. 2005. Somatic embryogenesis and genetic transformation in *Pinus radiata*. *In: Jain S, Gupta P (eds) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Springer, The Netherlands, pp 11-24.*

Withers L, King P. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters* 1: 213-220.



3. CAPITULO II

Caracterización de parámetros bioquímicos de tejido embriogénico de *Pinus radiata* sometido a distintos pretratamientos crioprotectores.

3.1 RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar el comportamiento bioquímico de tejido embriogénico de 4 LCEs de *Pinus radiata* en la etapa de criopreservación. La criopreservación del material se realizó con la técnica de congelación lenta, utilizando 5 pretratamientos crioprotectores con base 0,4 M sorbitol. Los pretratamientos fueron: 5% (v/v) DMSO, 10% (v/v) DMSO, 5% (v/v) DMSO y 0,09 M L-prolina, 10% (v/v) DMSO y 0,09 M L-prolina, 0,09 M L-prolina. El enfriamiento lento se optimizó en 120 minutos a -80°C en contenedores Mr Frosty. Para la descongelación el tejido embriogénico fue puesto a baño María a 37°C con recambios de medio de cultivo semanalmente. Una vez recuperado el tejido se realizaron mediciones de azúcares solubles totales, proteínas totales y prolina durante 4 semanas posteriores a la reactivación de crecimiento. Como control se utilizó tejido no criopreservado.

Los resultados de proteínas muestran que no existen diferencias significativas entre las semanas posteriores a la descongelación y los valores basales observados antes de criopreservar el tejido. Para el caso de los azúcares solubles totales se observaron diferencias significativas sólo la primera semana de subcultivo, recuperando sus valores basales a partir de la semana 2 de subcultivo. Finalmente, tampoco se observaron diferencias significativas en el contenido de prolina en relación a los valores basales. En relación a los pretratamientos crioprotectores se observó que éstos no influyeron de gran manera en el comportamiento de los parámetros bioquímicos en el periodo estudiado. De lo anterior podemos concluir que a pesar de los efectos provocados por el estrés durante el proceso de criopreservación, éste no afecta de manera significativa el metabolismo primario, ya que luego del segundo subcultivo, una vez reactivado su crecimiento, los parámetros estudiados vuelven a sus valores basales pre-criopreservación.

3.2 INTRODUCCIÓN

La criopreservación de plantas involucra el almacenamiento de tejido vegetal en nitrógeno líquido a -196°C o en su fase de vapor de nitrógeno líquido a -136°C . La principal ventaja de la criopreservación es que los tejidos pueden conservarse, en principio, indefinidamente, ya que a estas temperaturas ultra bajas se encuentran detenidos todos los procesos metabólicos (Kaczmarczyk *et al.* 2012).

El preservar la viabilidad del tejido vegetal depende de la habilidad de minimizar el estrés producto de la criopreservación (Zeliang y Pattanayak 2012). Antes de ser criopreservado el tejido embriogénico de coníferas es tratado principalmente con una mezcla de sorbitol y dimetilsulfóxido (DMSO) a distintas concentraciones (Hargreaves *et al.* 2002, Mathur *et al.* 2004, Carneros *et al.* 2017)). El método más frecuentemente utilizado para este tipo de tejido es el de enfriamiento lento desarrollado por Whitters y King (1980). Este método permite la deshidratación progresiva hasta el punto en que el contenido celular no formará cristales de hielo al alcanzar temperaturas criogénicas.

La mayoría del daño celular resulta de la severa deshidratación que ocurre durante la congelación. Cuando se forma hielo en los espacios intercelulares se produce una disminución del potencial hídrico fuera de la célula, esto provoca un movimiento de agua no congelada debido al gradiente de potenciales hídrico y químico desde el interior de las células hacia los espacios intercelulares (Tomashow 1998).

La deshidratación inducida por congelación podría tener una serie de efectos que producen daño celular, como la desnaturalización de proteínas y la precipitación de varias moléculas. La estabilización de las membranas a este daño por congelamiento estaría dada por cambios en la composición lipídica de las membranas (Steponkus y Webb 1992). Por otra parte, la acumulación de sacarosa y otros azúcares simples (glucosa, fructosa y galactosa) durante el congelamiento, contribuirían a la estabilización de éstas. También se ha observado la inducción de un gran número de genes que codifican para proteínas crioprotectoras que pudieran contribuir a la tolerancia a la congelación (Tomashow 1998).

Numerosos estudios han demostrado que las bajas temperaturas inducen la acumulación de metabolitos, incluidos carbohidratos tales como glucosa, fructosa, maltosa y rafinosa y aminoácidos tales como prolina y glutamina. Estos metabolitos juegan un importante rol protector en la tolerancia a la congelación en células vegetales (Burrit 2012). El contenido total de proteínas ha sido utilizado como marcador de la integridad y funcionalidad de las membranas celulares luego de la exposición a ciertos eventos de estrés (Martínez-Montero *et al.* 2002).

3.3 MÉTODOLÓGÍA

3.3.1 Material vegetal

El material vegetal fue obtenido del trabajo de investigación señalado en el capítulo 1. Se tomaron 100 mg de TE fresco en fase de multiplicación el mismo día de la criopreservación y semanalmente durante 4 semanas posteriores a la iniciación de la reactivación de crecimiento post criopreservación. Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1,5 ml en un freezer a -80 °C hasta que fueron procesadas.

3.3.2 Evaluación de parámetros bioquímicos

Se evaluaron parámetros bioquímicos del metabolismo primario; carbohidratos solubles totales y proteínas totales y un indicador de estrés por congelamiento; prolina. Las muestras para proteínas y prolina fueron homogenizadas con sus respectivos buffers de extracción en frío con un equipo Tissuelyser II (Qiagen) a 28 Hz por 1 minuto.

Las evaluaciones de parámetros bioquímicos realizadas al tejido control se identificó como semana 0. Las evaluaciones posteriores indican el tiempo transcurrido una vez que el tejido reactivó su crecimiento y comenzó su fase de multiplicación normal. Evidencia basada en la optimización de recuperación post almacenamiento en nitrógeno líquido requiere de un monitoreo de a lo menos 6 a 8 semanas post descongelación del tejido para poder determinar los factores e intervenciones que pudieran estar afectando la recuperación del tejido criopreservado (Benson y Harding 2012). Sin embargo, las evaluaciones sólo se realizaron hasta la semana 4 debido a la gran cantidad de muestras para evaluar que implicaba extender el periodo de evaluación.

Las LCEs seleccionados para la evaluación de parámetros bioquímicos no se recuperaron en todos los pretratamientos utilizados, y por lo mismo, fueron seleccionados para identificar algún patrón de comportamiento con relación a su criotolerancia. El genotipo B se recuperó con todos los pretratamientos aplicados, los genotipos D y H respondieron a 4 pretratamientos y el genotipo H sólo respondió a 3 de ellos.

Carbohidratos

El contenido de carbohidratos solubles totales se determinó utilizando el método de Yemm y Willis (1954) con 15 mg/ml de antrona y ácido sulfúrico al 72% (v/v). Para la confección de la curva patrón se utilizó 1 mg/ml de glucosa, disuelta en agua destilada. Para la extracción de la muestra se utilizó 100 mg de TE fresco por cada muestra adicionándole 2 ml de etanol al 85% (v/v) por 12 horas. Para la cuantificación se utilizaron 200 μ l por muestra en microplacas marca Trueline de 96 pocillos. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 625 nm. en un espectrofotómetro de microplacas marca Biotek, modelo Epoch. Los valores obtenidos fueron contrastados con la curva patrón de glucosa.

Proteínas

Para la extracción de proteínas se utilizó 100 mg de TE fresco por cada muestra a la cual se le adicionó 1,8 ml de buffer de extracción de proteínas. El buffer de extracción utilizado fue 100 mM Tris-HCl a pH 7, 6,5 mM EDTA, 1% (p/v) de PVP, 50 mM NaCl y 0,2% (v/v) de β -Mercapto etanol. Para la confección de la curva patrón se utilizó 1,45 mg/ml de Albúmina de Suero Bovino (ASB). Las muestras fueron agitadas en hielo durante 60 minutos y luego se centrifugaron a 8.000 rpm durante 20 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de proteínas totales solubles con el método de Bradford (1976) utilizando 1,8 ml por muestra de reactivo de Bradford marca Bio-rad Assay #500-006. Para la cuantificación se utilizaron 200 μ l por muestra en microplacas marca Trueline de 96 pocillos. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 595 nm. en un espectrofotómetro de microplacas marca Biotek, modelo Epoch. Los valores obtenidos fueron contrastados con la curva patrón de ASB.

Prolina

Para la extracción de prolina se utilizaron 100 mg de TE por muestra adicionándole 2 ml de ácido sulfosalicílico al 3% (p/v), luego cada muestra se agitó 60 minutos y centrifugó a 6.000

rpm por 30 minutos a 10°C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de prolina. La determinación de prolina se realizó mediante el método de Bates *et al.* (1973) utilizando 25 mg/ml de ninhidrina ácida disuelta en ácido acético glacial y 6 M de ácido fosfórico. Para la confección de la curva patrón se utilizó un patrón de 40 µM de L-prolina (Merck). La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 520 nm. en un espectrofotómetro de microplacas marca Biotek, modelo Epoch. Los valores obtenidos fueron contrastados con la curva patrón de prolina.

3.3.3 Análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados. Cada tratamiento fue repetido 3 veces y con 4 muestras cada uno cada semana de evaluación. Los datos obtenidos en observaciones cuantitativas se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0,05$) usando el software estadístico “Statistica”, Data Analysis Software System, versión 913, 2015.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Carbohidratos solubles totales

En la Figura 2.1 se presentan los valores obtenido de carbohidratos solubles totales (CST) en 4 genotipos que respondieron a distintos pretratamientos crioprotectores. En esta se observa una disminución en el contenido de CST a partir de la primera evaluación post criopreservación con relación a los valores basales observados en TE sin criopreservar. El genotipo B, que presentó una recuperación postcriopreservación independiente del pretratamiento utilizado mostró la más rápida alza, en la semana 2. Los genotipos F y H también presentaron un alza de sus contenidos de carbohidratos en la semana 2, sin embargo, hasta el final del periodo de evaluación aún no alcanzaban los valores iniciales observados pre-criopreservación. El genotipo D mostró los valores más bajos tanto antes de la congelación como una vez descongelado, observándose solo una leve alza al final del periodo. En general se observó el mismo comportamiento por genotipo

para todos los pretratamientos crioprotectores para los cuales se recuperó el TE una vez descongelado.

Fuente: Elaboración propia

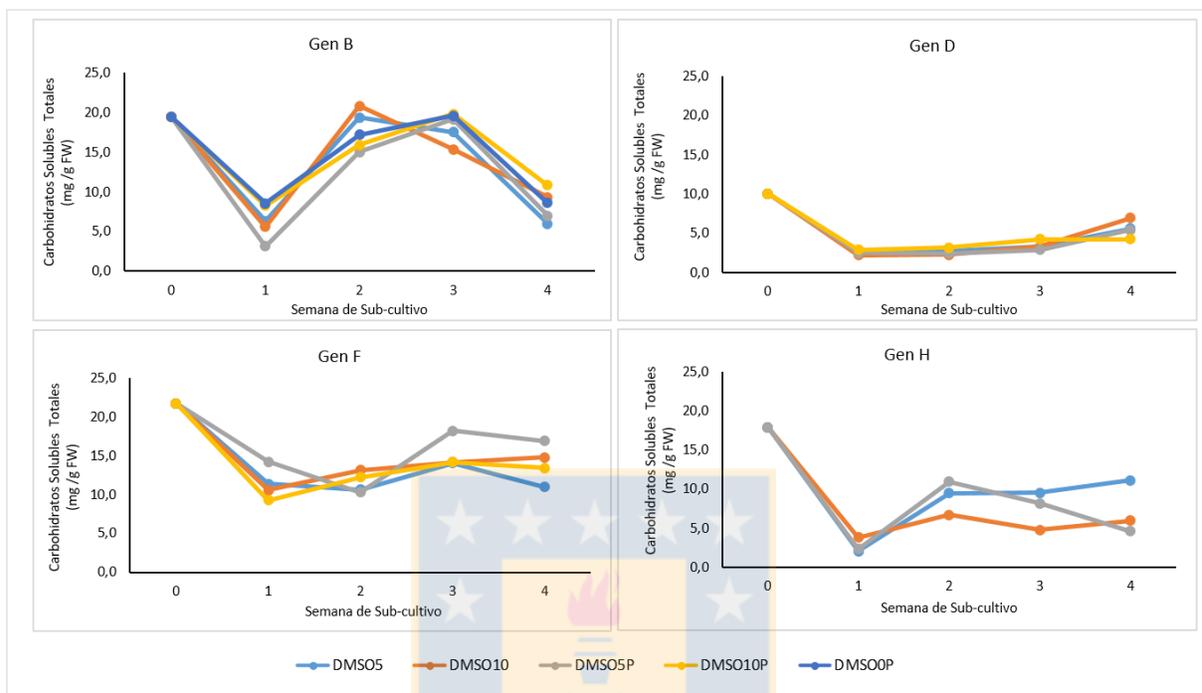


Figura 2.1 Contenido de carbohidratos solubles totales (CST) en tejido embriogénico (TE) de 4 genotipos de *P. radiata* sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.

Lipavska y Kondradova (2004), señalan que los CST juegan un rol protector indispensable bajo condiciones de estrés. En especies del género *Pinus* se ha reportado que la glucosa es el carbohidrato preferente en las demandas metabólicas de la especie (Treat *et al.* 1989). En un estudio en *Picea mariana* y *Picea abies* se observó que, durante la proliferación de TE, los niveles endógenos de sacarosa permanecían constantes y hacia el final del ciclo de subcultivo se observaba una fluctuación en los contenidos de rafinosa (Iraqi y Tremblay 2001).

3.4.2 Proteínas totales

En la Figura 2.2 se observa que el genotipo B presentó el mismo comportamiento con todos los pretratamientos crioprotectores durante todo el periodo de evaluación a excepción del pretratamiento con ausencia de DMSO (DMSO0P) que presentó un alza en la semana 2. El genotipo D presentó una disminución en el contenido de proteínas en la semana 2 para todos los

pretratamientos, el cual se normalizó hacia la semana 4. El genotipo F, el cual fue el más susceptible a la criopreservación, mostró un comportamiento similar para todos los pretratamientos, generando diferencias entre ellos en la semana 4. El genotipo H también mostró una disminución en la semana 2, pero de carácter más leve que lo observado en el genotipo D. En términos generales todos los genotipos alcanzaron sus valores de proteínas totales basales a la semana 4 de reactivado su crecimiento.

Fuente: Elaboración propia

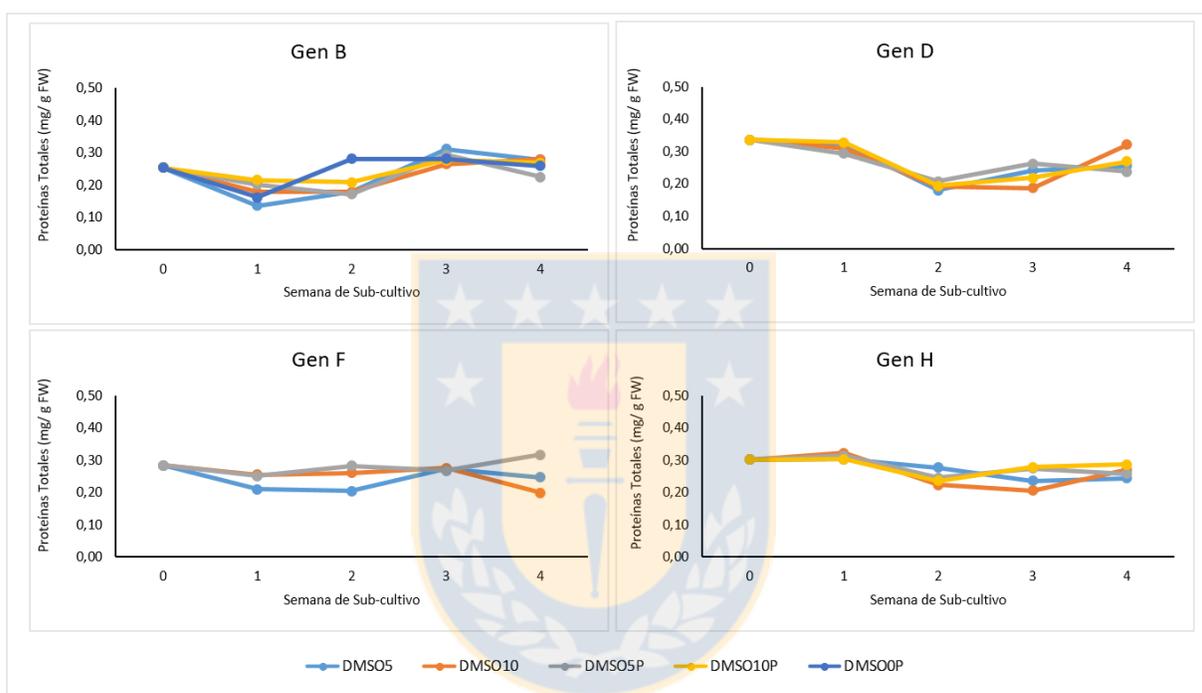


Figura 2.2 Contenido de proteínas totales en tejido embriónico (TE) de 4 genotipos de *P. radiata* sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.

Si bien en este estudio se esperaba un aumento en el contenido de proteínas totales post criopreservación, según lo observado por Tomashow (1998), esto no fue observado en los periodos de tiempo evaluados. Se presume que con el tiempo transcurrido entre la descongelación del TE y la primera evaluación post criopreservación el tejido fue capaz de recuperar sus valores iniciales. Martínez-Montero *et al.* (2002), en su estudio en TE de *Saccharum sp*, identificaron un aumento en el contenido total de proteínas el segundo día luego de ser descongelado, observándose una disminución paulatina hasta recuperar sus valores iniciales al cuarto día de subcultivo, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este estudio.

3.4.3 Prolina

En la Figura 2.3 se observa que el genotipo D es el con mayor contenido de prolina, pero también es el que tuvo menos variaciones durante el periodo evaluado. El genotipo H fue el con menor contenido, sin embargo, los contenidos de este aminoácido no tuvieron grandes variaciones una vez que el tejido reactivó su crecimiento luego de ser criopreservado. Se observó para todos los genotipos que el contenido de prolina no tuvo mayores variaciones tanto en el periodo evaluado ni entre los pretratamientos crioprotectores utilizados. Las mayores variaciones se observaron en la semana 1 para el genotipo B para todos los tratamientos, en la semana 2 en el genotipo F para todos los tratamientos y en la semana 1 en el genotipo H para el pretratamiento DMSO5.

Fuente: Elaboración propia

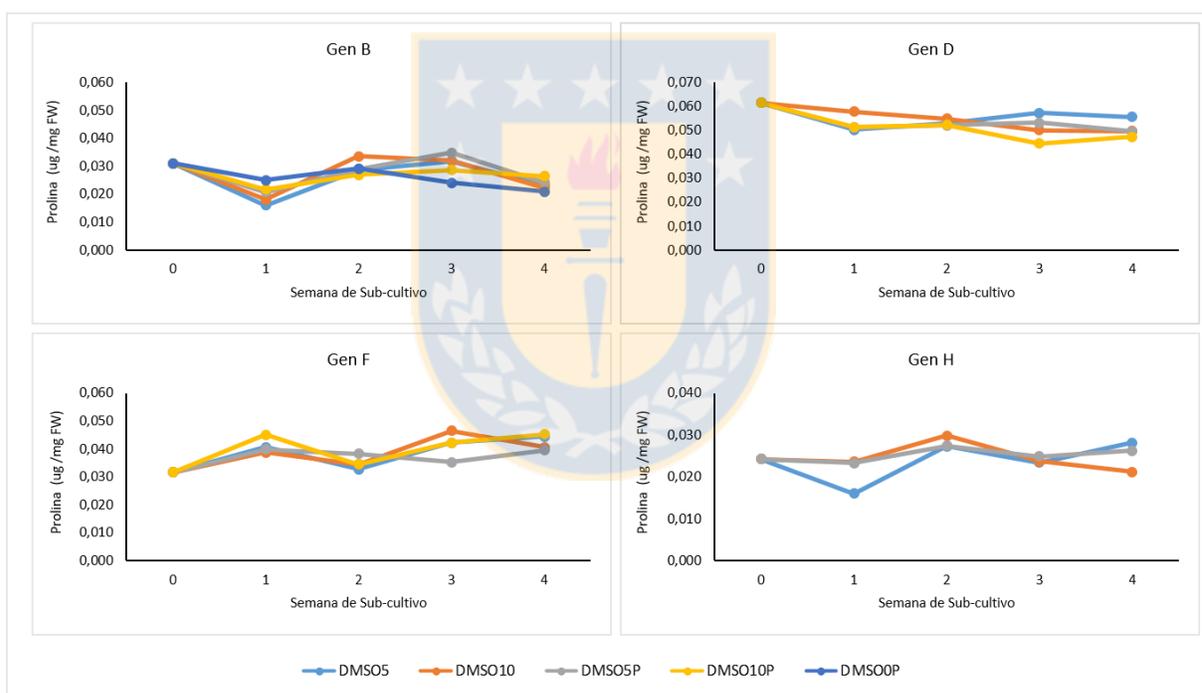


Figura 2.3 Contenido de prolina en tejido embriogénico (TE) de 4 genotipos de *P. radiata* sometidos a criopreservación con 5 pretratamientos crioprotectores.

La prolina participa en la síntesis de proteínas y regula muchas funciones importantes como el ajuste osmótico y la protección de proteínas durante condiciones de estrés (Kavi Kishor *et al.* 2015). Es por esto que se esperaba que los contenidos de prolina post criopreservación fueran mayores a los valores basales observados en los 4 genotipos analizados.

3.5 CONCLUSIONES

- ✓ No se observa un efecto del pretratamiento crioprotector en los valores de carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina, una vez que el tejido embriogénico ha reactivado su crecimiento post criopreservación.
- ✓ Los carbohidratos solubles totales tienen valores más bajos a los iniciales a lo menos hasta la semana 4 después de reactivar su crecimiento.
- ✓ Los valores de prolina una vez que el tejido ha reactivado su crecimiento no tienen variaciones significativas para ninguno de los genotipos estudiados.
- ✓ La aplicación exógena de L-prolina como suplemento en pretratamientos crioprotectores junto a sorbitol y DMSO, no tiene un efecto en los contenidos de prolina del tejido embriogénico una vez que éste ha reactivado su crecimiento.
- ✓ El patrón de comportamiento de los parámetros bioquímicos estudiados es dependiente del genotipo y no de su criotolerancia ni del pretratamiento utilizado al momento de criopreservar su tejido embriogénico, ya que genotipos con similar criotolerancia a pretratamientos específicos, no presentaron el mismo patrón durante el periodo de tiempo evaluado.

3.6 AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Cultivos Vegetales de la Facultad de Ciencias Forestales y del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción por facilitar sus instalaciones para todos los análisis realizados. A mi compañera de postgrado Karina Crisóstomo por su compañía incondicional durante todas mis mediciones. A Mónica Guíñez por su ayuda en el procesamiento de muestras.

3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bates, L. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.

Benson E. Harding K. 2012. Cryopreservation of Shoot Tips and Meristems: An Overview of Contemporary Methodologies. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N (eds.) *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 191-226.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Burrit D. 2012. Proline and the cryopreservation of plant tissue: Functions and practical applications. In: Katkov I (ed), *Current frontiers in Cryopreservation*. Intech, Croatia. pp 415-430.

Carneros E, Hernández I, Toribio M, Díaz-Sala C, Celestino C. 2017. 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.

Hargreaves C, Grace L, Holden D. 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep.* 21: 40-45.

Iraqi D. Tremblay F. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52: 2301- 2311.

Kaczmarczyk A, Funnekotter B, Menon A, Phang P, Al-Hanbali A, Bunn E, Mancera R. 2012. Current Issues in Cryopreservation. In: Katkov I (ed) *Current Frontiers in Cryobiology*. Intech, China, pp 417-438.

Lipavska H, Kondradova H. 2004. Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cell. Dev Biol Plant* 40: 23-30.

Mathur G, Alkutkar V, Nadgauda R. 2003. Cryopreservation of embryogenic culture of *Pinus roxburghii*. *Biol. Plant.* 46: 205-210.

Martínez-Montero M, Mora N, Quiñones J, González-Arno M, Engelmann F, Lorenzo J. 2002. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum sp*) embryogenic calluses. *CryoLetters* 23: 237-244.

Kavi Kishor P, Hima Kumari P, Sunita M, Sreenivasulu N. 2015. Role of proline in cell Wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Front Plant Sci* 6(544): 1-17.

Steponkus P, Webb M. 1992. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: G Somero, B Osmond (eds) *Water and Life: Comparative Analysis of Water Relationships at the Organismic, Cellular and molecular Level*. SpringerVerlag, Berlin, pp 338–362.

Tomashow M. 1998. Role of Cold-Responsive Genes in Plant Freezing Tolerance. *Plant Physiol* 118: 1–7.

Treat W, Engler C, Soltes E. 1989. Culture of photomixotropic soybean and pine in a modified fermentor using a novel impeller. *Biotechnol Bioengng* 34: 1191-1202.

Withers L, King P. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters* 1: 213-220.

Yemm E, Willis A. 1954. The estimation of carbohydrates in plants extract by anthrone. *Biochem J* 57(3): 508-514.

Zeliang P, Pattanayak A. 2012. Fundamental Cryobiology and Basic Physical, Thermodynamical and Chemical Aspects of Plant Tissue Cryopreservation. In: Abdurakmonov I (ed) Plant Breeding, IntechOpen, Croatia, pp 41-56.



4. CAPITULO III

Efecto de la densidad inicial de criopreservación en la capacidad madurativa de tejido embriogénico de *Pinus radiata*.

4.1 RESUMEN

Con el objetivo de determinar el efecto de la densidad inicial de tejido embriogénico criopreservado en la producción de embriones somáticos cotiledonares de *Pinus radiata* se evaluaron 5 LCEs con 4 densidades celulares iniciales: 7, 14, 21 y 28 % (p/v). El tratamiento control fue tejido embriogénico no criopreservado. Luego de permanecer en nitrógeno líquido las LCEs fueron descongeladas a 37°C. En primera instancia se generó la curva de crecimiento para determinar la frecuencia de subcultivo óptima. Se evaluó el porcentaje de reactivación del tejido embriogénico y el potencial embriogénico a través de microscopía, para luego determinar su capacidad madurativa. Los resultados obtenidos indicaron que el tiempo óptimo de subcultivo previo a la criopreservación era de 7 días. Con relación a la tasa de reactivación, se observó que las densidades celulares de 7 y 14 % disminuyeron significativamente el número de LCEs recuperadas con relación al tejido no criopreservado, mientras que en las densidades de 21 y 28% no se observaron diferencias significativas con el control. Esto indicaría que densidades celulares iniciales mayores, permite recuperar un mayor número de muestras cuando éstas requieren ser almacenadas en nitrógeno líquido. La capacidad madurativa, por su parte, no se vio afectada significativamente por ninguna de las densidades iniciales utilizadas.

4.2 INTRODUCCIÓN

La criopreservación de cultivos embriogénicos de coníferas ha sido utilizada para prevenir la pérdida de potencial embriogénico del tejido y evitar una posible variación genética causada por la mantención a largo plazo de cultivos creciendo activamente (Reed 2008). La técnica más frecuentemente utilizada para estos fines es el enfriamiento lento, lo que ha permitido el

desarrollo de protocolos efectivos para varias especies de coníferas. Esta técnica consiste en un congelamiento lento de tejido embriogénico (TE) en tasas de 0,5 a 1 °C/min⁻¹ y se considera muy eficiente ya que permite realizar grandes cantidades de muestras al mismo tiempo (Lambardi *et al.* 2008).

En el proceso de congelación y descongelación las células vegetales pueden sufrir daños como resultado de la exposición a bajas temperaturas, formación intracelular de cristales de hielo, deshidratación severa o formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Martinez-Montero y Harding 2015). Es por esto que son muchos los factores a evaluar al momento de generar protocolos efectivos de criopreservación. Dentro de los factores iniciales a considerar están; el estado fisiológico del tejido a criopreservar, las condiciones de cultivo estandarizadas, los intervalos de subcultivo y el tamaño del tejido celular a conservar (densidad) (Marum *et al.* 2004).

Heine-Dobbernack *et al.* (2008) señalan que la densidad celular al momento de criopreservar TE es un parámetro crítico para una exitosa tasa de recuperación. Poco se ha trabajado con relación a las densidades de las suspensiones celulares que se realizan para tener un tejido bien disgregado (más homogéneo) en etapas previas a la maduración y a la criopreservación. Existe evidencia que indica que menores densidades de TE al momento de la maduración, mejora la capacidad madurativa de las líneas embriogénicas de *Pinus radiata* (I. Montalbán, comunicación personal, 2015). Sin embargo, en el caso de la criopreservación de tejido embriogénico de coníferas sólo existen estudios en *Pinus pinaster* (Marum *et al.* 2004) y *Picea abies* y *Picea sitchensis* (Find *et al.* 1998).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la densidad inicial de tejido embriogénico criopreservado en la producción de embriones somáticos (Es) cotiledonares (capacidad madurativa) de *Pinus radiata*.

4.3 MÉTODOLOGÍA

4.3.1 Material vegetal

Conos inmaduros de *Pinus radiata* fueron seleccionados para la inducción de las líneas celulares embriogénicas (LCEs). Los cruzamientos controlados fueron realizados en el año 2015 en un Huerto Semillero de propiedad de la empresa Forestal Arauco S.A (Chile), ubicado en la Provincia de Arauco en la región del Bío-Bío, Chile (Coordenadas UTM WGS84 H18: Este 639,471 y Oeste 5.823.723).

Los conos colectados fueron desinfectados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% (v/v) por 3 minutos, las semillas fueron disectadas en forma manual y desinfectadas en cámara de flujo laminar con una solución de peróxido de hidrogeno al 10% (v/v) por 5 minutos en agitación y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Las semillas sin su testa fueron puestas en placa petri de 94 x 16 mm con 30 ml de medio de cultivo Litvay (LM) modificado (Litvay 1981) suplementado con 4,5 μM de 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) and 2,7 μM de 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g L⁻¹ sacarosa y 3 g L⁻¹ de Phytigel®. El pH fue ajustado a 5,6 antes de autoclavar a 121°C y 1 ATM de presión.

Al cabo de 12 semanas en cultivo, se cambiaron a placa de petri individual con medio de cultivo fresco. Las semillas que presentaron una proliferación celular friable, característica de un crecimiento de TE y que fue igual o mayor a 50 mm de diámetro se le asignó el código del nuevo genotipo. Para la proliferación del tejido se utilizó el mismo medio de cultivo, realizando cambio a medio fresco cada 7 días. El material embriogénico se mantuvo en condiciones de oscuridad a una temperatura de 22±2 °C. Para el presente estudio se seleccionaron 5 líneas celulares embriogénicas (LCEs).

Para la determinación del potencial embriogénico de las LCEs seleccionadas se realizaron preparaciones de 20 mg de tejido fresco a las que se le agregó 10 μl de tinción de 2% (p/v) acetocarmín por 4 minutos seguido de 2 enjuagues de agua destilada y luego 10 μl de tinción de 5% (p/v) Evans Blue por 15 segundos seguido de 3 enjuagues con agua destilada (Salaj *et al.* 2011). El tejido teñido fue puesto sobre un portaobjeto y se cubrió con un cubreobjeto para las

observaciones microscópicas, las cuales fueron realizadas en un microscopio Carl Zeiss, Axiostar Plus.

4.3.2 Criopreservación

Para la criopreservación de TE primario se utilizó el protocolo de congelación lenta planteado por Hargreaves *et al.* 1994 modificado (Figura 3.1). 7 días después del último subcultivo (Figura 3.1 A) el tejido fue suspendido en medio líquido de multiplicación Litvay (LM) modificado, con un suplemento 0,4 M de Sorbitol (Sigma Aldrich) por 48 horas, mantenido en agitación a 120 rpm a 22 ± 2 °C bajo condiciones de oscuridad. Luego se le adicionó en forma paulatina 10 alícuotas de DMSO hasta alcanzar una concentración de 6,5% (v/v) (Figura 3.1 B). Alícuotas de 1 ml de esta suspensión fueron dispensadas en crioviales de 2 ml (Nalgene). Los crioviales fueron almacenados en un congelador a -80°C por 90 min (Figura 3.1 C). Al cabo de este tiempo los crioviales fueron sumergidos en nitrógeno líquido a -196°C , donde se mantuvieron hasta su descongelación.

Fuente: Elaboración propia

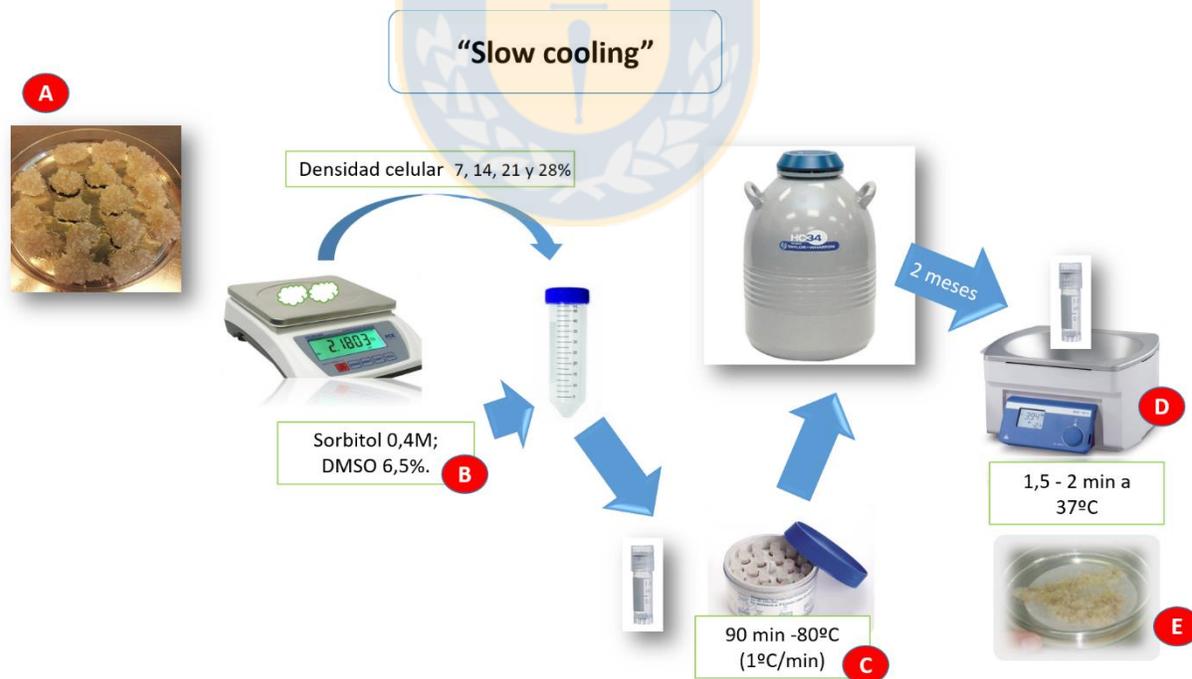


Figura 3.1 Método de criopreservación "Slow cooling" o enfriamiento lento. A: Tejido embriogénico con 7 días de subcultivo. B: Pretratamiento crioprotector utilizado. C: Fase de

enfriamiento lento. D: Descongelación del tejido embriogénico. E: Tejido embriogénico con crecimiento reactivado.

Se utilizaron 5 densidades celulares iniciales al momento de acondicionar y almacenar las muestras; 7, 14, 21 y 28% (p/v) de TE.

4.3.3 Descongelación y reactivación del tejido post-criopreservación

El material embriogénico se mantuvo almacenado por 2 meses en nitrógeno líquido, luego los crioviales fueron descongelados en agua estéril a 37°C en un baño termoregulado por 1 a 2 min hasta su descongelación (Kantha *et al.* 1988) (Figura 3.1 D). Una vez descongelados fueron limpiados con alcohol etílico al 70% (v/v) para ser introducidos en una cámara de flujo laminar, donde el tejido descongelado se dispensó sobre un filtro de nitrato de celulosa puesto sobre papel absorbente hasta que todo el medio líquido fue drenado, para luego ser depositado en una placa petri con medio de cultivo LM modificado. El recambio de medio de cultivo se realizó cada 7 días por 4 veces para eliminar residuos de crioprotectores del tejido criopreservado. Para la multiplicación del tejido se depositaron 9 aglomerados de aproximadamente 50 mm de diámetro por placa petri en medio de cultivo fresco, el cual se subcultivó cada 7 días. El almacenamiento del material posterior a la descongelación se realizó en oscuridad a 22±2°C y 60% de humedad relativa.

4.3.4 Maduración de embriones somáticos (Es)

Una vez que el tejido fue descongelado y entró nuevamente en su fase de multiplicación (Figura 3.1 E), fue puesto en medio LM modificado suplementado con 90 µM de ácido abscísico, 175 mM de sacarosa y 10 gr L⁻¹ de Phytigel®. La maduración de los Es se realizó a una concentración de 80 mg de tejido por placa petri, durante 4 a 5 meses hasta la completa maduración de sus embriones, en condiciones de oscuridad a una temperatura de 22±2°C y 60% de humedad relativa (Montalbán *et al.* 2010). El efecto de los tratamientos de densidad celular utilizada en criopreservación sobre la capacidad madurativa, se evaluó contabilizando el número total de Es normales maduros por gramo de peso fresco de TE (No. Es/g PF) obtenido de las

LCEs que presentaron crecimiento post criopreservación. Esto fue comparado con la capacidad madurativa del TE de cada línea celular previa a la criopreservación.

4.3.5 Análisis estadístico

El diseño experimental fue de bloques completos aleatorizados. Cada tratamiento fue repetido 3 veces, con 25 muestras cada uno. Los datos obtenidos en observaciones cuantitativas se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey a un nivel de confianza del 95% ($P \leq 0,05$) usando el software estadístico “Statistica”, Data Analysis Software System, versión 913, 2015.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Evaluación de tejido embriogénico (TE)

El material vegetal generado de la inducción de TE de semillas inmaduras de *P. radiata* se observa en la Figura 3.2 a. Las 5 LCEs seleccionadas fueron puestas a multiplicar hasta obtener tejido suficiente para poder criopreservar a lo menos 10 crioviales (Figura 3.2 b).

Fuente: Elaboración propia

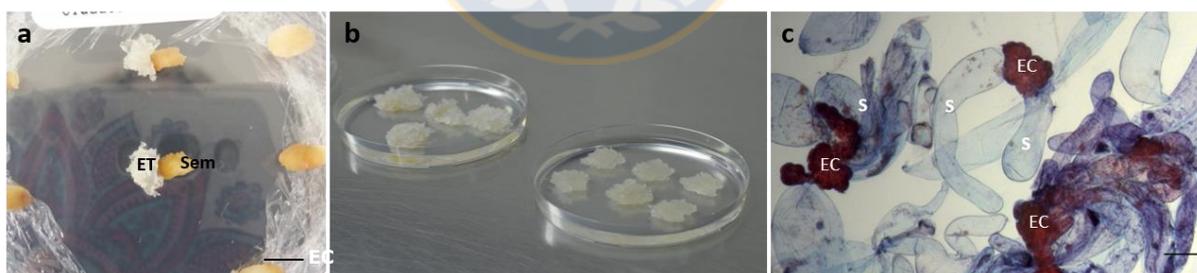


Figura 3.2 Tejido embriogénico (TE) generado de semillas inmaduras de *P. radiata* desde su generación hasta después de ser criopreservado. a: semilla de *P. radiata* extruida, Bar 1 cm. b: TE en crecimiento antes de ser criopreservado. c: vista microscópica de TE en multiplicación posterior a la criopreservación, una vez recuperado su crecimiento, se observan complejos proembriogénicos (CPEs), Bar 100 um. ET: tejido embriogénico, Sem: semilla inmadura, EC: Células embriogénicas, S: Células suspensoras.

En la Figura 3.3 se observa el patrón de crecimiento de las LCEs seleccionadas. Se observa que todas las líneas estudiadas tuvieron un patrón similar de crecimiento, observándose un ciclo de crecimiento activo hasta el día 12 donde el tejido entró en una fase de crecimiento estacionario hasta el día 14. Observaciones realizadas posterior a este periodo, indican que el tejido se mantuvo vivo hasta el día 21 sin presentar incrementos importantes en su crecimiento. Debido a esto se determinó un ciclo de cultivo previo a la criopreservación de 7 días.

Fuente: Elaboración propia

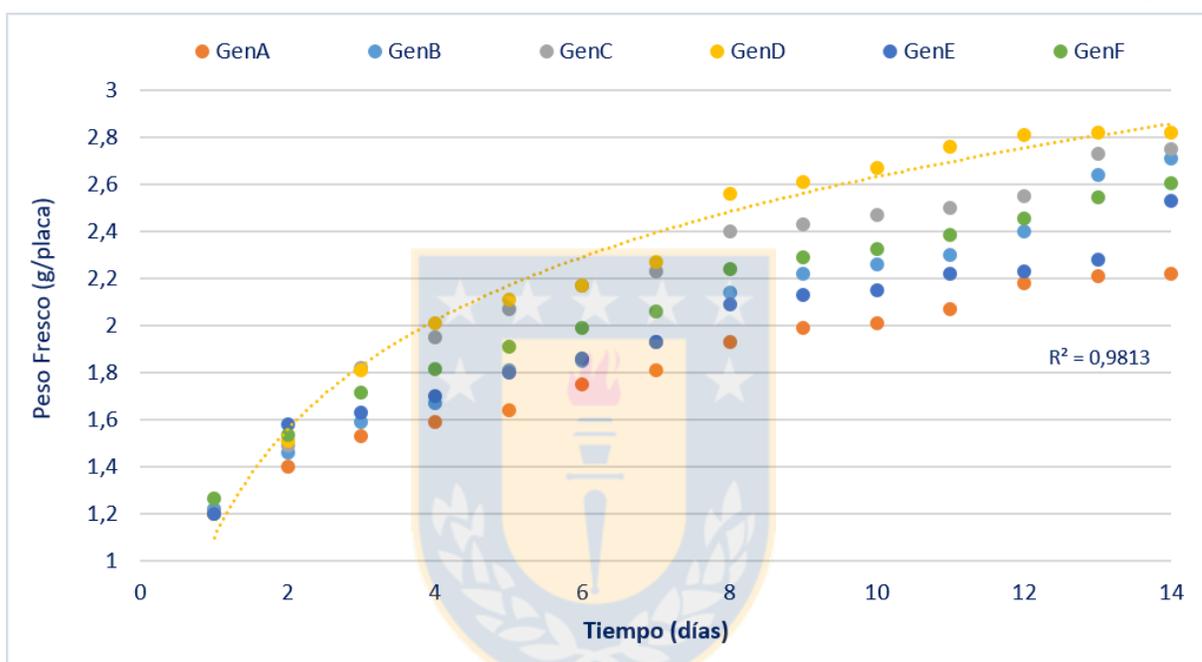


Figura 3.3 Curva de crecimiento celular de las líneas celulares embriónicas (LCEs) de *P. radiata*.

4.4.2 Descongelación y reactivación del tejido

Una vez descongelado el tejido no se observó pérdida de las estructuras proembriónicas (CPEs) producto de la criopreservación (Figura 3.2 c), observándose CPEs características de tejido embriónico de *P. radiata*, con abundantes centros meristemáticos rodeados de células suspensoras.

En este ensayo se ratificó lo observado en el ensayo de pretratamientos crioprotectores (Capítulo 1) con respecto al lavado del tejido descongelado antes de depositarlo sobre filtro de celulosa y drenarlo, antes de volver a colocarlo a reactivar su crecimiento en medio semisólido. El uso de la técnica de congelación lenta utilizada en este experimento fue efectiva con todas las densidades iniciales utilizadas en relación a la recuperación del crecimiento de tejido criopreservado de *P. radiata* tal como reportaron varios autores (Gupta y Durzan 1987, Lainé *et al.* 1992, Hargreaves *et al.* 2002, Salaj *et al.* 2012, Alvarez *et al.* 2012, Latutrie y Aronen 2013, Carneros *et al.* 2017, Nunes *et al.* 2017). Sin embargo, la tasa de recuperación para este experimento fue particularmente baja, ya que tan sólo el 46,7% de las líneas utilizadas respondieron a lo menos a uno de los pretratamientos de densidad celular. Consecuentemente a esto el periodo de recuperación mínimo para las LCEs con buena tasa de multiplicación fue de 3 semanas y para las LCEs con una menor tasa de multiplicación fue de 10 semanas, observándose una fase de latencia más extensa de lo habitual (datos no mostrados). Esto evidenció un fuerte efecto del genotipo en la duración de la fase de latencia. La recuperación de las líneas criopreservadas estuvo bajo lo esperado de acuerdo con lo reportado para otras especies de coníferas (Hägman *et al.* 1998, Ford *et al.* 2000, Mathur *et al.* 2003, Latutrie y Aronen 2013).

Fuente: Elaboración propia

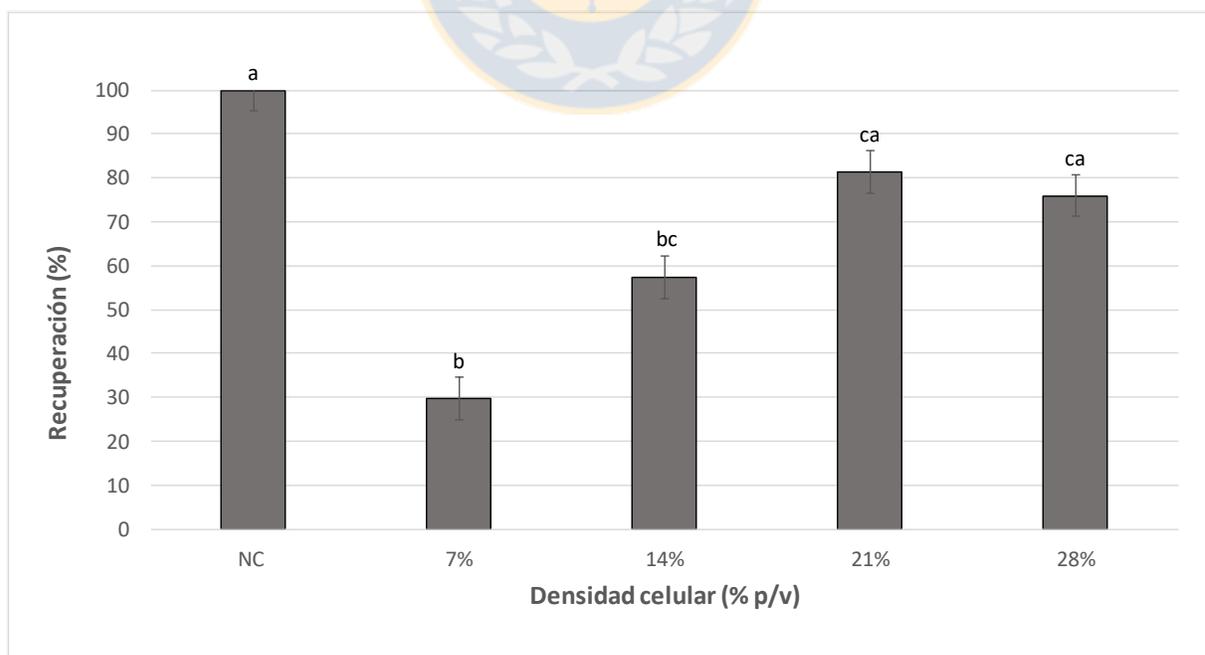


Figura 3.4 Efecto de 4 densidades celulares iniciales en la recuperación de tejido embriogénico

(TE) de *P. radiata* luego de ser criopreservado. Se muestran barras de error estándar. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo al *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

A pesar de que el tejido presentaba características macro-morfológicas normales al momento de iniciar el proceso de criopreservación, se observó que la tasa de multiplicación estaba un poco por debajo del promedio observado habitualmente en material embriogénico de *P. radiata*. Las líneas que no presentaron evidencia de crecimiento a las 10 semanas post descongelación, fueron eliminadas. Una vez descongelado, el TE presentó las mismas características que antes de ser criopreservado.

En el estudio realizado, se observó que todas las densidades celulares utilizadas disminuyeron significativamente el número de LCEs recuperadas con relación al tejido no criopreservado (NC) (Figura 3.4). Las densidades celulares de 7 y 14 % disminuyeron significativamente el número de LCEs recuperadas con relación al tejido no criopreservado, mientras que en las densidades de 21 y 28% no se observaron diferencias significativas con el control. Esto indicaría que densidades celulares iniciales mayores, permite recuperar un mayor número de muestras cuando éstas requieren ser almacenadas en nitrógeno líquido. Marum *et al.* (2004) obtuvieron similares resultados en TE de *Pinus pinaster*, y señalaron que, si bien las densidades celulares altas son las mejores para una criopreservación exitosa, no lo son cuando lo que se quiere es iniciar suspensiones celulares para multiplicar TE, siendo las mejores para este fin las que se encuentran bajo el 7%. Anterior a esto Kobayashi *et al.* (1999) en su estudio en *Daucus carota* señalaron que densidades muy altas podrían estar generando compuestos inhibidores que pudieran estar afectando el óptimo desarrollo de las células embriogénicas.

Fuente: Elaboración propia

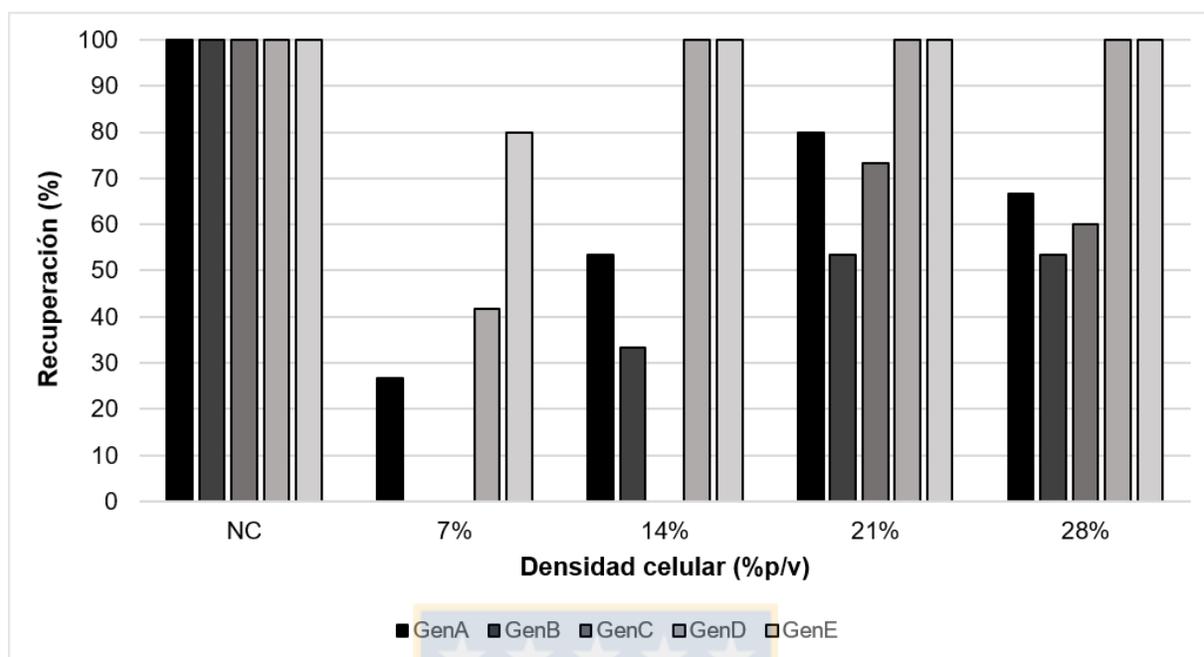


Figura 3.5 Recuperación de crecimiento (%) de tejido embriogénico (TE) observado en 5 líneas celulares de *P. radiata* (Gen A, B, C, D y E) criopreservadas con 4 densidades celulares iniciales.

En la Figura 3.5 se observa la recuperación obtenida por cada línea celular criopreservada en los distintos tratamientos de densidades iniciales. En ella se puede observar que en la densidad 7% se recuperaron 3 LCEs y en la densidad 14% se recuperaron 4 líneas. Por otra parte en los tratamientos 21 y 28% se recuperaron las 5 líneas criopreservadas.

4.4.3 Maduración de embriones somáticos

En la Figura 3.6 se observa el comportamiento del total de las muestras criopreservadas, observándose que ninguna de las densidades celulares iniciales utilizadas tuvo un efecto significativo en el número de embriones cotiledonares obtenidos de la maduración de TE criopreservado.

Fuente: Elaboración propia

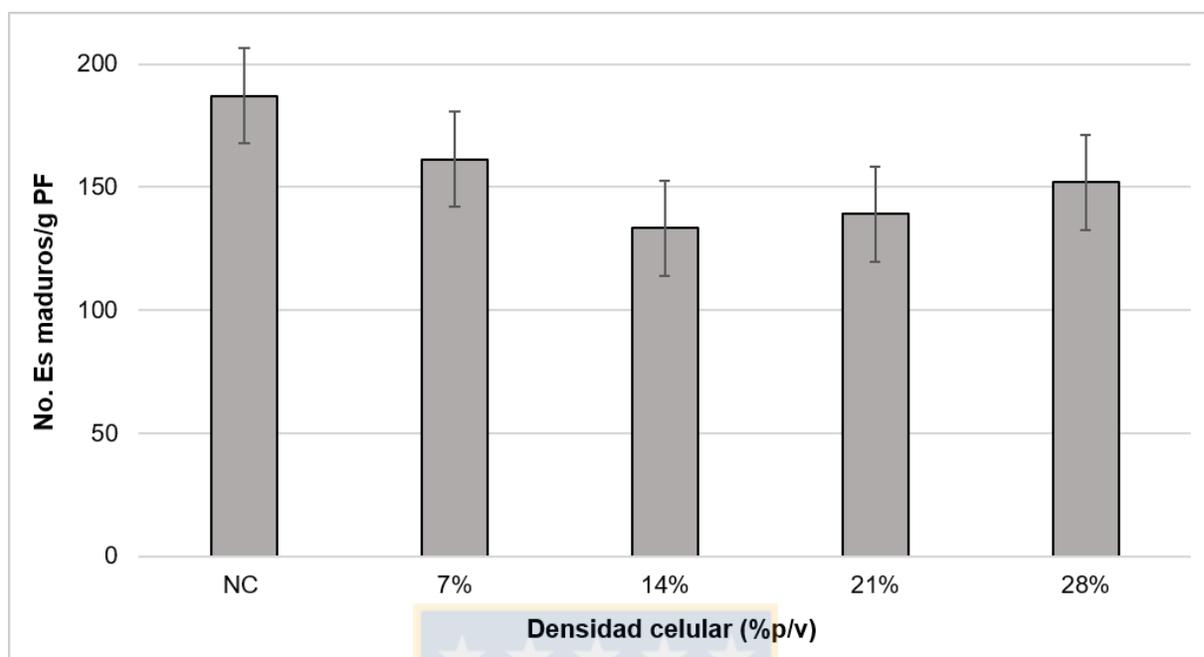


Figura 3.6 Efecto de 4 tratamientos de densidad inicial en el número de embriones maduros (capacidad madurativa) por gramo de peso fresco (No. Es/g PF) de tejido embriogénico (TE) de *P. radiata* recuperado luego de la criopreservación. Se muestran barras de error estándar. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

Al observar el comportamiento por genotipo, tres LCEs presentaron formación de embriones cotiledonares maduros independiente del pretratamiento aplicado. Se observó en la línea GenA que al utilizar una densidad inicial de 7% y en la línea celular GenE una densidad de 28%, se generó un aumento en el número de embriones luego de la criopreservación (Cuadro 3.1). Estos resultados ratifican la importancia de conocer el comportamiento a los distintos tratamientos de los genotipos que quieren ser almacenados en nitrógeno líquido.

Con relación a la capacidad madurativa de líneas criopreservadas de coníferas, diversos autores han señalado no haber observado efectos negativos significativos en sus LCEs, a causa de la criopreservación (Touchell *et al.* 2002, Vondrakova *et al.* 2010, Álvarez *et al.* 2012). E incluso autores como Latutrie y Aronen (2013) han señalado que observaron una mejora en el número de embriones cotiledonares en TE almacenados por largos periodos de tiempo.

Cuadro 3.1 Número de embriones somáticos (Es) cotiledonares de 5 Líneas celulares (LCEs) de *P. radiata* sometidas a 4 densidades iniciales de criopreservación. Casilleros sin datos corresponden a densidades donde la línea celular no se recuperó postcriopreservación. Tratamientos acompañados de distintas letras indican diferencias significativas entre tratamientos crioprotectores de acuerdo con el *Test* de Tukey a $P \leq 0,05$.

LCE	NC	7%	14%	21%	28%
GenA	340,3 ab	669,7 b	190,5 a	326,4 ab	287,9 a
GenB	284,8 a	-	247,1 a	198,6 a	244,8 a
GenC	10,8 a	-	-	3,8 a	5,4 a
GenD	230,2 a	52,0 a	130,9 a	127,0 a	178,6 a
GenE	69,3 a	64,7 a	16,2 a	13,9 a	73,9 a

Fuente: Elaboración propia

4.5 CONCLUSIONES

- ✓ Las características morfológicas del tejido embriogénico a criopreservar son esenciales al momento de preservar cualquier tejido. Éste debe encontrarse friable y con una alta tasa de multiplicación. De no ser así esto afectará la recuperación del tejido una vez descongelado.
- ✓ La densidad celular inicial utilizada al momento de criopreservar tejido embriogénico tiene un efecto significativo en la recuperación de éste una vez descongelado.
- ✓ Densidades iniciales bajas de tejido embriogénico al momento de criopreservar, tienen mayores posibilidades de resistir la criopreservación y recuperarse una vez descongelados.
- ✓ El genotipo utilizado tiene un alto componente en la recuperación de tejido criopreservado y en la capacidad madurativa de éste.
- ✓ La densidad celular inicial utilizada al momento de preparar las muestras de tejido

embriogénico para almacenarlas en nitrógeno líquido no afecta de manera significativa su capacidad madurativa (número de embriones cotiledonares) una vez descongelado.

- ✓ Densidades celulares iniciales de 21 y 28% son las más adecuadas para obtener un mayor número de embriones cotiledonares en tejido embriogénico de *P. radiata*.

4.6 AGRADECIMIENTOS

A BIOFOREST S.A por el financiamiento, al personal del Laboratorio de Biotecnología por el apoyo en la preparación de material, medio de cultivo y en especial a Mónica Guíñez y Nancy Pávez en el procesamiento del material.

4.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Álvarez J, Cortizo M, Ordás R. 2012. Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. *CryoLetters* 33: 476-484.

Carneros E, Hernández I, Toribio M, Díaz-Sala C, Celestino C. 2017. 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.

Find, J, Norgaard J, Krogstrup P. 1998. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. *Journal of Plant Physiology* 152: 510-517.

Ford C, Jones N, Van Staden J. 2000. Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36: 366-369.

Gupta P, Durzan D, Finkle B. 1987. Somatic polyembryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can J Forest Res* 17: 1130-1134.

Häggman H, Ryyänen L, Aronen T, Krajinakova J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scots pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 45-53.

Hargreaves C, Grace L, Holden D. 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep.* 21: 40-45.

Heine-Dobbernack E, Kiesecker H, Schumacher H. 2008. Cryopreservation of dedifferentiated cell cultures. In: Reed B (ed) *Plant cryopreservation. A practical guide*. Springer, New York, pp 141–165.

Kartha K, Fowke L, Leung N, Caswell K, Hakman I. 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 132: 529-539.

Kobayashi T, Higashi K, Saitou T, Kamada H. 1999. Physiological properties of inhibitory conditioning factor(s), inhibitory to somatic embryogenesis, in high-density cell cultures of carrot. *Plant Sci.* 144: 69–75.

Lainé E, Bade P, David A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell-suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11: 295-298.

Latutrie M, Aronen T. 2013. Long-term cryopreservation of embryogenic *Pinus sylvestris* cultures. *Scand J For Res*, 28(2): 103-109.

Lambardi M, Ozudogru EA, Benelli C. 2008. Cryopreservation of embryogenic cultures. In: Reed B (ed) *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. Springer, New York, pp 177-210.

Litvay J, Verma D, Johnson M. 1985. Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Reports* 4:325-328.

Martínez-Montero M, Harding K. 2015. Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation. *In: Barh D, Sarwar M (eds), PlantOmics: The Omics of Plant Science, Springer India, pp 655-682.*

Marum L, Estevao C, Oliveira M, Amancio S, Rodrigues L, Miguel C. 2004. Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine-effect of cryoprotectant and suspension density. *CryoLetters* 25: 363-374.

Mathur G, Alkutkar V, Nadgauda R. 2003. Cryopreservation of embryogenic culture of *Pinus roxburghii*. *Biol. Plant.* 46: 205-210.

Montalbán I, De Diego N, Moncaleán P. 2010. Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Tress Struct Funct* 24: 1061-1071.

Nunes S, Marum L, Farinha N, Tolentino V, Almeida T, Dias M, Santos C. 2017. Plant regeneration from ploidy-stable cryopreserved embryogenic lines of the hybrid *Pinus elliottii* x *P. caribaea*. *Ind Crops Prod* 105: 215–224.

Reed B. 2008. Cryopreservation: Practical considerations. *In: Reed B (ed) Plant cryopreservation: A practical guide. Springer, New York, pp 3–13*

Salaj T, Matusikova I, Fraterova L, Pirselova B, Salaj J. 2011. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 106: 55-61.

Salaj, T, Matusikova I, Swennen R, Panis B, Salaj J. 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiolog Plant* 34: 227-233.

Touchell D, Chiang V, Tsai C. 2002. Cryopreservation of embryogenic cultures of *Picea mariana* (black spruce) using vitrification. *Plant Cell Rep* 21: 118-124.

Vondrakova Z, Cvikrova M, Eliasova K, Martincova O, Vagner M. 2010. Cryotolerance in Norway spruce and its association with growth rates, anatomical features and polyamines of embryogenic cultures. *Tree Physiology* 30: 1335-1348.



5. DISCUSIÓN GENERAL

Es ampliamente conocido que la aplicación de crioprotectores raramente permite la sobrevivencia del 100% de germoplasma vegetal *in vitro* después de ser congelado y descongelado (Martínez-Montero y Harding 2015). Existe un considerable nivel de variabilidad a través de genotipos y especies donde la sobrevivencia puede variar en un gran porcentaje (Reed *et al.* 2004).

La técnica utilizada de congelación lenta es efectiva con relación a la respuesta del tejido criopreservado de *Pinus radiata* tal como reportó Hargreaves (2002) y otros autores en especies del género *Pinus* (Mathur *et al.* 2003, Marum *et al.* 2004, Salaj *et al.* 2011, Salaj *et al.* 2012, Alvarez *et al.* 2012, Latutrie y Aronen 2013, Carneros *et al.* 2017, Nunes *et al.* 2017). Ésta técnica además permite el procesamiento de un alto número de muestras, siendo muy eficiente en programas de mejoramiento genético forestal, donde se requiere almacenar un alto número de genotipos en periodos cortos de tiempo.

El uso de los crioprotectores adecuados es el primer paso al momento de desarrollar protocolos de criopreservación. En el caso particular de *P. radiata* se ha ratificado la eficiencia del uso de sorbitol combinado con DMSO y se abre una puerta de entrada a otros metabolitos protectores como la prolina. Es necesario ahondar en su modo de acción y ajustar la concentración óptima de este aminoácido en la fase de criopreservación. También se observó que existen LCEs que son criotolerantes incluso en ausencia de DMSO. Estos resultados fueron contrarios con lo señalado por Mathur *et al.* (2007) en su estudio en *Pinus roxburghii*, donde señala que el uso de DMSO previo a la inmersión en LN es limitante para la recuperación del tejido

En cuanto a crecimiento y apariencia, el ET no presentó diferencias morfológicas visuales ni microscópicas una vez descongelado luego de la criopreservación. Se observó tasas activas de crecimiento celular y aspecto blanco translúcido y los CPEs mantuvieron sus estructuras características. Los daños observados tanto en células meristemáticas como células vacuoladas recuperaron su tasa de crecimiento no observándose diferencias una vez reactivada la multiplicación de sus células.

La recuperación de las líneas criopreservadas fue dentro de lo esperado de acuerdo con lo reportado para otras especies de coníferas (Hägman *et al.* 1998, Ford *et al.* 2000, Mathur *et al.* 2003, Latutrie y Aronen 2013). En esta variable se confirma un efecto importante de las características del genotipo utilizado (Norgaard *et al.* 1993, Hägman *et al.* 1998, Salaj *et al.* 2012).

Una de las interrogantes en la recuperación de tejido criopreservado es cuál de todas las variables involucradas es la limitante para un exitoso protocolo de criopreservación. El primer paso es trabajar con tejido fresco y vigoroso en la fase logarítmica de crecimiento (Schumacher *et al.* 2015, Varis *et al.* 2017). Lambardi *et al.* (2018) sugieren en su estudio con *Cupressus sempervirens*, que el daño celular se produce en la fase de enfriamiento lento, lo cual concuerda con estudios preliminares realizados por nuestro equipo de trabajo, donde se observó que tiempos cortos (menores a 60 min) y excesivamente largos (mayores a 24 horas) son perjudiciales para la recuperación de TE criopreservado.

Si bien la capacidad madurativa del tejido criopreservado fue afectada negativamente con todos los pretratamientos crioprotectores utilizados, se observó que uno de ellos no presentó diferencias significativas con el control, lo que nos indica que el efecto negativo del almacenamiento en nitrógeno líquido en la producción de Es cotiledonares puede ser minimizado.

Diversos autores en estudios de coníferas han señalado no haber observado efectos negativos significativos, a causa de la criopreservación, en la capacidad madurativa de sus LCEs (Karthä *et al.* 1988, Norgaard *et al.* 1993, Touchell *et al.* 2002, Vondrakova *et al.* 2010, Alvarez *et al.* 2012). Latutrie y Aronen (2013) señalaron que obtuvo una mejor respuesta en la generación de Se en tejido criopreservado, sin embargo, también señala que esto pudo deberse a que los protocolos de maduración utilizados fueron más eficientes que los utilizados cuando el material fue criopreservado. Por su parte Gupta *et al.* (1987) observaron una disminución en la capacidad madurativa de ET provenientes de líneas criopreservadas de *Picea abies* y *Loblolly pine*.

La producción de plantas embriogénicas es el objetivo final del uso de la embriogénesis somática en programas de establecimiento de plantaciones operacionales de coníferas, por lo que es esencial evaluar cómo se ve afectada la capacidad madurativa en las distintas fases de los protocolos desarrollados, ya que no se puede inferir un resultado exitoso sólo con conocer la tasa de recuperación del material criopreservado. Un buen ejemplo de esto es el resultado obtenido por Salaj *et al.* (2012) donde no se observó una correlación entre la tasa de recuperación post criopreservación y el número de Se producidos.

Finalmente, el efecto a largo plazo del uso de DMSO no está claro en este estudio. Se observó morfologías aberrantes en dos LCEs en los pretatamientos con las concentraciones más altas de este crioprotector. La aparición de este tipo de morfología puede deberse al efecto tóxico que tiene este crioprotector en la generación de morfologías aberrantes (DeVerno *et al.* 1999, Aronen *et al.* 1999). Los demás genotipos presentaron una morfología normal, una baja tasa de hiperhidricidad y buen desarrollo de sus concordante con lo observado por Latutrie y Aronen (2013) en *P. sylvestris*.

Las evaluaciones posteriores indican el tiempo transcurrido una vez que el tejido reactivó su crecimiento y comenzó su fase de multiplicación normal. Evidencia basada en la optimización de recuperación post almacenamiento en nitrógeno líquido requiere de un monitoreo de a lo menos 6 a 8 semanas post descongelación del tejido para poder determinar los factores e intervenciones que pudieran estar afectando la recuperación del tejido criopreservado (Benson y Harding 2012).

Lipavska y Kondradova (2004), señalan que los carbohidratos juegan un rol protector indispensable bajo condiciones de estrés. En este estudio se observó una disminución en el contenido de carbohidratos solubles totales a partir de la primera evaluación post criopreservación con relación a los valores iniciales observados en TE sin criopreservar. En general se observó el mismo comportamiento por genotipo para todos los pretratamientos crioprotectores para los cuales se recuperó el TE una vez descongelado.

En especies del género *Pinus* se ha reportado que la glucosa es el carbohidrato preferente en las demandas metabólicas de la especie (Treat *et al.* 1989). En un estudio en *Picea mariana* y *Picea*

abies se observó que, durante la proliferación de TE, los niveles endógenos de sacarosa permanecían constantes y hacia el final del ciclo de subcultivo se observaba una fluctuación en los contenidos de rafinosa (Iraqi y Tremblay 2001).

En el caso de los contenidos de proteínas totales todos los genotipos alcanzaron sus valores de basales a la semana 4 de reactivado su crecimiento. Si bien en este estudio se esperaba un aumento en el contenido de proteínas totales post criopreservación, esto no fue observado en los periodos de tiempo evaluados. Se presume que con el tiempo transcurrido entre la descongelación del TE y la primera evaluación post criopreservación el tejido fue capaz de recuperar sus valores basales. Martínez-Montero *et al.* 2002, en su estudio en TE de *Saccharum sp.*, identificaron un aumento en el contenido total de proteínas el segundo día luego de ser descongelado, observándose una disminución paulatina hasta recuperar sus valores basales al cuarto día de subcultivo, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este estudio.

La prolina participa en la síntesis de proteínas y regula muchas funciones importantes como el ajuste osmótico y la protección de proteínas durante condiciones de estrés (Kavi Kishor *et al.* 2015). Es por esto que se esperaba que los contenidos de prolina post criopreservación fueran mayores a los valores iniciales observados en los 4 genotipos analizados. Sin embargo, se observó para todos los genotipos que el contenido de prolina no tuvo mayores variaciones tanto en el periodo evaluado ni entre los pretratamientos crioprotectores utilizados.

Las densidades celulares inferiores utilizadas en este estudio disminuyeron significativamente el número de LCEs recuperadas con relación al tejido no criopreservado, mientras que en las densidades mayores no se observaron diferencias con el control. Esto indicaría que densidades celulares iniciales mayores, permite recuperar un mayor número de muestras cuando éstas requieren ser almacenadas en nitrógeno líquido. Marum *et al.* (2004) obtuvieron similares resultados en tejido embriogénico de *Pinus pinaster*, y señalaron que, si bien las densidades celulares altas son las mejores para una criopreservación exitosa, no lo son cuando lo que se quiere es iniciar suspensiones celulares para multiplicar tejido embriogénico. Anterior a esto Kobayashi *et al.* (1999) en su estudio en *Daucus carota* señalaron que densidades muy altas

podrían estar generando compuestos inhibidores que pudieran estar afectando el óptimo desarrollo de las células embriogénicas.

El efecto de los tratamientos de densidad celular utilizada en criopreservación en relación con la capacidad madurativa de LCEs criopreservadas no fue significativo, lo que concuerda con diversos autores que han señalado no haber observado efectos negativos significativos en sus LCEs, a causa de la criopreservación (Touchell *et al.* 2002, Vondrakova *et al.* 2010, Álvarez *et al.* 2012).

La presente investigación ha permitido generar evidencia que demuestra que existe una disminución en la capacidad madurativa del tejido embriogénico de *P. radiata*, producto del estrés que se genera al criopreservarlo. El mayor impacto se observa cuando se utiliza como pretratamiento crioprotector una mezcla de sorbitol y prolina en ausencia de DMSO, y la magnitud del efecto es dependiente de la línea celular utilizada. Sin embargo, no se observó un efecto asociado a la densidad celular inicial utilizada al momento de realizar la criopreservación. Como complemento se generó la primera evaluación de parámetros bioquímicos tales como carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina en tejido embriogénico de *P. radiata* criopreservado. Valores similares a los iniciales (tejido no criopreservado) indican que, a pesar del estrés generado por la congelación y descongelación, una vez recuperado el crecimiento del tejido y transcurridas cuatro semanas de evaluación, el metabolismo se normaliza.

6. CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Es factible criopreservar de manera exitosa tejido embriogénico de *P. radiata* y con esto asegurar la producción masiva de plantas de genotipos de alto valor utilizados en silvicultura clonal.
- ✓ Las observaciones microscópicas ratifican que el tejido mantiene su capacidad embriogénica a pesar de los daños mecánicos que sufren las células producto de la formación de hielo intracelular.

- ✓ El mejor pretratamiento utilizado fue el uso de 0,4 M de sorbitol con DMSO al 5% y suplementado con 0,09 M de L-prolina, ya que permitió la recuperación de crecimiento de un mayor número de muestras una vez descongeladas, y permitió obtener un mayor número de embriones cotiledonares.
- ✓ No se observa un efecto del pretratamiento crioprotector en los valores de carbohidratos solubles totales, proteínas totales y prolina, una vez que el tejido embriogénico ha reactivado su crecimiento post criopreservación.
- ✓ Existe una disminución en los carbohidratos solubles del tejido embriogénico en relación con el contenido observado antes de la criopreservación, el cual hasta la semana 4 de evaluación no logró ser normalizado.
- ✓ El contenido de proteínas totales en el tejido embriogénico de las líneas evaluadas no se ve alterado de gran manera.
- ✓ Los valores de prolina una vez que el tejido ha reactivado su crecimiento no tienen variaciones significativas para ninguno de los genotipos estudiados.
- ✓ La aplicación exógena de L-prolina como suplemento en pretratamientos crioprotectores junto a sorbitol y DMSO, no tiene un efecto en los contenidos de prolina del tejido embriogénico una vez que éste ha reactivado su crecimiento.
- ✓ El patrón de comportamiento de los parámetros bioquímicos estudiados es dependiente del genotipo y no de su criotolerancia ni del pretratamiento utilizado al momento de criopreservar su tejido embriogénico, ya que genotipos con similar criotolerancia a pretratamientos específicos, no presentaron el mismo patrón durante el periodo de tiempo evaluado.
- ✓ Las características morfológicas del tejido embriogénico a criopreservar son esenciales al momento de preservar cualquier tejido. Éste debe encontrarse friable y con una alta tasa de multiplicación. De no ser así esto afectará la recuperación del tejido una vez

descongelado.

- ✓ La densidad celular inicial utilizada al momento de criopreservar tejido embriogénico tiene un efecto significativo en la recuperación de éste una vez descongelado.
- ✓ Densidades iniciales bajas de tejido embriogénico al momento de criopreservar, tienen mayores posibilidades de resistir la criopreservación y recuperarse una vez descongelados.
- ✓ El genotipo utilizado tiene un alto componente en la recuperación de tejido criopreservado y en la capacidad madurativa de éste.
- ✓ La densidad celular inicial utilizada al momento de preparar las muestras de tejido embriogénico para almacenarlas en nitrógeno líquido no afecta de manera significativa su capacidad madurativa (número de embriones cotiledonares) una vez descongelado.
- ✓ Densidades celulares iniciales de 21 y 28% son las más adecuadas para obtener un mayor número de embriones cotiledonares en tejido embriogénico de *P. radiata*.
- ✓ Las respuestas evaluadas a la presencia de distintos crioprotectores y densidad celular inicial, fueron genotipo dependiente existiendo LCEs resistentes a la congelación independiente del tratamiento utilizado.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez J, Cortizo M, Ordas R. 2012. Cryopreservation of somatic embryogenic cultures of *Pinus pinaster*: effects on regrowth and embryo maturation. *CryoLetters* 33. 476-484.

Benson E. 2008. Cryopreservation theory. In: Reed B (ed) *Plant cryopreservation: a practical guide*. Springer, New York. pp 15-30.

Burrit D. 2012. Proline and the cryopreservation of plant tissue: Functions and practical applications. In: Katkov I (ed) Current frontiers in Cryopreservation. Intech, Croatia. pp 415-430.

Carneros E, Hernández I, Toribio M, Díaz-Sala C, Celestino C. 2017. 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. 2017: 1-9.

Cyr D. 1999. Cryopreservation of embryogenic cultures of conifers and its application to clonal forestry. In Jain S, Gupta P, Newton R (eds) Somatic embryogenesis of woody plants. Vol 4. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 239-262.

Dhindsa R, Monroy A, Sangwan V. 1998. Plant Cold Hardiness, Ed PH Li&THH Chen. Plenum Press, New York, pp 15-28.

Find, J, Norgaard J, Krogstrup P. 1998. Growth parameters, nutrient uptake and maturation capacity of two cell-lines of Norway spruce (*Picea abies*) in suspension culture. Journal of Plant Physiology 152: 510-517.

Ford C, Jones N, Van Staden J. 2000. Optimization of a working cryopreservation protocol for *Pinus patula* embryogenic tissue. In Vitro Cell Dev Biol Plant 36: 366-369.

Gale S, John A, Benson E. 2007. Cryopreservation of *Pice sitchensis* (sitka spruce) embryogenic suspensor masses. CryoLetters 28: 225-239.

García-Mendiguren O, Montalbán I, Goicoa T, Ugarte M, Moncaleán P. 2016. Environmental conditions at the initial stages of *Pinus radiata* somatic embryogenesis affect the production of somatic embryos. Tress 30: 949-958.

Guan Y, Li S, Fan X, Su Z. 2016. Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Front Plant Sci* 7: 1-12.

Gupta P, Durzan D, Finkle B. 1987. Somatic embryogenesis in embryogenic cell masses of *Picea abies* (Norway spruce) and *Pinus taeda* (Loblolly pine) after thawing from liquid nitrogen. *Can J Forest Res* 17: 1130-1134.

Häggman H, Ryyänen L, Aronen, T, Krajnakova J. 1998. Cryopreservation of embryogenic cultures of Scott pine. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 45-53.

Harding K. 2004. Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters* 25(1): 3-22.

Hargreaves C, Smith D. 1992. Cryopreservation of *Pinus radiata* embryogenic tissue. *Int Plant Propagators Soc Comb Proc* 42: 327-333.

Hargreaves C, Grace L, Holden D. 2002. Nurse culture for efficient recovery of cryopreserved *Pinus radiata* D. Don embryogenic cell lines. *Plant Cell Rep.* 21: 40-45.

Hazubska-Przybyl T, Bojarczuk K. 2016. Tree somatic embryogenesis in science and forestry. *Dendrobiology* 76: 105–116.

INFOR. 2017. El Sector Forestal Chileno 2017. Recuperado de: http://wef.infor.cl/publicaciones/sector_forestal/2017/SectorForestal_2017.pdf

Kartha K, Fowke L, Leung N, Caswell K, Hakman I. 1988. Induction of somatic embryos and plantlets from cryopreserved cell cultures of white spruce (*Picea glauca*). *J Plant Physiol* 132: 529-539.

Kristensen M, Find J, Floto F, Moller J, Norgaard J, Krogstrup P. 1994. The origin and development of somatic embryos following cryopreservation of an embryogenic suspension culture of *Picea sitchensis*. *Protoplasma* 182: 65-70.

Lainé E, Bade P, David A. 1992. Recovery of plants from cryopreserved embryogenic cell-suspensions of *Pinus caribaea*. *Plant Cell Reports* 11(5-6): 295-298.

Lazo-Javalera M, Tiznado-Hernández M, Vargas-Arispuro I, Valenzuela-Soto E, Rocha-Granados M, Martínez-Montero M, Rivera-Domínguez M. 2015. Data on antioxidant activity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) following cryopreservation by vitrification. *Data in Brief* 5: 549-555.

Martínez-Montero M, Mora N, Quiñones J, González-Arno M, Engelmann F, Lorenzo J. 2002. Effect of cryopreservation on the structural and functional integrity of cell membranes of sugarcane (*Saccharum sp.*) embryogenic calluses. *CryoLetters* 23: 237-244.

Martínez-Montero M, Harding K. 2015. Cryobionomics: Evaluating the Concept in Plant Cryopreservation In: Barh D, Sarwar M (eds) *PlantOmics*, Springer India, pp 655-682.

Marum L, Estevo C, Oliveira M, Amancio S, Rodríguez L, Miguel C. 2004. Recovery of cryopreserved embryogenic cultures of maritime pine-effect of cryoprotectant and suspension density. *CryoLetters* 25: 363-374.

Mathur G, Alkutar V, Nadgauda R. 2003. Cryopreservation of embryogenic culture of *Pinus roxburghii*. *Biol. Plant.* 46: 205-210.

Nörsgaard J, Duran V, Johnsen O, Krogstrup P, Baldursson S, Von Arnold S. 1993. Variation in cryotolerance of embryogenic *Picea abies* cell lines and the association to genetic, morphological, and physiological factors. *Can J For Res* 23:2560-2567.

Ozudogru E, Lambardi M. 2016. Cryotechniques for the long-term conservation of embryogenic cultures from woody plants. *Methods in Molecular Biology* 1359: 537-550.

Panis B, Lambardi M, 2005. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). In *The Role of Biotechnology*, Villa Guarino, Turin, Italy. pp. 43-54.

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

Sakai A. 2000. Development of cryopreservation techniques. In: Engelmann F, Takagi H (eds) In: Japan International Research Centre for Agricultural Sciences. Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute, Cryopreservation of tropical plant germplasm. Rome, pp 1-7.

Salaj T, Panis B, Swennen R, Salaj J. 2007. Cryopreservation of embryogenic tissues of *Pinus nigra* Arn. by a slow freezing method. *CryoLetters* 28: 69-76.

Salaj T, Matusikova I, Panis B, Swennen R, Salaj J. 2010. Recovery and characterization of hybrid firs (*Abies alba* x *A. cephalonica*, *Abies alba* x *A. numidica*) embryogenic tissues after cryopreservation. *CryoLetters* 31: 206- 217.

Salaj T, Matusikova I, Fraterova L, Pirsellova B, Salaj J. 2011. Regrowth of embryogenic tissues of *Pinus nigra* following cryopreservation. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 106: 55-61.

Salaj, T, Matusikova I, Swennen R, Panis B, Salaj J. 2012. Long-term maintenance of *Pinus nigra* embryogenic cultures through cryopreservation. *Acta Physiolog Plantarum* 34(1): 227-233.

Salaj T, Matusova R, Swennen R, Panis B, Salaj J. 2016. Tissue regeneration of *Abies* embryogenic cell lines after 1 year storage in liquid nitrogen. *Biologia* 71 (1): 93-99.

Toivonen P, Kartha K. 1989. Cryopreservation of cotyledons of nongerminated white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss) embryos and subsequent plant regeneration. *Journal of Plant Physiology* 134(6): 766-768.

Von Arnold S, Larsson E, Panagiotis N, Moschou T, Uddenberg D, Bozhkov P. 2016. Norway spruce as a model for studying regulation of somatic embryo development in conifers. In: Park Y, Bonga J, Moon H. (eds) *Vegetative Propagation of Forest Trees*, Seoul, Korea. pp 351-372.

Walter C, Find J, Grace L. 2005. Somatic embryogenesis and genetic transformation in *Pinus radiata*. In: Jain S, Gupta P (eds) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Springer, The Netherlands, pp 11-24.

Withers L, King P. 1980. A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. *CryoLetters* 1: 213-220.

