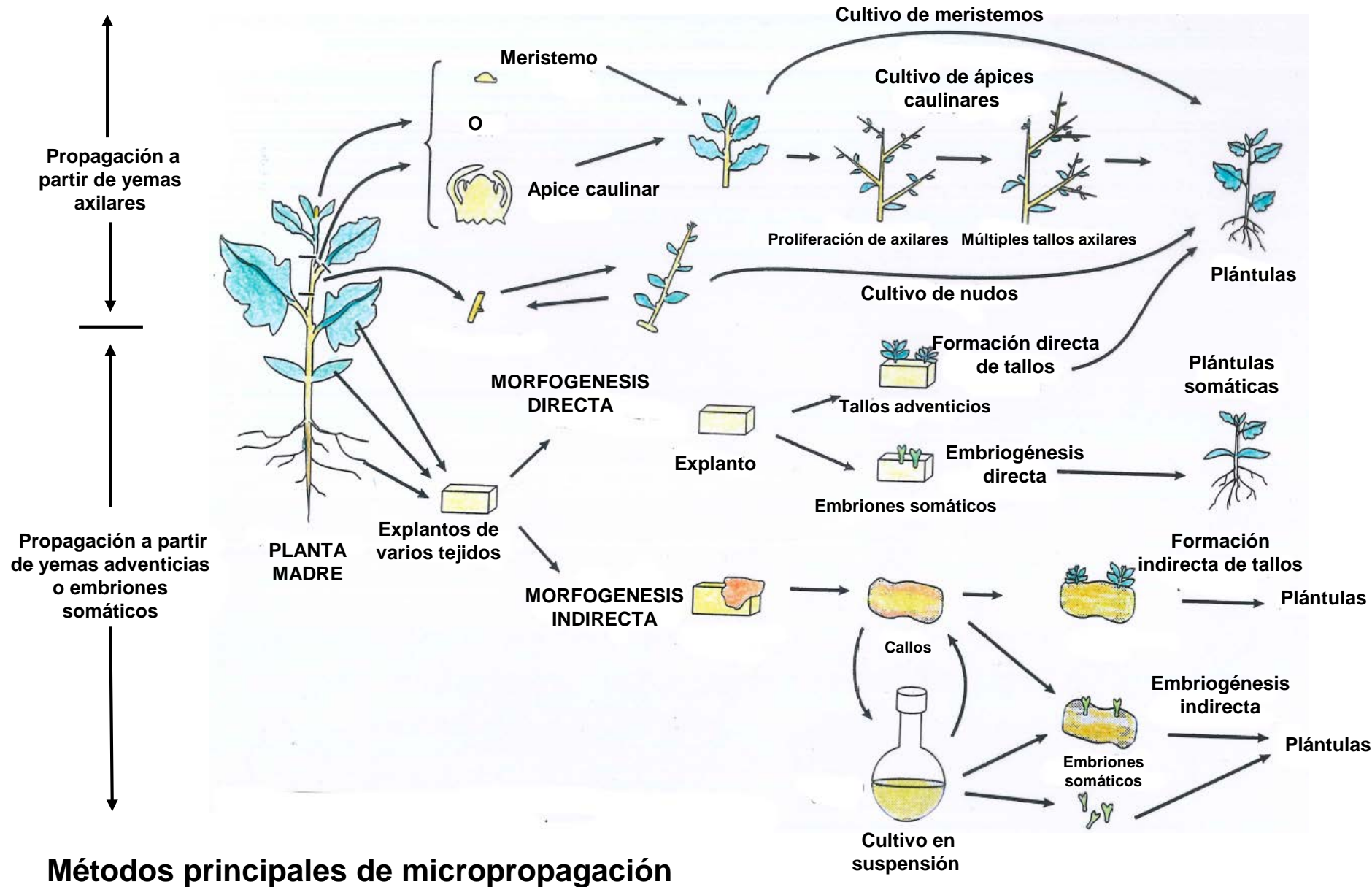




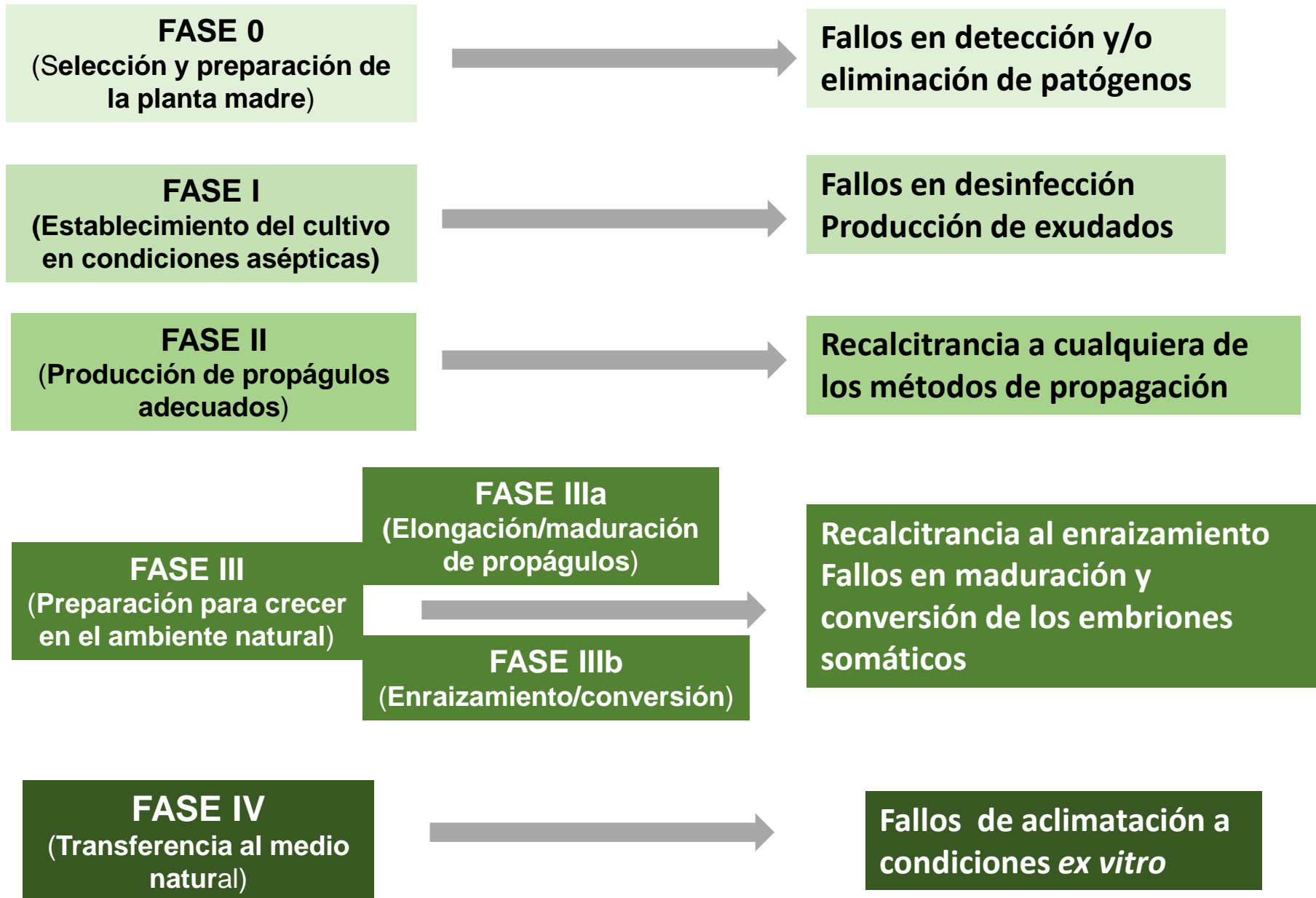
Retos actuales en micropropagación

Juan Segura
Departamento de Biología Vegetal
Universidad de Valencia



Métodos principales de micropropagación

FASES DE LA MICROPROPAGACION Y PROBLEMAS



Retos en FASE 0

- **Mejorar las cualidades fisiológicas y fitosanitarias de la planta madre**
- **Investigar el Fitomicrobioma de las especies que se desea micropropagar**

Fitomicrobioma = microorganismos que colonizan las plantas

Holobionte (meta- o super-organismo): Planta hospedadora y su comunidad microbiana

Hologenoma = genoma del holobionte. Se identifica mediante **análisis metagenómicos**

- El éxito del establecimiento in vitro depende de la eliminación de microorganismos patógenos. Dado que en los explantos quedan bacterias no detectadas, **el termino cultivo axénico** (desprovisto de cualquier tipo de contaminación) **debe evitarse y ser sustituido por aséptico** (libre de contaminación detectable).
- Las bacterias patógenas y las que se multiplican en el medio de cultivo deben, necesariamente, eliminarse. Sin embargo, **debe prestarse atención a todas aquellas bacterias que sean beneficiosas en la micropropagación**. Bacterias y plantas interactúan entre si: las bacterias pueden modular el balance hormonal, modificar la nutrición y ayudar a tolerar estreses; por su parte, las plantas influyen sobre el número, diversidad y actividad de los microorganismos en la rizosfera y en los que habitan en el interior de las célula.
- Existen datos que demuestran que **la inoculación de lo cultivos con bacterias beneficiosas puede mejorar la organogénesis o embriogénesis somática, aunque los mayores beneficios se obtienen en la aclimatación de las microplantas**
- La bacterización de las microestaquillas o de las microplantas durante el cultivo in vitro es fácil y permite un mejor control del proceso de colonización durante el enraizamiento en medio solido o liquido o durante la transferencia al invernadero en un sustrato estéril

Género *Burkholderia*; efectos de *B. phytofirmans* PsJN

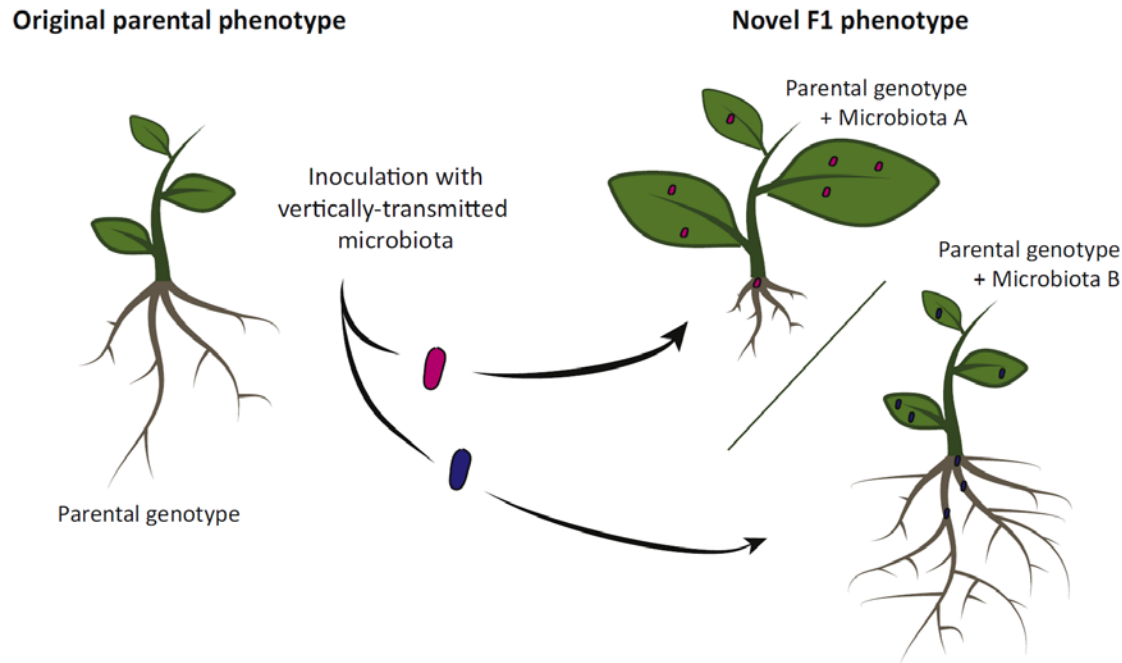
El género incluye mas de 60 especies, de las que 30 viven asociadas con plantas (muchas son endosimbiontes) y pueden ser beneficiosas por ser fijadoras de N₂, facilitar disponibilidad de Fe y P, producir reguladores de crecimiento o proteger contra patógenos. *B. phytofirmans* PsJN coloniza inicialmente las raíces y después pasa a la parte aérea.

| Taxon/strain | Source | Subject of inoculation | Type of action | The impact mechanism |
|--|---------------------|--|--|---|
| <i>Burkholderia phytofirmans</i> /PsJN™ (earlier <i>Pseudomonas</i> sp. /PsJN) | From roots of onion | On nodal explants of potato | Stimulated microshoots growth; increased roots number, dry weight of shoots and roots, stimulated cuticular hairs on leaves, secondary roots and lignification | Production of plant hormones |
| As above | As above | On nodal segments of <i>Vitis vinifera</i> | Increased shoot length, number of nodes, dry weight of shoots and roots and overall biomass microplants, protected of shoot explants against <i>Botritis cinerea</i> | Inhibition of <i>Botritis cinerea</i> on PDA medium |
| As above | As above | On weaned seedling roots of <i>Panicum virgatum</i> | Increased shoot and root growth, of Alamo cv | NA |
| As above | As above | On the base of microshoots in rooting medium of <i>Helianthus</i> sp | Increased number of rooted shoots, number and length of roots and acclimatization at non-optimal temperature | NA |
| As above | As above | On rooted shoots of potato | Increased fresh weight of microplants | Change in amount of IAA, trans-zeatin and GA ₃ |
| <i>Burkholderia</i> spp. IF25 | From vineyard soil | On bases of microcuttings | Fastened rooting, increased roots number | Modulation of auxin biosynthesis |

Datos tomados de la Tabla 1 de: Orlikowska et al (2017) *Bacteria in the plant tissue culture environment. Plant Cell Tissue Organ Culture* 128: 487-508

Mas información: Edwin B. Herman (Ed) *Microbial Organisms in Plant Tissue Cultures: 2012-2017. Agritech Publications. P.O. Box 255 , Shrub Oak, NY 10588 (<http://AgritechPublications.com>);); E-mail: Agritech@AgritechPublications.Com*

El holobionte como sujeto de mejora: Se propone la obtención de nuevos fenotipos modificando conjuntamente el genoma de la planta y de su microbioma⁽¹⁾. El concepto parece factible debido a una nueva tecnología que posibilita la transmisión de las bacterias a la nueva generación⁽²⁾



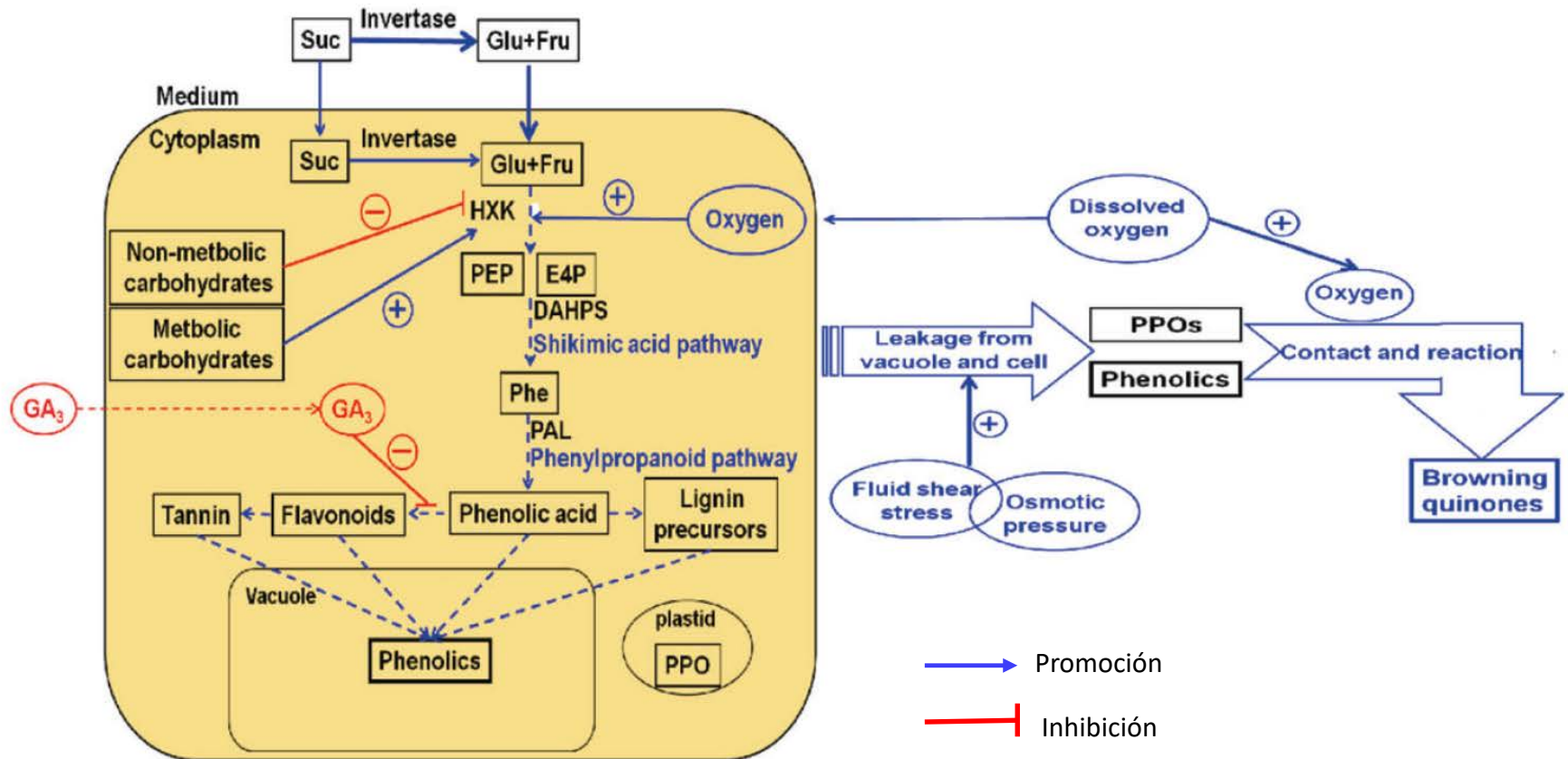
Uso conceptual del microbioma transmitido verticalmente como base para la mejora a nivel del holobionte. El genotipo parental original puede inocularse con bacterias que modifican varios caracteres. Gracias a la tecnología desarrollada por Mitter et al (2), que posibilita la transmisión de la bacteria a la nueva generación, mediante la inoculación de las flores con las bacterias, el fenotipo deseado puede obtenerse combinando los caracteres del hospedador y de las bacterias, que forman una unidad heredable.

(1) Wei y Jousset (2017) Plant Breeding Goes Microbial. Trends in Plant Science 22: 555-558

(2) Mitter et al. (2017) A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. Front. Microbiol. 8, 11

Retos en FASE I: Control del “browning”

En cultivos celulares de *Taxus chinensis* y *Glycyrrhiza inflata* el “browning” esta causado por una reacción enzimática; además, la biosíntesis de fenoles, regulada por azúcares, juega un papel decisivo en el proceso. Los compuestos más abundantes en el medio son flavonoides derivados de la ruta de los fenilpropanoides; los sustratos principales de la reacción del “browning” fueron miricetina y quercetina. **La inhibición de la síntesis de flavonoides con GA₃ puede impedir el “browning” del medio de cultivo.**

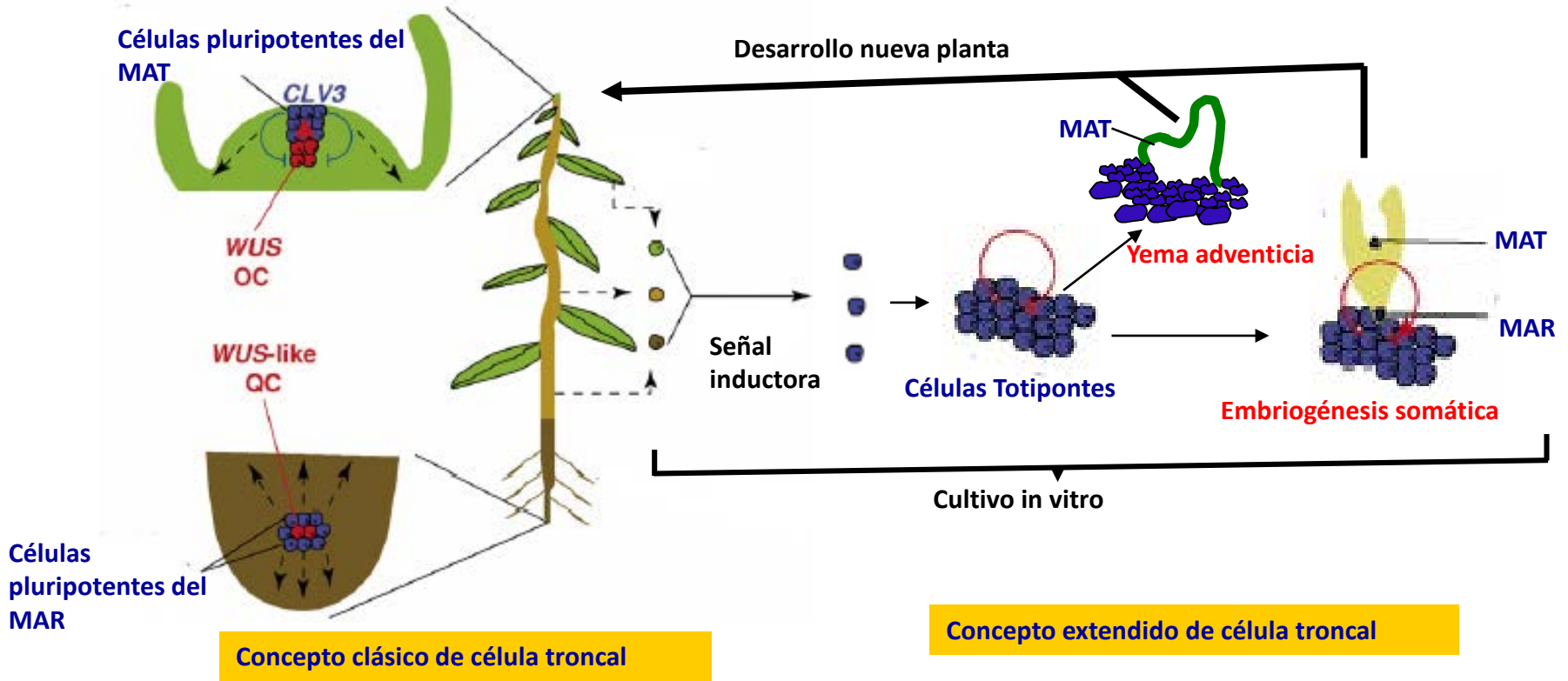


DAHPS, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintasa; **E4P**, eritrosa 4P; **Fru**, fructosa; **Glu**, glucosa; **HXK**, hexoquinasa; **PEP**, fosfoenolpiruvato; **Phe**, fenilalanina; **PPOs**, polifenol oxidasas; **Suc**, sacarosa.

Retos en FASES II-III y IV: Mayor conocimiento de las bases moleculares de la regeneración

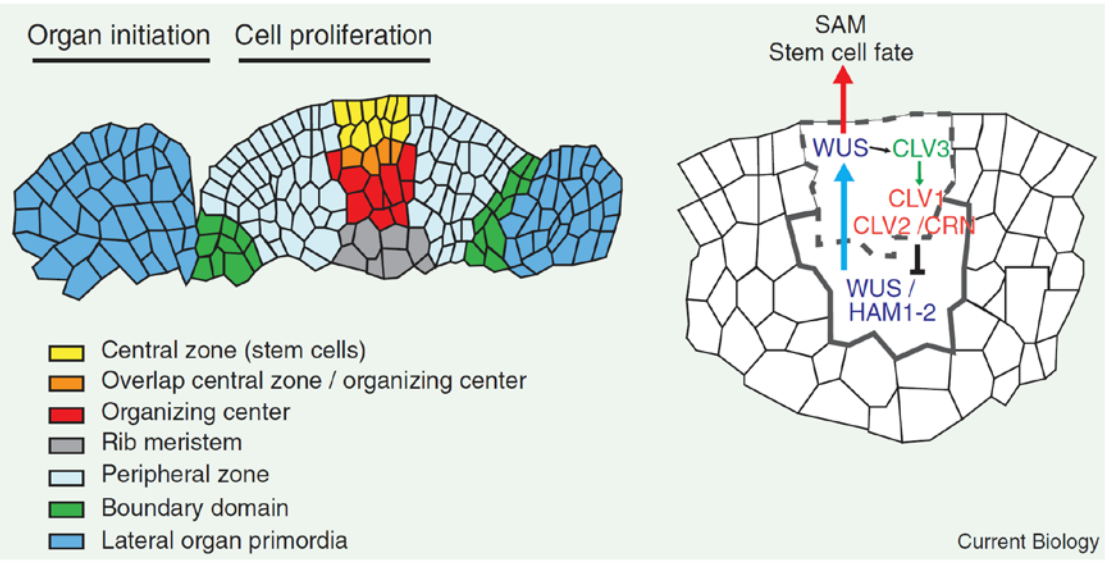
Manipulación in vitro de plantas: Desde tratar y rezar hasta clonar y jugar^(*)

^(*)Idea original de *Gan y Amasino (1996) Cytokinins in plant senescence: From spray and pray to clone and play . BioEssays 18: 557-565*



Concepto “clásico” y “extendido” de célula troncal en las plantas. El cuerpo de la planta es el producto de la actividad de las células “Troncales” de los meristemos apicales. Son **células pluripotentes** ubicadas en “nichos” que reciben señales intercelulares para su mantenimiento como células troncales. En el MAT, las células troncales (en azul) están situadas por encima del centro organizador (OC, en rojo) que expresa el gen *WUS* y que está rodeado de células en diferenciación y diferenciadas (en verde). El bucle *CLV/WUS* (líneas azules) se encarga de mantener las células troncales. En el MAR, las células troncales (azul) son mantenidas por señales semejantes a *WUS* que emanan del centro quiescente (en rojo). Las flechas discontinuas negras indican el gradiente de diferenciación. **Las células somáticas de los distintos órganos pueden ser inducidas in vitro por diferentes señales para formar células troncales capaces de proliferar y dar lugar a un embrión (o a un meristemo de tallo o raíz) que, originará una planta.** Estas células son, por lo tanto, totipotentes.

Organización y mantenimiento de los meristemas apicales de tallo y raíz

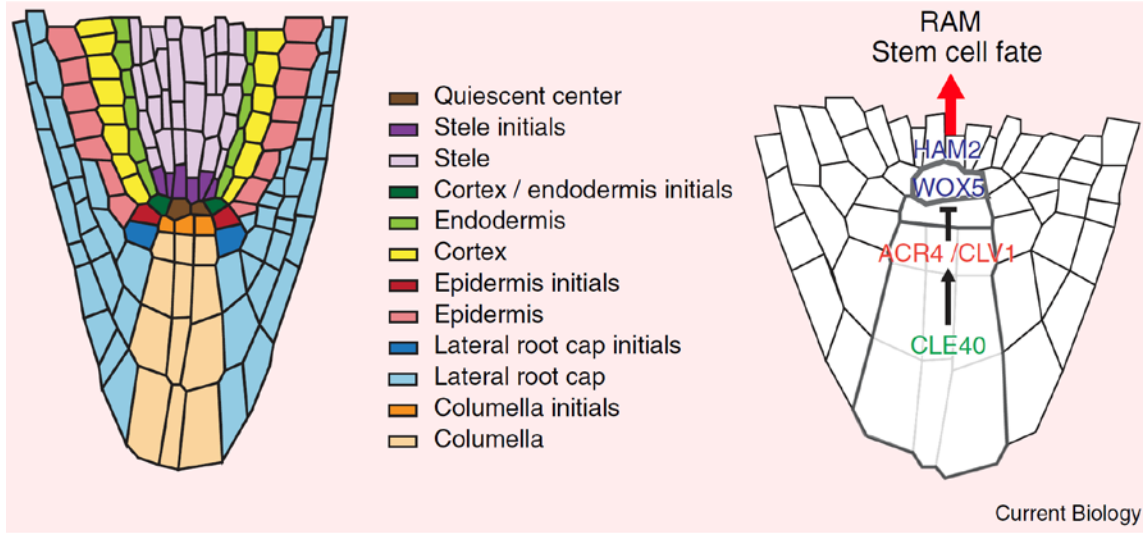


Meristemo apical del tallo (SAM)

Izquierda: Dominios funcionales del meristemo

Derecha: Bucle CLV/WUS (CLAVATA/WUSCHEL) responsable del mantenimiento y actividad del SAM.

El factor de transcripción WUS, producido en el Centro Organizador es necesario y suficiente para el mantenimiento de las células troncales.



Meristemo apical de la raíz (RAM).

Izquierda: Se muestra el centro quiescente (QC) y las células iniciales (troncales) que originan los distintos tipos celulares de la raíz primaria.

Derecha: El bucle CLE40/ACR4, participa en el mantenimiento y actividad del RAM.

El factor de transcripción WOX5 (WUS-RELATED HOMEODOMAIN 5), sintetizado en el QC, mantiene las células troncales y es reprimido por el bucle CLE40/ACR4. A diferencia de CLV3, producido en las células troncales del SAM, el péptido CLE40 procede de células diferenciadas (Columela)

La proliferación de las células troncales del MAT también es regulada por señales procedentes de los primordios foliares⁽¹⁾

¹Je et al. (2016) Signaling from maize organ primordia via FASCIATED EAR3 regulates stem cell proliferation and yield traits. *Nature Genetics* (2016) 48: 785-791

La señal es un oligopéptido de la familia CLE denominado **FCP1** (FON2-LIKE CLE PROTEIN 1). El receptor, la proteína quinasa **FEA3** (FASCIATED EAR 3) se sitúa en la parte basal de la zona central del meristemo

El Bucle FCP1/FEA3 coexiste con el bucle CLV/WUS

Bucle CLV/WUS: Las células troncales expresan un oligopéptido (flecha roja), semejante a CLV3 de arabidopsis, que se une a un complejo receptor situado en el centro organizador (OC), semejante al complejo CLV1/CLV2 de arabidopsis, e inicia una ruta de señalización que reprime la transcripción del gen *WUS*. El producto génico del gen *WUS*, es un factor de transcripción móvil (flecha verde) que emigra a la CZ y activa la proliferación de las células troncales.

Señalización del oligopéptido ZmFCP1: Este oligopéptido, sintetizado en las células de los primordios foliares (P0), que aun están en la zona periférica (PZ) del MAT o en los primordios foliares mas desarrollados (P1) emigra hasta la parte basal del OC, donde se une al receptor FEA3 e inicia una ruta de señalización que reprime la transcripción del gen *WUS* (reprime, por tanto la proliferación de células troncales).

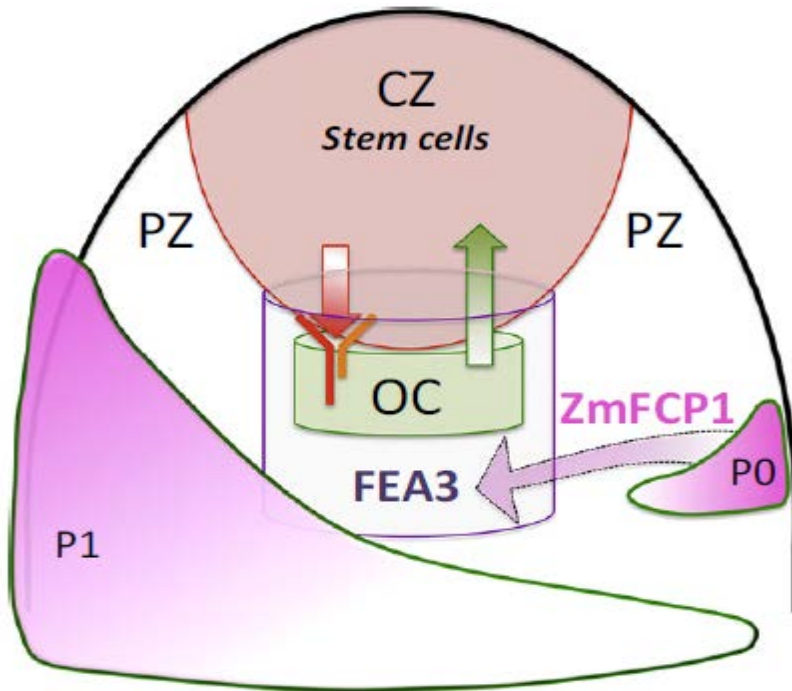
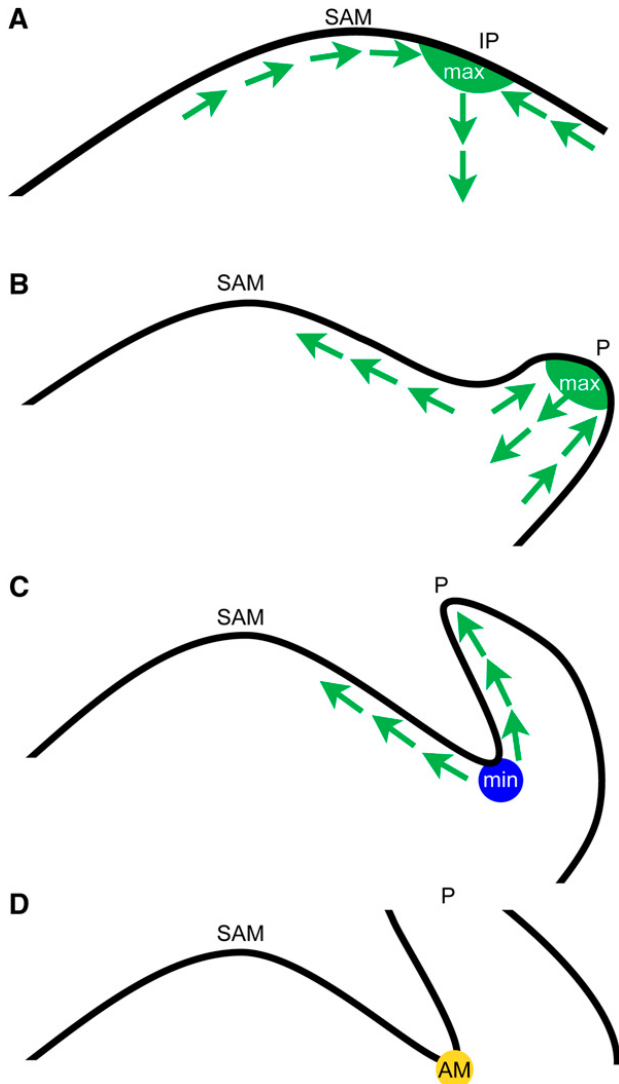


Figura procedente de: Nardmann et al (2016) Stem cell fate versus differentiation: the missing link. *Trends in Plant Science* 21: 725-727, 2016

La formación de los meristemos axilares requiere mínimos localizados de auxina y la acumulación subsiguiente de citoquininas

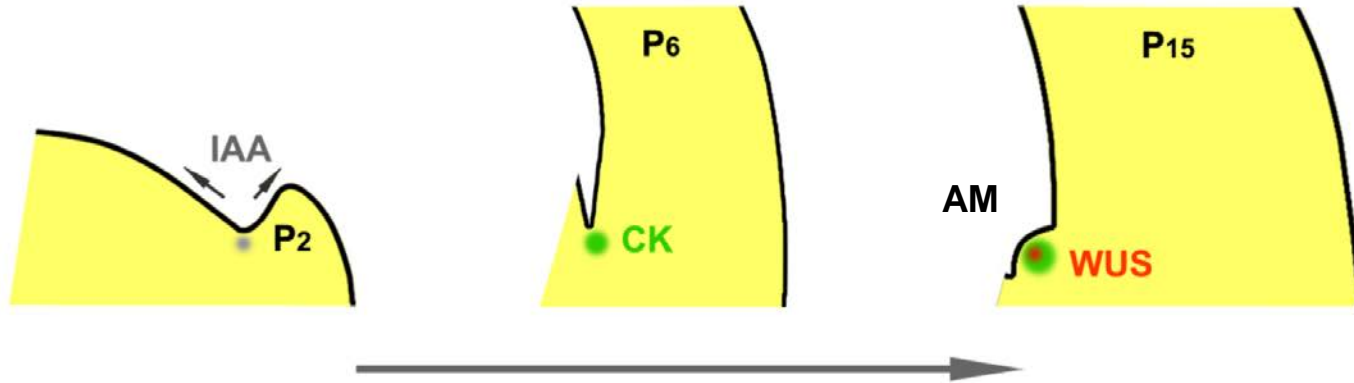
Formación de mínimos de auxina e iniciación de los meristemos axilares



- **(A)** La localización convergente de los transportadores PIN1 conduce a un máximo de auxina (max, en verde) donde se formará un nuevo primordio foliar (IP).
- **(B)** Una vez que el nuevo primordio inicia su crecimiento, PIN1 se localizará hacia el ápice del primordio foliar (P) y el meristemo apical del tallo (SAM), generándose gradientes auxínicos.
- **(C)** Después de la elongación del primordio foliar, la auxina es transportada fuera de la región axilar, formándose un mínimo de auxina (min, círculo azul) en la axila de la hoja. Ese mínimo de auxina induce la acumulación transitoria de citoquininas en la misma región (**ver diapositiva siguiente**)
- **(D)** La disminución de auxina y la acumulación de citoquininas favorece la formación del meristemo axilar (AM, círculo amarillo; **ver diapositiva siguiente**). Las flechas indican flujo de auxina mediado por PIN1.

Wang et al. (2014) Auxin depletion from the leaf axil conditions competence for axillary meristem formation in Arabidopsis and tomato. *Plant Cell* 26: 2068–20

La formación de los meristemas axilares requiere la expresión del gen *WUS* inducida por citoquininas



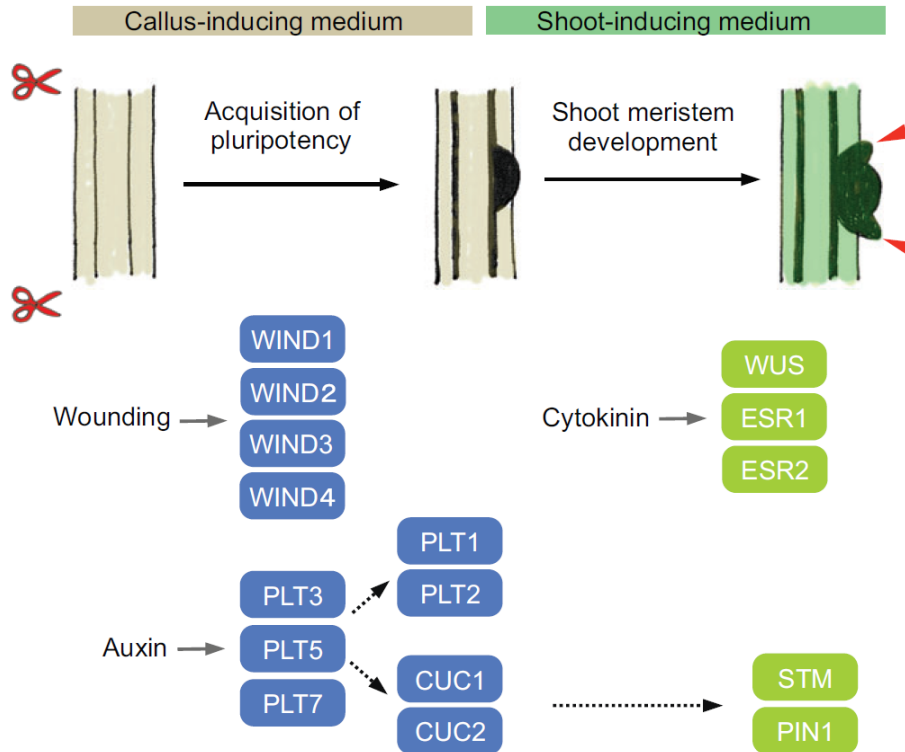
Coincidiendo con el mínimo de auxina (mancha gris) en la axila del primordio foliar, se produce una acumulación de CKs (mancha verde), que activa la formación del meristemo axilar (AM)¹. Para que esto suceda las CKs inducen la expresión del gen *WUS* (mancha roja) que activa el nicho de células troncales y completa la iniciación del AM²

La transcripción de *WUS* es activada por reguladores de respuesta de tipo B (ARR-B). La expresión de *WUS* mediada por CKs se correlaciona con un incremento en marcadores de acetilación y metilación de histonas asociados con la activación de la transcripción²; por lo tanto, la expresión de *WUS* requiere un ambiente epigenético permisivo para restringirla a tejidos exclusivamente meristemáticos.

¹Wang et al. (2014). The stem cell niche in leaf axils is established by auxin and cytokinin in Arabidopsis. *Plant Cell* 26: 2055–2067.

²Wang et al. (2017) Cytokinin signaling activates *WUSCHEL* expression during axillary meristem initiation. *Plant Cell* 29: 1373–1387

Bases moleculares de la neoformación de tallos

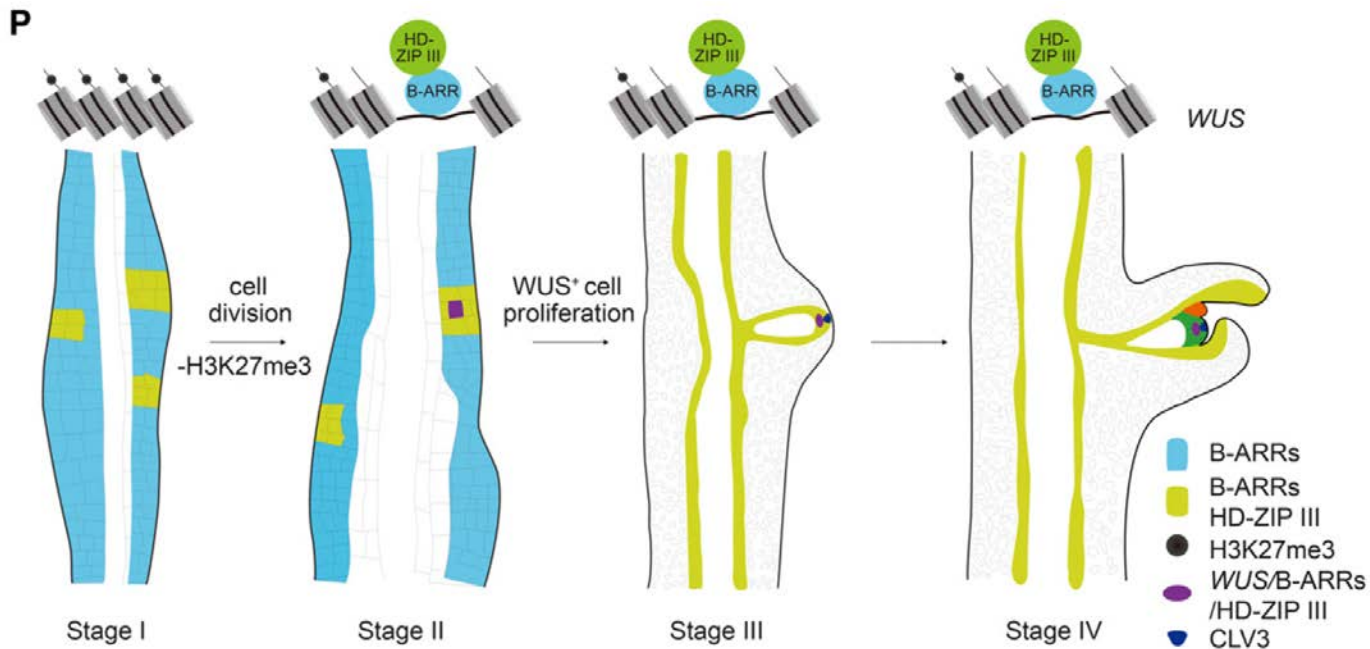


Las flechas negras continuas indican regulación transcripcional directa, demostrada por evidencias moleculares y las discontinuas regulación transcripcional directa o indirecta., inferida a partir de evidencias genéticas

Las heridas inducen la expresión de los factores transcripcionales WIND1-4 (WOUND_INDUCED DEDIFFERENTIATION 1-4), para promover la adquisición de pluripotencia en los sitios de corte. El cultivo de los explantos en medio inductor de callo (CIM), rico en auxina, activa la expresión de los factores de transcripción PLT3, PLT5 y PLT7 (PLETHORA 3,5,7), que subsiguientemente promueven la adquisición de pluripotencia a través de la inducción de PLT1, PLT2, CUC1 y CUC2 (CUPSHAPED COTYLEDON 1,2). Una vez que los explantos son transferidos al medio inductor de tallos (SIM), rico en citoquininas, se produce la inducción de los genes *WUS*, *ESR1* y *ESR2* (*ENHANCER OF SHOOT REGENERATION* 1, 2), que especifican las células que formarán tallos. La expresión de *CUC2* queda confinada a los promeristemos, en los que el factor de transcripción *STM* (*SOOT MERISTEMLESS*) y el transportador de eflujo de auxina *PIN1* regularán el patrón y la formación de los meristemos (cabezas de flecha rojas).

Las citoquininas, a través de los reguladores de respuesta de tipo B inducen la expresión de WUS , requisito fundamental para la regeneración de tallos

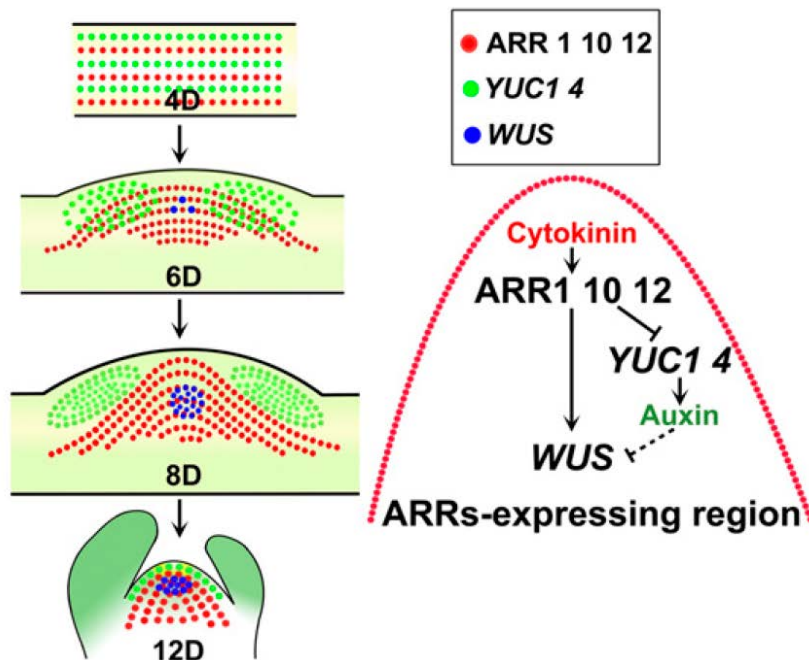
Las células WUS⁺ marcan la región progenitora de los tallos durante el proceso de regeneración in vitro. La primera acción de las citoquininas es inactivar la marca epigenética represora H3K27me3 en el locus WUS. Seguidamente, Los reguladores de respuesta de tipo B ARR1, ARR2, ARR10, y ARR12, activan espacialmente la expresión de WUS uniéndose a factores de transcripción HD-ZIP III silenciados por microRNA165/6



Mecanismo en dos pasos para la regeneración de tallos inducida por citoquininas. Los distintos colores indican los patrones de expresión de *ARRs* de tipo B, *CLV3*, *WUS* y factores de transcripción *HD-ZIP III*

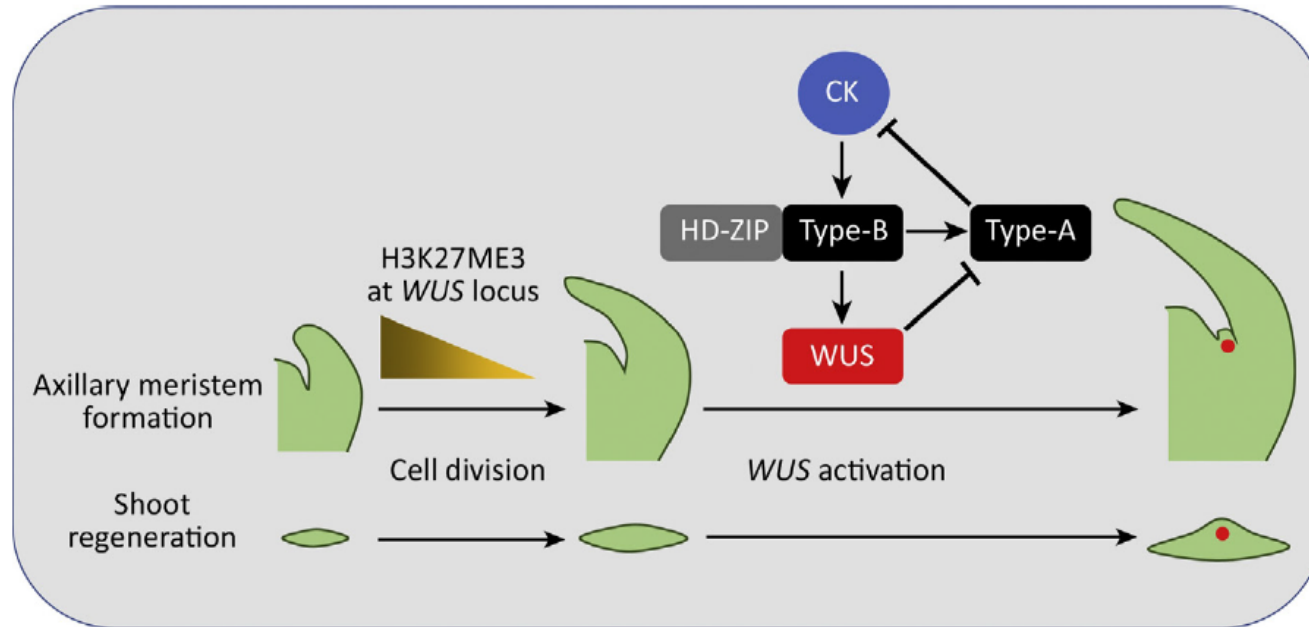
Además de activar la expresión de *WUS*, las citoquininas, a través de los reguladores de respuesta de tipo B reprimen la síntesis de auxinas en la zona donde se inicia la regeneración de tallos

Los reguladores de respuesta de tipo B (ARRs-B), activan la transcripción del gen *WUS*. En paralelo, los ARRs-B inhiben la acumulación de auxina reprimiendo los genes que codifican las enzimas de biosíntesis de auxina *YUCCAs*. Las dos rutas son esenciales para la regeneración de novo del nicho de células troncales del tallo



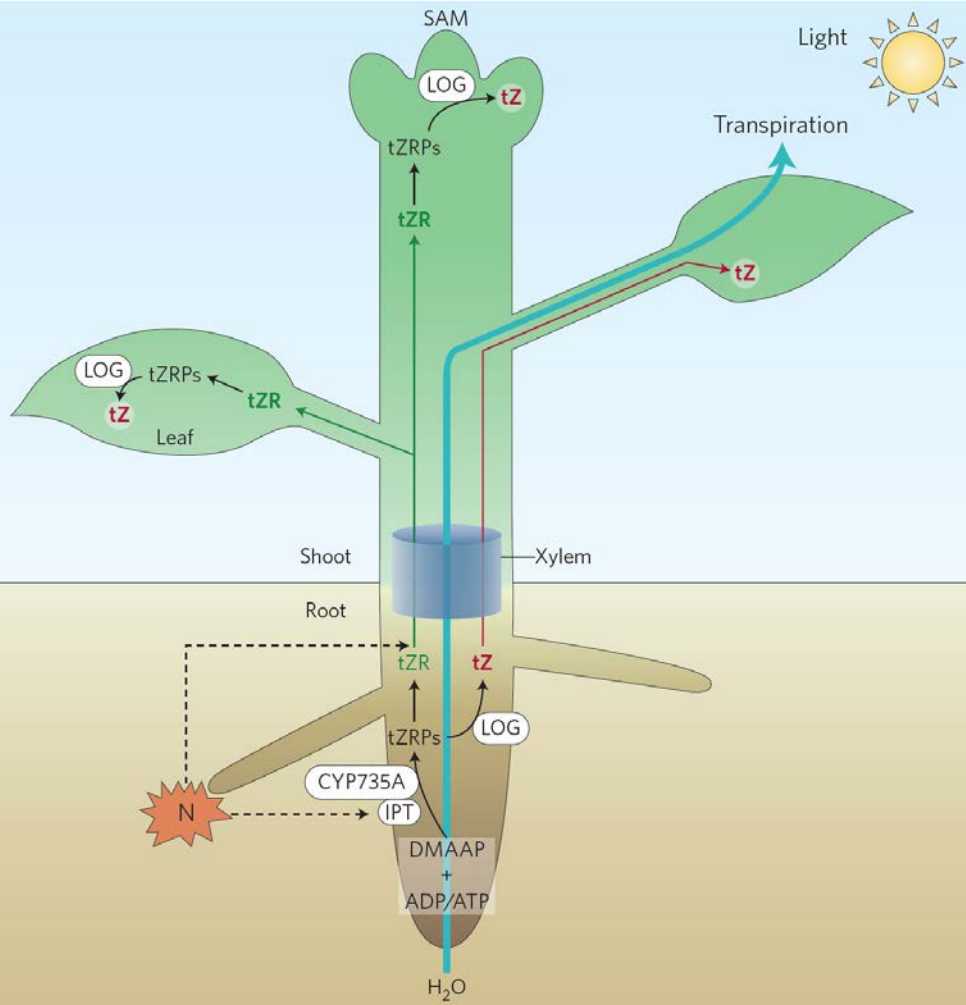
Inicialmente (4días) se observa expresión de *ARRs-B* y *YUCs* en todo el explanto. Después de 6 días en el medio de inducción de tallos, la expresión de *ARR1*, *ARR10*, y *ARR12* se restringió a zonas en las que las señales *YUC* estaban reducidas. La transcripción de *WUS* se inició en unas pocas células. Después de 8 días, se redujo más la señal *YUC* e incrementó la de *WUS*. A los 12 días, las señales *ARR1*, *ARR10*, y *ARR12* se enriquecieron en la región central del meristemo, donde *WUS* marca el nicho de células troncales y las señales *YUC* son indetectables.

Tanto en la formación de meristemos axilares como en la regeneración de tallos, las citoquininas activan el gen *WUS* a través de los reguladores de respuesta de tipo B (B-ARRs)



La reducción en la marca epigenética represora **H3K27me3** (trimetilación de la lisina 27 en la histona H3) en el locus *WUS* es un pre-requisito para que se active la expresión, dependiente de CK, del gen *WUS*, tanto en la formación de meristemos axilares como en la regeneración de tallos. El dominio de expresión de *WUS* se muestra en rojo. CK, citoquinina; Type-A, Reguladores de Respuesta de Arabidopsis (ARR) de tipo A; Type-B, Reguladores de Respuesta de Arabidopsis (ARR) de tipo B; HD-ZIP, factores de transcripción HD-ZIPIII.

El tipo de citoquinina exportado por la raíz ejerce efectos diferenciales sobre el desarrollo de los tallos



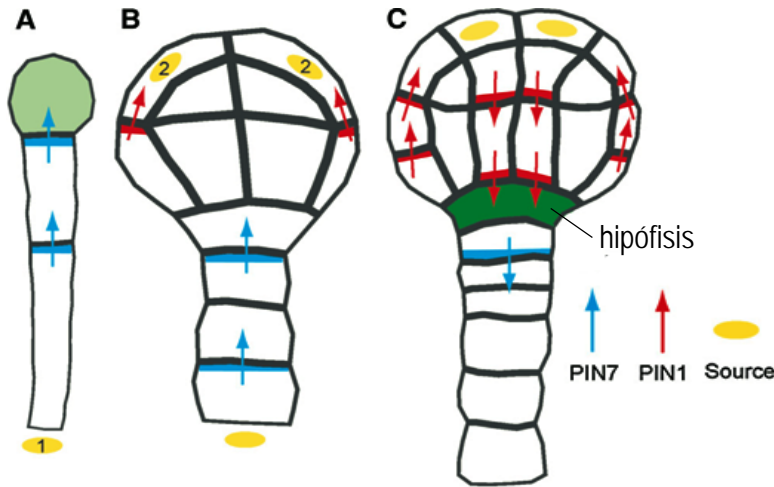
La trans-Zeatina (tZ), en rojo, y su precursor (ribósido) inactivo tZR (en verde), sintetizado a partir de dimetilalil difosfato (DMAAP) y ADP o ATP, son transportados a la parte aérea, vía xilema, donde regulan distintos procesos del desarrollo. La tZ procedente de la raíz solo controla el tamaño de la hoja. Sin embargo, el tZR procedente de la raíz controla tanto el desarrollo de la hoja como la actividad del meristemo apical del tallo (SAM) una vez convertido, localmente, en tZ por la enzima LOG (LONELY GUY). Considerando que la disponibilidad de nitrógeno (N) y luz (modulando la transpiración foliar) altera las cantidades de tZR y tZ (y posiblemente su proporción) en el xilema, este sistema doble de comunicación a larga distancia, adapta el crecimiento del tallo a los cambios ambientales. Los óvalos en blanco las reacciones enzimáticas. tZRPs, tZ-ribotido 5'-fosfatos

Davière y Achard (2017) *Cytokinins on the move. Nature Plants* 3:17116

Osugi et al. (2017) *Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in Arabidopsis shoots. Nature Plants* 3: 17112

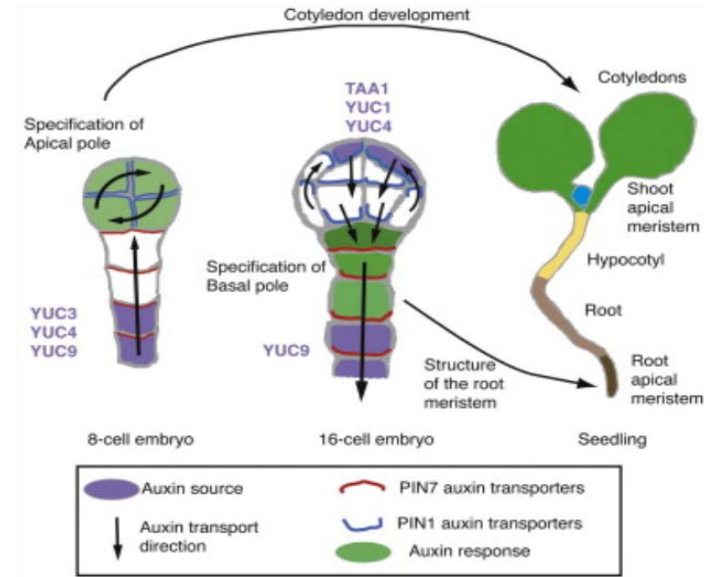
Bases moleculares de la Embriogénesis somática

En muchas especies se induce embriogénesis somática cuando los explantos se cultivan en medio con auxina y, después, se transfieren a medio libre de auxina. **El evento fisiológico clave cuando el explanto se transfiere a un medio sin auxina es el establecimiento de gradientes auxínicos.** Este hecho inicia un programa similar al de la embriogénesis cigótica (establecimiento del eje apical basal, que determina la formación del embrión)



Generación de las polaridades celulares emergentes e iniciación secuencial del eje apical-basal, mediado por la auxina. re la auxina y la localización intracelular de los transportadores PIN.

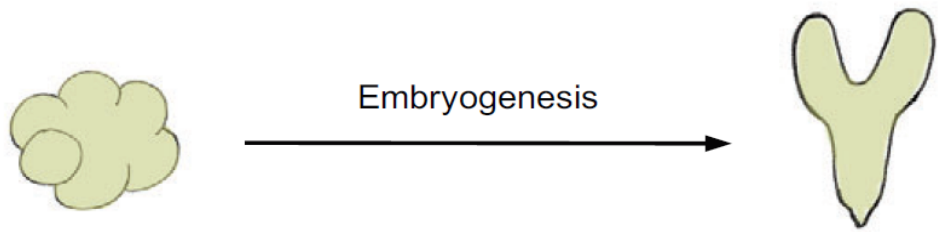
(A) El embrión de una célula recibe auxina de los tejidos maternos (1) a través de PIN7 (flechas azules). La auxina se acumula, en el futuro proembrión (mancha verde). (B) El embrión de 16 células despliega, inicialmente, la polaridad de PIN1 hacia el lado apical de las células protodérmicas (flechas rojas), lo que determina un flujo de auxina en los bordes del embrión. Este evento coincide con el inicio de la producción autónoma de auxina en las células más apicales del proembrión (2). (C) En la fase globular del embrión (16 o 32 células) la producción autónoma de auxina cambia la dirección del transporte auxínico, lo que se manifiesta en la localización basal de PIN1 y PIN7 (flechas rojas y azules) y posterior acumulación de auxina (dependiente del transporte) en la célula más apical del suspensor (hipófisis), marcando así el futuro polo radicular. *Wabnik et al (2013) Modeling framework for the establishment of the apical-basal embryonic axis in plants Current Biology 23:2513-2518*



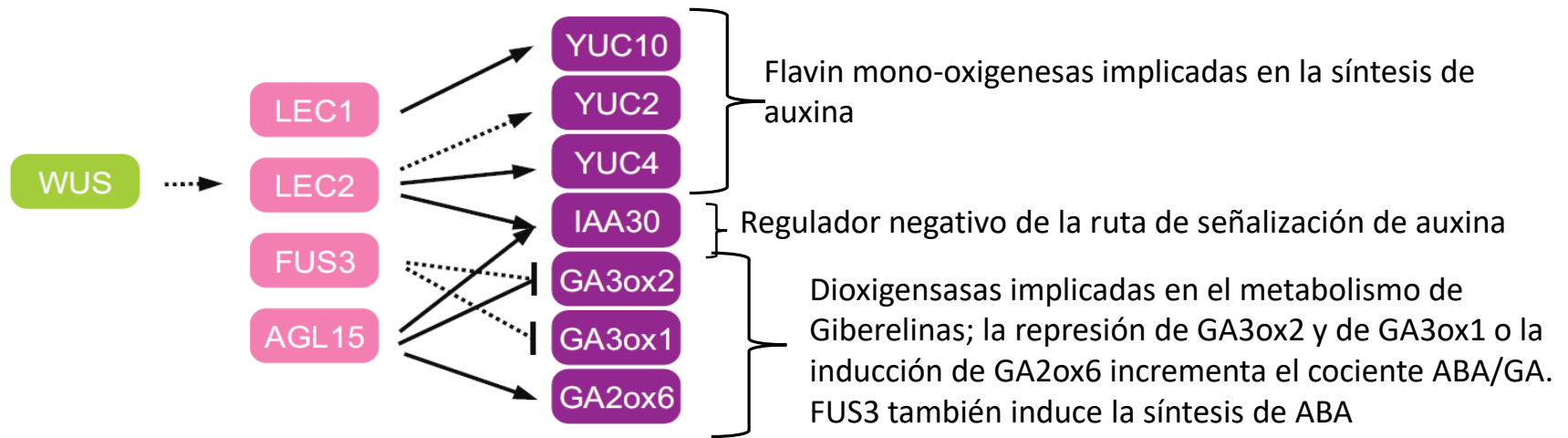
Tanto la síntesis de auxina, a través de la ruta del indol pirúvico, como su transporte (mediado por los transportadores PIN) especifican los polos apical y basal del eje embrionario.

En el suspensor del embrión de 8 células se expresan los genes YUC; desde esa zona, la auxina es transportada por PIN7 hacia la parte apical, donde se acumula y especifica el polo apical del eje (origina el meristemo apical del tallo). En el estado globular (embrión de 16 células) aparece un nuevo foco de síntesis de auxina en la zona apical del proembrión, reflejado por la expresión de los genes TAA y YUC. Esta actividad es requerida para la polarización de PIN1, que revierte el flujo de auxina hacia la base del embrión y lleva a la formación de un nuevo máximo de auxina que es responsable de la especificación del polo basal (origina el meristemo apical de la raíz). *Robert et al. (2013) Local Auxin Sources Orient the Apical-Basal Axis in Arabidopsis Embryos Current Biology 23: 2506-2512*

Bases moleculares de la Embriogénesis somática



Durante la fase globular del embrión cigótico se establecen las células troncales de los meristemos apicales de tallo y raíz. Los genes *WUS* y *WOX5* (*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5*) son los marcadores de los centros organizadores de del ,meristemo apical del tallo y raíz, respectivamente (1) . Ambos genes, también son marcadores en la embriogénesis somática



El establecimiento de un gradiente auxínico en el callo embriogénico especifica la expresión del gen *WUS* . Seguidamente, la proteína *WUS* induce la expresión de los factores transcripcionales *LEC1*, *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 1,2*) y *FUS3* (*FUSCA3*), que junto con *AGL15* (*AGAMOUS-LIKE 15*) modulan los niveles endógenos de auxina, giberelinas y ABA para promover embriogénesis. Las flechas negras continuas indican regulación transcripcional directa, demostrada por evidencias moleculares y las discontinuas regulación transcripcional directa o indirecta., inferida a partir de evidencias genéticas. La línea truncada denota represión (2)

1) ten Hove et al (2015) *Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. Development* 142: 420-430

2) Ikeuchi et al. (2016) *Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. Development* 143: 1442-1451

Factores de transcripción implicados en la inducción de embriogénesis somática (1)

Una serie de Factores de Transcripción regulan la totipotencia celular y promueven Embriogénesis somática espontáneamente (en ausencia de auxinas) al ser sobre-expresados. Varios pertenecen a la familia AINTEGUMENTA-LIKE (AIL) y otros, se agrupan en la red transcripcional LAFL.

En arábido, **la familia AIL** forma una clade de 8 miembros: BABY BOOM (BBM), AINTEGUMENTA (ANT), AIL1, PLETHORA1 (PLT1), PLT2, AIL6/PLT3, CHOTTO1 (CHO1)/EMBRYOMAKER (EMK)/AIL5/PLT5, y PLT7. BBM se expresa en el embrión y meristemo radicular, donde regula la identidad celular y el crecimiento junto con otras proteínas AIL. La sobre-expresión de AIL induce pluripotencia, totipotencia y/o proliferación celular.

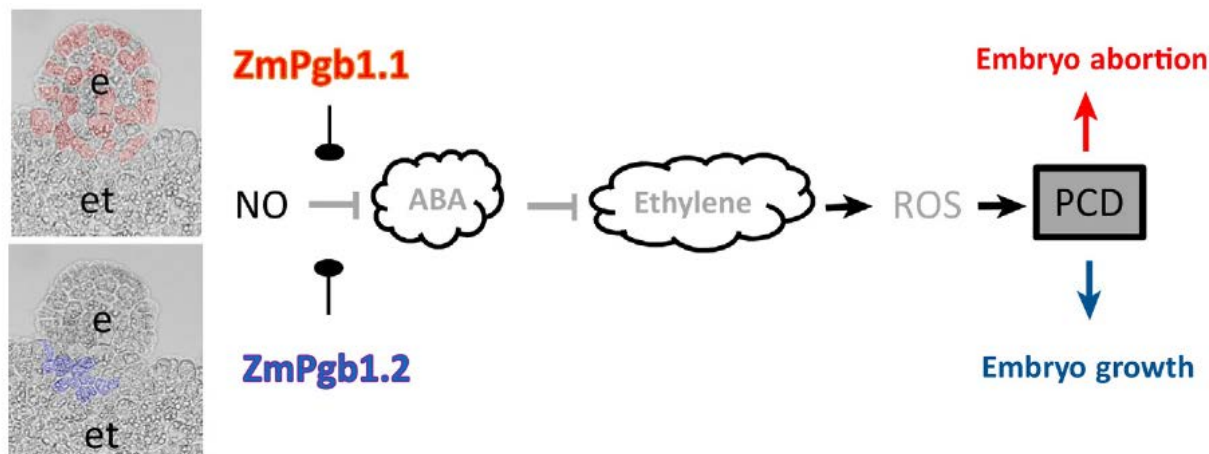
La red transcripcional **LAFL**, se denomina así por estar formada por los factores de transcripción LEC1/LEC1-LIKE (L1L), ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3 (ABI3), FUSCA3 (FUS3) y LEC2. **Las proteínas LAFL participan en la embriogénesis, regulando procesos iniciales, como la identidad del embrión, y procesos tardíos, como la maduración y dormición.** Aunque la sobre-expresión de FUS3 y ABI3 no induce embriogénesis somática, si confieren características embrionarias a las plántulas. LEC1 y LEC2 regulan directamente la expresión de la maduración de la semilla y de genes de biosíntesis y respuesta del IAA, y estas funciones pueden jugar un papel en la inducción del estado totipotente. Además, LEC2 activa directamente al factor de transcripción MADS AGL15, que favorece la embriogénesis somática si se sobre-expresa en embriones cigóticos inmaduros. La expresión de los genes *LAFL* es controlada por el remodelador de cromatina PICKLE (PKL) y por los factores de transcripción VIVIPAROUS1/ABI3-LIKE (VAL)/HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE (HSI). Las mutaciones en los genes *PKL* o *VAL* lleva a un incremento en la expresión de los genes *LAFL* y al mantenimiento de la identidad embrionaria en las plántulas.

BBM induce totipotencia celular a través de la activación transcripcional de la red LAFL

(1) Más información en: Horstman et al (2017) The BABY BOOM Transcription Factor Activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 Network to Induce Somatic Embryogenesis. *Plant Physiology* 175: 848–857

Fitoglobinas (hemoglobinas que no participan en simbiosis con diazótrofos) y óxido nítrico (NO) están implicados en morfogénesis

Las fitoglobinas reducen los niveles de NO (en su estado oxidado, la fitoglobina metaboliza el NO a nitrato). A través de este mecanismo, las fitoglobinas modulan el destino celular y/o varias rutas de señalización hormonal y controlan la embriogénesis somática y organogénesis, entre otros procesos.

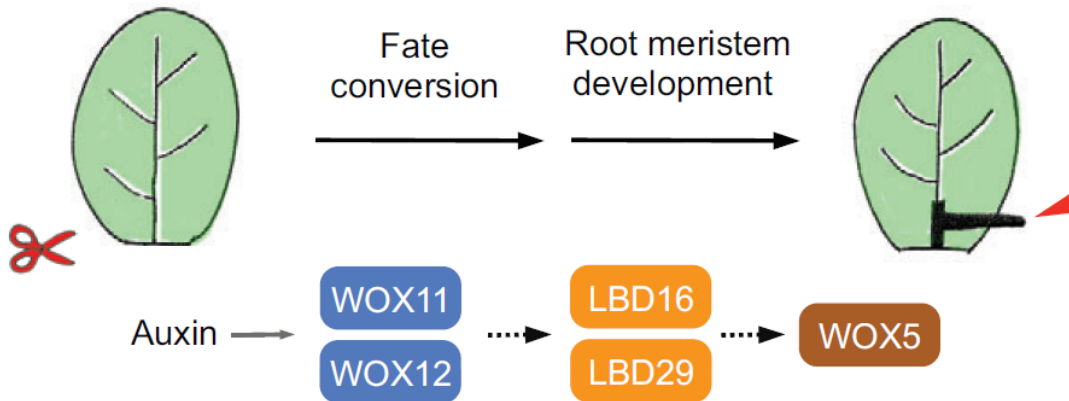


Muerte celular programada (PCD) durante la embriogénesis somática del maíz. Los embriones inmaduros (e, en rojo) se conectan al callo embriogénico (et). Las fitoglobinas ZmPgb1.1 y ZmPgb1.2 reducen los niveles de NO, el cual, a su vez, reprime la síntesis de ABA, que inhibe la síntesis y sensibilidad al etileno, que promueve la formación de ROS y la PCD. El gen *ZmPgb1.1* se expresa en el embrión (en rojo), por lo que si es suprimido se produce PCD y aborto del embrión. En contraste, el gen *ZmPgb1.2* se expresa en las células que unen el embrión con el callo embriogénico (en azul); la supresión de este gen induce PCD en las células de anclaje, lo que libera al embrión inmaduro, permitiendo su desarrollo (*Trends in Plant Science 1585, en prensa*)

- Elhiti et al (2013) Function of type 2 Arabidopsis hemoglobin in the auxin-mediated formation of embryogenic cells during morphogenesis *Plant J* 74: 946-958
- Huang, S. et al. (2014) Hemoglobin control of cell survival/ death decision regulates in vitro plant embryogenesis. *Plant Physiol.* 165, 810–825
- Godee, C. et al. (2017) Cellular localization of the Arabidopsis class 2 phytohemoglobin influences somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 68, 1013–1023
- Stasolla y Robert (2017) Determining cellular responses: phytohemoglobins may direct the traffic. *Trends in Plant Science 1585, en prensa*

Bases moleculares de la neoformación de raíces

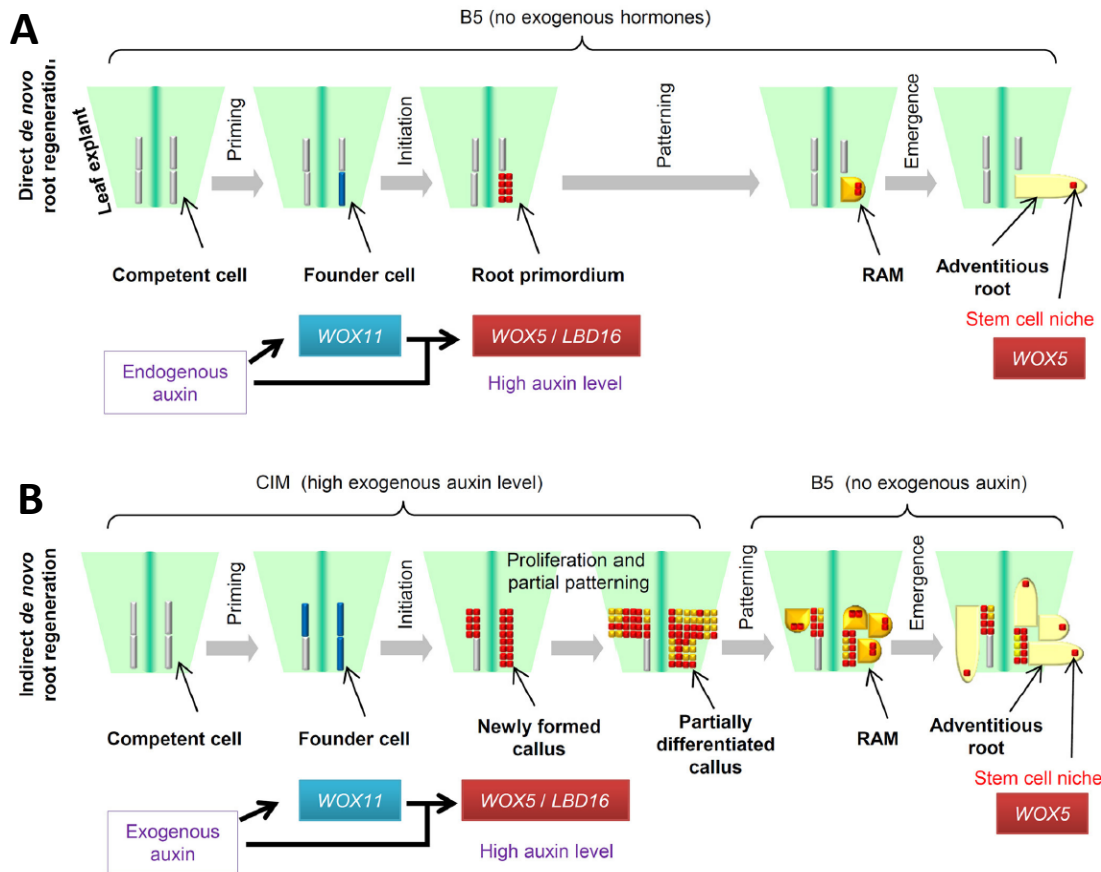
El cultivo de explantos en medio inductor de raíces (RIM) activa la regeneración de raíces a partir de células del periciclo, donde las auxinas promueven la diferenciación de primordios de meristemos radiculares. Por ello, los explantos con primordios de meristemos de raíces laterales forman raíces espontáneamente, tanto en las zonas de corte como intactas, mientras que los explantos sin estos primordios solo regeneran raíces en las zonas de corte después del tratamiento con auxina.



Las flechas negras continuas indican regulación transcripcional directa, demostrada por evidencias moleculares y las discontinuas regulación transcripcional directa o indirecta., inferida a partir de evidencias genéticas

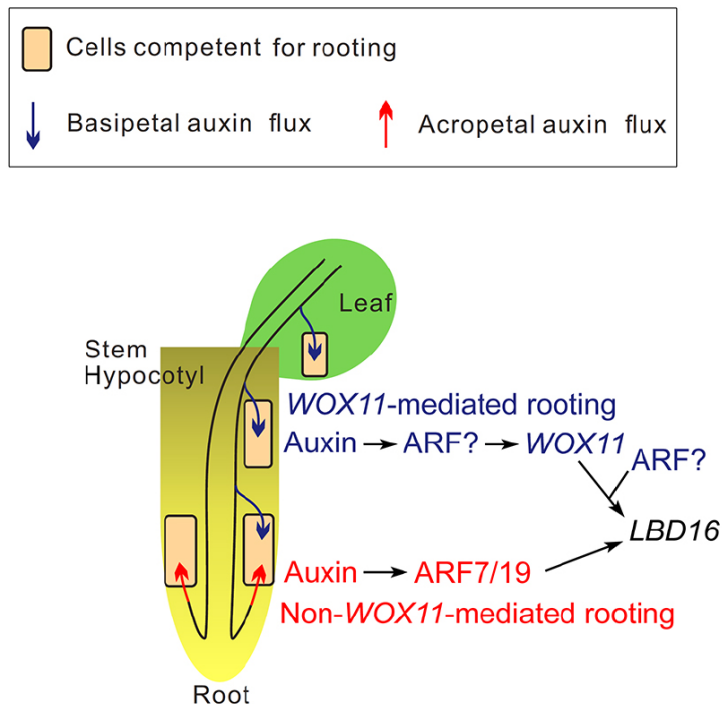
La acumulación de auxina en las zonas de corte del explanto foliar promueve la conversión de las células foliares del procambium/parenquima en “células fundadoras” de la raíz. El proceso se inicia con la activación de los factores de transcripción WOX11 y WOX12 (WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 11, 12)*. Seguidamente, estos factores transcripcionales participan en la neoformación de meristemos radiculares que implican la expresión de LBD16, LBD29 (LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16,29) y, finalmente de WOX5, lo que inicia la formación del meristemo lateral de la raíz (cabeza de flecha roja).

* La inducción de WOX11/12 se produce a través de la ruta de señalización de la auxina que lleva a la degradación en el proteasoma de represores transcripcionales que son previamente ubiquitinados por el complejo E3 ubiquitin ligasa SCF^{TIR1/AFB}



Comparación entre la regeneración directa (A) e indirecta (B) de raíces. Tanto las fases como los marcadores son similares. En las dos rutas están implicados WOX11 para las células fundadoras y WOX5/LBD16 para los primordios radiculares. **Sin embargo, la fuente de auxina es diferente;** en la regeneración directa, la auxina es de origen endógeno, mientras que en la indirecta, es aportada por el medio de cultivo. **El comportamiento de la auxina también es diferente.** En la regeneración directa, las transiciones en el destino celular están controladas por la auxina endógena y los programas de desarrollo; además, la concentración de auxina se centraliza en unas pocas células, por lo que el número de raíces es limitado (1-3). En contraste, en la regeneración indirecta se inducen muchas células competentes para formar células fundadoras que se dividen y forman callo en presencia de auxina exógena. Muchas células del callo están enriquecidas con auxina, por lo que, al eliminar la auxina exógena, se forman muchas raíces adventicias

La respuesta a la auxina es diferente en raíces primarias de plantas crecidas en suelo y verticalmente en medio de cultivo (1/2 MS, por ejemplo), lo que sugiere que señales ambientales diferentes pueden causar respuestas diferentes a las auxinas

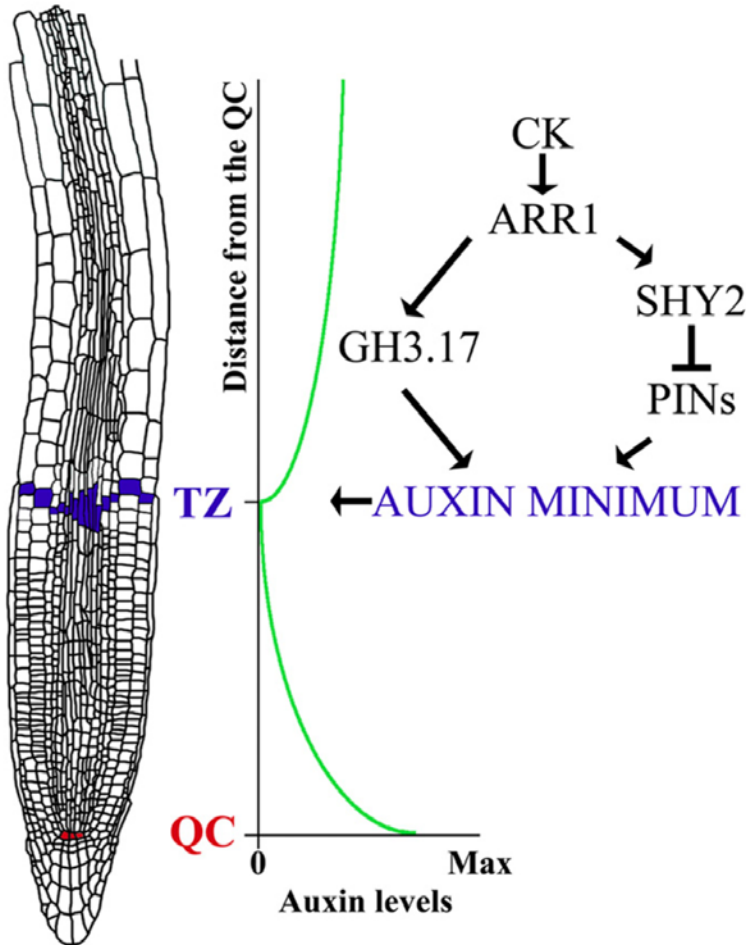


Las rutas de enraizamiento mediadas (en azul) o no mediadas (en rojo) por *WOX11* contribuyen a la plasticidad en la formación del sistema radicular en *arabidopsis*.

El enraizamiento mediado por *WOX11* puede producirse en explantos de hojas, tallos e hipocotilos. También tienen lugar en raíces, principalmente en respuesta a señales ambientales, como estrés o heridas.

La ruta de enraizamiento no mediada por *WOX11* es dependiente de señales del desarrollo para producir raíces laterales. Los interrogantes indican la propuesta de que los factores de transcripción de respuesta a auxina (ARF) están implicados en el enraizamiento mediado por *WOX11*.

El establecimiento de mínimos de auxina activa la diferenciación celular en la zona de transición de la raíz (TZ), esto es, la frontera que separa la división de la diferenciación celular. El establecimiento del mínimo de auxina es controlado por las citoquininas



Las citoquininas (CK), a través del regulador de respuesta ARR1:

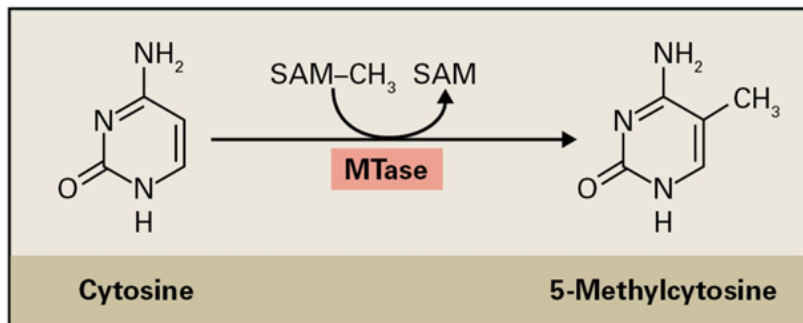
a) Promueven la expresión de enzimas (GH3.17, GRETCHEN HAGEN 3.17) que inactivan la auxina, al catalizar la formación de conjugados con aminoácidos

b) Reprimen el transporte polar de la auxina promoviendo la expresión de SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2), un represor de la ruta de señalización que regula negativamente a los transportadores PINs.

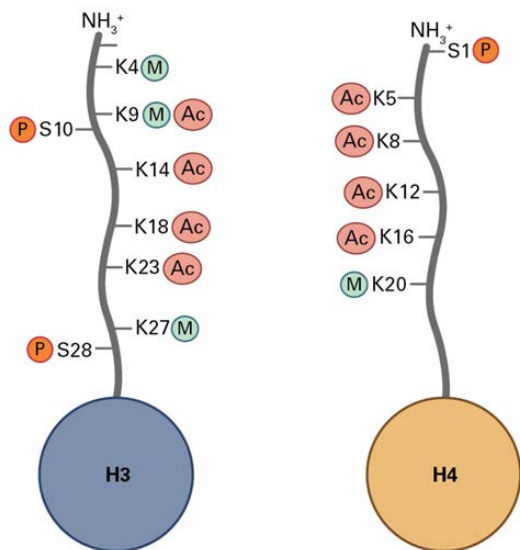
Ambos procesos conducen a un mínimo de auxina que actúa como una señal que posiciona la TZ y conduce a las células meristemáticas hacia su diferenciación.

Control epigenético de la regeneración in vitro

Las marcas epigenéticas fundamentales son **la metilación del DNA y una serie de modificaciones post-traducción de las histonas** que suceden a nivel de los extremos amino y carboxilo de estas proteínas



Metilación de la citosina. Una metiltransferasa (MTase) transfiere un grupo metilo desde S-adenosil metionina (SAM) a la citosina, rindiendo 5-metilcitosina. El efecto de la metilación sobre la expresión génica depende de la localización de la citosina metilada. La metilación del promotor se asocia con una menor transcripción, mientras que la metilación en la zona de codificación se correlaciona con una transcripción moderada o alta.



Modificaciones covalentes de las histonas H3 y H4. “M” denota metilación; “Ac” acetilación; y “P” fosforilación. Se indican posiciones de los aminoácidos lisina (K) y Serina (S) con respecto al extremo N-terminal de las proteínas.

La acetilación es catalizada por Histona acetil transferasas, que transfieren el resto acetilo del Acetil CoA. En general, la acetilación de histonas activa la expresión génica, reduciendo la condensación de la cromatina. Las enzimas Histona deacetilasas, eliminan la acetilación.

La metilación se produce especialmente sobre residuos de lisina y es catalizada por histona metil transferasas que usan SAM como donador. Se pueden añadir 1, 2 o 3 grupos metilo por aminoácido. El efecto de la metilación sobre la expresión génica depende del aminoácido que es metilado. **Así, la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3) por el complejo represor policomb 2 (PRC2) reprime los genes**, mientras que la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) a través de las proteínas Titorax lleva a la activación del gen

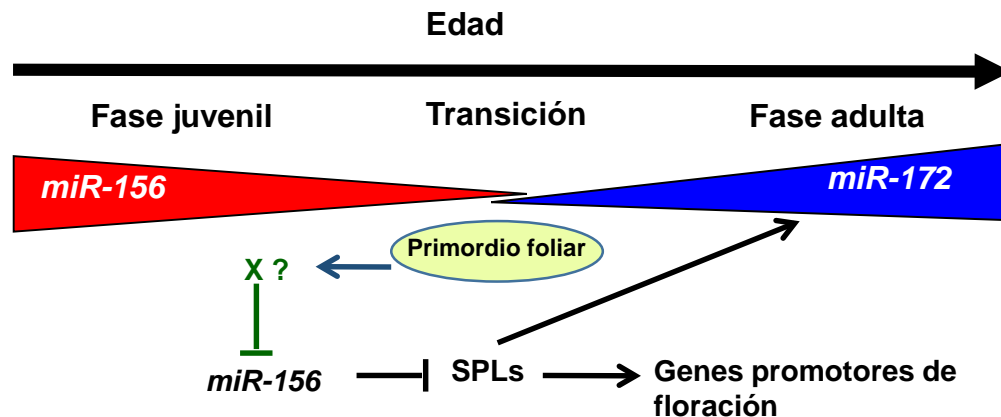
Las marcas epigenéticas influyen sobre la expresión de los genes marcadores de los procesos de regeneración.

- ✓ **Mutaciones en el gen que codifica la DNA METILTRANSFERASA1.** Activan la regeneración de tallos sobre SIM, lo que se acompaña de un incremento en la expresión de genes diana de MET1, como *WUS*
- ✓ **Deacetilación de histonas.** Este proceso inhibe la transcripción de genes reguladores de morfogénesis y, por lo tanto, reprime la regeneración. De hecho, en *Arabidopsis*, los tratamientos con inhibidores de la deacetilación o mutantes de pérdida de función de deacetilasas genera embriones en tallos. Estos fenotipos se asocian con la expresión ectópica de reguladores embriogénicos como *LEC1* y *LEC2*
- ✓ **Complejo represor policomb 2 (PRC2).** Este complejo trimetila la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3) y reprime el potencial regenerativo al silenciar genes reguladores de la morfogénesis. De hecho, mutantes *prc2* de *Arabidopsis* (Nature Plants 1: 15089, 2015) desarrollan callo y estructuras semejantes a embriones. PRC2 reprime al regulador de reprogramación *WIND3* y al regulador embriogénico *LEC2*. Otros reguladores clave de la regeneración, como *WOX11*, *WOX5*, *WUS* y *STM* también son reprimidos por el complejo PRC2. **Por el momento, se desconoce como el complejo represor es eliminado para permitir la regeneración, in vitro o in vivo.**

La pérdida de capacidad regenerativa al aumentar la edad de la planta esta ligada a los niveles de expresión de microRNAs *miR156* y *miR172*

Ambos miRNAs y sus factores de transcripción diana coordinan la transición entre las fases juvenil y adulta (*Cell* 138:625-627, 2009); *Development* 138, 245-249, 2011)

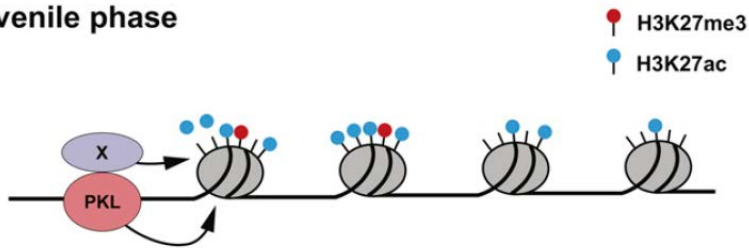
Los mi RNAs *miR156* y *miR172* exhiben niveles de expresión diferentes en función de la edad y desarrollo de la plantas: *miR156* disminuye mientras que *miR172* incrementa con la edad. A medida que incrementa la edad, la bajada en *miR156* y los incrementos en *miR172* conducen a una activación de factores de transcripción que promueve genes implicados en la transición floral.



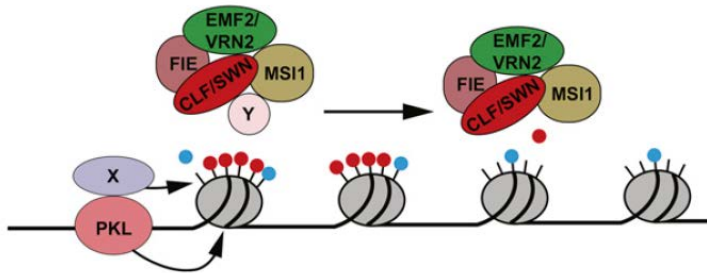
Los *miRNA* 156, 172 y los factores de transcripción SPLs (**S**quamosa **P**romoter **B**inding-**L**ike) forman un circuito regulador: Los *miR156* reprimen algunos genes *SPLs* que son reguladores positivos de *miR172*. Por otra parte, algunos de los *SPLs* reprimidos por *miR156* codifican reguladores positivos de otros promotores de floración. De ese modo, al ir avanzando el desarrollo (edad), la bajada en *miR156* y las subidas en *miR172* y ciertos *SPLs* conducen a la activación de los genes que regulan la transición floral. **Se sugiere que el cambio de fase se inicia con la producción de una señal (X) en los primordios foliares que reprime a *miR-156***

La disminución en los niveles de expresión de mi156 durante el cambio de fase se debe a procesos epigenéticos en la cromatina de los genes que producen este miRNA (**MIR156A** y **MIR156C**). Concretamente, el silenciamiento de estos genes durante el cambio de fase se asocia con un descenso en la acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac) y un incremento en la tri-metilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3). Se demuestra además que el balance entre H3K27ac y H3K27me3 juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica.

Juvenile phase



Adult phase



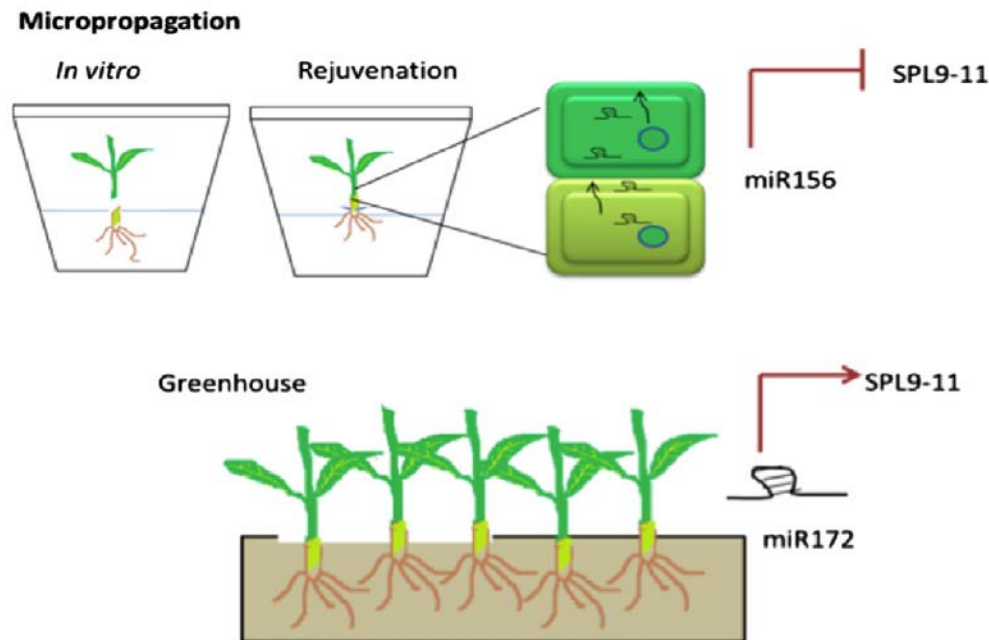
Xu et al (2016) *The Plant Cell* 28: 28–41

Modelo para la regulación de los genes **MIR156A/MIR156C** durante el cambio de fase

El remodelador de la cromatina PKL está unido constitutivamente a los promotores de ambos genes y reduce H3K27ac al asociarse con una histona deacetilasa (X). La transición hacia la fase adulta se produce, bien cuando el nivel de H3K27ac cae hasta un nivel que no inhibe la unión del complejo represor PRC2 o cuando un factor regulado temporalmente (Y) incrementa la afinidad de estos genes por los complejos represores SWN-PRC2 o CLF-PRC2. Seguidamente, PRC2 metila H3K27, moviéndose desde el extremo 5' al extremo 3' del gen

La caída en la expresión de miR156 es responsable de la disminución en la capacidad regenerativa (Plant Cell 27:349-360, 2015). El miR156 es un represor de los factores de transcripción SPL9, que inhiben la actividad de los Reguladores de respuesta de tipo B. Por lo tanto, si se reduce el miR156, hay menos sensibilidad a CKs.

El movimiento de los miRNAs entre los tejidos injertados explica el efecto “rejuvenecedor” del injerto o microinjerto con tejidos juveniles

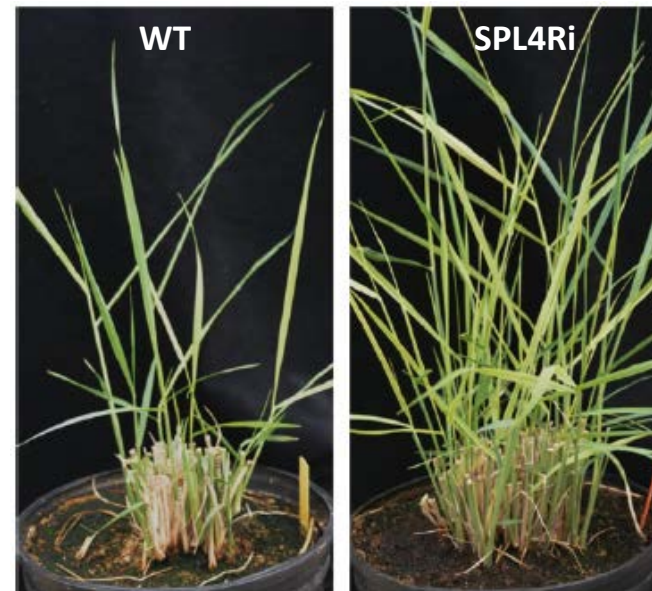


El mi156 también está controla la formación de yemas axilares

La sobreexpresión de *miR156* indujo la formación de yemas aéreas en *Panicum virgatum* L. Además el factor de transcripción *SPL4*, diana de miR156 regula la iniciación de yemas axilares. La represión de *SPL4* promueve la formación de yemas aéreas e incrementa las yema basales, mientras que su sobreexpresión suprime la formación de yemas y el ahijado



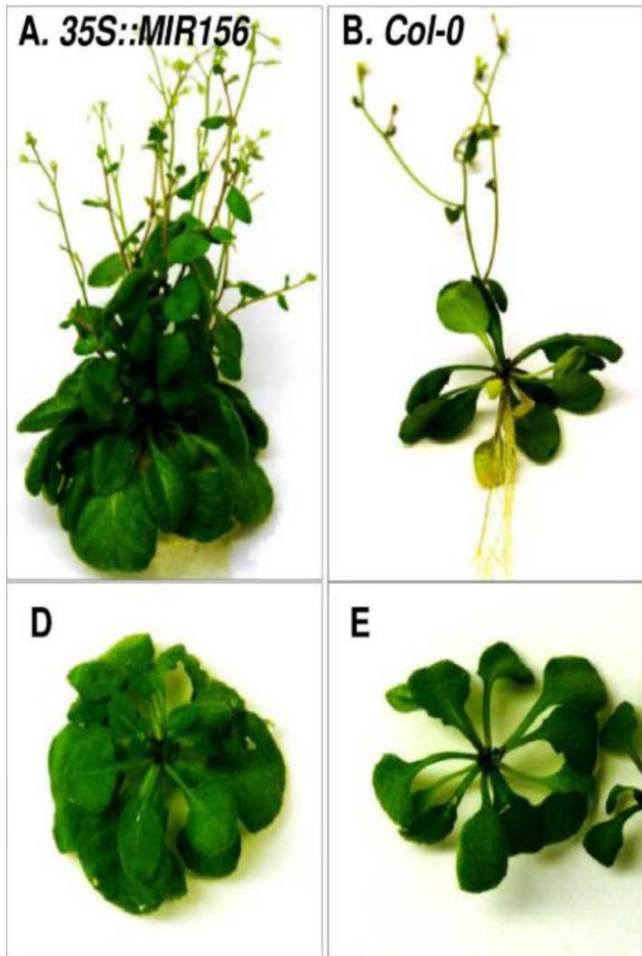
Segmentos nodales de plantas de *P. virgatum* sobreexpresoras de *miR156*



El silenciamiento del gen *SPL4* promueve el rebrote de *P. virgatum*

La inhibición de la DNA metil transferasa y la sobre-expresión de miR156 promueve el enraizamiento en tejidos adultos¹

¹Massoumi et al (2017) Azacytidine and *miR156* promote rooting in adult but not in juvenile Arabidopsis tissues. Journal of Plant Physiology 208: 52–60

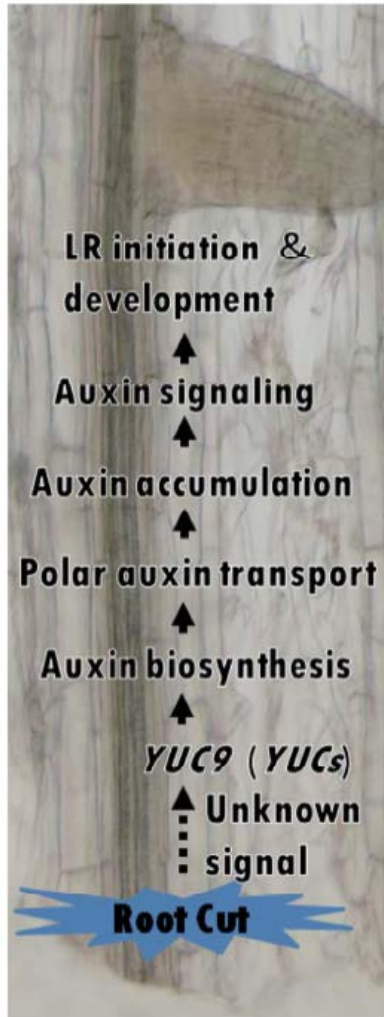


En esta publicación se estudió el efecto de la azacitidina (AzaC), un inhibidor de la metilación del DNA, y del *miR156* sobre la formación de raíces adventicias en tejidos adultos y juveniles de Arabidopsis.

La sobre-expression de *miR156* promovió el enraizamiento solo en tejidos adultos. El tratamiento con Azacitidina también promovió el enraizamiento en tejidos adultos, pero tuvo poco efecto en tejidos juveniles.

Poda de raíces: una opción para mejorar el enraizamiento

Una publicación reciente¹ descubre el mecanismo molecular del “root pruning” (root cutting), que permite incrementar el número de raíces laterales



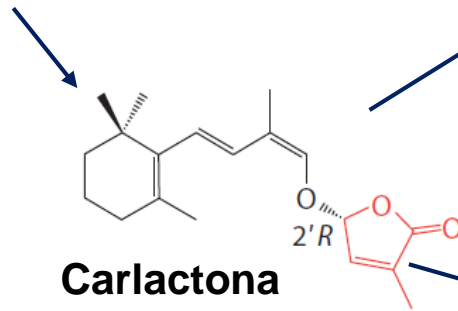
El corte de la raíz activa la expresión de genes implicados en la síntesis de auxina (*YUC 9* y otros de la familia *YUC*), lo que incrementa el nivel de auxina, lo que induce la expresión de los genes implicados en el transporte polar de la auxina, especialmente los de la familia *PIN*. La promoción del transporte polar de la hormona conduce a una acumulación de la auxina y a la activación de la ruta de señalización que lleva a la inducción de raíces laterales.

¹Xu et al (2017) *YUCCA9-mediated auxin biosynthesis and polar auxin transport synergistically regulate regeneration of root systems following root cutting*. *Plant and Cell Physiology* doi/10.1093/pcp/pcx107/4101880

Estrigolactonas: arquitectos del cuerpo de las planta

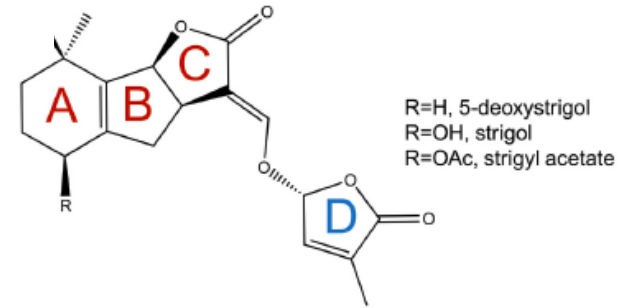
Hormonas derivadas de la oxidación de los carotenoides. Las estrigolactonas canónicas constan de una lactona tricíclica (anillos A, B y C) unida a un butenólido (anillo D), aunque los anillos A, B y D pueden faltar

CAROTENOIDES

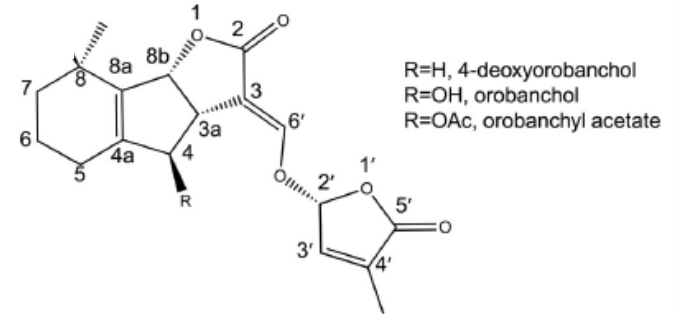


Carlactona

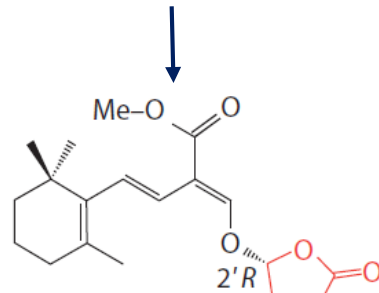
Familia del orobancol



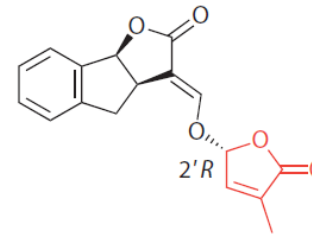
Familia del estrigol



Acido carlactonoico



Metil carlactonoato

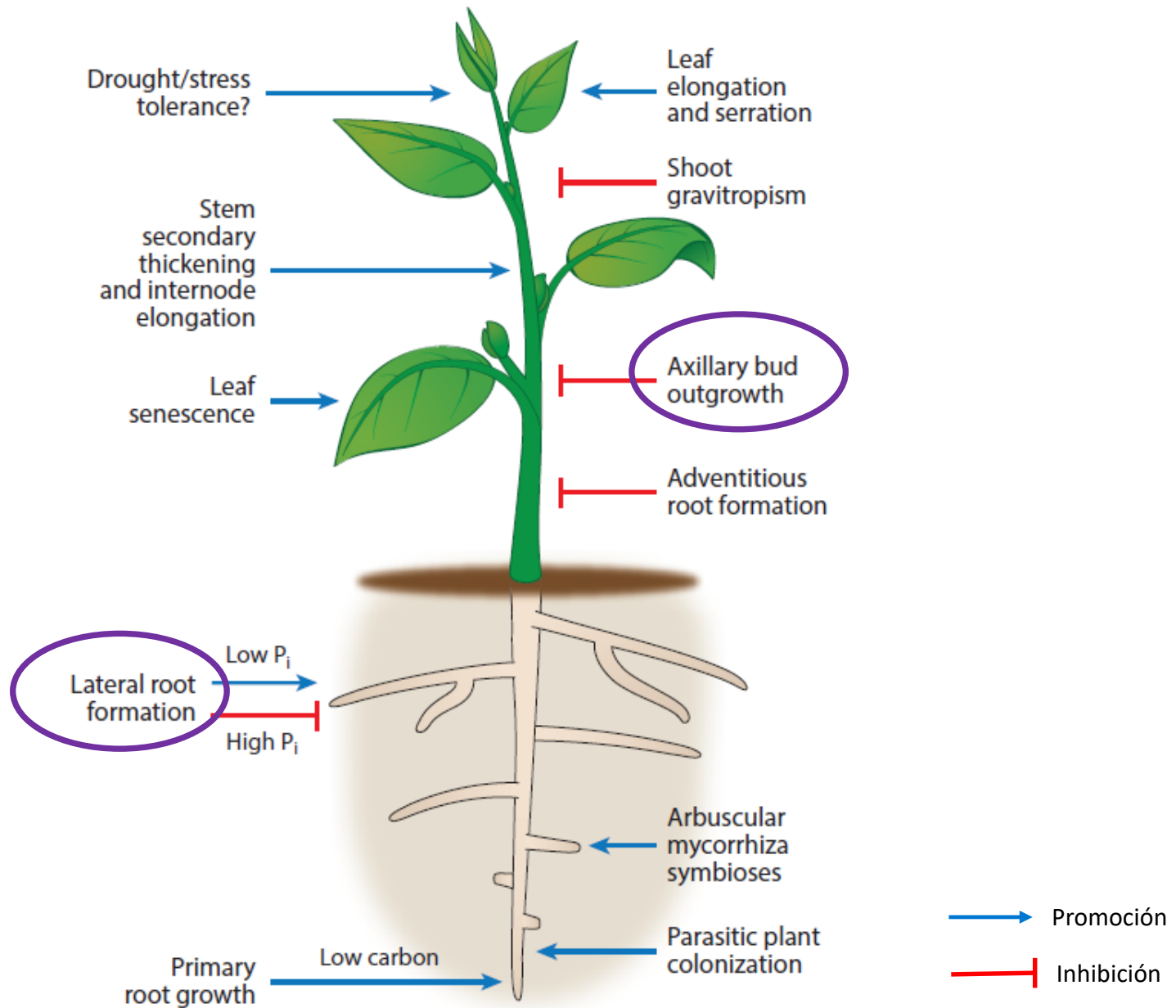


GR24^{5DS}

Estrigolactona sintética

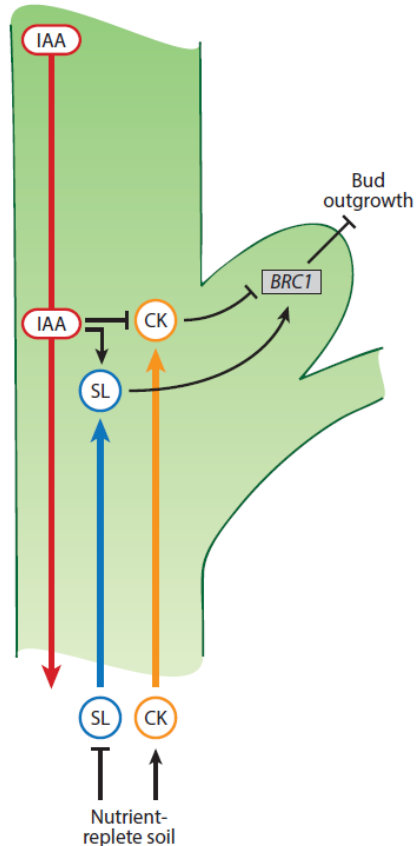
En Arabidopsis

Efectos de las estrigolactonas

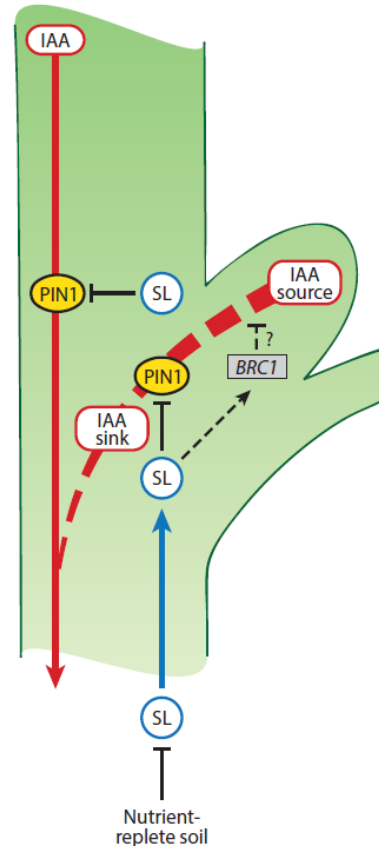


Modelos de regulación del rebrote de las yemas axilares

a Direct action



b Canalization



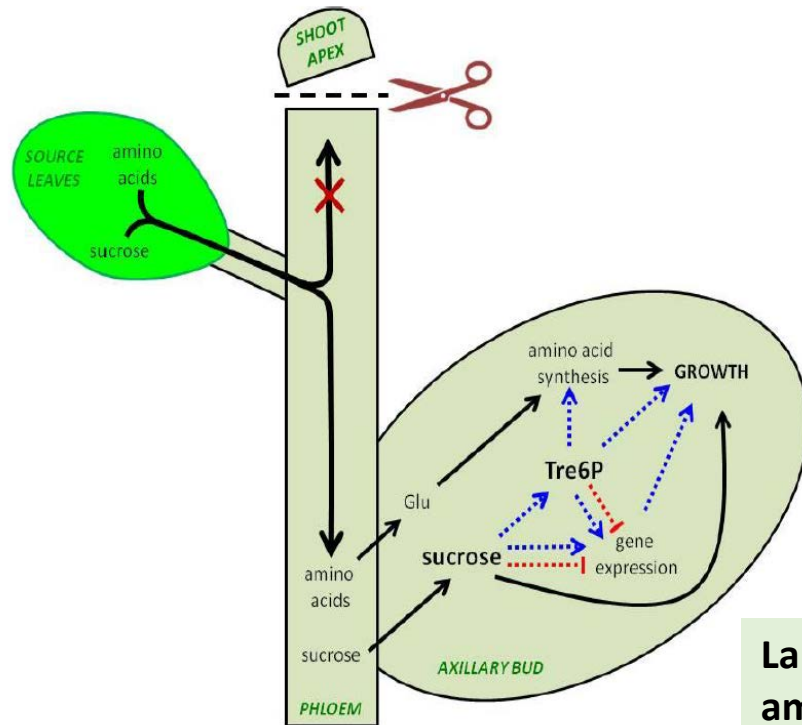
BRC1, *BRANCHED1*; CK, citoquinina; IAA, ácido indol-3-acético; PIN1, PIN-FORMED1; SL, estrigolactona.

a) Acción directa (o de los segundos mensajeros). Las estrigolactonas (SL) y citoquininas (CK) procedentes de la raíz inhiben o promueven, respectivamente, el rebrote de las yemas axilares. Las auxinas (IAA) procedentes de la yema apical modulan el proceso activando la síntesis de SL y reprimiendo la síntesis de CK

b) Canalización. Pone el énfasis en transporte polarizado de la auxina y en la capacidad de las yemas para exportar auxina. En el modelo es fundamental la canalización del transporte polar de la auxina desde las yemas axilares hasta el flujo polarizado de auxina en el tallo principal. El rebrote podría explicarse en base a una competición entre yemas por el transporte de auxina a través del tallo principal. Su funcionamiento depende de la movilización subcelular y supracelular de los transportadores de eflujo de auxina (PIN1, por ejemplo). Las SL atenúan la actividad de PIN1 en la yema y en el tallo principal, afectando la fuerza de la fuente y sumidero y reduciendo la capacidad de las yemas para exportar auxina. Las SL también reprimen el rebrote promoviendo la expresión de *BRC1* (líneas discontinuas).

Los modelos no se excluyen mutuamente; en ambos, la disponibilidad de nutrientes en el suelo influye sobre la síntesis de hormonas en la raíz, proveyendo un mecanismo para la coordinación del crecimiento relativo de ambos órganos

Aclaración: el agente desencadenante de la DA es la concentración de sacarosa que llega a la yema apical⁽¹⁾



La sacarosa activa el rebrote de las yemas axilares después de la decapitación⁽¹⁾. Recientemente⁽²⁾ se ha demostrado que el nivel de trehalosa-6P (Tre6P en las yema axilares incrementa inmediatamente después de la decapitación de la yema apical. Este disacárido es una señal de la disponibilidad de sacarosa, por lo que su subida indica que ha incrementado la entrada de sacarosa en la yema axilar. La decapitación también incrementa el nivel de aminoácidos en las yemas axilares. Por lo tanto, el rebrote de las yemas axilares lleva a una reconfiguración del metabolismo del C y N, necesario para sintetizar las moléculas que se utilizan en el crecimiento de las yemas. Muy posiblemente, la Tre6P esta implicada en la coordinación de estos cambios metabólicos.

La decapitación afecta al aporte de sacarosa y aminoácidos a las yemas axilares, activando una subida en Tre6P que coincide con la liberación del rebrote de las yemas axilares y la reconfiguración del metabolismo del C y N. Las líneas solidas indican transporte o flujos metabólicos y las discontinuas interacciones reguladoras.

¹Mason et al (2014) Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. PNAS 111: 6092-6097

² Fichtner et al (2017) Trehalose 6-phosphate is involved in triggering axillary bud outgrowth in garden pea (*Pisum sativum* L.) Plant Journal (2017) doi: 10.1111/tpj.13705

Pese al importante papel de las estrigolactonas en la regulación del rebrote de las yemas axilares hay pocas publicaciones sobre su efecto en cultivo in vitro

Verstraeten et al (2014) Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science* 5: 495; DOI: 10.3389/fpls.2014.00495

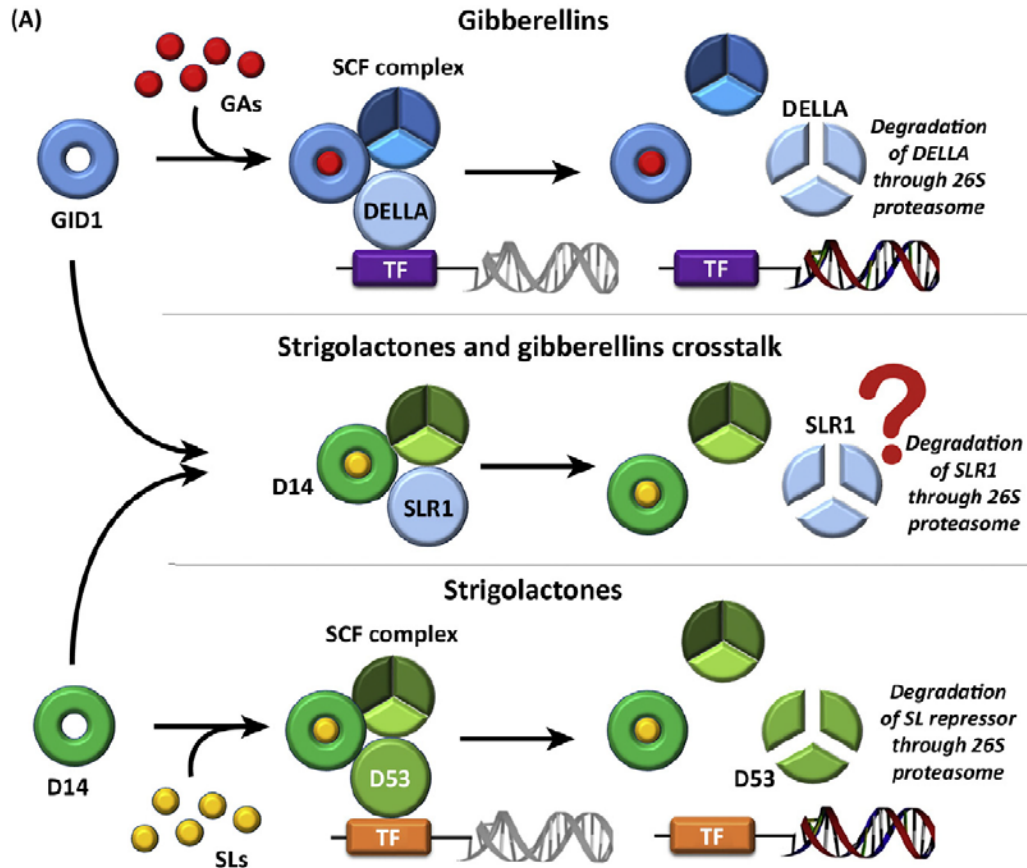
“The hormones cytokinins, ethylene, jasmonic acid, and strigolactones in general reduce the root-inducing capacity”

Wu et al (2017) Strigolactones affect tomato hormone profile and somatic embryogenesis. *Planta* 245: 583-594. DOI: 10.1007/s00425-016-2625-0

“Exogenously applied synthetic strigolactone GR24 affected somatic embryo formation and morphogenesis of strigolactone-deficient tomato mutant through crosstalk with auxins and cytokinins indicating involvement of SLs in the embryogenic process”

Interacción estrigolactonas (SLs) /giberelinas(GAs)

SLs y GAs comparten algunos hechos de su ruta de señalización¹ además, la biosíntesis de las SLs es regulada por GAs²



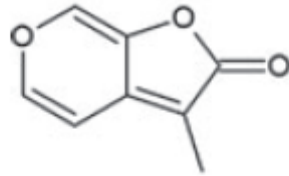
Las rutas de señalización de GAs y SLs **comparten algunas similitudes**, como sus **receptores** [GIBBERELIC-ACID INSENSITIVE1(GID1) para GAs y DWARF14 (D14) para SLs] que pertenecen al grupo de las α/β hidrolasas, y la **degradación de los represores de la ruta de señalización** [DELLA/SLENDER1(SLR1) para GAs y DWARF53 (D53) para SLs] a través de la ruta Ubiquitina-proteasoma.

Dado que en el arroz, el receptor D14 de las estrigolactonas se une a SRL1, una de las proteínas DELLA, se puede postular una interacción entre ambas hormonas.

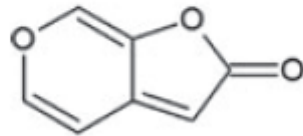
¹Marzec (2017) Strigolactones and Gibberellins: A New Couple in the Phytohormone World? Trends in Plant Science 1584. En prensa

²Ito et al. (2017) Regulation of strigolactone biosynthesis by gibberellin signaling. Plant Physiol. 174, 1250–1259

Interacción estrigolactonas (SLs) / Karriquinas (KARs)



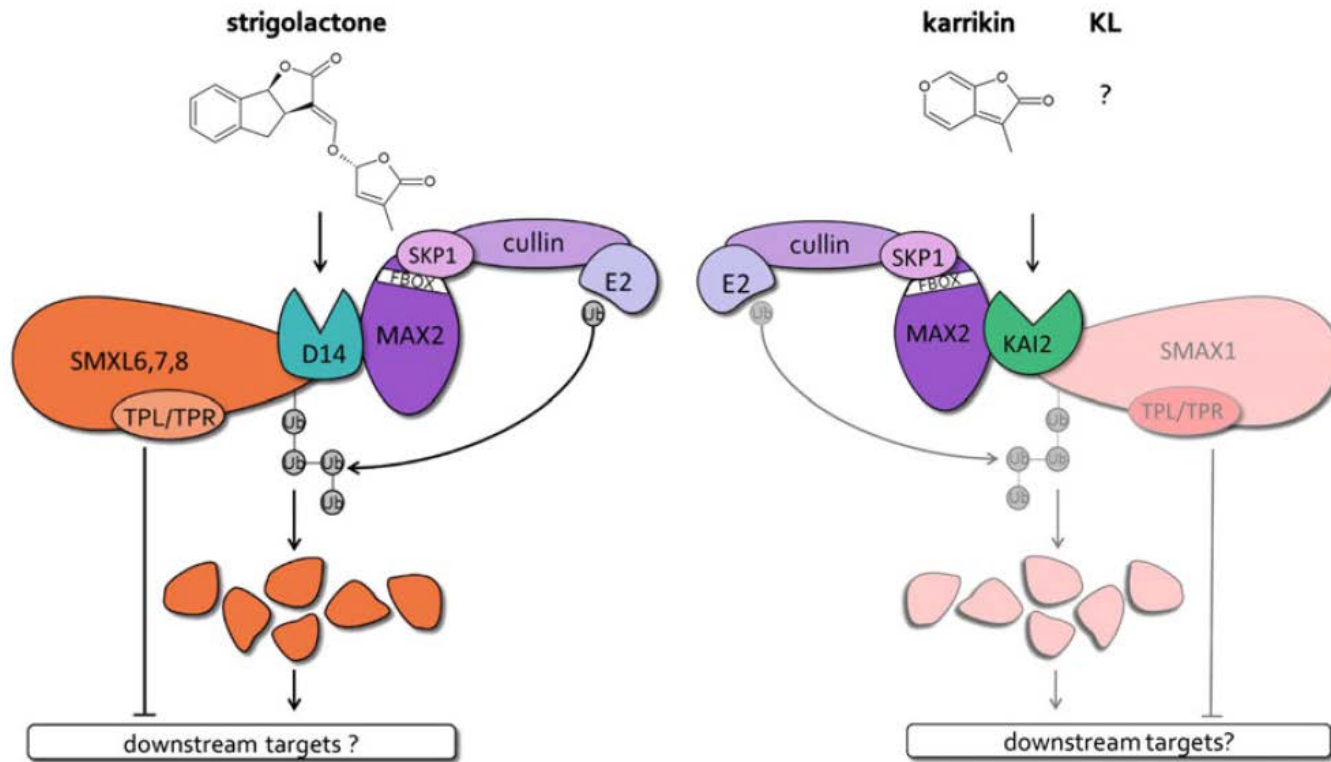
KAR₁



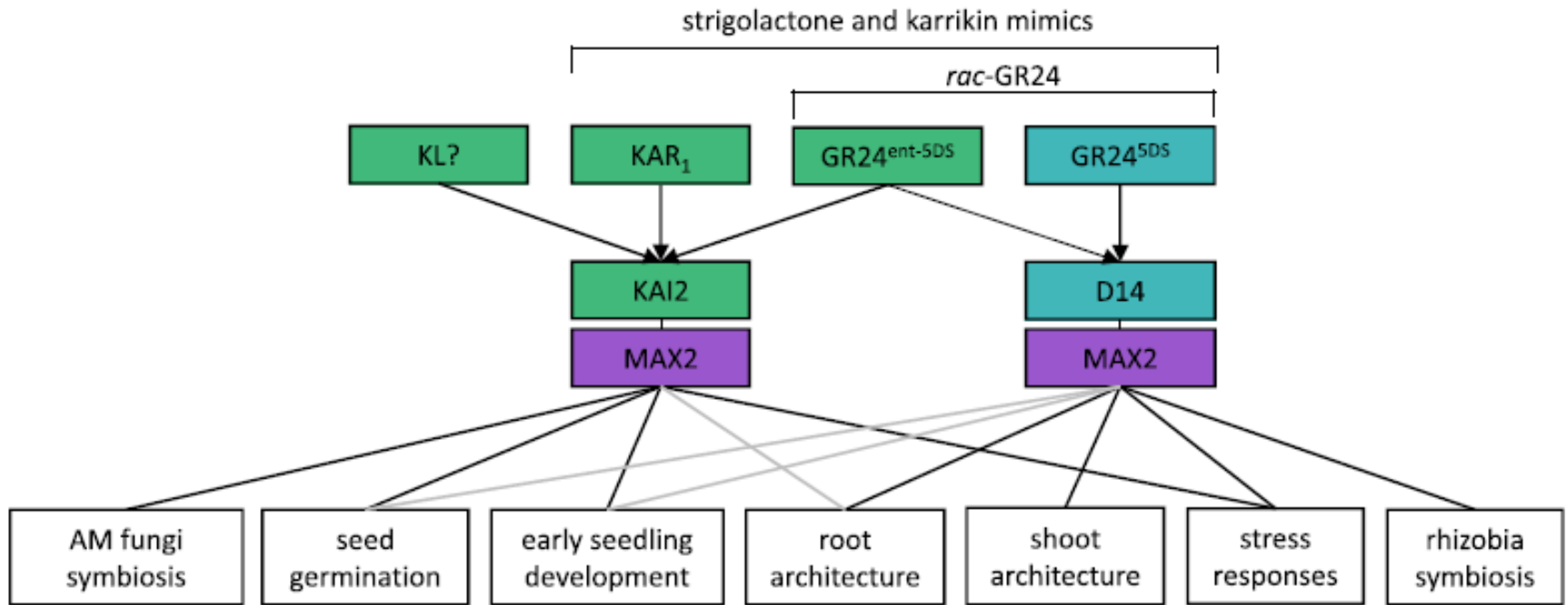
KAR₂

Las karriquinas son un grupo de compuestos descubiertos en el humo de la combustión del material vegetal durante los incendios forestales. El término Karriquina deriva de la voz aborígen “Karric” (humo) del pueblo Noongar del suroeste de Australia; el sufijo “in” denota moléculas biológicamente activas (análogo a giberelina o auxina).

Karriquinas y estrigolactonas comparten algunos componentes de su ruta de señalización, como la proteína F del complejo E3 ubiquitin ligasa SCF^{MAX2} ; su proteína receptora (KAI2, KARRIQUINA INSENSIBLE 2) es paróloga del receptor D14 de las estrigolactonas. **Evidencias genéticas sugieren que KAI2 pueda reconocer un compuesto endógeno, sintetizado por las plantas, semejante a las karriquinas (KL).** De hecho la estrigolactona sintética GR24 mimetiza las señales de estrigolactonas y karriquinas



Ruta de señalización de las estrigolactonas y posibles interacciones con la señalización de karriquinas y moléculas endógenas semejantes a Karriquinas (KL). Las estrigolactonas son percibidas por el receptor D14, lo que provoca la ubiquitilación, por la ubiquitin ligasa SCF^{MAX2}, y posterior degradación en el proteasoma, de los represores SMXL6,7 y 8, lo que permite la transcripción de genes de respuesta a la hormona. Pofr analogía, pero aun sin demostrar (se muestra en sombreado, el reconocimiento de Klpor el receptor KAI2 induciría la la degradación de los represores y la activación de respuestas.



Procesos biológicos regulados por estrigolactonas y mimetizados por karriquinas.

Los componentes de la ruta de señalización específicos de estrigolactonas y karriquinas se presentan en verde y cian, respectivamente, mientras que la proteína F MAX2, compartida por ambas rutas, se muestra en púrpura. Las líneas grises indican efectos posibles, aun no contrastados.

Otros retos: **Micropropagación fotoautótrofa**

Photoautotrophic micropropagation (PAM) narrowly refers to the propagation and growth of explants or plants under disease-free conditions on medium containing no supplemental organic components as nutrients. In PAM or sugar-free medium micropropagation, chlorophyllous explants having photosynthetic ability are used to enhance their photoautotrophic growth. **Environmental factors such as light intensity and carbon dioxide concentration need to be properly controlled for promoting photosynthesis of explants and/or plants.** PAM, which improves both the in vitro aerial and root zone environments, **significantly promotes the growth of in vitro plants, increases the multiplication rate, and thus shortens the multiplication period of the in vitro stage.** Moreover, in vitro plants grown under photoautotrophic conditions show **better acclimatization** with higher survival rate during the ex vitro stage. This chapter reviews the special features of PAM and its practical application over the last decade, and the potential for scaling up large culture vessels to aseptic culture rooms for closed transplant production systems⁽¹⁾

Photoautotropism is a natural mode of nutrition in plants. However, this mode of nutrition is suppressed in plants where photomixotrophy is induced under tissue culture laboratory conditions and provision of ready made carbon in the form of sugar in nutrition medium. The micropropagation procedure is carried out in aseptic conditions and the micropropagated plantlet needs to be acclimatized before its transfer to the external environment, as most of the necessary plant structures for the survival of the plant are lacking. However **with the advent of the photoautotrophic micropropagation there is much scope for development of less labour intensive, automated tissue culture procedure leading to development of hardened plants which will not require acclimatization.** Photoautotrophic micropropagation is carried out using the natural ability of plant to prepare its own food in controlled environment. **Various factors that affect photoautotrophic micropropagation like carbon source, light intensity, humidity, support material and CO₂ concentration have been elaborated⁽²⁾**

(1) Nguyen et al (2016) **PHOTOAUTOTROPHIC MICROPROPAGATION.** En: *Plant Factory An Indoor Vertical Farming System for Efficient Quality Food Production.* T Kozai, G Niu y M Takagaki (Eds), Capítulo 20, pp 271-283. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-801775-3

(2) Kaur (2015) Photoautotrophic micropropagation an emerging new vista in micropropagation-A review. *Agricultural Reviews* 36: 198-207

Otros retos: **Automatización**¹

Plant tissue and organ cultures in vitro usually face technological challenges. When submerged cultivation of plant cells in a controlled environment is desired, the characteristic growth morphology and physiology of differentiated organ cultures present a problem in process scale-up. Temporary immersion systems (TIS) were developed several decades ago. These systems are providing the most natural environment for in vitro culture of plant shoots and seedlings. **Over the past few years, TIS have been recognized as a perspective technology for plant micropropagation, production of plant-derived secondary metabolites, expression of foreign proteins, and potential solutions in phytoremediation.** Nowadays, several TIS, operating on similar or divergent technological principles, have been developed and successfully applied in the cultivation of various plant in vitro systems, including somatic embryos and **transformed root cultures.** In this article, the operational principle and technological design of the most popular TIS are reviewed. In addition, recent examples of the application of temporary immersion technology for in vitro cultivation of plant tissue and organ cultures at laboratory and pilot scales are discussed. Finally, future prospects and challenges to the industrial realization of that fast-developing technique are outlined.

¹*Georgiev et al (2014) Temporary immersion systems in plant biotechnology. Engineering in Life Science 14: 607-621*

Otros retos: **Diseño de material**¹

Background: Due to the complex process of designing and manufacturing new plant tissue culture vessels through conventional means there have been limited efforts to innovate improved designs. Further, development and availability of low cost, energy efficient LEDs of various spectra has made it a promising light source for plant growth in controlled environments. However, direct replacement of conventional lighting sources with LEDs does not address problems with uniformity, spectral control, or the challenges in conducting statistically valid experiments to assess the effects of light. Prototyping using 3D printing and LED based light sources could help overcome these limitations and lead to improved culture systems.

Results: A modular culture vessel design in which the fluence rate and spectrum of light are independently controlled was designed, prototyped using 3D printing, and evaluated for plant growth. This design is compatible with semi-solid and liquid based culture systems. Observations on morphology, chlorophyll content, and chlorophyll fluorescence based stress parameters from in vitro plants cultured under different light spectra with similar overall fluence rate indicated different responses in *Nicotiana tabacum* and *Artemisia annua* plantlets. This experiment validates the utility of 3D printing to design and test functional vessels and demonstrated that optimal light spectra for in vitro plant growth is species-specific.

Conclusions: 3D printing was successfully used to prototype novel culture vessels with independently controlled variable fluence rate/spectra LED lighting. This system addresses several limitations associated with current lighting systems, providing more uniform lighting and allowing proper replication/randomization for experimental plant biology while increasing energy efficiency. A complete procedure including the design and prototyping of a culture vessel using 3D printing, commercial scale injection molding of the prototype, and conducting a properly replicated experiment are discussed. This open source design has the scope for further improvement and adaptation and demonstrates the power of 3D printing to improve the design of culture systems

¹*Shukla et al. (2017) Application of 3D printing to prototype and develop novel plant tissue culture systems. Plant Methods (2017) 13:6*

Diferencias mínimas en la fase de desarrollo pueden implicar cambios importantes en las respuestas de los explantos cultivados *in vitro*, lo que explica porque los protocolos de regeneración siempre deben ser optimizados. El análisis preciso y microscópico de los tejidos es la mejor guía cuando se ensayan métodos de regeneración ⁽¹⁾

(1) Rosspopoff et al. (2017) Direct conversion of root primordium into shoot meristem relies on timing of stem cell niche development. Development 144: 1187-1200

En esta publicación se demuestra que el programa de desarrollo de un primordio de raíz lateral puede cambiarse para formar, directamente, un meristemo apical de tallo a los cuatro días de un tratamiento con citoquininas. La conversión del primordio de raíz lateral en meristemas apical de tallo es un proceso de transdiferenciación, concomitante con la expresión diferencial de los genes que regulan el desarrollo de raíces y tallos, cambios hormonales y actividad mitótica. **La conversión solo es posible dentro de una ventana muy estrecha durante el desarrollo inicial del primordio de raíz lateral y requiere la presencia de células troncales apicales.** Dentro de esa ventana, los programas organogénicos de tallos y raíces son muy plásticos y el estatus de nicho de células troncales puede ser revertido repelidas veces.

Se estima que existen más de **5000 especies** de plantas en las que no son aplicables los métodos convencionales de conservación. Para estas especies “excepcionales”, **la única alternativa real es la aplicación de la tecnología del cultivo in vitro**. Sin embargo, **el uso efectivo de esta tecnología requerirá más investigación básica sobre la manipulación in vitro de las plantas, así como una mayor colaboración entre los grupos implicados , con el fin de utilizar, de forma más eficiente, los conocimientos científicos e infraestructuras existentes**. Estos desafíos son importantes, pero la necesidad de conservar las especies amenazadas exige que se aborden de inmediato¹

¹ Pence (2013) In Vitro Methods and the Challenge of Exceptional Species for Target 8 of the Global Strategy for Plant Conservation. ANN. MISSOURI BOT. GARD. 99: 214–220.