

Puerto de la Cruz, 26 de abril de 2011

Bienvenidos a Tenerife:

Es todo un honor que Tenerife haya sido escogida por la Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales como escenario para celebrar su IX Reunión, en un marco tan singular como es la ciudad de Puerto de la Cruz.

La labor que esta Sociedad ha realizado desde su creación merece el reconocimiento de todos. Sus avances en el campo de la investigación han mejorado, sin duda, la competitividad del sector agrícola. Aquí en Canarias, nadie duda del papel esencial jugado por CULTESA en sus veinticinco años de historia.

Durante los próximos días, ustedes tendrán la oportunidad de profundizar en todos los frentes de investigación abiertos en el ámbito de SECIVIT, de poner en común los resultados de sus trabajos, y de hacer también partícipe a la población de los logros conseguidos que son, al fin y al cabo, los logros del sector agrario.

Espero y deseo que también disfruten de las bondades de esta Isla nuestra que, desde hoy, será también la suya.

Cordialmente,

Ricardo Melchior Navarro
Presidente del Cabildo de Tenerife



**NOVENA
REUNIÓN DE
LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA
DE CULTIVO
IN VITRO
DE TEJIDOS
VEGETALES**



26 - 29 de abril,
Hotel Botánico - Puerto de la Cruz
Tenerife - 2011
www.secivttenerife.com

ORGANIZA:



COMITÉ ORGANIZADOR

Presidenta **M^a. Teresa Cruz Bacallado**, CULTESA
Mónica Coig O´Donnell Cavallé, CULTESA
Belén Sosa Hernández, CULTESA
María Durban García, CULTESA
Leonardo Jesús Amador Díaz, CULTESA
Manuel Caballero Ruano, ICIA
Juan Bernardo Pérez Hernández, ICIA
Jua Felipe Pérez Francés, Universidad de La Laguna
Sebastiana Mederos Molina, Universidad de La Laguna
Rafael Robaina Romero, Universidad Las Palmas de Gran Canaria
Rafael Zárate Méndez, Cluster Biotifarm

COMITÉ CIENTÍFICO

Leonardo Jesús Amador Díaz, CULTESA
Antonio Ballester Álvarez-Pardiñas, IIAG-CSIC
Enric Melé Grau, IRTA
Vicente Moreno Ferrero, IBMPC - Universidad Politécnica Valencia
Juan Felipe Pérez Francés, Universidad de La Laguna
Juan Bernardo Pérez Hernández, ICIA
Fernando Pliego Alfaro, Universidad de Málaga
Mariano Toribio Iglesias, IMIDRA
Ana Vázquez López-Lomo, Univ. Complutense de Madrid
Rafael Zárate Méndez, Cluster Biotifarm

DIRECCIÓN

Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife S.A. (CULTESA)
Ctra. Prís Guayonje, 68 - 38350 Tacoronte - Tenerife





COLABORAN

Cabildo de Tenerife

Caja Canarias – Banca Cívica

Agromillora

Asaga

Asprocan

Ayuntamiento de Puerto de la Cruz

Ayuntamiento de Tacoronte

Biosigma

Canarias Explosivos

CULTESA

Jardín Botánico

Finca Savasa

Fundación Tenerife Rural

Laboratorio Fernández Rapado PQSA

Laboratorio Matachana SA

La Fast

Maresa

Millipores SAS

Teleférico Pico del Teide

Syservat

Universidad de La Laguna

Viceconsejería de Agricultura y Ganadería–Gobierno de Canarias



	Martes 26 de abril	Miércoles 27 de abril	Jueves 28 de abril	Viernes 29 de abril
08:00		SECRETARÍA TÉCNICA		
08:30		Entrega de documentación	SECRETARÍA TÉCNICA	
09:00		INAUGURACIÓN IX Reunión SeciTV	SESIÓN III Mod. Dr. Leandro Peña García Transformación genética Dr. Rob Dirks	
09:30		CONFERENCIA DE APERTURA Mod. M ^a Teresa Cruz Bacallado The last frontier of biotechnology: horticultural crops Prof. Richard E. Litz		
10:00			Pósters Sesión III	
10:30		CAFÉ		
11:00		SESIÓN I Mod. Dr. Enric Meli Grau Oportunidades de negocio en el cultivo in vitro Dr. Leonardo J. Amador Diaz Prof. Rafael Robalino Romero Dr. Guillermo García-Salvay Reina	CAFÉ	VISITA FINCA DE CULTIVOS TROPICALES CON PLANTAS PRODUCIDAS IN VITRO
11:30			MESA REDONDA Mod. Dr. Juan Bernardo Pérez Hernández Transgénicos Dr. Daniel Ramón Vidal Dra. Quima Messeguey Paypoch	
12:00		Pósters Sesión I		VISITA A CULTESA Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife
12:30		MESA REDONDA Mod. Dr. Antonio Ballester Álvarez-Pardinas Nomenclatura Dra. Aroeli Barroto Muñoz		
13:00			ALMUERZO	
13:30				
14:00				
14:30		ALMUERZO		
15:00				
15:30		SESIÓN II Mod. Prof. Fernando Pliego Alfaro Morfogénesis Prof. Carmen Díaz-Sala Galeano	SESIÓN EMPRESAS	
16:00			SESIÓN IV Mod. Prof. Juan Segura García del Río Cultivo in vitro aplicado a la mejora genética Dr. Benito José Pineda Chaza	
16:30		CAFÉ		
17:00	ENTREGA DE DOCUMENTACIÓN		CAFÉ	
17:30		Pósters Sesión II		
18:00	SECRETARÍA TÉCNICA		Pósters Sesión IV	
18:30		VISITA AL JARDÍN BOTÁNICO	Asamblea ordinaria SECIVTV	
19:00	HOTEL BOTÁNICO		Asamblea extraordinaria para el nombramiento de la nueva junta directiva de la SECIVTV	
19:30				
20:00		NOCHE LIBRE		
			CENA DE GALA RESTAURANTE LA GAÑANA	
21:00	CÓCTEL DE BIENVENDA			

PROGRAMA

Martes 26 de abril

16.00 – 20.00 h. Entrega de documentación

20.00 – 22.00 h. **CÓCTEL DE BIENVENIDA EN EL LAGO MARTIÁNEZ**
Gentileza del Ilmo. Ayuntamiento de Puerto de la Cruz

Miércoles 27 de abril

08.00 – 09.00 h. Entrega de documentación

09:00 – 09:30 h. **INAUGURACIÓN IX REUNIÓN**

09:30 – 10:30 h. **CONFERENCIA DE APERTURA**

Moderador: **M^a Teresa Cruz Bacallado**

Ponente: **Prof. Richard E. Litz**, Professor and Director Horticultural Sciences Tropical Center University of Florida

10:30 – 11:00 h. **Café**

11:00 – 12:30 h. **SESIÓN DE TRABAJO I**

OPORTUNIDADES DE NEGOCIO EN EL CULTIVO IN VITRO

Moderador: **Dr. Enric Melé Grau**, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)

Charla: **Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias**

Ponente: **Dr. Leonardo Jesús Amador Díaz**, Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife (CULTESA)

Charla: **Transferencia tecnológica en el cultivo in vitro de macrofitos marinos**

Ponente: **Prof. Rafael Robaina Romero**, Catedrático de Universidad, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

Charla: **Aplicaciones del cultivo in vitro de microalgas y cianobacterias**

Ponente: **Dr. Guillermo Garcia-Blairsy Reina**, Banco Nacional de Algas. Centro Biotecnología Marina, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria

12:30 – 13:00 h. **POSTERS SESIÓN TRABAJO I**



- 13:00 – 14:00 h. **MESA REDONDA: NOMENCLATURA**
Moderador: **Dr. Enric Melé Grau**, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
Charla: **Evolución de la terminología científica del cultivo in Vitro**
Ponente: **Dra. Araceli Barceló Muñoz**, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA)
- 14:00 – 15:30 h. **ALMUERZO**
- 15:30 – 16:30 h. **SESIÓN DE TRABAJO II - MORFOGÉNESIS**
Moderador: **Dr. Fernando Pliego Alfaro**, Universidad de Málaga
Charla: **Bases moleculares de la organogénesis in vitro.**
Ponente: **Prof. Carmen Díaz-Sala**, Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá de Henares
- 16:30 – 17:00 h. **CAFÉ**
- 17:00 – 18:00 h. **POSTERS SESIÓN TRABAJO II**
- 18:00 – 19:00 h. **Visita al Jardín Botánico**
- NOCHE LIBRE**

Jueves 28 de abril

- 09:00 – 10:00 h. **SESIÓN TRABAJO III - TRANSFORMACIÓN GENÉTICA**
Moderador: **Dr. Leandro Peña García**, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)
Charla: **GMO but not transgenic, the Reverse Breeding case: new possibilities for plant breeding**
Ponente: **Dr. Rob Dirks**, Adjunct Directeur R&D. Rijk Zwaan Breeding B.V.
- 10:00 – 11:00h **POSTERS SESIÓN TRABAJO III**
- 11:00 – 11:30 h. **Café**



- 11:30 – 13:30 h. **MESA REDONDA - TRANSGÉNICOS**
 Moderador: **Dr. Juan Bernardo Pérez Hernández**, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias (ICIA)
 Charla: **Percepción Social de la Biotecnología**
 Ponentes: **Dr. Daniel Ramón Vidal**, Consejero Delegado BIÓPOLIS, S.L.
Dra. Joaquina Messeguer Peypoch, Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA)
- 13:30 – 15:30 h. **Almuerzo**
- 15:30 – 16:00 h. **SESIÓN DE EMPRESAS**
- 16:00 – 17:00 h. **Sesión de Trabajo IV – CULTIVO IN VITRO APLICADO A LA MEJORA GENÉTICA**
 Moderador: **Dr. Juan Segura García del Río**, Universidad de Valencia
 Charla: **Técnicas de Cultivo in Vitro aplicadas a la Mejora Vegetal**
 Ponente: **Dr. Benito José Pineda**, IBMCP – Valencia
- 17:00 – 17:30 h. **Café**
- 17:30 – 18:30 h. **POSTERS SESIÓN TRABAJO IV**
- 18:30 h. **Asamblea ordinaria SECIVTV**
- 19:00 h. **Asamblea extraordinaria para el nombramiento de la nueva junta directiva de la SECIVTV**
- 21:00 h. **CENA DE GALA RESTAURANTE LA GAÑANÍA**
 Gentileza Excmo. Cabildo Insular de Tenerife

Viernes 29 de abril

- **Visita a finca de cultivos tropicales con plantas producidas in vitro**
- **Visita empresa Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife (CULTESA)**
- **Almuerzo en CULTESA**

Sábado 30 de abril

EXCURSIÓN PARQUE NACIONAL CAÑADAS DEL TEIDE



ÍNDICE DE RESUMENES

CA-I - CONFERENCIA DE APERTURA

Richard E. Litz

The Last Frontier of Biotechnology: Horticultural Crops

Sesiones de Trabajo

S I - OPORTUNIDADES DE NEGOCIO EN EL CULTIVO IN VITRO

S I-C01

García-Jiménez P, Zarranz -Elso M, Pérez Navarro E, Robaina RR

Transferencia tecnológica en el cultivo in vitro de macrófitos marinos

S I-C02

Leonardo Jesús Amador Díaz

Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias

S I-C03

Guillermo García-Blairsy Reina

Aplicaciones del cultivo in Vitro de microalgas y cianobacterias

S II - MORFOGÉNESIS

S II-C01

Dolores Abarca, Alberto Pizarro, Inmaculada Hernández, Elena Carneros, Silvia P. Solana, Alicia del Amo, Carmen Díaz-Sala

Bases Moleculares de la Organogénesis in vitro

S III - TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

S III-C01

Rob Dirks

GMO but not transgenic, the Reverse Breeding case: new possibilities for plant breeding

S IV - CULTIVO IN VITRO APLICADO A LA MEJORA GENÉTICA

S IV-C01

Benito José Pineda Chaza

Técnicas de Cultivo In Vitro aplicadas a la Mejora Vegetal

Mesa Redonda

MR-I NOMENCLATURA

Araceli Barceló Muñoz

Evolución de la terminología científica del cultivo in vitro

MR-II TRANSGÉNICOS

Daniel Ramón Vidal, Joaquina Messeguer Peypoch

Transgénicos y percepción social de la biotecnología

Sesión de Posters

S I - OPORTUNIDADES DE NEGOCIO EN EL CULTIVO IN VITRO

S I-PO1

Beatriz Cuenca, María Menéndez Gutiérrez, Antonio Ballester y Nieves Vidal

Producción a gran escala de *Castanea sativa* mediante micropropagación de yemas axilares en biorreactores de inmersión temporal

S I-PO2

Ana Carrasco, Jose Ignacio Ruiz de Galarreta y Patrick Riga

Obtención de minitubérculos de patata mediante cultivo aeropónico

S I-PO3

Amador, L.J., Díaz, C.E., Reina, M., González-Coloma, A. y Fraga, B.M.

Biotransformación de un sesquiterpeno africanano por el hongo *Mucor plumbeus*

S I-PO4

Amador, L.J., Díaz, C.E. y Fraga, B.M.

Quantificación del angelato de 8 β -hidroxi-african-4(5)-en-3-ona en el cultivo de raíces transformadas de *Senecio hermosae* (Asteraceae)

S I-PO5

Amador, L.J., Díaz, C.E., González-Coloma, A., Reina, M. y Fraga, B.M.

Metabolitos secundarios del cultivo de raíces transformadas de *Nepeta teydea* (Labiatae) con actividad insecticida

S II - MORFOGÉNESIS

S II-PO6

Mónica Coig-O'Donnell, María Durban, M^a Belén Sosa, M^a Teresa Cruz

Multiplificación de *Jatropha curcas* mediante micropropagación y enraizamiento de estaquillas



S II-P07

Patricia Corral-Martínez y José M. Seguí-Simarro

¿Por qué no es eficiente la obtención de doble haploides en tomate?

S II-P08

M^a Jesús Prado, Yosvanis Acanda, Manuel Rey

Efecto de los carbohidratos en la maduración de embriones somáticos de vid (*Vitis vinifera* L. cv Mencía)

S II-P09

Teresa Martínez, Ana María Vieitez, Rubén Mallón

Embriogénesis somática y regeneración de planta en *Quercus bicolor*. Importancia de las arabinogalactanoproteínas

S II-P10

Rubén Mallón, Purificación Covelo, Ana María Vieitez

Aplicación del sistema de inmersión temporal a la proliferación de embriones somáticos de *Quercus robur*

S II-P11

Elena Corredoira, Teresa Martínez, Antonio Ballester y Ana María Vieitez

Inducción de embriogénesis somática en *Quercus alba*

S II-P12

M^a Concepción Sánchez, Elena Corredoira, Laura V. Janeiro y M^a del Carmen San José

Efecto de los carbohidratos sobre la multiplicación in vitro del aliso

S II-P13

Ana María Ortuño, Licinio Díaz, F. Sánchez, I. Pérez y J.A. Del Río

Organogénesis en cultivo in vitro de *Limonium insigne*

S II-P14

M Dabauza, M Pazos-Navarro, E Correal, J Croser, MC Castello y D Real

Regeneración de plantas de *Bituminaria bituminosa* a partir de explantos de hoja

S II-P15

Juan Bernardo Pérez Hernández, María Teresa Cruz Bacallado, María Durbán García y Belén Sosa Hernández

Embriogénesis somática en platanera: nueva metodología para el establecimiento de suspensiones celulares y regeneración de plantas

S II-P16

Manuel Cantos, Juana Liñán, María del Carmen Giraldo, María del Mar Parra, José Luis García y Antonio Troncoso

Micropropagación de individuos seleccionados de *Prunus avium* en Andalucía a partir de semillas y embriones

S II-P17

M.Y. González-Padrón, J.C. Luis y F. Valdés

Introducción en cultivo in vitro de *Jatropha curcas* y diferencias en la micropropagación con benciladenina y kinetina

S II-P18

Patricia Corral, Rubén Mallón, Juan Rodríguez-Oubiña y María Luz González

Crioconservación y regeneración de ápices caulinares de *Crepis novoana*

S II-P19

E. Suárez Toste, J. A. Rodríguez Pérez , M. Carmen Alfayate y J. F. Pérez Francés

Efecto de diferentes pretratamientos sobre el desarrollo in vitro de yemas axilares en explantos multinodales de dos cultivares del género *Leucospermum* (Proteaceae).

S II-P20

María Teresa Cruz Bacallado, María Durbán García, Belén Sosa Hernández y Juan Bernardo Pérez Hernández

Incidencia de la variación somaclonal en platanera micropropagada por embriogénesis somática y por multiplicación de brotes

S II-P21

Padilla, I.M.G., Carmona-Martín, E., Westendorp, N. y Encina, C.L.

Método para la proliferación permanente de plantas de papaya (*Carica papaya* L.) en cultivos de larga duración

S II-P22

Vallés MP, Sánchez-Díaz RA, Muñoz-Amatriaín y Castillo AM

Identificación de mecanismos moleculares implicados en la embriogénesis de la microspora en cebada

S II-P23

Isabel Vidoy-Mercado, Araceli Barceló e Isabel MG Padilla

Micropropagación de *Lesquerella fendleri* L mediante organogénesis

S II-P24

Arancha Arbeloa, Wiem Elleuch, Pilar Andreu y Juan A. Marín

Organogénesis de brotes y raíces adventicias de higuera (*Ficus carica* L.). Influencia del tamaño de hoja

S II-P25

Sergio Cerezo, José A. Mercado y Fernando Pliego-Alfaro

Efecto del cultivo en medio líquido sobre la producción de embriones somáticos de olivo y su conversión en plantas



S II-P26

Miguel Blasco, Azahara Barra, Carmen Brisa, Juan Segura, Mariano Toribio e Isabel Arrillaga
Inducción de embriogénesis somática en amentos de encina (*Quercus ilex* L.)

S II-P27

Belén Tejedor, M^a Elena Aguilar, Vicente Moreno y Alejandro Atarés
Micropropagación de *Jatropha curcas* L.

S II-P28

Héctor Rodríguez-Sanz, M^a Carmen Risueño y Pilar S. Testillano
Localización in situ de auxinas endógenas durante la embriogénesis del polen inducida por estrés in vitro

S II-P29

Pilar S. Testillano, Mohammad Faisal, Héctor Rodríguez-Sanz, José Antonio Manzanera y M^a Carmen Risueño
Pollen and somatic embryogenesis in *Quercus suber*: searching for common markers and features in two in vitro embryo developmental pathways

S II-P30

Prem D, Bueno MA, Testillano PS y Risueño MC
Quantitative assessment of microspore switchover to embryogenic pathway in olive using fluorescence bioimaging and flow cytometry techniques

S II-P31

Fatiha Bradaï, Fernando Pliego-Alfaro y Carolina Sánchez-Romero
Análisis fenotípico de la estabilidad genética en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática

S III-TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

S III-P32

Elena Corredoira, Ana María Vieitez, y Antonio Ballester
Sobreexpresión en embriones somáticos de castaño del gen CsTL1 que codifica una taumatina

S III-P33

Nieves Vidal, Ana M. Vieitez y Rubén Mallón
Aplicación del Sistema de Inmersión Temporal a la transformación genética de embriones somáticos de *Quercus robur* L.

S III-P34

Inma Farran, Luis Larraya, Jon Carballeda, Ruth Sanz-Barrio, Alicia Fernández-San Millán y Jon Veramendi
Optimización de la transformación plastidial de patata (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*)

S III-P35

Carmen Fagoaga, Ana Redondo y Leandro Peña

Transformación genética de Citrange Carrizo adulto con un vector de transformación precursor de RNA interferente frente a GA20-oxidasa para tratar de conseguir portainjertos cítricos enanos

S III-P36

Laura Sanjurjo, José Ramón Vidal, Rubén Saporta, Antonio Segura y Francisco de la Torre

Estudio sobre el empleo del cassette mínimo para la transformación genética de vid (*Vitis vinifera*)

S III-P37

Palomo-Ríos, E., Pliego-Alfaro, F. y Mercado, J. A

Proteínas de fluorescencia como marcadores en la transformación genética de aguacate.

S III-P38

García-Almodovar, R.C.; Petri, C.; Padilla, I.M.G. and Burgos, L.

Cre-ating marker-free plants by combining site-specific recombination and the dao1 gene that allows both positive and negative selection

S III-P39

Nuria Alburquerque, César Petri, Lydia Faize y Lorenzo Burgos

El silenciamiento de dos oncogenes de *Agrobacterium tumefaciens* mediante un transgén quimérico de pequeño tamaño induce resistencia a la enfermedad de la agalla de corona

S III-P40

Ozuna C., Caballero L.. y Barro F.

Efecto del tratamiento osmótico sobre la embriogénesis, regeneración y obtención de plantas transgénicas de trigo

S III-P41

Pistón, F., Gil-Humanes, J., Tollefsen, S., Sollid, L.M. y Barro, F.

Silenciamiento de gliadinas de trigo relacionadas con la enfermedad celíaca mediante ARN de interferencia

S IV-CULTIVO IN VITRO APLICADO A LA MEJORA GENÉTICA

S IV-P42

Pablo Aleza, José Cuenca, José Juárez, José Antonio Pina, María Hernández, Carmen Ortega, Antonio Navarro, Violeta Ortega y Luis Navarro

Programa de obtención de híbridos triploides del IVIA

S IV-P43

Yosvanis Acanda, M^a Jesús Prado y Manuel Rey

Regeneración rápida de plantas de vid (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía) mediante la inducción de embriogénesis somática con TDZ en filamentos estaminales.



S IV-P44

Patricia Corral-Martínez y José M. Seguí-Simarro

Cultivo in vitro de microsporas aisladas de berenjena (*Solanum melongena*) para la obtención de individuos doble haploides

S IV-P45

Juan M. González, Rifka Hammami, Eva Frierio, Consuelo Soler y Nicolás Jouve

Cultivo in vitro y regeneración de plantas en tres citotipos de *Brachypodium*: influencia del genotipo y del medio de cultivo

S IV-P46

Carmen Martín y M. Elena González-Benito

Crioconservación y estabilidad genética de cultivos de ápices en especies con multiplicación vegetativa: el caso de menta y crisantemo

S IV-P47

Isabel Mendoza-Poudereux, Alicia Navarro, Jesús Muñoz-Bertomeu, Juan Segura e Isabel Arrillaga

Caracterización de descendencias de líneas transgénicas de espliego que sobreexpresan el gen de la enzima Linalol sintasa

S IV-P48

Arancha Gómez, Beatriz Pintos, Juan Antonio López, Emilio Camafeita, Nieves Sánchez y M^a Ángeles Bueno

Maduración de embriones somáticos de *Q. suber* L: proteínas implicadas

S IV-P49

Nieves Sánchez, Beatriz Pintos, Rafael Navarro, Arancha Gómez, Jesús Jorrín y M^a Ángeles Bueno

Haploides y doblehaploides para la mejora genética de *Q. ilex* L. obtenidos mediante cultivo in vitro

S IV-P50

Mercedes Dabauza, María Pazos-Navarro, David Walker, José Antonio del Río, Ana M. Ortuño y Enrique Correal

Efecto de la radiación UV sobre la producción de furanocumarinas en callos y plántulas de *Bituminaria bituminosa*

S IV-P51

Verónica Codesido, Silvia Valladares, Enrique Ferro, Carmen Díaz-Sala y Conchi Sánchez

Expresión del gen *CsERF1* en los procesos de embriogénesis somática y enraizamiento adventicio en castaño

S IV-P52

César Pérez-Ruiz, Emilia López-Solanilla, Nerea Larrañaga, Elizabeth Uberhuaga, Rosa Armijos, Eugenia Bolacel y [Santiago Moreno-Vázquez](#)

Desarrollo y evaluación de marcadores moleculares para bacterias contaminantes en cultivos in vitro de plantas.

S IV-P53

César Pérez Ruiz, Santiago Moreno-Vázquez, [Letícia Carvalho Benitez](#), Luciano Carlos da Maia, Luis Willian Pacheco Arge y Eugenia Jacira Bolacel Braga

Características morfológicas y moleculares de arroz en estrés salino

S IV-P54

María Lorena Fernández, Rubén Saporta, Laura Sanjurjo, Francisco de la Torre, Verónica Fernández, Antonio Segura, María Teresa Herrera y [José Ramón Vidal](#)

Estudio del cultivo de suspensiones celulares proembriogénicas de Albariño (Vitis vinifera) para una eficiente transformación genética y regeneración de plantas

S IV-P55

Isabel Imbroda, Isabel MG Padilla y [Araceli Barceló](#)

Conservación en frío de brotes micropropagados de olivo, cultivar “Arbequina”

S IV-P56

[Miguel-Apeles Díaz](#) y Juan-Bernardo Pérez

Amplificación de la respuesta embriogénica de suspensiones celulares de platanera

S IV-P57

[Elena García](#), Pilar Lorente, Juan A. Marín, Arancha Arbeloa y Pilar Andreu

Micropropagación e injerto in vitro de pistacho

S IV-P58

Jesús Alegre, David Medel, Mar Ruiz, Cristina Celestino, Luis Gil y [Mariano Toribio](#)

Micropropagación y conservación ex situ de germoplasma de los olmos singulares de la Comunidad de Madrid

S IV-P59

[Azahara Barra](#), Miquel Blasco, Mar Ruiz, Cristina Celestino, Jesús Alegre, Isabel Arrillaga y Mariano Toribio

Inducción de embriogénesis somática y establecimiento en medio líquido de líneas embriogénicas obtenidas de óvulos en desarrollo de encina

S IV-P60

[María Luisa González-Castañón](#)

Micropropagación de *Asparagus prostratus* mediante la inducción de yemas adventicias sobre yemas axilares cultivadas in vitro



S IV-P61

Alicia Navarro-Marín, Miquel Blasco, Carmen Brisa, Juan Segura e Isabel Arrillaga
Influencia de los reguladores de crecimiento y la temperatura durante el proceso embriogénico en *Pinus pinaster*

S IV-P62

Eva Guzmán García y Carolina Sánchez Romero
Evaluación de la aplicabilidad de un método de crioconservación a la embriogénesis somática de aguacate

S IV-P63

Eva Guzmán García y Carolina Sánchez Romero
Efecto de un precultivo con sacarosa en la crioconservación de cultivos embriogénicos de aguacate

S IV-P64

Juan A. Marín, Manel Boudabous, Pilar Lorente, Elena García, Pilar Andreu y Arancha Arbeloa
Eliminación de una contaminación bacteriana endógena en el cultivo in vitro de brotes de la variedad de manzano Douce de Djërba

S IV-P65

Benito Pineda, Teresa Antón, Begoña García-Sogo, Alejandro Atarés, Peter Schleicher, Juan Francisco Campos, Belén Morales, Manuel García, Fernando Pérez, Trinidad Angosto, Rafael Lozano, M^a Carmen Bolarín y Vicente Moreno
***Solanum lycopersicum* salt sensitive - 8, un mutante insercional de tomate con una elevada hipersensibilidad a estrés salino**

S IV-P66

Teresa Antón, Benito Pineda, Estela Giménez-Caminero, Juan Capel, Alejandro Atarés, Fernando Pérez-Martín, Begoña García-Sogo, Rafael Lozano, Vicente Moreno y Trinidad Angosto
Arlequín, un mutante insercional de tomate que desarrolla frutos de mayor calidad nutricional

S IV-P67

Geraldine Goergen, Benito Pineda, Alejandro Atarés, Begoña García-Sogo, Teresa Antón, Sibilla Sánchez, Manuel García, Juan Capel, Rafael Lozano y Vicente Moreno
Identificación y caracterización de SI fruit size -12: un mutante de tomate con mayor calibre de fruto

S IV-P68

M. Polifrone, F. Amil Ruiz, R. Blanco Portales, J. Muñoz Blanco y J.L. Caballero
Estudio de resistencia inducida por productos a base de algas (gama ALGACAN) en líneas celulares vegetales y ensayos en cultivos de tomate



CONFERENCIA DE APERTURA



THE LAST FRONTIER OF BIOTECHNOLOGY: HORTICULTURAL CROPS

Richard E. Litz

Tropical Research & Education Center and IFAS Center for Tropical Agriculture,
University of Florida, 18905 SW 280 Street, Homestead FL USA 33031-3360

Few groups of crop species have profited so little from conventional plant breeding as the tree fruits. With very few exceptions, the major fruit cultivars of the twentieth century were selected in previous centuries either as outstanding dooryard trees or otherwise as openly pollinated seedling trees. When the potential of genetic transformation became apparent some thirty years ago at the birth of the biotechnology revolution, it was immediately obvious that woody perennial crop species would possibly benefit more from this new technology than any other group of crop plants. Indeed, some of the very earliest classical works in the cell culture field had been concerned with tree species [1,2]. Although there has been impressive subsequent work involving biotechnology of horticultural tree crop species, sadly our hopes have not been realized, and we continue to await the imminent breakthroughs for almost every tree fruit species. How must we interpret the slow pace of innovation? What has gone wrong? Where can we place the blame? We can all agree that the science continues to be held back by the lack of conventional genetic studies with many species, to say nothing of genomics studies. Certainly, we have been underfunded by government agencies, which have been hesitant to support this work with specialty crops and by grower groups, which have tended to look askance at biotechnology unless other strategies to resolve breeding and production problems have failed. Very important, though, I believe we have been impatient to be at the forefront of emerging biotechnologies. In our struggle to remain competitive with advances involving biotechnology of agronomic and horticultural field crops we have failed to invest time and energy into basic cell culture studies, i.e., basic and efficient regeneration pathways from mature phase materials. As a result, many of us have fallen behind and we must struggle now to proclaim the relevance of our work.

References

LaRue, C.D. 1954. Studies on growth and regeneration in gametophytes and sporophytes of gymnosperms. Brookhaven Symp. Biol. 6: 187-208.

Stevenson, F.F. 1956. The behavior of Citrus tissues and embryos in vitro. Ph.D. dissertation, University of Michigan, Ann Arbor.

Acknowledgements

Raymond Schnell, USDA ARS, Subtropical Horticultural Research Station, Miami FL





SESIONES DE TRABAJO

S I - OPORTUNIDADES DE NEGOCIO EN EL CULTIVO IN VITRO

TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA EN EL CULTIVO IN VITRO DE MACRÓFITOS MARINOS

García-Jimenez P, Zarranz –Elsa M, Pérez Navarro E, Robaina RR

Departamento de Biología.Facultad de Ciencias del Mar. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
rrobaina@dbio.ulpgc.es

Las fanerógamas forman comunidades o pastos marinos que definen ecosistemas, cuyo estado de salud se asocia a la calidad de las aguas litorales, ya que son un lugar adecuado para la puesta, la fijación y el desarrollo de un número elevado de invertebrados, especies algales y peces, al tiempo que impidien, con sus raíces, cambios bruscos en el sedimento por efecto de la erosión.

En los últimos años se ha observado que las actividades humanas en el litoral amenazan a las comunidades de fanerógamas, lo que lleva a la regresión de estos ecosistemas. y al detrimento de la calidad de sus aguas. Estas alteraciones ambientales preocupan a los sectores más implicados en la acción directa sobre el litoral (grandes constructoras) y responsables de estos espacios (instituciones locales). Los trabajos de trasplantes no siempre han producido los resultados esperados, ante la imposibilidad de encontrar una población donadora adecuada, un método de trasplante efectivo o sencillamente, la reducida supervivencia de los explantos. Se ha pensado en la micropropagación de estas especies como vía de aumentar la producción vegetal para ser utilizada en trabajos de restauración.

En este trabajo presentamos los avances obtenidos en la micropropagación de dos especies: **Posidonia oceanica** (L.) y *Cymodocea nodosa* (Uchria) Ascherson. En el primer caso, los trabajos, realizados por encargo de la empresa TRAGSA, han permitido la invención "Método de cultivo in vitro de plantas fanerógamas marinas" (Reg. OEPM 07/05/2010), en el caso de **C. nodosa**, la invención ES2338968. En ambos se ha intentado la vía de propagación a partir del establecimiento de cultivos celulares, obteniéndose resultados que han mejorado los esfuerzos realizados hasta la fecha, en los que escasamente se habían pasado del estadio de puesta en cultivo aséptico de explantos (Jewett – Smith y McMillan, 1990; Koch & Durako, 1991, Jones & Ellender, 1991, Ellender, 1991; Bird et al. 1993, García-Jiménez et al. 2006)

Referencias

- Bird, K.T., Cody B.R., Jewett-Smith J, and Kane, M.E. 1993. Salinity effects on *Ruppia maritima* L. Cultured in vitro. Bot. Mar. (36): 23-28.
- García-Jiménez P, Navarro E.P, Santana C.H, Luque A. and Robaina R. (2006). Anatomical and nutritional requirements for induction and sustained growth in vitro of *Cymodocea nodosa* (Uchria) Ascherson. Aquatic Botany 84: 79-8
- Jewett-Smith J. and McMillan C. 1990. Germination and seedling development of **Halophila engelmannii** Aschers. under axenic conditions. Aquat. Bot.36: 167-177.
- Jones J.I. and Ellender R.D. 1991. Initiation of callus cultures and plantlet regeneration from seagrasses and marine coastal plants. University of Southern Missisipi Pub. 119 p.
- Koch E.W. and Durako M.J. 1991. In vitro studies of the submerged angiosperm **Ruppia maritima**: auxin and cytokinin effects on plant growth and development. Mar. Biol. 110: 1-6.



ESTUDIO FITOQUÍMICO DE RAÍCES TRANSFORMADAS GENÉTICAMENTE DE PLANTAS CANARIAS

Leonardo Jesús Amador Díaz

Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC. Avda. Astrofísico Fco. Sánchez 3, 38206.Tenerife

Las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución una amplia diversidad de metabolitos secundarios, a menudo con estructuras químicas muy complejas, que juegan un papel importante en su interacción con el medio ambiente y otros organismos. Además de la importancia para la planta, estos productos naturales se están utilizando en los últimos años como una fuente general de diversidad química para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica en muchas compañías farmacéuticas y agroquímicas, lo que representa un enorme valor desde el punto de vista económico.

El potencial de las plantas para descubrir nuevos compuestos con nuevas actividades biológicas es enorme, si tenemos en cuenta que sólo el 10% aproximadamente de las especies conocidas de plantas han sido objeto de algún estudio fitoquímico. A pesar de todo lo investigado hasta el momento, las plantas representan una "herencia verde" y constituyen un recurso que permanece prácticamente sin explorar para la búsqueda de nuevas sustancias potencialmente útiles.

Sin embargo, un factor importante para el descubrimiento de estos compuestos es la fuente del material vegetal de partida. Así, por ejemplo, las raíces de las plantas tienen la capacidad de sintetizar una notable diversidad de metabolitos secundarios. Quizá los ejemplos más destacados de la diversidad química que muestran las raíces vienen de su uso para obtener una amplia variedad de productos que se emplean como medicinas, agroquímicos, tintes, condimentos, fragancias, etc. Sin embargo, las raíces constituyen desde el punto de vista fitoquímico una reserva biológica inexplorada, debido a su crecimiento lento y difícil recolección.

Una de las razones de la poca atención que se ha dado a la biosíntesis de los compuestos que se acumulan en las raíces, en comparación con los encontrados en otros órganos de la planta, se debe principalmente a su crecimiento subterráneo (implica mayores dificultades técnicas para su estudio) y a la falta de un sistema experimental adecuado. En la búsqueda de alternativas para su estudio, las técnicas biotecnológicas como los cultivos de raíces transformadas genéticamente con **Agrobacterium rhizogenes**, se utilizan como sistema experimental para el estudio del metabolismo específico de la raíz. Por otra parte, constituyen una técnica eficiente para analizar y producir metabolitos secundarios que se biosintetizan normalmente en las raíces de plantas diferenciadas.

La capacidad de crecimiento de estos cultivos, su estabilidad genética y biosintética, su facilidad de mantenimiento y la capacidad para sintetizar un amplio espectro de compuestos químicos, hacen que los cultivos de raíces transformadas se presenten como una tecnología atractiva para la producción de metabolitos secundarios de las raíces de plantas [Nadia *et al.*, 2010; Mehrotra *et al.*, 2010]. En los últimos 10-15 años se han descrito en la literatura científica, como fuente de productos naturales, cultivos de raíces transformadas de aproximadamente doscientas especies de plantas en las que se puede observar un amplio rango de capacidades biosintéticas.

Aprovechando el potencial fitoquímico que representa la biodiversidad botánica del archipiélago canario, en esta presentación se exponen los resultados obtenidos del estudio fitoquímico de las raíces transformadas de dos endemismos canarios protegidos, **Senecio hermosae** (Asteraceae) y **Nepeta teydea** (Labiatae), de donde se han aislado e identificado sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, compuestos aromáticos y alcaloides pirrolizidínicos. Con la intención de obtener información acerca del potencial biológico de las raíces transformadas de estos endemismos, se presentan los resultados de actividad bioplaguicida (antialimentaria, tóxica, citotóxica y fitotóxica) de estos compuestos [Amador, 2010].

Referencias

Mehrotra, S., Rahman, L.U., Kukreja, A.K. (2010) *Biotechnology and Applied Biochemistry* 56, 161.

Nadia, N.O., Li, T. (2010) *Plant Science* 180, 439.

Amador, L. J. (2010) **Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias**. Premio de Investigación Agustín de Bethencourt 2008. Servicio de publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias. Depósito legal: TF-2162/2010. ISBN: 978-84-7985-334-1. pp. 1-300.





SESIONES DE TRABAJO

S II - MORFOGÉNESIS

BASES MOLECULARES DE LA ORGANOGÉNESIS IN VITRO

Dolores Abarca, Alberto Pizarro, Inmaculada Hernández, Elena Carneros, Silvia P. Solana, Alicia del Amo, Carmen Díaz-Sala

Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares. Madrid.

En plantas, la posibilidad de inducir la formación de raíces, tallos o embriones de forma adventicia a partir de células somáticas adultas se conoce desde hace años y, además de poner de manifiesto la plasticidad del desarrollo vegetal, ha sido explotada en horticultura, agricultura y en el ámbito forestal. En general, la inducción de organogénesis adventicia se produce directamente a partir de determinados tipos celulares o indirectamente a partir de una masa de callo. Además, existe una ventana durante el desarrollo en la que la pluripotencia se restablece fácilmente, siendo la capacidad de regeneración más alta durante las etapas tempranas del mismo. En especies forestales, una pérdida de competencia para regenerar órganos y embriones está asociada a la edad y madurez del árbol. El conocimiento de los mecanismos involucrados en la reprogramación celular, que permite a células diferenciadas adquirir atributos pluripotentes de células troncales, dividirse y originar nuevos órganos, ayudará a entender cómo se fijan los destinos celulares, y cómo las células vegetales retienen la capacidad de manifestar plasticidad de desarrollo bajo condiciones de cultivo específicas. La inducción de organogénesis adventicia se ha asociado tradicionalmente a la concentración y balance de reguladores de desarrollo, especialmente auxinas y citoquininas, y a la capacidad celular para reactivar el ciclo de división. Sin embargo, el establecimiento de gradientes hormonales que conllevan patrones específicos de distribución espacio-temporal y el establecimiento de dominios de expresión génica son también importantes. Además, la capacidad celular para reactivar el ciclo de división por sí misma no es suficiente para reprogramar estados celulares específicos, y la reprogramación puede ocurrir antes de las primeras divisiones celulares o después de varios ciclos de división celular. Cambios en los destinos celulares están asociados a cambios en el programa de expresión génica específico de una célula somática adulta y a la inducción de un patrón de expresión que determina un nuevo destino celular. Por tanto, el estudio de los mecanismos involucrados en la reprogramación del patrón de expresión génica, especialmente de genes de estadios tempranos del desarrollo, es crucial para entender la plasticidad celular. Otros factores como el estado de la cromatina y los mecanismos epigenéticos involucrados en la manifestación de una arquitectura nuclear específica son importantes ya que favorecen cambios de expresión génica dependiente del tejido, de la posición y del estado de desarrollo. La caracterización molecular de vías de desarrollo en *Arabidopsis*, la secuenciación de varios genomas y la disponibilidad de herramientas genómicas en varias especies vegetales, incluidas especies forestales, han supuesto un avance importante para el estudio de genes reguladores involucrados en procesos de regeneración.





SESIONES DE TRABAJO

S III - TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

GMO BUT NOT TRANSGENIC, THE REVERSE BREEDING CASE: NEW POSSIBILITIES FOR PLANT BREEDING

Rob Dirks

Rijk Zwaan Breeding BV
Fijnaart, The Netherlands

Reverse Breeding is a new tool for plant genetics and breeding that combines Genetic Engineering, Doubled Haploid Technology and Molecular Marker Technology. Expression of (a) key-gene(s) during meiotic recombination is attenuated by a chimaeric transgene, which results in a-synapsis and a loss of homologous recombination. The induced anomaly causes the formation of spores that are predominantly aneuploid. Just by chance, some spores do contain a normal euploid set of chromosomes and with DH technology, such spores can be induced to undergo division, embryogenesis, and finally be regenerated into plants. Reverse Breeding allows reconstruction of phenotypes with previously unknown genetic make-up and therefore resembles apomixis but it also produces chromosome substitution lines. Most importantly, Reverse Breeding allows breeding per chromosome, which is a major step forward in breeding by genetics and map-based breeding.

Primary transformants are selected that contain only one copy of the transgene. This means that half of the spore population that was formed without recombination is free from the transgene.

In spite of the absence of a transgene, such regenerants and the crosses with such lines, are considered GMO's in Europe. In the US such plants are not GMO's. There is a considerable difference in viewpoint between the different legislations.





SESIONES DE TRABAJO

S IV - CULTIVO IN VITRO APLICADO A LA MEJORA GENÉTICA

TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO APLICADAS A LA MEJORA VEGETAL

Benito José Pineda Chaza

Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

El cultivo **in vitro** ha adquirido a lo largo de los años una enorme importancia en el ámbito de la mejora vegetal. El mejorador de plantas dispone ahora de una serie de herramientas que le permiten conseguir logros que resultan imposibles de ejecutar a través de métodos convencionales y avanzar con mucha mayor rapidez en sus programas de mejora. El principio en el que se basa el cultivo **in vitro**, al igual que todas las aplicaciones de mejora que de él se derivan, estriba en la totipotencia de las células vegetales, es decir, en la capacidad que tienen las células para regenerar plantas enteras (Moreno, 1997).

Conviene indicar que la regeneración de plantas a partir de células cultivadas **in vitro** (es decir, la morfogénesis **in vitro**) se puede producir por dos vías alternativas: directa o indirecta. En el primer caso, la regeneración se produce a partir de células sin pasar por una fase de callo (morfogénesis directa), o en todo caso por una fase de callo muy reducida (morfogénesis casi directa). En el segundo, la morfogénesis se verifica en dos fases: en la primera se induce una desorganización celular, lo que genera un callo desorganizado y en la segunda se produce una reorganización celular que da lugar a estructuras organizadas. La clave es que estos dos procesos morfogénicos tienen aplicaciones diferentes desde un punto de vista de mejora.

Típicamente, en los procesos de morfogénesis directa la consecuencia es la estabilidad, es decir, lo que cabe esperar es que no haya variación genética. De resultados de este tipo de morfogénesis se derivan una serie de aplicaciones entre las que cabe destacar la propagación clonal de genotipos seleccionados o, en un sentido más amplio, la reproducción vegetativa en masa de estos genotipos así como el saneamiento del material vegetal a partir del cultivo de meristemos o del microinjerto.

En cambio, cuando la morfogénesis es indirecta, cabe esperar que haya una cierta variación genética entre las plantas regeneradas. Esto nos lleva al concepto de variación somaclonal o variación genética que surge como consecuencia del cultivo **in vitro**, dando pie, en términos de mejora, al aprovechamiento de la variación intraespecífica.

Por otro lado, la regeneración de plantas a partir de protoplastos ha propiciado el desarrollo de métodos de hibridación celular somática. La fusión entre protoplastos de diferentes especies ha posibilitado establecer cruces más amplios superando las barreras de incompatibilidad sexual existentes, lo que hace factible el planteamiento de programas de mejora basados en el aprovechamiento de la variación extraespecífica. En este campo de investigación conviene mencionar la hibridación, habida cuenta de las numerosas aplicaciones que ofrece esta técnica en el terreno de la mejora vegetal.

La regeneración de plantas haploides a partir de gametos es otra de las aplicaciones del cultivo **in vitro** que está teniendo un gran impacto en los programas de mejora, toda vez que permite la rápida obtención de líneas puras (dobles haploides) en tan sólo dos pasos mediante el método haplo-diploide.

Por último, los métodos de transformación genética permiten transferir de forma controlada genes candidatos o alterar la expresión de genes endógenos (mutagénesis insercional) y, en consecuencia, introducir nuevos caracteres o modificar los existentes en cultivares o líneas élite sin que, básicamente, quede alterado el fondo genético responsable de sus buenas características agronómicas.

En definitiva, la tecnología del cultivo **in vitro** ofrece una amplia gama de posibilidades en la investigación aplicada, sobre todo desde el punto de vista de la producción y de la mejora vegetal.

Referencias

Moreno V (1997). La selección somaclonal, una alternativa biotecnológica para la mejora de plantas ornamentales. En Biotecnología y Agricultura: Las Plantas del Futuro. Fundación Bancaja [Ed.], pp 59-96.

Agradecimientos

Proyecto MCYT / FEDER AGL2009-13388-C03





MESAS REDONDAS

MR-I NOMENCLATURA

EVOLUCIÓN DE LA TERMINOLOGÍA CIENTÍFICA DEL CULTIVO IN VITRO

Araceli Barceló Muñoz

IFAPA Cortijo de la Cruz s/n Churriana 29140 Málaga
araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

Aunque no es necesario señalar la importancia de la terminología científica, sí es preciso resaltar que, debido a la creciente interdisciplinariedad de las ciencias experimentales, cada vez cobra más importancia disponer de una terminología científica sistemática y organizada, que elimine posibles ambigüedades y homogeneice las designaciones que se dan a los conceptos que pertenecen a varias disciplinas.

Debemos preguntarnos si la terminología empleada actualmente en el cultivo **in vitro** es clara y homogénea. Debemos preguntarnos, asimismo, si esa terminología ha evolucionado en los últimos años. Y en cada uno de los casos, si esa evolución se ha debido a la adecuación de los términos al uso que actualmente se les da, o al mal uso de los mismos.

Finalmente, debemos plantearnos si es necesario normalizar esta terminología, y cuáles serían los cauces para hacerlo.

Referencias

Cabré Castellví, M.T. 1993: La Terminología: Teoría, metodología, aplicaciones. Barcelona: Ed. Antártida.



MESAS REDONDAS

MR-II MORFOGÉNESIS

TRANSGÉNICOS Y PERCEPCIÓN SOCIAL DE LA BIOTECNOLOGÍA

Daniel Ramón Vidal ⁽¹⁾ y Joaquina Messeguer Peypoch ⁽²⁾

⁽¹⁾ Biopolis S.L. Polígono La Coma s/n 46 980 Paterna (Valencia)

⁽²⁾ IRTA. Centro de Cabrils. Carretera de Cabrils s/n 08348 (Barcelona)

A escala mundial, la superficie cultivada con OGMs ha ido aumentando cada año, llegando en el 2010 a los 134 millones de Ha localizadas en 25 países diferentes. El 90% de los 14 millones de agricultores que cultivan OGMs son pequeños agricultores que viven en países en desarrollo, lo que demuestra una progresiva aceptación de este tipo de cultivos por parte de este sector. En Europa, existe un ambiente hostil hacia los transgénicos de tal manera que se regula muy restrictivamente su cultivo pero no tanto la importación. Actualmente hay solamente 100000 Ha cultivadas con maíz transgénico en Europa y la mayor proporción de esta cifra se planta en España.

La percepción negativa de los consumidores europeos hacia estos productos está incrementada por una intensa campaña en contra de su comercialización abanderada por determinadas organizaciones ecologistas. Su mensaje es claro: los OGM son un riesgo para la salud de los consumidores y para el medio ambiente. ¿Qué hay de cierto en todo ello? La respuesta es más bien poco. De hecho, son los alimentos y cultivos más evaluados en toda la historia de la agroalimentación y estas evaluaciones se han hecho durante años antes de conceder su permiso de comercialización. Dichas evaluaciones afectan a su seguridad alimentaria y a su riesgo ambiental y cuestan muchos años de trabajo (entre 5 y 10) y muchos millones de euros.

En cuanto a la seguridad alimentaria, se siguen los criterios establecidos en su día por la FAO y OMS. Con ellos es necesario evaluar en cada nuevo alimento transgénico su composición nutricional, su posible alergenicidad y su posible toxicidad. Todos los alimentos transgénicos comercializados hasta la fecha han pasado estas evaluaciones, lo que les convierte en un paradigma de cómo debería evaluarse la seguridad alimentaria de los nuevos alimentos. A pesar de todas las noticias en medios de comunicación que ligan consumo de OGM a apariciones de alergias, resistencias a antibióticos, problemas inmunitarios e, incluso, apariciones de ciertos tipos de cánceres, no existe un solo dato científico que apoye estas tesis, sino justo las contrarias. Existen centenares de informes rigurosos accesibles en las páginas web de las agencias evaluadoras (por ejemplo EFSA o FDA) que así lo atestiguan, como existen ya centenares de artículos en revistas científicas que muestran los datos de dichas evaluaciones.

En cuanto al riesgo ambiental, se habla con frecuencia de la transferencia de genes, el descenso de la biodiversidad y el riesgo de afectar, en el caso de las plantas transgénicas resistentes a plagas, organismos distintos de la plaga diana. En realidad estos riesgos son los mismos que tienen las plantas convencionales en los que su frecuencia de aparición es idéntica a la detectada en los transgénicos.

Un caso muy especial ligado al cultivo de OGM es el llamado concepto de coexistencia, definido como el derecho que tienen los agricultores de cultivar lo que quieran, ya sea transgénico, convencional o ecológico. Muy ligado a este concepto está el de la trazabilidad y etiquetado. La UE marca que si un producto tiene un contenido de OGM superior al 0.9% debe etiquetarse como transgénico. Por tanto debe evitarse la presencia accidental de transgénico en el convencional estableciendo normas de coexistencia durante el cultivo. Además de la pureza de las semillas, limpieza de maquinaria, etc, las medidas más frecuentes para garantizar la coexistencia son las distancia de seguridad, zonas tampón o separación de las fechas de siembra y floración para evitar la presencia de transgénico debido a la polinización cruzada.

El equipo del IRTA firmante de esta comunicación ha estado siguiendo durante estos últimos 8 años esta problemática en Catalunya y hemos podido ordenar por importancia los factores que influyen en el flujo de genes. Además, hemos podido constatar que el 87% de los agricultores de la zona de Foixa utilizan los dos tipos de maíz, transgénico y convencional; un 12 % utiliza solamente convencional y un 1% utiliza solamente transgénico. Estos datos por sí solos ya reflejan la buena aceptación que tiene el maíz transgénico en la zona estudiada.



SESIONES DE POSTERS

S I - OPORTUNIDADES DE NEGOCIO EN EL CULTIVO IN VITRO

PRODUCCIÓN A GRAN ESCALA DE CASTAÑA SATIVA MEDIANTE MICROPROPAGACIÓN DE YEMAS AXILARES EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL

Beatriz Cuenca¹, María Menéndez Gutiérrez¹, Antonio Ballester² y Nieves Vidal²

¹ TRAGSA. Dpto de Mejora Agroforestal. Crta. Maceda-Valdrey km 2. 32700 Maceda. Ourense. ²Dpto. Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña.

E-mail: bcuenca@tragsa.es

Este trabajo presenta la micropropogación **in vitro** a gran escala de clones seleccionados de castaño mediante el cultivo de yemas axilares en biorreactores de inmersión temporal (IT) con el doble objetivo de reducir los costes de producción y mejorar la calidad de la planta para facilitar su aclimatación.

Se han utilizado 2 tipos de biorreactores: reactores comerciales RITA® y reactores diseñados y construidos en el departamento de Mejora Agroforestal de TRAGSA para cultivar mayor cantidad de material vegetal.

En el caso de los reactores RITA® se han utilizado 2 clones de castaño en los que se han estudiado los siguientes parámetros: tipo de explanto inicial (segmentos apicales o nodales y la longitud de los mismos), n° de explantos por reactor, reguladores de crecimiento, n° de inmersiones diarias y diferentes soportes para los explantos. Dichos parámetros han sido evaluados en función del aspecto de los brotes obtenidos, su capacidad de multiplicación y los pesos fresco y seco. Además se han realizado ensayos de enraizamiento.

En el caso de los bioreactores construidos por TRAGSA, los experimentos se han centrado en determinar el diseño más adecuado en cuanto a forma, volumen y sustrato soporte, estandarizando el resto de los parámetros: medio y tipo de explantos habituales en el cultivo **in vitro** comercial de esta especie (cultivo de segmentos internodales en medio de Greshoff y Doy adicionado con BAP 0,1 mg/l), un sólo clon en cultivo y 3 inmersiones de 3 minutos y 6 ventilaciones de 1 min para todos los recipientes de cultivo.

Los resultados obtenidos por el momento revelan el potencial del cultivo de castaño en reactores RITA®, si bien es necesario ajustar las condiciones del cultivo para evitar la hiperhidricidad de los brotes resultantes. El parámetro más determinante en este sentido es la utilización de un soporte inerte (dados de lana de vidrio, por ejemplo) en lugar de disponer directamente los explantos sobre el cestillo del reactor, así como disminuir la concentración de N₆benzyl adenina (BA) con respecto al cultivo tradicional en medio semisólido. Para maximizar el rendimiento (número y la longitud de los brotes obtenidos, así como peso fresco y seco), parece adecuado utilizar como explantos iniciales tanto segmentos apicales como nodales de no más de 1 cm de longitud, y someterlos al menos a 2 inmersiones diarias de 1 minuto de duración, si bien resultados preliminares indican que la proliferación del cultivo podría incrementarse con el número de inmersiones sin causar por ello mayor hiperhidricidad en los brotes. Por otra parte, los ensayos de enraizamiento realizados hasta el momento muestran que el porcentaje de enraizamiento de los brotes procedentes de inmersión temporal es ligeramente superior al de los brotes procedentes de medio semisólido gelificado con agar.

Respecto a los bioreactores de diseño propio, los factores limitantes han sido la contaminación y la hiperhidricidad en todos los casos. El mayor volumen de los recipientes de cultivo (2, 5 y 10 l) complica la manipulación incrementando la incidencia de contaminación. La hiperhidricidad es generalizada, si bien los envases con dados de lana de roca como soporte presentan menor incidencia de hiperhidricidad y un mejor aspecto general. Los envases de mayor capacidad producen un mayor número de brotes por explanto pero de menor longitud (no enraizables) y aspecto menos saludable. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren la posibilidad de emplear grandes volúmenes para maximizar el número de explantos en multiplicación y posteriormente transferir esos explantos a bioreactores de menor volumen, con soporte de lana de roca para obtener explantos enraizables.

Esta investigación ha sido financiada parcialmente por la Xunta de Galicia (O9MRUO16E).

OBTENCIÓN DE MINITUBÉRCULOS DE PATATA MEDIANTE CULTIVO AEROPÓNICO

Ana Carrasco¹, Jose Ignacio Ruiz de Galarreta² y Patrick Riga³

¹NEWCO Sociedad para la Transferencia de Tecnología en Patata, S.L. Granja Modelo de Arkaute. 01192 Vitoria-Gasteiz.

²Neiker Tecnalia. Centro de Arkaute. Apdo 46. 01080 Vitoria-Gasteiz.
E-mail: jiruiz@neiker.net

³Neiker Tecnalia. Centro de Derio. Parque Tecnológico de Zamudio. 48160 Derio (Vizcaya)

La producción de semilla prebase de patata (*Solanum tuberosum* L.) es prácticamente inexistente en España ya que implica abordar desde el inicio, el esquema de producción de patata siembra para lo cual se requiere cierta base tecnológica. En este contexto, Newco Sociedad para la Transferencia de Tecnología en Patata S.L., en colaboración de Neiker-Tecnalia, plantearon la optimización de los procesos de producción de semilla prebase. El inicio de dicho proceso en patata se basa en el cultivo de tejidos, e implica la multiplicación *in vitro* de plantas-madre libres de virus y su posterior cultivo en condiciones asépticas para la producción de minitubérculos que se homologan a la generación G-2 del sistema de selección genealógica. Sin embargo, la producción de semilla G-2 mediante métodos convencionales de multiplicación *in vitro* y posterior cultivo de las vitroplantas en sustrato, es muy laborioso y con un coste de producción muy elevado, debido al bajo número de tubérculos producidos por planta y la incidencia de enfermedades del suelo. Para optimizar el proceso de obtención de minitubérculos, NEIKER Tecnalia había realizado estudios previos, comparando aeroponía e hidroponía, pero a nivel piloto. (Ritter et al., 2001)

La aeroponía es una alternativa que permite el crecimiento de las plantas en el aire gracias a aplicaciones periódicas de nutrientes nebulizados al sistema radicular. Para el presente trabajo se emplearon las variedades Agria, Baraka, Gorbea, Harana, Jaerla, Kennebec, Leire y Zorba, evaluando además de la producción de minitubérculos en aeroponía, la producción en campo a partir de los obtenidos aeropónicamente. El método se inició con la introducción *in vitro* de las variedades y generación de núcleos iniciales para su micropropagación. Posteriormente, se procedió al repicado de las mismas mediante explantos. La pre-aclimatación de las vitroplantas se realizó en cámaras húmedas con solución nutritiva y pequeñas perforaciones que facilitaron el intercambio gaseoso. La aclimatación posterior de las microplántulas se llevó a cabo en invernadero en condiciones controladas

Todas las variedades se adaptaron perfectamente al cultivo aeropónico, obteniéndose unas tasas de supervivencia muy elevadas. Se desarrollaron numerosos estolones y la formación de minitubérculos fue completamente normal con ausencia de enfermedades, siendo cosechados periódicamente y en función del tamaño deseado. En todos los casos los índices de multiplicación superaron ampliamente los obtenidos en producción convencional. En algunas variedades como Jaerla, Kennebec, Leire y Zorba, las tasas de obtención de minitubérculos por planta se incrementaron hasta 10 veces frente a la producción en turba. La plantación en campo de los minitubérculos obtenidos en este sustrato y los producidos en condiciones aeropónicas no mostraron diferencias significativas respecto a la producción por planta.

De los resultados obtenidos se desprende que el cultivo aeropónico es una alternativa muy eficaz para asegurar la disponibilidad de semilla de patata de alta calidad, teniendo en cuenta que actualmente no existe en España ningún organismo o empresa que produzca semilla prebase G-2 mediante estos sistemas innovadores.

Referencias:

Ritter E., Angulo B., Riga P., Herrán C., Rellosa J.B. y San José M. 2001. Comparison of hydroponic and aeroponic cultivations systems for the production of potato minituber. *Potato Res.* 44: 127-135.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN (Aerohidro) y parcialmente por el INIA (RTA2008-00045-C02-01) y Gobierno Vasco.



BIOTRANSFORMACIÓN DE UN SESQUITERPENO AFRICANANO POR EL HONGO *MUCOR PLUMBEUS*

Amador, L.J.¹, Díaz, C.E.¹, Reina, M.¹, González-Coloma, A.² y Fraga, B.M.¹

¹Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez 3, 38206. Tenerife. ²Instituto de Ciencias Agrarias-CCMA, CSIC. C./Serrano, 115, 28006. Madrid.

Las biotransformaciones son procesos en los que se hace uso de sistemas biológicos [animales, vegetales, microorganismos o enzimas] para producir modificaciones químicas en compuestos que no son sus sustratos naturales [Hanson, 1995]. Tienen un gran potencial para producir nuevos productos de utilidad o generar compuestos conocidos de una forma más eficiente. Asimismo, ofrecen unas condiciones muy ventajosas como sistema experimental, dado que las condiciones de pH y temperatura necesarias para su realización son suaves y normalmente no requieren la protección de grupos funcionales. Por otro lado, desde un punto de vista medioambiental, las bioconversiones se desarrollan en medio acuoso, bajo condiciones muy suaves y los residuos que generan son fácilmente degradados por la naturaleza, creando así unas condiciones de mínima o nula contaminación.

En los últimos años ha habido un creciente interés por la biotransformación de productos naturales, dado que estas reacciones son una alternativa en la preparación de nuevos derivados de compuestos con actividad antibacteriana, antiviral, citotóxica, insecticida, etc. En el caso concreto de los compuestos terpénicos, en la última década se han descrito en la literatura científica aproximadamente 300 publicaciones referentes a su transformación microbiológica. Las bacterias y hongos son los biocatalizadores más empleados en esta área de investigación, y en menor proporción las enzimas, levaduras, microalgas, cianobacterias y plantas [De Carvalho *et al.*, 2006]. En el caso de hongos, los del género *Mucor* son capaces de transformar un amplio rango de sustratos. Entre sus especies la más empleada ha sido *Mucor plumbeus*, un hongo que posee una baja especificidad en el sustrato. Así, se han estudiado las biotransformaciones con este hongo de derivados del cedrol, óxido de manoil, óxido de ent-13-epi-manoil, dehidroabietano, ent-kaur-16-eno y estemodano [Fraga *et al.*, 1996; 1998; 2001; 2003; 2004].

Con el objetivo de obtener nuevos derivados funcionalizados y estudiar su estructura-actividad como potenciales plaguicidas frente a diferentes especies dianas, en este trabajo se describe la biotransformación del angelato de 8β-hidroxi-african-4(5)-en-3-ona (**1**), aislado y cuantificado en el cultivo de raíces transformadas de *S. hermosae*, por el hongo *M. plumbeus*. La incubación del metabolito **1** con un cultivo de este hongo condujo a la obtención de once nuevos derivados del esqueleto africanano, un esqueleto poco frecuente en la naturaleza. Asimismo, se describe, por primera vez, la actividad antialimentaria, tóxica, citotóxica y fitotóxica de sesquiterpenos con esqueleto de africanano frente a *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, líneas celulares CHO y Sf9 y *Lactuca sativa* [Amador, 2010].

De manera general, la transformación microbiológica de **1** por el hongo *M. plumbeus* nos ha permitido disponer, en algunos casos, de derivados estructurales con una mayor actividad insecticida a la mostrada por el propio sustrato.

Referencias

- Hanson, J.R., [1995]. Biochemical & Medicinal Chemistry Series, W.H. Freeman Spektrum, Oxford.
- De Carvalho, C.C.C.R., da Fonseca, M.M.R. [2006] Biotech. Adv. 24, 134.
- Fraga, B.M., Guillermo, R., Hanson, J.R., Truneh, A., [1996] Phytochemistry 42, 1583.
- Fraga, B.M., González, P., Guillermo, R., Hernández, M.G., [1998] J. Nat. Prod. 61, 1237.
- Fraga, B.M., González, P., Hernández, M.G., López, M., Suárez, S., [2001] Tetrahedron 57, 761.
- Fraga, B.M., Hernández, G., Arteaga, J. M., Suárez, S., [2003] Phytochemistry 63, 663.
- Fraga, B.M., Álvarez, L., Suárez, S., [2003] J. Nat. Prod. 66, 327.
- Fraga, B.M., Guillermo, R., Hernández, M.G., Chamy, M.C., Garbarino, J.A., [2004] Tetrahedron 60, 7921.
- Amador, L. J., [2010] Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias. Premio de Investigación Agustín de Bethencourt 2008. Servicio de publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias. Depósito legal: TF-2162/2010. ISBN: 978-84-7985-334-1. pp. 1-300.



CUANTIFICACIÓN DEL ANGELATO DE 8SS-HIDROXI-AFRICAN-4(5)-EN-3-ONA EN EL CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *SENECIO HERMOSAE* (ASTERACEAE)

Amador, L.J., Díaz, C.E. y Fraga, B.M.

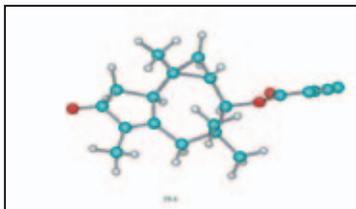
Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC. Avda. Astrofísico Fco Sánchez 3, 38206. Tenerife

En Canarias, el género *Senecio* (Asteraceae) está representado por tres taxones endémicos, *S. bollei*, *S. palmerensis* y *S. hermosae*. *S. hermosae* es un endemismo local que crece en Vallehermoso (La Gomera) en torno a los 400-500 m. Debido a su área de distribución y al número de ejemplares existentes, se encuentra sometido a un alto grado de amenaza.

En este trabajo se ha conseguido inducir y establecer, por primera vez, las condiciones del cultivo *in vitro* de raíces transformadas de *S. hermosae* utilizando *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Asimismo, se han establecido y analizado las condiciones óptimas del crecimiento del cultivo, confirmándose la transformación genética del mismo por análisis molecular (PCR) de su ADN.

La curva de crecimiento del cultivo de raíces transformadas de *S. hermosae* se caracterizó por una delimitación clara de la fase de latencia, fase exponencial y fase estacionaria. Este tipo de patrón en la curva de crecimiento se ha observado en varios cultivos *in vitro* de raíces transformadas de diferentes especies de la familia Asteraceae como *Cichorium intybus* (Malarz *et al.*, 2002), *Rudbeckia hirta* (Luczkiewicz *et al.*, 2002) y *Artemisia annua* (Liu *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han encontrado referencias bibliográficas para poder comparar el patrón de crecimiento de raíces transformadas de especies del género *Senecio*.

La cromatografía del extracto etanólico de las raíces transformadas de *S. hermosae* condujo al aislamiento e identificación estructural de un total de trece compuestos, entre componentes terpenicos, alcaloides y otros componentes. Se describe por primera vez en la bibliografía química cinco de estas sustancias (Amador, 2010). Una vez analizado el perfil metabólico de las raíces transformadas de esta especie y dado que el angelato de 8β-hidroxi-african-4(5)-en-3-ona (**1**) fue el compuesto mayoritario del cultivo, nos planteamos estudiar su producción.



El estudio del crecimiento del cultivo de raíces transformadas de *S. hermosae* y la producción del angelato de 8β-hidroxi-african-4(5)-en-3-ona (**1**), se realizó durante un periodo de 36 días. La producción del metabolito **1** está asociada al crecimiento de las raíces, mostrando un aumento que es directamente proporcional a la biomasa de éstas. Se observa un rápido crecimiento finalizada la fase de latencia (día 8) y se alcanza un máximo de producción el día 32, en la fase estacionaria, con un peso seco de 156.3 mg/l. Asimismo, la máxima concentración del metabolito **1** en el cultivo de raíces transformadas de *S. hermosae* (17.4 mg/g peso seco) fue 5 veces superior a la observada en las raíces de plantas cultivadas *in vitro* (3.2 mg/g peso seco). En comparación con los valores de la producción de algunos metabolitos secundarios en cultivos de raíces transformadas, nuestros resultados indican que el cultivo de raíces transformadas de *S. hermosae* es un sistema muy válido para la producción *in vitro* del angelato de 8β-hidroxi-african-4(5)-en-3-ona (**1**).

Referencias

- Malarz, J., Stojakowska, A., Kisiel, W., Z. [2002]. Naturforsch. 57c, 994.
 Luczkiewicz, M., Zárate, R., Dembinska-Migas, W., Migas, P., Verpoorte, R., [2002] Plant Sci. 163, 91.
 Liu, C.Z., Wang, Y.C., Ouyang, F., Ye, H.C., Li, G.F. [1998] Biotech. Lett. 20, 265.
 Amador, L. J., [2010] Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias. Premio de Investigación Agustín de Bethencourt 2008. Servicio de publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias. Depósito legal: TF-2162/2010. ISBN: 978-84-7985-334-1. pp. 1-300.



METABOLITOS SECUNDARIOS DEL CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *NETEPA TEYDEA* (LABIATAE) CON ACTIVIDAD INSECTICIDA

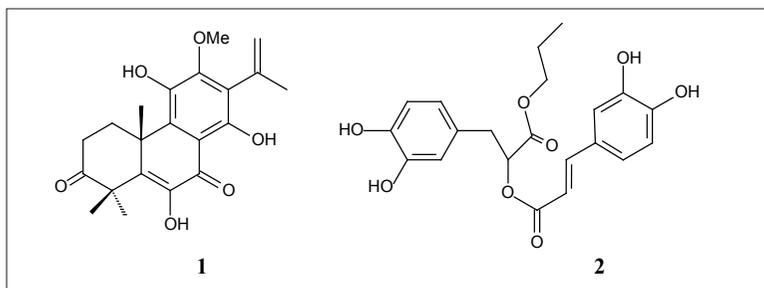
Amador, L.J.¹, Díaz, C.E.¹, González-Coloma, A.², Reina, M.¹ y Fraga, B.M.¹

¹Instituto de Productos Naturales y Agrobiología, CSIC. Avda. Astrofísico Francisco Sánchez 3, 38206. Tenerife. ²Instituto de Ciencias Agrarias-CCMA, CSIC. C/Serrano, 115, 28006. Madrid.

Netepa teydea (Labiatae) es un endemismo protegido de las cumbres de Tenerife y La Palma (retamar-codesar de alta montaña) que crece entre 1900-2100 m de altitud. Se trata de una planta herbácea perenne, rizomatosa conocida vulgarmente como “nébeda”, “tonática”, “salvia de cumbre” o “hierba del Teide”. Esta especie se ha utilizado en la medicina tradicional como anticatarral, diurética, pectoral, hipoglucemiante y afrodisíaca (Pérez de Paz, P.L. *et al.*, 1999).

En este trabajo se ha conseguido inducir y establecer, por primera vez dentro del género, las condiciones del cultivo *in vitro* de raíces transformadas de *N. teydea* mediante *Agrobacterium rhizogenes* ATCC 15834. Esta técnica biotecnológica la hemos utilizado en el estudio de los metabolitos secundarios que se sintetizan en sus raíces y como fuente potencial de posibles metabolitos con actividad biológica. Asimismo, se han analizado y establecido las condiciones óptimas del crecimiento del cultivo durante un periodo de 36 días, confirmándose la transformación genética del mismo por análisis molecular (PCR) de su ADN.

El estudio cromatográfico del extracto de raíces transformadas de *N. teydea* nos llevó al aislamiento e identificación estructural de 21 compuestos, entre sesquiterpenos, diterpenos del tipo del abietano, triterpenos pentacíclicos y compuestos aromáticos. De este cultivo se ha aislado un diterpeno del tipo del dehidroabietano, nuevo en la bibliografía química, que hemos denominado teydeadiona (**1**). Asimismo, se ha obtenido el propil éster del ácido rosmarínico (**2**) por primera vez como producto natural (Amador, 2010).



Con el objetivo de conocer el potencial biológico de las raíces transformadas de este endemismo canario, se han estudiado los efectos tóxicos y antialimentarios de los compuestos aislados frente a *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. Asimismo, se evaluó la citotoxicidad en líneas celulares procedentes de células de ovario de hámster chino (CHO) y de tejido ovárico de la pupa de *Spodoptera frugiperda* (SF9). Finalmente, se valoró la actividad fitotóxica de estos compuestos sobre la germinación de semillas y longitud radicular de *Lactuca sativa* (Asteraceae).

Referencias

Pérez de Paz, P.L., Hernández Padrón, C.E. (1999) **Plantas medicinales o útiles en la flora canaria**, Fco. Lemus Editor, La Laguna. Depósito legal: TF-848/1999. ISBN: 84-87973-12-4. pp. 1-386.

Amador, L. J. (2010) **Estudio fitoquímico de raíces transformadas genéticamente de plantas canarias** Premio de Investigación Agustín de Bethencourt 2008. Servicio de publicaciones de la Caja General de Ahorros de Canarias. Depósito legal: TF-2162/2010. ISBN: 978-84-7985-334-1. pp. 1-300.



SESIONES DE POSTERS

S II - MORFOGÉNESIS

MULTIPLICACIÓN DE *JATROPHA CURCAS* MEDIANTE MICROPROPAGACIÓN Y ENRAIZAMIENTO DE ESTAQUILLAS

Mónica Coig-O'Donnell, María Durban, M^a Belén Sosa, M^a Teresa Cruz
CULTESA (Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife S.A.)

Apdo. 73, 38350 Tacoronte, Santa Cruz de Tenerife. E-mail: cultesa@cultesa.com

Jatropha curcas es un arbusto perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae. En las últimas décadas esta planta ha sido objeto de gran interés debido a que el aceite obtenido de sus semillas presenta características físico-químicas que permiten su empleo como biocombustible en motores diesel. Además de su potencial como cultivo energético, diferentes partes de la planta poseen aplicaciones medicinales y de otra índole. Todo ello, unido a la gran resistencia que este cultivo presenta frente a la sequía, sus escasos requerimientos nutricionales y su eficacia en la protección del suelo frente a la erosión, explica el gran interés por el cultivo masivo de esta especie.

La propagación por semilla presenta como inconvenientes la pérdida de viabilidad con el almacenamiento y la heterogeneidad de la progenie. La micropropagación y el enraizamiento de estaquillas constituyen dos alternativas de multiplicación capaces de asegurar una progenie homogénea.

Diferentes tipos de explanto (ápices, segmentos nodales, segmentos de hoja, segmentos de cotiledón, fragmentos de peciolo y fragmentos de raíz) fueron empleados como material de partida para la micropropagación de *Jatropha curcas*. Este material fue cultivado en medio basal MS (1962) suplementado con diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas.

De las diferentes citoquininas estudiadas (6-bencilaminopurina, tidiazurón, kinetina, 2-isopenteniladenina, zeatina y meta-topolina), la 6-bencilaminopurina adicionada al medio de cultivo a una concentración de 1 mg/l fue la que proporcionó mejores resultados en cuanto a obtención de brotes a partir de ápices y segmentos nodales, pudiéndose obtener una tasa media de multiplicación de 3-4 brotes por explanto. La adición de una reducida concentración de auxina (0,5 mg/l de ácido indolbutírico) y de tirosina (100 mg/l) condujo a una mayor elongación y un mejor desarrollo foliar de los brotes obtenidos, acelerando y facilitando así el aislamiento y repicado de los mismos.

Se observó que tanto el éxito del establecimiento como la tasa de multiplicación se ven fuertemente condicionados por la edad del material vegetal de partida, presentando los explantos más maduros elevados porcentajes de contaminación endógena y bajo potencial regenerativo.

Si bien los segmentos nodales constituyen el tipo de explanto más eficaz, se observa que tejidos embrionarios como fragmentos de cotiledón, de hipocotilo o de raíz poseen un elevado potencial regenerativo y generan brotes adventicios en diversos medios, en ocasiones forma directa, sin pasar por una fase intermedia de callo.

La tasa de enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase de multiplicación se ve fuertemente influenciada por la edad del material de partida y por el número repicados en medio de multiplicación (la benciladenina presenta un efecto inhibitorio sobre el enraizamiento de esta planta). En las mejores condiciones se han obtenido resultados cercanos a un 50% de enraizamiento en medio MS suplementado con 3 mg/l de ácido indolbutírico, 1 mg/l de ácido indolacético y 1 mg/l de ácido indolbutírico. La adición de una pequeña cantidad de carbón activo (0,25 g/l) posee un efecto beneficioso en la longitud y número de raíces emitidas. Las vitroplantas obtenidas fueron aclimatadas en invernadero lográndose un 70% de supervivencia.

El enraizamiento de estaquillas constituye otra alternativa de multiplicación para lograr una progenie homogénea. Estaquillas de unos 20 cm. de longitud fueron enraizadas con un 95% de éxito y transferidas a tierra tras ser sumergidas durante 24 horas en una solución acuosa de ácido indolbutírico 100 mg/l y sembradas en una mezcla de sustrato y poliuretano expandido (3:1).

¿POR QUÉ NO ES EFICIENTE LA OBTENCIÓN DE DOBLE HAPLOIDES EN TOMATE?

Patricia Corral-Martínez y José M. Seguí-Simarro

Instituto para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV). Ciudad Politécnica de la Innovación. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n. 46022 Valencia.

Los doble haploides androgénicos representan una herramienta muy útil para reducir el tiempo y los recursos necesarios para obtener líneas puras que puedan ser utilizadas en programas de mejora (Seguí-Simarro, 2010). El tomate (*Solanum lycopersicum*) es la especie hortícola más importante a nivel mundial en producción y en área cultivada (FAOSTAT, 2009). A pesar de su importancia, no se han conseguido grandes avances en cuanto a la inducción de la androgénesis mediante cultivo de anteras como vía de obtención de doble haploides (Seguí-Simarro et al., 2011). Otras vías de obtención de doble haploides siguen aún sin ser exploradas. A día de hoy, la obtención de doble haploides en tomate a partir del cultivo de anteras presenta importantes limitaciones, como la baja eficiencia observada en la inducción y la baja proporción de doble haploides espontáneos (Seguí-Simarro y Nuez, 2007; Corral-Martínez et al., 2011).

En este trabajo se han buscado explicaciones a estas limitaciones observadas a la hora de obtener individuos doble haploides en tomate mediante cultivo de anteras. Como genotipo, hemos utilizado una línea androstéril con la mutación *ms10³⁵*, ya que produce una gran cantidad de callos comparada con las líneas fértiles. A partir de ella, hemos analizado el proceso de formación de callos en anteras de tomate cultivadas *in vitro* en estadio de meiocito. Los regenerantes obtenidos tras el cultivo fueron analizados mediante citometría de flujo, marcadores morfológicos y marcadores microsatélites para determinar su ploidía y determinar su origen androgénico o somático. Tras analizar los resultados se observó un alto porcentaje de callos mixoploides y de origen somático.

El análisis microscópico de las anteras demostró que en la línea androstéril, la proliferación del tejido conectivo presente en el septo intralocular de la antera es la causa de la gran cantidad de callos de origen somático observada. En cuanto a la presencia de mixoploides, el estudio de las primeras etapas del cultivo *in vitro* de las anteras demostró que los meiocitos contenidos en ellos sufren diversos procesos de fusión nuclear entre núcleos haploides. El análisis molecular mediante marcadores microsatélites confirmó estas observaciones. Esto sucede también en algunas células haploides de los callos originados.

En definitiva, la fusión entre núcleos haploides y la proliferación del tejido de los septos interloculares de las anteras estarían detrás de la gran cantidad de callos mixoploides y de origen somático obtenidos, y estarían dificultando la inducción de androgénesis a partir de los meiocitos. Esto a su vez explicaría la baja eficiencia en la obtención de doble haploides en tomate, descrita a lo largo de más de 40 años de estudio de este problema biotecnológico.

Referencias

FAOSTAT (2009) <http://faostat.fao.org>

P. Corral-Martínez, F. Nuez and J.M. Seguí-Simarro. Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms 10³⁵* tomato anthers. 2011. *Euphytica*. DOI 10.1007/s10681-010-0303-z.

Seguí-Simarro, J.M., Nuez, F. 2007. Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture in tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1119-1132.

Seguí-Simarro, J.M. 2010. Androgenesis Revisited. *Botanical Review*. 76, 377-404.

Seguí-Simarro, J.M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V., González-García, B. 2011. Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*. DOI 10.1007/s00299-010-0984-8.



Efecto de los carbohidratos en la maduración de embriones somáticos de vid (*Vitis vinifera* L. cv Mencía).

M^a Jesús Prado, Yosvanis Acanda, Manuel Rey

Dpto. Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Universidad de Vigo, 36310 Vigo. mrey@uvigo.es

La maduración asincrónica y la germinación precoz son algunas de las características indeseadas que se manifiestan frecuentemente en los protocolos de regeneración de plantas de vid mediante embriogénesis somática y que pueden comprometer la eficiencia de los protocolos establecidos hasta ahora. Se ha comprobado que determinados compuestos adicionados al medio de cultivo como pueden ser los carbohidratos, las poliaminas y el ABA pueden modular estas características indeseadas en otras especies.

En este trabajo se estudió el efecto de distintos carbohidratos en el desarrollo de los embriones somáticos de vid. Se tomaron callos embriogénicos obtenidos a partir de filamentos estaminales del cultivar Mencía en medio de inducción (sales NN; vitaminas MS; 2,4-D 1 μ M y TDZ 4´5 μ M), y se disgregaron en medio líquido LD2 (sales NN; vitaminas MS; 2,4-D 1 μ M y TDZ 9 μ M) en agitación a 150 rpm durante una semana. El disgregado se tamizó a través de una malla de 750 μ m. La suspensión embriogénica obtenida se mantuvo durante 4 semanas en agitación y se refrescó el medio de cultivo semanalmente. Se inocularon cuatro gotas de la suspensión embriogénica en placas conteniendo 20 ml de medio de diferenciación (sales NN; vitaminas MS, 0´25% de carbón activo) con carbohidratos (galactosa, lactosa o glicerol) a distintas concentraciones (1, 3 o 6%). Al cabo de 4 semanas se registró la cantidad de embriones según tres estados de desarrollo definidos (hasta torpedado, cotiledonar y germinado).

La lactosa resultó ser el mejor carbohidrato para la obtención de un mayor número de embriones totales aunque incrementos en su concentración afectaron negativamente a la sincronización del desarrollo de los mismos. La frecuencia de embriones cotiledonares y la germinación precoz aumentó significativamente a medida que se aumentó la concentración de lactosa. Incrementos en la concentración de galactosa frenaron el desarrollo de los embriones observándose un marcado aumento en la frecuencia de embriones con menor grado de desarrollo, aunque se observó una significativa disminución de la germinación precoz. Sin embargo, la concentración de galactosa más elevada (6%) provocó una marcada disminución en el número de embriones totales. Los cultivos no sobrevivieron en altas concentraciones de glicerol mientras que bajas concentraciones solamente permitieron la formación de unos pocos embriones globulares.

En conclusión, se ha podido comprobar con este trabajo que los carbohidratos adicionados al medio de cultivo modulan la germinación precoz y el sincronismo del desarrollo de los embriones somáticos de vid.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto AGL2009-07488). Agradecemos a M^a Pilar Grueiro su excelente trabajo de laboratorio. M^a Jesús Prado agradece a la Xunta de Galicia la concesión de un contrato de investigador del Programa Isidro Parga Pondal. Yosvanis Acanda agradece al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación por la concesión de una beca MAEC-AECID. Agradecemos también a la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia las facilidades para la utilización del material vegetal del Centro de Formación y Experimentación de Viticultura y Enología de Ribadumia (Pontevedra) y a Julián Benítez y M^a José Graña, del mismo centro, su colaboración para la recogida del mismo.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTA EN QUERCUS BICOLOR. IMPORTANCIA DE LAS ARABINOGALACTANOPROTEÍNAS

Teresa Martínez, Ana María Vieitez, Rubén Mallón

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC, Avda. de Vigo s/n, Apartado 122, 15780 Santiago de Compostela, A Coruña. E-mail: temar@iia.gal.csic.es

En el presente estudio se ha inducido la embriogénesis somática (ES) en *Quercus bicolor* a partir de explantos foliares y de ápices caulinares. Se desarrollaron embriones somáticos mediante el cultivo en medio de inducción consistente en medio basal Murashige & Skoog (MS, 1962) suplementado con 0,5 mg/L de benciladenina (BA) y 4 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) durante 8 semanas, transfiriendo los explantos sucesivamente a medios de expresión con concentraciones reducidas de reguladores (4 semanas) y en medio desprovisto de ellos (8 semanas). Dado el papel que se atribuye a las arabinogalactanoproteínas (AGP) en la inducción embriogénica de diversas especies, se evaluó el efecto de estos compuestos a lo largo del proceso de ES suplementando o no los diferentes medios con AGP de diferente origen (*Larix* sp. o *Acacia* sp.) a diversas concentraciones.

Los embriones se desarrollaron a partir de las 12 semanas de cultivo en los explantos foliares y de las 15 semanas en los ápices. La frecuencia de callo superó el 90% en todos los tratamientos, si bien el porcentaje de embriogénesis fue relativamente bajo. Sin embargo, las líneas de embriones establecidas se mantienen y multiplican fácilmente mediante embriogénesis secundaria. La respuesta embriogénica se incrementó significativamente al 4,5% frente al 0,5% en las hojas en expansión aisladas del primer nudo a partir del ápice en presencia de AGP de *Larix*. La AGP de *Acacia* no promovió respuestas embriogénicas, aunque sí incrementó el peso del callo desarrollado.

Para definir y optimizar el medio de proliferación de embriones mediante embriogénesis repetitiva, se ensayaron tres combinaciones de reguladores de crecimiento (BA 0,1 mg/L; BA 0,1 mg/L + ANA 0,05 mg/L; BA 0,1 mg/L + zeatina 0,1 mg/L) adicionadas al medio basal MS. Las mejores tasas de multiplicación, en base al número total de embriones y número de embriones en etapa cotiledonar, se obtuvieron en el tratamiento con BA y ANA, aunque la proporción más alta de embriones cotiledonares opacos se alcanzó con el tratamiento que incluía BA y zeatina.

Antes de germinar los embriones fue necesaria la aplicación de tratamientos de maduración, mediante el cultivo en medios con dosis elevadas de carbohidratos (sorbitol o maltosa durante 4 semanas) y la aplicación de estratificación en frío (4°C durante 8 semanas). El cultivo en sorbitol incrementó la respuesta de germinación, aunque fue el almacenamiento en frío el que tuvo un efecto significativamente positivo en la conversión en plántula. La utilización de medios basales diferentes, Gresshoff & Doy (GD, 1972) frente a 1/2 MS, durante la etapa de germinación no afectó a la frecuencia de conversión en plántula, sin embargo con el medio GD se observó una importante reducción del porcentaje de propágulos con embriogénesis secundaria, lo que representa una ventaja para el desarrollo de la nueva planta.

Referencias

Gresshoff PM, Doy CH (1972). *Planta* 107:161-170.
Murashige T, Skoog F (1962). *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

Agradecimientos

R. Mallón es investigador postdoctoral contratado del programa JAE-Doc (CSIC). Los autores agradecen a la empresa "Foresta Mantenimiento de Plantaciones" la cesión del material vegetal. Esta investigación ha sido parcialmente financiada por la Xunta de Galicia mediante el proyecto O9MRU002400PR.



APLICACIÓN DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL A LA PROLIFERACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE QUERCUS ROBUR

Rubén Mallón, Purificación Covelo, Ana María Vieitez

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC, Avda. de Vigo s/n, Apartado 122, 15780 Santiago de Compostela, A Coruña. E-mail: rmallon@iag.csic.es

El uso de la embriogénesis somática repetitiva permite la proliferación de embriones somáticos y el mantenimiento del potencial embriogénico. En este estudio se investigaron los efectos de los reguladores del crecimiento [auxinas y/o citoquininas] del medio de proliferación de embriones y del sistema de cultivo (medio semisólido o estándar frente a inmersión temporal) con el fin de mejorar las tasas de multiplicación y la calidad de los embriones somáticos de dos líneas embriogénicas de *Quercus robur* derivadas de árboles adultos (San-José et al., 2010).

Los reguladores del crecimiento tuvieron un efecto significativo en el proceso de embriogénesis repetitiva, obteniéndose mayores tasas de multiplicación (en base al número total de embriones y número de embriones en fase cotiledonar) con el medio suplementado con benciladenina (0,44 μM) mientras que la producción de embriones se redujo significativamente cuando el medio contenía ácido naftalenacético (0,27 μM) como único regulador.

Los sistemas de inmersión temporal (TIS) constituyen un método eficaz para la automatización de la embriogénesis somática (Etienne y Berthouly, 2002) y su aplicación a los sistemas embriogénicos de roble se desarrolló en este estudio. En los experimentos de proliferación embriogénica en condiciones de TIS se evaluó la aplicación de cuatro ciclos con inmersiones de un minuto cada 6, 8, 12 y 24 horas, comparándolas con el cultivo en medio semisólido.

En general, la inmersión temporal mejoró la proliferación y la calidad de los embriones somáticos. Los ciclos de inmersión de un minuto cada 8 o 12 horas resultaron ser los que produjeron una mayor sincronización del proceso, con una producción aproximada del 90% de los embriones somáticos en fase cotiledonar, junto con un incremento de la biomasa total y de la tasa de multiplicación. También se observó un efecto genotípico en la respuesta proliferativa de ambas líneas embriogénicas tanto con el sistema de cultivo estándar como con el sistema de inmersión temporal.

Los embriones proliferados mediante el sistema de inmersión temporal mantuvieron la capacidad germinativa, obteniéndose tasas de conversión en plántula similares al método estándar.

Referencias

Etienne H, Berthouly M (2002) *Plant Cell Tissue Organ Cult* 69:215–231.

San-José MC, Corredoira E., Martínez MT, Vidal N, Valladares S, Mallón R, Vieitez AM (2010) *Plant Cell Rep* 29:661–671.

Agradecimientos

R. Mallón es investigador postdoctoral contratado del programa JAE-Doc (CSIC). Esta investigación ha sido parcialmente financiada por la Xunta de Galicia mediante el proyecto O9MRU002400PR.



INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN QUERCUS ALBA L.

Elena Corredoira, Teresa Martínez, Antonio Ballester, y [Ana María Vieitez](#)

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC, Apartado 122, 15780, Santiago de Compostela,
E-mail:Amvieitez@iag.csic.es

La embriogénesis somática (ES) se ha revelado como un proceso de regeneración de plantas de gran importancia en la mejora de especies forestales. En línea con nuestros estudios sobre la inducción de sistemas embriogénicos, el presente trabajo se ha realizado con el objeto de obtener ES en *Quercus alba* L. (roble blanco), utilizando explantos foliares y ápices caulinares obtenidos de cultivos de brotes en proliferación derivados de árboles de 6-7 años.

El proceso embriogénico se ha inducido mediante cultivo sucesivo en medio de Murashige y Skoog (1962) adicionado con 4 mg/l ácido naftalenacético (ANA) y 0,5 mg/l benciladenina (BA) (Medio M1), cultivo en medio de expresión con la concentración de reguladores de crecimiento reducida (M2), y en medio desprovisto de reguladores (M3). Como respuesta embriogénica se observó la formación de masas nodulares proembriogénicas (PEMs) y embriogénicas a partir de tejido de callo originado en el lado abaxial de las hojas o primordios foliares. El experimento diseñado para optimizar el método de inducción embriogénica reveló que las mejores tasas (aproximadamente el 50%) se obtenían mediante transferencia directa desde medio M1 a medio M3 sin reguladores, resultando una mejora y simplificación del método estándar. La mayoría de los embriones se desarrolla entre 8-12 semanas del inicio del cultivo y el porcentaje de inducción es mayor en las hojas frente a los ápices.

El estado de desarrollo de la hoja, correlacionada con su posición a lo largo del brote, tuvo un efecto significativo en la respuesta embriogénica, reduciéndose de forma basipetala. Los mejores resultados (en función de la frecuencia de ES y del número de zonas embriogénicas por explanto) se han obtenido en las hojas jóvenes en desarrollo, situadas en los nudos 1 y 2 a partir del ápice. Mediante el estudio anatómico se evaluó el grado de diferenciación de los tejidos de los diferentes explantos foliares, relacionándolo con su capacidad para inducir embriones somáticos. El estudio mostró que las hojas con mayor potencial embriogénico poseían tejidos poco diferenciados, incluyendo la epidermis en la que todavía era evidente la presencia de células precursoras de las células oclusivas de los estomas, de células precursoras de los tricomas y falta de acumulo de sustancias tipo polifenoles o taninos, mientras que el mesófilo mostraba un bajo contenido en almidón. Además, en los márgenes del limbo foliar, donde se forman preferentemente los embriones, el mesófilo no está completamente diferenciado en parénquima en empalizada y esponjoso. Todas estas características marcan importantes diferencias con las hojas de las posiciones 3 y 4. Se sugiere que la capacidad de inducir embriogénesis en hojas de *Q. alba* podría relacionarse con un determinado nivel de actividad de los meristemos apical, y del marginal y laminar de las hojas responsables de la expansión de las mismas.

Las líneas embriogénicas obtenidas se mantienen y multiplican desde hace dos años mediante embriogénesis secundaria, habiéndose obtenido regeneración de plantas mediante la aplicación de un tratamiento de maduración con sorbitol 6% y un pretratamiento de estratificación en frío (4°C) durante 2 meses.

Referencias

Murashige T, Skoog F (1962) *Physiologia Plantarum* 15:473-497

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento a la empresa "Foresta Mantenimiento de Plantaciones" por la cesión del material vegetal. Se agradece a M^a José Cernadas Cernadas su excelente trabajo técnico. Esta investigación ha sido financiada parcialmente por la Xunta de Galicia (Proyecto O9MRU002400PR).



EFFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS SOBRE LA MULTIPLICACIÓN IN VITRO DEL ALISO

M^a Concepción Sánchez, Elena Corredoira, Laura V. Janeiro y M^a del Carmen San José

¹Departamento de Fisiología Vegetal.IIAG.CSIC. Apartado 122. 15080 Santiago de Compostela.

E-mail:elenac@iiag.csic.es

²INLUDES. Diputación Provincial de Lugo. Ronda de la Muralla 140. 27004 Lugo

Aunque la sacarosa es el carbohidrato más ampliamente utilizado en la micropropagación de numerosas especies, no siempre es el más efectivo. Algunos autores señalan la glucosa como la fuente hidrocarbonada más adecuada para el cultivo in vitro de algunas leñosas, entre las que se encuentran diversas especies del género *Alnus* (Tremblay et al., 1986).

En este trabajo se ha estudiado el efecto de ambos tipos de azúcares [sacarosa y glucosa] en diferentes concentraciones [2 y 3%] sobre la multiplicación in vitro de dos clones de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. de origen adulto. El medio mineral utilizado estaba compuesto por las sales y vitaminas del WPM (Lloyd y McCown, 1980), agar Difco 0.7%, 0.1 mg/l de 6-benciladenina y 0.5 mg/l de ácido indol acético. Los cultivos se transfirieron a medio fresco cada 3 semanas hasta completar un ciclo de multiplicación de 9 semanas. Los datos se recogieron al final de las 9 semanas.

En ambos clones, los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la glucosa a una concentración del 2%, su efecto fue especialmente significativo en el número total de brotes que pasa de 2.96 con glucosa 2% a 1.95 con sacarosa 3% en el clon G1, y de 3.48 a 2.46 en el R4. La longitud de los brotes también fue mayor al utilizar la glucosa, pasando de 22.07 mm con glucosa 2% a 15.66 con sacarosa 3% en el clon G1, y de 18.78 mm a 15.45 en el R4. Con glucosa 3% se obtuvieron resultados similares, si bien la calidad de los brotes fue mejor con la concentración más baja. La influencia de los azúcares no fue tan marcada en el enraizamiento, obteniendo porcentajes superiores al 80% en ambos clones.

Referencias

Lloyd G, McCown B (1980) In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 34: 94-103

Tremblay FM, Perinet P, Lalonde M (1986) Biotechnology in Agriculture and Forestry [Bajaj YPS, ed] Vol 1 Trees 1 Pág: 87-101 Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Esta investigación ha sido financiada por el INLUDES (Diputación Provincial de Lugo) mediante un Convenio CSIC-INLUDES

ORGANOGENÉESIS EN CULTIVO IN VITRO DE LIMONIUM INSIGNE

Ana María Ortuño^a, Licinio Díaz^a, F. Sánchez^b, I. Pérez^a y J.A. Del Río^a

^aDepartamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, E-30100 Murcia. ^bCentro del Banco de Germoplasma de la Región de Murcia. La Alberca, E-30150 Murcia, España. E-mail: aortuno@um.es

El género *Limonium* Miller (Plumbaginaceae), incluye especies herbáceas, la mayoría de ellas nativas del Mediterráneo y de las Islas Canarias, las cuales presentan alto valor ornamental (Martín y Pérez, 1995). En la Región de Murcia, este género está representado por 14 especies, la mayoría perennes, salvo alguna especie anual, las cuales se suelen presentar en áreas de distribución reducida, por lo que en algunos casos, se las considera como especies protegidas, entre las que está incluida *Limonium insigne*.

El desarrollo de las técnicas de propagación "in vitro" de especies del género *Limonium* Mill., tiene gran interés desde un punto de vista conservacionista, ya que permitiría la obtención de individuos de buena calidad genética, a partir de ejemplares silvestres seleccionados, pudiéndose llevar a cabo la restitución de poblaciones naturales, paliando el efecto de la amenaza que supone la tendencia a la hibridación con otras especies del mismo género con las que conviven, así como conservar y regenerar este germoplasma. Por otra parte, dado el interés ornamental que presentan todas las especies de este género, el desarrollo de propágulos tendría una gran repercusión como recurso fitogenético para la agricultura y la jardinería.

Hasta el momento, las aportaciones en esta línea de trabajo son escasas y se han basado en el cultivo de explantos de inflorescencias (Amo-Marco e Ibáñez, 1998), o bien en el aislamiento y cultivo de yemas internas localizadas en la base de las plantas en roseta (Oviedo y Guevara 1988), con los consiguientes problemas de dependencia de la etapa de floración para la obtención de tallos florales, en el primer caso, o de contaminación y de destrucción de plantas madre, en el segundo.

En este trabajo se proponen métodos alternativos a los anteriormente descritos, para la micropropagación de plantas de *Limonium insigne*, utilizando dos posibles vías, la inducción de caulogénesis directa a partir de explantos de hojas y el cultivo de yemas vegetativas, obtenidas de plántulas "in vitro" de *Limonium insigne*, habiéndose optimizado las concentraciones de reguladores de crecimiento en ambos casos. En el caso del cultivo de yemas, los mejores resultados fueron obtenidos con 2 μ M 6-benzilaminopurina + 5 μ M kinetina. En relación a la calogénesis, la combinación de 5 μ M kinetina y 0,5 μ M ácido naftalenacético, resultó ser la más apropiada para la formación de tallos.

Referencias

- Amo-Marco, JB, Ibáñez, MR (1998) *Plant Growth Regulation* 24:49-54
 Martín, C, Pérez, C (1995) *J Hort Sci* 70 :97-103
 Oviedo, Y, Guevara, E (1988) *Agronomía Costarricense* 12:113-122

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PEPLAN: Subproyectos S4-E005-02 y S13-E005-02 de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.



REGENERACIÓN DE PLANTAS DE BITUMINARIA BITUMINOSA A PARTIR DE EXPLANTOS DE HOJA

M Dabauza¹, M Pazos-Navarro¹, E Correal¹, J Croser², MC Castello², D Real^{2,3}.

¹ Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/Mayor s/n, 30150-La Alberca, Murcia, Spain. ² Centre of Legumes in Mediterranean Agriculture (CLIMA), The University of Western Australia, 35 Stirling Hwy, Crawley, WA 6009, Australia. ³ Department of Agriculture and Food, Western Australia (DAFWA), South Perth, WA 6151, Australia. e.mail:mercedes.dabauza@carm.es

Bituminaria bituminosa (L.) Stirt. pertenece a la familia **Fabaceae**, su distribución se localiza en la cuenca Mediterránea y Macaronesia y existen tres variedades botánicas: **bituminosa**, **albomarginata** y **crassiuscula** que se encuentran presentes en las Islas Canarias, donde la especie toma el nombre de "Tedera" (Méndez y col. 1990-1991). La importancia de esta especie radica en sus aplicaciones: 1) ornamental, 2) fitoestabilizadora de suelos contaminados por cinc (Walker y col. 2007), 3) forrajera en áreas españolas con bajas precipitaciones y, en otros países con áreas de clima mediterráneo como Australia (Real y col. 2008), 4) productora de metabolitos secundarios de interés farmacéutico-medicinal, como los pterocarpanos y las furanocumarinas (FCs) que presentan actividad anticancerígena y antimitótica. Además, las FCs se utilizan en el tratamiento de enfermedades dérmicas y poseen actividad antifúngica y antibacteriana (Martínez y col. 2009). Debido a la importancia de la especie, estamos trabajando en colaboración grupos españoles (IMIDA, Instituto Canario de Investigaciones Agrarias -ICIA-, Universidad de Murcia y Universidad de Alicante) y australianos (CLIMA, The University of Western Australia y DAFWA) para alcanzar tres objetivos prioritarios y seleccionar clones 1) de interés forrajero, 2) con resistencia a estreses abióticos (frío, sequía y metales pesados) y 3) con elevada concentración de FCs para su uso clínico. Fruto de esta colaboración, en lo que se refiere a cultivo **in vitro**, se han desarrollado protocolos para el establecimiento y micropropagación de yemas apicales y nodales (Pazos-Navarro y col. 2009, Pazos-Navarro y col. en preparación) y de regeneración de plantas a partir de hojas y anteras (Croser y col. enviado). En este trabajo, presentamos los resultados de un protocolo de regeneración de plantas a partir de callos organogénicos de hoja: peciolo, foliolo y zona de inserción entre peciolo y foliolo (PLA) de dos variedades de **Bituminaria bituminosa**: var. **albomarginata** clon Famara OMV33E-F29-A15 y var. **bituminosa** clon Calnegre PA.

La formación de callo organogénico y la regeneración de brotes se obtuvieron cultivando los explantos durante un mes, en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) modificado, suplementado con 0,1 mg l⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP) a 1 ó 5 mg l⁻¹. Para la elongación y desarrollo de los brotes, los callos organogénicos se cultivaron en el mismo medio base adicionado de 0,01 mg l⁻¹ de ANA y 0,8 mg l⁻¹ de BAP. El enraizamiento de los brotes elongados se realizó en un medio MS modificado, suplementado con 1mg l⁻¹ de ácido indolbutírico. En ambos clones, los explantos con mayor capacidad regenerativa fueron peciolo y PLA. El número máximo de brotes por callo obtenido fue de 34 en Calnegre y de 26 en Famara. El porcentaje de enraizamiento fue de 45% y 30% en Calnegre y Famara, respectivamente. En la aclimatación de ambos clones, se alcanzó un 90% de supervivencia de las plantas.

Referencias

- Croser JS, Castello MC, Pazos-Navarro M, Real D, Correal E, Dabauza M. **In vitro** regeneration from organogenic petiole, leaf and anther calli of the perennial pasture legume **Bituminaria bituminosa**. [Enviado]
- Martínez S, Correal E, Real D, Ortuño A, Del Río JA. [2009]. En 'Recent progress in medicinal plants (RPMP) Drug Plants I'. [Eds AS Awaad, JN Govil VK Singh] pp. 307-322.
- Méndez P, Fernández M, Santos A. [1990-1991]. *Pastos* 20-21 (1-2): 157-166.
- Murashige T, Skoog F. [1962]. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Walker DJ, Bernal MP, Correal E. [2007]. *Water Air Soil Pollut* 184:335-345.
- Real D, Albersten T, Snowball R, Howieson J, Revell C, Ewing M, Correal E, Mendez P, Rios S. [2008]. *En XXI Int Grassland Cong and VIII Int Rangeland Cong, Hohhot, China. Vol II* - 452.
- Pazos-Navarro M, Correal E, Dabauza M. [2009]. *En VIII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Murcia.*
- Pazos-Navarro M, Correal E, Ortuño A, Del Río JA, Dabauza M. Establishment and micropropagation from apical and nodal segments of **Bituminaria bituminosa** (L.) Stirt.: A source of Furanocoumarins. [En preparación].

Agradecimientos

Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria (Proyecto nº RTA2007-00046-00-00), Fondo Social Europeo, IMIDA.



EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PLATANERA: NUEVA METODOLOGÍA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

Juan Bernardo Pérez Hernández¹, María Teresa Cruz Bacallado², María Durbán García² y Belén Sosa Hernández²

¹Departamento de Fruticultura Tropical, ICIA, Aptd. 60, 38200 La Laguna, Tenerife. Email: jbperez@icia.es

²Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife, S.A. (CULTESA), Aptd. 73, 38350 Tacoronte, Tenerife.

Aunque se dispone de técnicas ya establecidas para la regeneración de plantas por embriogénesis somática en platanera (Strosse et al., 2003), el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas (SCEs) continúa siendo uno de los puntos críticos del proceso. A ello contribuye la baja respuesta embriogénica de los tejidos empleados como explanto inicial, comúnmente flores masculinas inmaduras procedentes de plantas adultas. Este tipo de explanto plantea además dificultades de escisión y de disponibilidad numérica, lo que dificulta enormemente la obtención de cultivos embriogénicos a escala comercial.

Al objeto de facilitar e incrementar el establecimiento de cultivos para la inducción de embriogénesis, se ha desarrollado un sistema de multiplicación *in vitro* de flores masculinas inmaduras mediante proliferación de yemas florales en presencia de las citoquininas benciladenina (BA) o tidiazurón (TDZ) a concentraciones variables (Pérez-Hernández y Rosell-García, 2008). La aplicación de esta nueva técnica ha permitido estudiar la eficiencia del establecimiento de SCEs en comparación con la metodología existente.

Con el empleo de flores masculinas multiplicadas *in vitro* se obtuvieron frecuencias máximas de establecimiento de ECSs del 1.27%, frente al 0.47% obtenido para el caso de explantos obtenidos de planta adulta. En ambos casos se completó la ruta embriogénica con la regeneración de plantas *in vitro*. Durante el proceso de regeneración se cuantificó la formación de embriones somáticos a partir de SCEs establecidas y se determinó su tasa de germinación. En base a estos resultados se estimó el potencial de las SCEs para la micropropagación de la platanera en un rango entre 10.000 y 60.000 plantas por mL de volumen de células sedimentadas.

Referencias

Pérez-Hernández JB y Rosell-García P (2008) Plant Cell Reports 27: 965-971

Strosse H, Domergue R, Panis B, Escalant JV y Côte F (2003) INIBAP Technical Guidelines 8, Montpellier. (ISBN 2-910810-63-1)



MICROPROPAGACIÓN DE INDIVIDUOS SELECCIONADOS DE PRUNUS AVIUM EN ANDALUCÍA A PARTIR DE SEMILLAS Y EMBRIONES.

Manuel Cantos; Juana Liñán, María del Carmen Giraldo, María del Mar Parra, José Luis García y Antonio Troncoso.

Departamento de Biotecnología Vegetal. IRNAS (CSIC). Avda. Reina Mercedes 10. P.O. Box 1052, 41080 Sevilla. E-mail: cantos@irnase.csic.es

En la actualidad, existe en la Unión Europea un fuerte déficit de madera y un superávit de productos agrícolas. Esta situación se ve agravada con la entrada de nuevos países miembros. Por ello, la posibilidad de disponer de especies con crecimiento rápido, buena adaptación al medio y rusticidad, y madera de alta calidad, es del máximo interés. Estas características pueden reunir las algunas especies de cerezos, como **Prunus avium**, que, por otro lado tiene un gran valor ecológico añadido, debido a que sus poblaciones en Andalucía están en clara regresión a causa de las talas excesivas y la dificultad de su propagación, por lo que se consideran relictas y por ello, esta especie está catalogada como "vulnerable" en el Libro Rojo de la Flora Silvestre Amenazada de Andalucía (2000). Además, **P. avium** presenta un alto potencial económico, tanto por la citada calidad de su madera, como por su uso en jardinería o como portainjerto.

Por ello, el objetivo de este trabajo es la optimización de sistemas de propagación **in vitro** a partir de semillas y embriones de plantas seleccionadas atendiendo a criterios de producción de madera y recuperación de individuos localizados en lugares de interés medioambiental en Andalucía.

Para alcanzar este objetivo, se utilizaron semillas de **Prunus avium** recogidas por personal de EGMASA en el año 2007 en la Dehesa de Camarate, Sierra Nevada (Granada) área considerada como hábitat óptimo para esta especie (Vivero et al., 2001) y otras recolectadas en el mismo año por personal del IRNAS en la localidad de Castaño de Robledo en la Sierra de Aracena y Picos de Aroche en Huelva, zona de interés por contar con individuos aislados de porte adecuado para la extracción de madera.

La germinación de semillas sin endocarpo en bandejas de PVC selladas y esterilizadas fue del 53.3% en 34 días. Las semillas sin endocarpo esterilizadas, en cajas de Petri con agua e **in vitro**, presentaron porcentajes de germinación del 60% en 16 días y 25% en 50 días, respectivamente. Estos resultados indican que una parte de la dormancia de la semilla la provoca el endocarpo leñoso. Tras la eliminación del endocarpo, la semilla desnuda embebida previamente en agua y cultivada posteriormente **in vitro** mejoró la germinación respecto a la no embebida, lo que indica una endodormancia debida al endospermo y/o al embrión. El cultivo **in vitro** de embriones se demostró el método más eficaz, tanto en rendimiento (96.7%) como en tiempo (6-8 días). No obstante, la procedencia de las semillas influyó claramente en la germinación de los embriones y en el posterior desarrollo de la plántula. La plántula obtenida del embrión se desarrolló adecuadamente en medio de cultivo MS 1/3 (Murashige y Skoog, 1962) y VID (Troncoso et al., 1990) en ambos casos sin reguladores de crecimiento. Mediante la micropropagación de las plántulas obtenidas de embriones en medio VID sin reguladores de crecimiento se logró un buen desarrollo de la parte aérea y una radicación del 42%. No obstante, estos resultados se podrían mejorar modificando el equilibrio de citoquininas y auxinas al medio de cultivo. Finalmente, la adaptación al exterior de las plantas obtenidas fue aceptable con un porcentaje de aclimatación del 63.8%. Sin embargo, para el mantenimiento de las plantas adaptadas fue preciso reducir considerablemente el aporte de agua de riego al sustrato, debido a que las plantas micropropagadas de **P. avium** mostraron una marcada sensibilidad al exceso de agua en el sustrato.

Referencias

- Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía. (2000). Tomo I: Especies en peligro de extinción. Junta de Andalucía, Sevilla.
- Murashige & Skoog (MS) (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol.Plant*, 15 (3): 473-497.
- Troncoso, A., Villegas, A., Mazuelos, C., Cantos, M. 1990. Growth and mineral composition of grape-vine rootstock cultured **in vitro** with different levels of ammonium nitrate. *Plant Nutrition. Physiology and Application*. Kluwer Academic Publisher. 653-654.
- Vivero J. L., Hernandez-Bermejo J. E., Prados Ligeró J. (2001) Conservation strategies and management guidelines for wild *Prunus* genetic resources in Andalusia, Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* Volume 48, Number 5, 533-546.



INTRODUCCIÓN EN CULTIVO *IN INVITO* DE *JATROPHA CURCAS* Y DIFERENCIAS EN LA MICROPROPAGACIÓN CON BENCILADENINA Y KINETINA.

M.Y. González-Padrón, J.C. Luis, F. Valdés.

Dpto. Biología Vegetal (Fisiología Vegetal), Universidad de La Laguna, 38071 S/C de Tenerife.
Email: yanetglezpadron@gmail.com

Jatropha curcas es un árbol perteneciente al género **Jatropha**, catalogado dentro de la familia **Euphorbiaceae**. Este género consta de 170 especies, distribuidas entre América y África, siendo su centro genético de dispersión México (Debnath & Bisen, 2008). A esta especie se le atribuyen numerosas propiedades en la medicina tradicional. Además, a partir de sus semillas se obtiene un aceite que puede ser transformado en biodiesel. Por tanto, una fuente de energía alternativa al petróleo. Generalmente a la hora de introducir **J. curcas** en cultivo **in vitro** se han utilizado cotiledones (Kumar *et al.*, 2010), yemas apicales (Purkayastha, *et al.*, 2010) y segmentos nodales (Sujatha *et al.*, 2005) que luego son inducidos a callo generando nuevas yemas su propagación.

En nuestro trabajo hemos querido mantener la integridad del material utilizando embriones germinados **in vitro**. Una vez se han desarrollado las plántulas son inducidas a generar yemas axilares cuando se exponen a diferentes concentraciones de citoquininas, como benciladenina (Li *et al.*, 2008) o kinetina (Singh *et al.*, 2010)

El protocolo para introducir los embriones de **J. curcas** en cultivo **in vitro** consistió en una esterilización previa a la imbibición de la semilla, seguida de una segunda esterilización, tras eliminar la testa. El medio de cultivo donde se sembraron los embriones fue medio Murashige & Skoog (1962) (MS) a la mitad de su concentración con el fin de germinar y desarrollar los embriones en condiciones adecuadas. Después de 3 semanas de crecimiento en dicho medio, a las plántulas se les eliminó la parte radicular y los cotiledones para sembrar segmentos nodales en medio fresco MS con diferentes concentraciones de benciladenina (0-4mg/L), así como kinetina, 0-4mg/L, respectivamente en estas condiciones.

Se compararon las diferencias existentes entre las plántulas sometidas a concentraciones crecientes de benciladenina y kinetina, con respecto a la formación de callo y el desarrollo de yemas adventicias.

Referencias

- Debnath M. & Bisen P.S. (2008) *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 288-306.
- Kumar N., Anand K. G. V. & Reddy M.P. (2010) *Acta Physiologiae Plantarum*, 32 (5): 917-924
- Purkayastha J., Sugla T., Paul A., Solleti S.K., Mazumdar P., Basu A., Mohommad A., Ahmed Z. & Sahoo L. (2010) *Biologia Plantarum*, 54 (1): 13-20
- Sujatha M., Makkar H.P.S. & Becker K. (2005) *Plant Growth Regulation*, 47 (1): 83-90
- Li M. R., Li H.Q., Jiang H.W., Pan X.P. & Wu G.J. (2008) *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 92 (2): 173-181
- Singh A., Reddy M.P., Chikara J. & Singh S. (2010) *Industrial Cops and Products*, 31 (2) 209-213
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15:473-497



CRIOCONSERVACIÓN Y REGENERACIÓN DE ÁPICES CAULINARES DE *CREPIS NOVOANA*

Patricia Corral¹, Rubén Mallón², Juan Rodríguez-Oubiña³, María Luz González¹

Departamentos de Fisiología Vegetal¹ y Botánica³, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela

²Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia-CSIC, 15780 Santiago de Compostela

El uso de técnicas biotecnológicas aplicadas a la conservación de especies vegetales amenazadas ha alcanzado una gran relevancia en las últimas décadas. Entre ellas, la criopreservación permite el almacenamiento y conservación de material vegetal a bajas temperaturas (-196°C) en nitrógeno líquido (NL), presentando una serie de ventajas sobre otras metodologías como la posibilidad de almacenamiento durante largos periodos de tiempo, el escaso espacio requerido para ello y la posibilidad de mantener la estabilidad genética del material vegetal a conservar (Mallón *et al.*, 2008).

Entre las especies catalogadas como en peligro crítico de extinción (CR) en el Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España (Bañares *et al.*, 2003) y en el Catálogo Gallego de Especies Amenazadas (2007) figura *Crepis novoana* S. Ortiz, Soñora & Rodr. Oubiña.

En este estudio se describe la aplicación de la técnica de vitrificación como método de criopreservación de ápices de plantas de *C. novoana* cultivadas *in vitro*. Se utilizaron como explantos ápices caulinares de brotes obtenidos a partir de yemas axilares (Corral *et al.*, 2011) desarrollados en medio semisólido Murashige & Skoog (MS, 1962) sin reguladores del crecimiento. Tras 2 semanas de subcultivo se escindieron los ápices (1-1,5 mm) y se transfirieron, durante 48 horas, a 4 medios de precultivo diferentes, con o sin osmóticos (sacarosa, sorbitol o glicerol) a una concentración de 0,3 M. Asimismo, también se evaluó el efecto de una solución de carga (LS) consistente en medio MS con sacarosa (0,4 M) y glicerol (2 M) previa a la exposición a una solución de vitrificación de plantas, PVS2 (Sakai *et al.*, 1990) a 0°C durante 20 minutos. Tras un periodo de almacenamiento de una semana en NL, los ápices se retiraron de la PVS2 y se lavaron con una solución de ½ MS y sacarosa (1 M) durante 15 minutos. El medio de recuperación consistió en medio semisólido MS con benciladenina (0,44 µM). Se evaluó semanalmente la regeneración de los ápices durante un periodo de 6 semanas.

La exposición de los ápices a la solución de carga fue imprescindible para su regeneración después de la congelación. En ausencia de la LS no se produjo la recuperación de los ápices criopreservados. La presencia de osmóticos en los medios de precultivo incrementó significativamente la tasa de regeneración de los ápices. De los 3 osmóticos utilizados, el sorbitol fue el que dio un mayor porcentaje de recuperación. Sin embargo, la presencia de sacarosa como osmótico mejoró la calidad de los brotes, desarrollando hojas de mayor tamaño. Los brotes obtenidos a partir de los ápices criopreservados, crecieron con normalidad y muchos enraizaron al ser transferidos a medio MS sin reguladores.

Referencias

- Bañares A, Blanca G, Güemes J, Moreno JC, Ortiz S (2003). Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid.
- Corral P, Mallón R, Rodríguez-Oubiña J, González ML (2011). Plant Cell Tiss Organ Cult (En Prensa).
- Mallón R, Bunn E, Turner SR, González ML (2008). Cryoletters 29: 363-370.
- Murashige T, Skoog F (1962). Physiol Plant 15: 473-497.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1990). Plant Cell reports 9: 30-33.

Agradecimientos

Este estudio ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante el proyecto PGIDT/PGIDIT07MDS-009200PR.



EFFECTO DE DIFERENTES PRETRATAMIENTOS SOBRE EL DESARROLLO IN VITRO DE YEMAS AXILARES EN EXPLANTOS MULTINODALES DE DOS CULTIVARES DEL GÉNERO LEUCOSPERMUM (PROTEACEAE)

E. Suárez Toste¹, J. A. Rodríguez Pérez², M. Carmen Alfayate³ y J. F. Pérez Francés¹

¹ Dpto. Biología Vegetal (Fisiología). Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38071. La Laguna. Tenerife.

² Dpto. Ingeniería, Producción y Economía Agraria. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria. Universidad de La Laguna. 38071. La Laguna. Tenerife

³ Dpto. Microbiología y Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de La Laguna. 38071. La Laguna. Tenerife ensuarez@ull.es

El cultivo de próteas comenzó en Canarias en los años 80, principalmente en las zonas costeras y de medianías (400-800 msm) de las islas de Tenerife, La Palma y Gran Canaria, llegando en la actualidad a ocupar unas 60 ha. Los géneros con mayor superficie cultivada en las islas son **Leucospermum**, **Leucadendron** y **Protea**, siendo **Leucospermum** uno de los géneros económicamente más importantes de la familia. Más del 90% de la producción de flores se exporta al mercado holandés, quedando sólo una pequeña cantidad en el mercado local. Aunque su propagación por esquejes no presenta excesiva dificultad, en ocasiones puede ser difícil satisfacer la demanda del mercado mediante el empleo de la propagación vegetativa convencional. Por ello, la propagación mediante técnicas de cultivo **in vitro** de tejidos podría convertirse en una alternativa importante para solventar este problema, permitiendo, además, el intercambio de material vegetal a nivel internacional con todas las garantías sanitarias.

Se seleccionaron y aislaron ramas de aproximadamente 15 cm de longitud que fueron esterilizadas y sembradas en un medio líquido compuesto por las sales del medio Murashige and Skoog (1962) (MS) con los macronutrientes a ¼ de su concentración y diferentes concentraciones de benciladenina y ácido giberélico, durante 10 días. Tras lo cual se emplearon, como explantos primarios, segmentos multinodales de **L. 'Flamespike'** y **L. 'Tango'**, que se sembraron en un medio sólido ½ MS sin reguladores de crecimiento. Como tratamiento control, explantos multinodales a los que no se les aplicó ningún pretratamiento se sembraron en un medio ½ MS al que se adicionaron diferentes concentraciones de benciladenina y ácido giberélico. A las 4 semanas de cultivo se determinó el porcentaje de yemas desarrolladas en cada uno de los casos, realizándose las siembras en 4 épocas determinadas del año (febrero, mayo, agosto y noviembre), durante 2 años.

En aquellos explantos en los que no se aplicaron pretratamientos, el porcentaje de yemas fue muy bajo a lo largo de todo el año en ambos cultivares, especialmente durante la época de floración. La aplicación de los pretratamientos provocó un incremento importante en el desarrollo de yemas, especialmente durante el invierno (época de floración). Este incremento se produjo en todos los casos, independientemente de las concentraciones de reguladores de crecimiento adicionadas. Las yemas obtenidas en los ensayos con pretratamientos presentaron un desarrollo normal, mientras que en las control se observaron diferencias dependiendo de las concentraciones de reguladores empleadas. Así por ejemplo, las desarrolladas en los medios con combinación de BA y GA₃ presentaron tallos engrosados y hojas deformes y excesivamente anchas, mientras que las obtenidas en ausencia de reguladores o en presencia únicamente de GA₃ presentaron un desarrollo normal y una mayor longitud, especialmente en el caso del GA₃.

La aplicación de estos pretratamientos permitiría, por tanto, obtener una producción **in vitro** más o menos homogénea durante todo el año, independientemente del estado fisiológico de la planta madre.

Referencias

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay of tobacco tissues. *Physiol. Plant.* 15:473-497.



INCIDENCIA DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN PLATANERA MICROPROPAGADA POR EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y POR MULTIPLICACIÓN DE BROTES

María Teresa Cruz Bacallado¹, María Durbán García¹, Belén Sosa Hernández¹ y Juan Bernardo Pérez Hernández²

¹Cultivos y Tecnología Agraria de Tenerife, S.A. (CULTESA), Aptd. 73, 38350 Tacoronte, Tenerife.
Email: direccion@cultesa.com

²Departamento de Fruticultura Tropical, ICIA, Aptd. 60, 38200 La Laguna, Tenerife.

Probablemente sea la platanera la especie frutal más micropropagada de forma comercial a escala mundial. La tecnología actual de propagación se basa en la obtención por multiplicación de nuevos brotes a partir del cultivo de ápices caulinares. La ruta embriogénica, a pesar de ofrecer un enorme potencial para la propagación de esta especie, muestra una serie de inconvenientes que han limitado su posible aplicación comercial, entre los que destaca un aumento del riesgo de aparición de plantas fuera de tipo.

Con el fin de evaluar la incidencia de aparición de variantes somaclonales, se realizó un seguimiento durante la fase de aclimatación en vivero de varios grupos de plantas producidas por cultivo *in vitro*, obtenidas a partir de distintos protocolos de micropropagación: (1) multiplicación de brotes (Vuylsteke, 1998), (2) suspensiones celulares embriogénicas (SCEs) derivadas de flores masculinas inmaduras de plantas adultas (Escalant et al., 1994) y (3) SCEs derivadas de cultivos de flores masculinas en proliferación *in vitro* (Pérez-Hernández y Rosell-García, 2008).

El tipo de variaciones observadas en las plantas regeneradas a partir de las diferentes líneas embriogénicas coincidió con las encontradas en las plantas producidas por multiplicación de brotes. Las más frecuentes resultaron ser variables de altura (extra enana, pequeña enana y gigante), de pigmentación (variegadas y pardas) y de malformación de hoja (tipos viróticos). En cuanto a niveles de incidencia de aparición de variantes somaclonales, no se observaron grandes diferencias entre el material producido a partir de flores en proliferación *in vitro* (5 a 24 % de plantas fuera de tipo) y aquellas producidas a partir de flores inmaduras de planta adulta (6 – 16 % de variantes). La micropropagación por multiplicación de brotes resultó en tasas de variación entre el 2 y el 6 %.

Referencias

- Escalant JV, Teisson C, Côte F (1994) *In vitro* Cellular and Developmental Biology – Plant 30: 181-186
Pérez-Hernández JB y Rosell-García P (2008) Plant Cell Reports 27: 965-971
Vuylsteke D (1998) International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan (ISBN 978-131-140-1)

MÉTODO PARA LA PROLIFERACIÓN PERMANENTE DE PLANTAS DE PAPAYA (CARICA PAPAYA L.) EN CULTIVOS DE LARGA DURACIÓN

Padilla, I.M.G.*, Carmona-Martín, E., Westendorp, N. and Encina, C.L.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biotecnología, Estación Experimental La Mayora, CSIC, Algarrobo-Costa, 29750 Málaga, Spain. * Centro IFAPA- Churriana-Málaga Cortijo de la Cruz 29140 Málaga.
E-mail: clencina@eelm.csic.es

Se ha establecido un protocolo de micropropagación fiable para brotes de papaya obtenidos de dos tipos de explantos, uno de explantos secundarios obtenidos de brotes regenerados a partir de embriones somáticos y otro a partir de brotes desarrollados de secciones nodales obtenidas de papayas maduras cultivadas en invernadero y estos cultivos se han mantenido in vitro en las mismas condiciones durante más de 11 años y aun tienen una buena calidad.

Para obtener una proliferación permanente de brotes de papaya y la obtención continuada de plántulas, proponemos la incubación de brotes de papaya en un medio de cultivo para su multiplicación, elongación y enraizado. Este medio consiste en la formulación basal de Murashige y Skoog (1962) suplementada con ANA (0.1 mg l⁻¹), BA (0.5 mg l⁻¹), GA₃ (0.5 mg l⁻¹), adenina sulfato (40 mg l⁻¹), sacarosa (30 g l⁻¹), tiamina (100 mg l⁻¹), piridoxina (50 mg l⁻¹), ácido nicotínico (50 mg l⁻¹), glicina (200 mg l⁻¹), inositol (100 mg l⁻¹) y bacto-agar (8 g l⁻¹).

En este medio los explantos de papaya son capaces de crecer y desarrollarse indefinidamente. Los cultivos presentan inicialmente un crecimiento en roseta, desarrollándose multitud de yemas que posteriormente elongan y enraizan en su mayor parte en ese mismo medio de cultivo. El ciclo de crecimiento completo se obtiene entre dos o tres meses. Posteriormente, plántulas o brotes individuales pueden ser separados de la roseta y aclimatados normalmente o enraizados si es necesario.

El medio de enraizado consiste en medio MS con las sales reducidas a la mitad suplementado con AIB (0.5-1 mg l⁻¹) y los brotes se incuban en dicho medio durante 10 días en condiciones de oscuridad, después de esta fase de inducción los brotes son incubados en medio líquido MS con las sales reducidas a la mitad sobre un soporte físico de vermiculita para la elongación de las raíces durante 4 semanas antes de su trasplante y aclimatación.

La aclimatación se realiza en un invernadero en un túnel de aclimatación bajo condiciones de controlado y progresivo estrés hídrico, obteniéndose una tasa de recuperación de plantas del 85% en cuatro semanas.

Referencias

Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497



IDENTIFICACIÓN DE MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA EN CEBADA

Vallés MP*, Sánchez-Díaz RA, Muñoz-Amatriain, Castillo AM

Departamento Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza. E-mail: valles@eead.csic.es

La embriogénesis de la microspora, es el proceso mediante el cual una microspora, tras ser sometida a un tratamiento de estrés, cambia su patrón de desarrollo encaminado a la formación de un grano de polen e inicia un proceso de embriogénesis que dará lugar a un embrión y finalmente a una planta completa. El interés despertado por los mecanismos que intervienen en la embriogénesis de la microspora, no sólo se debe a la posibilidad de que estos conocimientos puedan contribuir a una mejora de los sistemas de producción de plantas doble haploides, si no a que la embriogénesis de la microspora puede ser un sistema modelo para estudiar el control de las primeras fases del desarrollo de la embriogénesis zigótica y somática .

Para identificar los mecanismos moleculares que intervienen en el inicio del patrón del desarrollo embriogénico de la microspora en cebada, se ha realizado un estudio mediante técnicas de transcriptómica utilizando el 22k "Barley1 GeneChip" comparando los perfiles de expresión génica de anteras antes y después del tratamiento de estrés, y a los 4 y 8 días de cultivo. En este estudio se han seleccionado 1.797 genes que aumentaban su expresión a los 4 días de cultivo respecto a los 4 días de inducción por estrés. La clasificación funcional de los genes nos determinó el predominio de cambios de expresión asociados a procesos metabólicos, transporte celular, respuesta a estrés, transcripción y ciclo celular.

Para asociar estos genes según su perfil de expresión se realizó un análisis de clústeres que nos determinó 13 perfiles de expresión. De entre ellos destacan dos clústeres que corresponden a genes que se activan de "novo" y fuertemente a los 4 días de cultivo. El clúster 4 agrupó genes que se activan a los 4 días de cultivo, pero mantenían su nivel de expresión a los 8 días de cultivo, que podían jugar un papel importante en el inicio y mantenimiento del estado embriogénico. El clúster 7 agrupó genes que se activaban de forma específica a los 4 días de cultivo y que podían jugar un papel activo en la inducción de la embriogénesis. En el clúster 4 la mayoría de los genes estaban asociados a procesos de generación de componentes celulares y control de la transcripción, mientras que en el clúster 7 predominaban los genes relacionados con procesos metabólicos, respuesta a estrés y control de la transcripción. Se ha analizado la expresión de alguno de los genes identificados, tanto durante la embriogénesis de la microspora como en la embriogénesis zigótica mediante PCR-Semicuantitativa.

Los genes seleccionados en este estudio representan una colección de genes de expresión en embriogénesis temprana de la microspora. Estos genes puede tener un gran valor como genes marcadores de embriogénesis en otras especies y sistemas.

MICROPROPAGACIÓN DE LESQUERELLA FENDLERI L MEDIANTE ORGANOGÉNESIS

Isabel Vídoy-Mercado, Araceli Barceló e Isabel MG Padilla

IFAPA Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga

Lesquerella fendleri es una especie crucífera que se cultiva como planta anual de invierno y está adaptada a zonas áridas, con poca irrigación y suelos calcáreos. Sus semillas tienen un 25% en peso de aceite, que es rico en ácidos grasos, siendo el ácido lesquerólico el principal, con un contenido de hasta el 60% del total. Estos aceites pueden tener una gran utilidad en productos industriales tales como lubricantes, plásticos, recubrimientos, cosméticos, etc. Por ello, recientemente se está prestando atención a la producción y mejora mediante métodos biotecnológicos de esta especie. En este trabajo presentamos un método de micropropagación de **Lesquerella fendleri**, mediante organogénesis. Las semillas de **Lesquerella** fueron esterilizadas con hipoclorito sódico y cultivadas *in vitro*, en medio MS, alcanzándose una tasa de germinación media del 68%, a los diez días. Secciones de 3-5 mm de hipocótilo, cotiledón y pecíolo se utilizaron como explantos primarios para los experimentos de organogénesis. El cotiledón fue el explanto menos reactivo mientras que con hipocótilo y pecíolo se alcanzó un 100% de regeneración en un medio MS con 1 mg/l de BA y 0.5 mg/l de NAA, con un número medio de regenerantes por explantos de 2.8 y 2.2 respectivamente. Los brotes regenerados elongaron en medio MS sin reguladores de crecimiento y fueron enraizados en este mismo medio solo o con la adición de 0.1 mg/l de IAA. Las plántulas enraizadas fueron aclimatadas en el invernadero, en un sustrato compuesto por turba:perlita (1:1), con una alta tasa de supervivencia. Este método puede ser utilizado para la multiplicación de líneas de interés y para la transformación genética de esta especie.

Este trabajo se ha realizado con la financiación del Plan E, bajo proyecto BIOLUBS ME09-091.



ORGANOGENESIS DE BROTES Y RAÍCES ADVENTICIAS DE HIGUERA (FICUS CARICA L.). INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE HOJA

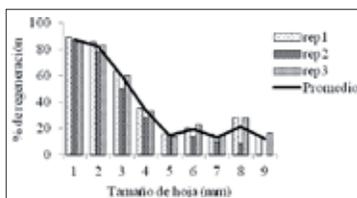
Arancha Arbeloa, Wiem Elleuch, Pilar Andreu, Juan A. Marín

E. E. de Aula Dei (CSIC). Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza. E-mail: arbeloa@eead.csic.es

La organogénesis *in vitro* a partir de tejidos foliares en frutales leñosos es recalcitrante en numerosas especies; sin embargo, es de gran interés desarrollar métodos eficaces de regeneración a partir de tejidos adultos. Numerosos factores pueden influir en los protocolos de organogénesis en estas especies, entre ellos el tamaño de hoja. Aunque en diversos trabajos en frutales se señalan mejores resultados en organogénesis a partir de hojas pequeñas, no se encuentra un trabajo sistemático sobre la influencia del tamaño de hoja en la regeneración. En este trabajo se presenta un estudio de inducción de brotes y raíces adventicias a partir de hojas de ápices vegetativos en higuera y su relación con el tamaño de la hoja.

De los dos protocolos seguidos, el primero incluyó la estimulación previa de los ápices de brotes *in vitro* en presencia de 1 mg/l BAP y 1 mg/l NAA y posteriormente en ausencia de NAA (Gentile et al., 2002). Se estudió la influencia del tamaño de las hojas separadas del ápice (1-9 mm) en la regeneración. La regeneración fue inducida en estas hojas a las 3 semanas de cultivo en medio QL (Quoirin y Lepoivre, 1977) con 1 mg/l de BAP.

El porcentaje medio de regeneración fue del 37.74%. El valor máximo de regeneración fue de 87.6% observado en las hojas de menor tamaño (1 mm), y el valor mínimo de regeneración fue 12.12% en hojas de mayor tamaño (9 mm). Además, el porcentaje de regeneración disminuyó a medida que el tamaño de la hoja aumentó y el análisis de regresión logística mostró que este efecto es muy significativo.



Las hojas pequeñas (1-4 mm) regeneraron más de un brote, lo que no ocurrió en las hojas mayores. Se estudió, asimismo, la velocidad de regeneración de brotes en relación al tamaño de hoja, observándose que los brotes regenerados a partir de hojas pequeñas (1-4 mm) comenzaron en la 4ª semana, mientras que las hojas de tamaño 6, 7, 8 y 9 mm regeneraron a partir de la 7ª semana.

En un segundo protocolo, las hojas provenientes de brotes micropropagados, se trataron con un pulso auxínico (MS líquido con 1.7 μM de 2,4-D durante 90 minutos) y después se cultivaron en el medio de regeneración LR1 solidificado con Phytigel (0.28%) con 2.6 μM de NAA y de 3.5 μM de BAP (Pascual y Marín, 2005). Con este protocolo se obtuvo un alto porcentaje de regeneración (85.55%), pero con diferentes patrones de regeneración: hojas que regeneraron únicamente raíces (53.33%), únicamente brotes (26.67%) y ambos simultáneamente (5.56 %).

El tamaño de hoja ha sido definitivo en la inducción de organogénesis en higuera tanto en los porcentajes obtenidos como en el tipo de organogénesis y la velocidad de aparición de la misma. Por otra parte, el protocolo seguido ha influido en el patrón de regeneración: mientras que el protocolo 1 indujo únicamente la regeneración de brotes, el protocolo 2 indujo la regeneración de brotes y de raíces.

Referencias

Gentile, A.; Monticelli, S.; Damiano, S. 2002. Adventitious shoot regeneration in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Plant Cell Rep.* 20: 1011-1016.

Quoirin, M.; Lepoivre, P. 1977. Etudes de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Hort.* 78:437-442

Pascual, L.; Marín, J.A. 2005. A liquid pulse of the auxin 2,4-D induces higher shoot and root regeneration from leaf explants of adult *Prunus* rootstock. *Scientia Horticulturae* 106: 582-592.

Este trabajo ha sido financiado en parte por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43

EFECTO DEL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE OLIVO Y SU CONVERSIÓN EN PLANTAS

Sergio Cerezo, José A. Mercado y Fernando Pliego-Alfaro

Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, C P 29071 Málaga.

E-mail: ferpliego@uma.es

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie de gran importancia económica en la cuenca mediterránea donde se localizan los principales países productores de aceite de oliva. El uso de herramientas biotecnológicas puede ser de gran utilidad en la mejora de esta especie; así, la transformación genética permite incorporar caracteres de interés en periodos de tiempo más cortos aunque requiere de un sistema de regeneración eficiente a partir de las células transformadas. Estudios recientes llevados a cabo en nuestro grupo de investigación permiten desarrollar un protocolo eficiente de regeneración mediante la vía embriogénica en material juvenil del cv. Picual (Cerezo et al. 2011).

El empleo del cultivo en suspensión en la embriogénesis somática presenta ventajas como el incremento en las tasas de proliferación y la sincronización de los cultivos. No obstante, el cultivo prolongado en estas condiciones puede inducir degeneración y pérdida de capacidad embriogénica, así como un incremento en la aparición de variantes somaclonales (Von Arnold 2008). Trabajos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto la utilidad del cultivo de callo embriogénico en suspensión con diferentes fines; así, la aplicación de tres semanas de cultivo en medio líquido suplementado con antibiótico son necesarias para la selección del material transgénico (Pérez-Barranco et al. 2009; Torreblanca et al. 2010). Por otro lado, el cultivo del callo embriogénico en medio líquido durante 4 semanas permite la sincronización y selección de embriones globulares para su posterior maduración y conversión (Cerezo et al. 2011). En este trabajo se evaluó la respuesta del callo embriogénico de olivo al cultivo continuado en suspensión, así como su efecto en la conversión en plantas.

Las líneas embriogénicas utilizadas proceden de callo embriogénico obtenido a partir de radículas de embriones zigóticos de la variedad 'Picual'. El cultivo se inició inoculando 1 g de callo embriogénico en 50 ml de medio líquido ECO de proliferación en matraces de 125 ml. Los matraces se mantuvieron en agitación continua a 100 rpm con subcultivos cada 28 días. Se tomaron datos de proliferación del callo durante 16 meses, y durante el primer año, a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de iniciarse el experimento, se aisló la fracción fina del callo embriogénico utilizando mallas de 3x3 mm. Los embriones globulares de la fracción fina se emplearon para la regeneración de plantas siguiendo el protocolo descrito por Cerezo et al. (2011). Las plantas regeneradas se mantuvieron en medio de multiplicación hasta su aclimatación en invernadero.

Los resultados obtenidos muestran un ligero descenso de la capacidad de proliferación del callo embriogénico mantenido en suspensión. El incremento de peso del callo embriogénico a lo largo de 16 meses alcanzó un valor medio de $1,98 \pm 0,3$ g/subcultivo, duplicando el peso inicial. Sin embargo, los valores medios de incremento de peso fueron significativamente mayores durante los 10 primeros meses de cultivo, disminuyendo la capacidad de proliferación del callo un 16% a partir del décimo mes, valores medios de $2,18 \pm 0,19$ vs $1,67 \pm 0,05$ g/subcultivo. En cuanto a la regeneración de plantas a partir de los embriones mantenidos en medio líquido, a los 2 meses de cultivo se observó el mayor porcentaje de regeneración de brotes, 76%, disminuyendo el número de brotes recuperados en los muestreos posteriores, con valores del 24% después de un año. Estas plantas están siendo aclimatadas para analizar posibles cambios fenotípicos inducidos por el cultivo prolongado en medio líquido.

En conclusión, los datos obtenidos indican que el cultivo prolongado en medio líquido reduce ligeramente la capacidad de proliferación del callo embriogénico y la conversión en plantas de los embriones somáticos.

Referencias

Pérez-Barranco et al. (2009) *Plant Cell Tiss Org Cult* 97:243-251.

Torreblanca et al. (2010) *Plant Cell Tiss Org Cult* 103:61-69.

Cerezo et al. (2011) *Plant Cell Tiss Org Cult* [En prensa].

Von Arnold S. (2008) In: George EF, Hall MA, De Klerk G-J (eds.) *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd edition. Vol. 1. The Background. Springer, Dordrecht, pp 335-354.



INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN AMENTOS DE ENCINA (*QUERCUS ILEX L.*)

Miquel Blasco¹, Azahara Barra², Carmen Brisa¹, Juan Segura¹, Mariano Toribio², Isabel Arrillaga¹

¹Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia; miquel.blasco@uv.es

² IMIDRA - Finca «El Encín». Apdo.127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

La encina (*Quercus ilex L.*) es una de las especies más representativas del bosque mediterráneo. Además de por su resistencia a la sequía y su importancia ecológica como refugio de algunos animales, la encina tiene importancia económica por las bellotas, empleadas para la alimentación del ganado porcino y por la densidad y resistencia de su madera utilizada para la construcción de barcos, casas y otras fabricaciones tradicionales. En algunos países se utiliza para el cultivo simbiótico de trufas, lo cual contribuye al desarrollo rural y la estabilización de la población en áreas deprimidas. No obstante, la investigación científica sobre esta especie se encuentra ralentizada debido a la dificultad en la conservación de semillas, la variabilidad en la producción de bellota y su gran recalcitrancia a la propagación vegetativa convencional, especialmente de los árboles adultos. Por ello, se hace imprescindible la disponibilidad de protocolos para la propagación de genotipos de interés. En este trabajo se presentan los primeros resultados sobre el establecimiento de líneas embriogénicas de encina a partir de amentos procedentes de dos genotipos de la provincia de Valencia.

Se recogieron amentos durante dos años consecutivos: abril de 2009 (un genotipo de Villar del Arzobispo, Valencia) y en mayo del 2010 (tres genotipos de Remedio, Villar del Arzobispo y Hunde, también de la provincia de Valencia). Una vez esterilizados los amentos, se aislaron las flores y se pre-acondicionaron durante 10 días en medio sin reguladores de crecimiento, tras lo cual se transfirieron a medio de inducción (MS o SH) suplementado con 10 μ M BA y 10 ó 50 μ M NAA durante 20 días. Posteriormente, se subcultivaron durante 30 días en medio SH con las hormonas reducidas, para pasarlos finalmente a medio SH sin reguladores de crecimiento (medio de manifestación) donde se mantuvieron 60 días. En estas condiciones se obtuvo respuesta embriogénica en 2 explantos en el ensayo del primer año (2009, genotipo Villar del Arzobispo) y en 5 del segundo año (2010, todos del genotipo Hunde). Dado que en los experimentos del 2009 los embriones se indujeron en explantos que habían sido cultivados en medio MS, éste fue seleccionado como medio de inducción en los ensayos posteriores. No hubo diferencias apreciables entre las combinaciones hormonales ensayadas.

En los ensayos del primer año, uno de los embriones somáticos presentó embriogénesis recurrente en el medio de manifestación, por lo que fue amplificado, en medio MS con BA/NAA, para tener suficiente material en experimentos de maduración y germinación. Para favorecer su maduración, los embriones así obtenidos se aislaron y sembraron en los siguientes 4 medios: medio con macronutrientes MS reducidos a la mitad sin o con sorbitol (MSI y MSII, respectivamente) y medio con macronutrientes SH reducidos a la mitad sin o con sorbitol (SHI y SHII, respectivamente). Los 4 medios (sin reguladores de crecimiento) se suplementaron con 30g/l de sacarosa. El medio MSII (con sorbitol) favoreció la proliferación de embriogénesis secundaria mientras que en ausencia de sorbitol se indujo callo con apariencia embriogénica. También se realizó un experimento de maduración siguiendo el protocolo descrito por Mauri y Manzanera (1) que se basa en la utilización de ABA, estratificación y posterior tratamiento con BA. Ninguno de los tratamientos promovió la maduración de los embriones. En la mayoría de los casos se obtuvieron embriones malformados con los cotiledones soldados o embriogénesis secundaria. La transferencia posterior de estas estructuras a medio con carbono activo no promovió el desarrollo de los embriones.

Con la línea establecida el primer año y 3 de las del segundo, se han iniciado cultivos en medio líquido partiendo de 250 mg por línea. Al cabo de un mes, con un subcultivo a las dos semanas, se procedió al fraccionamiento de las suspensiones con tamices de 0.25; 0.42 y 1.00 mm de malla, estableciendo así cuatro tamaños celulares para cada una de las líneas. La velocidad de crecimiento para cada fracción celular se midió anotando el volumen celular tras centrifugación suave a 0, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 20, y 25 días de iniciados los cultivos. Se pretende homogeneizar el material para sincronizar los procesos de proliferación y así facilitar la posterior maduración y germinación de los embriones.

[1] Mauri PV, Manzanera JA (2004). *In vitro Cell Dev Biol* 40:495-498.

Proyecto cofinanciado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-66345-C02-01 y 02; AGL2010-22292-C03-01 y 03); Generalitat Valenciana (Prometeo 2009/075) y por una beca (FPI) del MICINN a M.B.

MICROPROPAGACIÓN DE *JATROPHA CURCAS* L.

Belén Tejedor¹, M^a Elena Aguilar¹, Vicente Moreno² y Alejandro Atarés²

¹ Centro Agronómico y Tropical de Investigación y Enseñanza. Laboratorio de Biotecnología. Sede Central del CATIE, Cartago, 3050 Turrialba, Costa Rica

² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV CPI Ed. 8E, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia. aatares@ibmcp.upv.es

En el momento actual, el uso del biodiésel se presenta como alternativa al empleo de los combustibles fósiles. Además de los beneficios medioambientales, el empleo de una especie como ***Jatropha curcas*** para la obtención de biodiésel presenta otras ventajas. En primer lugar, al ser una especie sin uso alimentario, no hay riesgo de que su empleo pueda interferir en los mercados de productos de primera necesidad. Por otro lado, sus características hacen que pueda ser una alternativa de cultivo en tierras abandonadas o marginales, consiguiendo su recuperación para la agricultura. Por último el rendimiento medio en la producción de aceite de *Jatropha* es muy superior al de otras especies oleaginosas (Jongschaap et al, 2007)

Por estos motivos, desde hace unos años se han intensificado las investigaciones para mejorar distintos aspectos relacionados con ***Jatropha curcas*** tanto en organismos públicos como en empresas privadas. En este contexto, el desarrollo de protocolos de multiplicación vegetativa en accesiones seleccionadas de esta especie puede ayudar a la utilización del material vegetal adecuado para cada área de cultivo.

En el presente trabajo se ha abordado el desarrollo de una serie de metodologías que nos permitan la micropropagación de ***Jatropha curcas*** mediante regeneración adventicia. En primer lugar se estudió el patrón polisómico de distintas partes de la planta comprobando que tanto en los cotiledones como en los hipocotilos no existía mixoploidía.

Posteriormente, se puso a punto a un protocolo de esterilización de diversos tipos de explantes a partir de la accesión Nicaragua catalogada por el banco de semillas del CATIE. En primer lugar se abordó la implantación y brotación de yemas axilares y ápices meristemáticos. Se comprobó que la obtención de plantas madre con un mejor estado sanitario que las empleadas en este trabajo podría permitir la micropropagación a partir de este tipo de explantes.

Tras la obtención de material axénico mediante la esterilización y germinación de semillas in vitro se pudo abordar el estudio de las mejores condiciones para la regeneración adventicia, multiplicación, elongación y enraizamiento de nuevas vitroplantas. El método de micropropagación que dio mejores resultados consiste en la regeneración vía organogénica a partir de explantes de cotiledón, seguida de una fase de multiplicación para aumentar el número de brotes, una fase de elongación y el enraizamiento de los mismos. En la parte final del trabajo se llevó a cabo la aclimatación de las plantas obtenidas (Tejedor, 2010)

Por tanto, tras estos experimentos se dispone de un protocolo de micropropagación que permite la multiplicación de la accesión Nicaragua de ***Jatropha curcas*** mediante técnicas de cultivo in vitro.

Referencias

Jongschaap, R.; Corne, W.; Bridraban, P. y Bradenburg, W. (2007) Claims and Facts of ***Jatropha curcas*** L. Global evaluation of *Jatropha curcas*. Breeding and Propagation Programme. **Plant research International.B.V. Wageningen**, 158

Tejedor, B. (2010) Micropropagación de ***Jatropha curcas*** L. Trabajo Final de Carrera de la ETSIA Universidad Politécnica de Valencia



LOCALIZACIÓN IN SITU DE AUXINAS ENDÓGENAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS DEL POLEN INDUCIDA POR ESTRÉS IN VITRO

Héctor Rodríguez-Sanz, M^a Carmen Risueño, Pilar S. Testillano

Desarrollo de Plantas y Arquitectura Nuclear, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid. E-mail: testillano@cib.csic.es, risueno@cib.csic.es

Entre los reguladores de crecimiento vegetal (PGRs) mayoritarios, las auxinas están implicadas en numerosos procesos de desarrollo, incluida la embriogénesis. Su acción combinada con otros PGRs regula la división y expansión celular durante procesos morfogénicos, los cuales son modulados por factores ambientales. La síntesis endógena de ácido indol acético (IAA), auxina endógena mayoritaria, aumenta durante la embriogénesis zigótica acumulándose en dominios específicos del embrión y redistribuyéndose de forma específica con la formación y maduración del embrión. El conocimiento de los mecanismos reguladores y la posible implicación de factores externos en el crecimiento y desarrollo del embrión es todavía muy escaso, debido en parte a la dificultad de análisis que presenta el embrión joven dentro de los tejidos maternos y junto al endospermo. En este sentido, los sistemas *in vitro* de embriogénesis, y especialmente los cultivos de microsporas aisladas constituyen excelentes sistemas para la disección de los mecanismos que controlan la formación del embrión. Muchos sistemas de embriogénesis *in vitro* requieren de la aplicación exógena de auxinas para la iniciación y posterior proliferación. Sin embargo la embriogénesis de polen en cultivos de microsporas aisladas se induce por estrés en medios de cultivo libres de PGRs.

En este trabajo se analiza la presencia y distribución de auxina endógena durante la progresión de la embriogénesis del polen en cultivos de microsporas aisladas de **Brassica napus**. Se ha inducido la reprogramación de la microspora a la ruta embriogénica mediante un tratamiento de estrés por calor a 32°C y se han analizado muestras en distintas etapas de la formación del embrión derivado de polen. Se ha realizado la localización **in situ** de IAA mediante inmunofluorescencia con anticuerpos específicos en criocortes y cortes semifinos de muestras procesadas mediante criotécnicas, y posterior análisis en microscopía láser confocal. Como control, se realizaron ensayos de inmunodeplección prebloqueando los anticuerpos con IAA.

Los resultados mostraron la presencia de IAA endógeno en embriones derivados de polen en distintas etapas del desarrollo **in vitro**, en medios de cultivo libres de PGRs, con una distribución específica y acumulaciones en zonas proliferativas del embrión en crecimiento. Los datos indican la existencia de biosíntesis endógena de IAA durante la reprogramación de la microspora a embriogénesis y desarrollo del embrión, así como su redistribución en dominios concretos similar a la embriogénesis zigótica. Estos datos sugieren a las auxinas como factor regulador endógeno del proceso *in vitro* y proporcionan nuevas evidencias de analogías entre la embriogénesis del polen y zigótica.

Agradecimientos

Trabajo financiado por el MICINN, proyectos BFU2008-00203 y AGL2008-04255.

POLLEN AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN QUERCUS SUBER: SEARCHING FOR COMMON MARKERS AND FEATURES IN TWO IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENTAL PATHWAYS

Pilar S. Testillano¹, Mohammad Faisal¹, Héctor Rodríguez-Sanz¹,
José Antonio Manzanera² y M^a Carmen Risueño¹

¹Desarrollo de Plantas y Arquitectura Nuclear, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

²E.T.S.I. Montes, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Ciudad Universitaria s.n.28040 Madrid,

E-mail: testillano@cib.csic.es, risueno@cib.csic.es

Long-lived woody plants in both, domesticated and non-domesticated conditions are key drivers of terrestrial biodiversity, research interest in trees is increasing and focused on both economically and ecologically important species, some forest trees like oak being used as model systems in genomic research programmes. Tree breeding strategies has focused on ways to reduce cycle time and improve the efficiency of selection; here, propagation of selected trees by somatic embryogenesis and genetic engineering approaches applied to haploids and double-haploid plants produced in short-times by in vitro pollen embryogenesis have a high potential.

Production of doubled haploid plants from anther cultures is especially useful for regeneration and breeding of forest trees, since the long regeneration time and strong inbreeding depression of these species makes the traditional breeding methods impractical. The induction of haploid embryos in anther cultures, from cork oak (L.), after application of specific stress conditions has been reported (Bueno et al. 1997); the system constituting one of the few examples of successful regeneration of microspore-derived plantlets in a woody species with economic interest. An efficient and reproducible in vitro system of somatic embryogenesis in cork oak was also established (García-Martín et al. 2005).

The search for molecular and cellular markers during early stages of microspore embryogenesis and further embryo development constitutes an important goal in the identification of cells committed to the embryogenesis developmental programme as opposed to those cells which are non-responsive to the embryogenic pathway, as well as in the elucidation of the cellular mechanisms underlying in vitro embryo progression. They are also important tools for monitoring the metabolic processes involved in the process.

Previous studies of the group have reported that changes in cell wall polymers and starch, as well as epigenetic marks were associated with the pollen reprogramming to embryogenesis (Ramírez et al. 2004, Barany et al. 2010).

In this work, we approach a comparative analysis of the two pathways, pollen and somatic embryogenesis, in cork oak, in order to characterize common markers and differential features of both pathways. Somatic embryos were induced from immature zygote embryo cultures, and pollen embryos were induced on anther cultures. Samples of both in vitro embryogenesis systems were obtained at different stages, fixed and processed for further cytochemical and immunocytochemical techniques at light and confocal microscopy. Rearrangements of the structural organization of cells and tissues, as well as changes in cell wall polymers and structure, nuclear organization and epigenetic marks were analyzed in developing embryos of both in vitro systems.

The results give new insights into the identification of the cellular mechanisms involved in the embryogenesis induction and progression, and extent the knowledge in woody species in which the information is still very scarce.

References

- Bárany, I., Fadón B., Risueño M.C., Testillano P.S. (2010) Cell wall components and pectin esterification levels as markers of proliferation and differentiation events during pollen development and pollen embryogenesis in L. J Exp Bot 61, 1159-1175.
- Bueno, M.A., Gómez A., Boscaiu M., Manzanera J.A., and Vicente O. (1997). Stress induced haploid plant production from anther cultures of Physiol. Plantarum 99, 335-341.
- García-Martín, G., Manzanera J.A., González-Benito M.E. (2005). Effect of exogenous ABA on embryo maturation and quantification of endogenous levels of ABA and IAA in somatic embryos. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 80, 171-177.
- Ramírez, C., Testillano P. S., Pintos B., Moreno M.A., Bueno M.A., Risueño M.C (2004). Changes in pectins and MAPKs related to cell development during early microspore embryogenesis in Quercus suber L. Eur J Cell Biol 83, 213-225

Work supported by MICINN projects BFU2008-00203 and AGL2008-04255.



QUANTITATIVE ASSESSMENT OF MICROSPORE SWITCHOVER TO EMBRYOGENIC PATHWAY IN OLIVE USING FLUORESCENCE BIOIMAGING AND FLOW CYTOMETRY TECHNIQUES

Prem D^{1,*}, Bueno MA², Testillano PS¹, Risueño MC¹

¹Plant Development and Nuclear Architecture, Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

²Forest Biotechnology Lab, CIFOR-INIA, A-VI, Km 7.5. 28040 Madrid. Spain

E-mail: testillano@cib.csic.es, risueno@cib.csic.es

The switch on from gametophytic to embryogenic pathway of microspores is the first step towards the obtention of doubled haploids and in trees species this knowledge is still scarce. Induction of microspore embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.) has been reported by isolated microspore culture [1], and cellular markers of the reprogramming process have been characterized [2], with cell wall polymers being one of the prominent markers [3].

We have studied several critical endogenous (plant genotype, time of bud collection, microspore stage, thermal pre-treatment) and exogenous (media composition, carbon source, thermal and chemical stress treatments after microspore isolation, culture temperature, cell density) factors that affect microspore embryogenesis induction in olive. Some modifications on the pre-treatment, processing and microspore isolation methods have been developed to improve the protocol of the culture system. In this report, we present our results of the evaluation of those factors to improve the *in-vitro* system for microspore reprogramming and formation of multicellular pro-embryos. The process has been monitored at light and fluorescence microscopy by cytochemistry and quantitative assessment by high-throughput flow cytometry targeting cell viability and cellulose deposition. Also bioimaging approaches have been used to analyse the results obtained.

A new culture system for cold pre-treatment of buds was established using a cold pre-culture protocol. The cold pre-culture of buds and cold stress treatment of isolated microspores with or without starvation inducing agents such as polyols showed a marked increase in frequency of embryogenesis induction. Controlled exposure of isolated microspores spindle inhibitors, without low temperature stress, also enhanced the frequency of embryogenic divisions. Moreover, a cell density of $1-2 \times 10^5$ cells/ml was essential to keep a congenial osmotic environment. However, the choice of carbon source had a marked effect on the embryogenesis process both in terms of proliferation and differentiation. Maltose provided an appropriate osmotic balance leading to the differentiation of multicellular structures from single cells. Nevertheless, a change to sucrose as carbon source enhanced the viability and the efficiency of cell division which was essential for maintaining the cell proliferation rate. Therefore, a split carbon source regimen was found most suitable for maintenance of embryogenic divisions after induction. These new insights offer several clues to fine tune the microspore embryogenesis process in olive.

Bueno et al. 2005. Acta Physiol. Plantarum 27, 695-702.

Solís et al. 2008. Plant Sci. 174, 597-605.

Barany et al. 2010. J Exp. Bot. 61, 1159-1175.

Work supported by MICINN projects AGL2008-04255 and BFU2008-00203.

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN PLANTAS DE OLIVO REGENERADAS VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Fatiha Bradaï, Fernando Pliego-Alfaro y Carolina Sánchez-Romero

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n. 29071 Málaga.
E-mail: c.sanchez@uma.es

El cultivo **in vitro** puede inducir la aparición de variación somaclonal en las plantas regeneradas (Larkin y Scowcroft, 1981). Este hecho puede resultar beneficioso cuando lo que se persigue es un aumento de la variabilidad genética. Sin embargo, cuando el objetivo es la propagación clonal en masa, la obtención de plantas fieles al tipo es un requisito indispensable. Tanto en un caso como en otro, resulta imprescindible conocer si la técnica de cultivo utilizada provoca la aparición de cambios en nuestro sistema experimental, la envergadura de dichos cambios, su estabilidad y los principales factores involucrados en la aparición de los mismos. Sin embargo, los casos en los que se ha llevado a cabo un estudio de la estabilidad genética después de la aplicación de técnicas de cultivo **in vitro** no son frecuentes.

El análisis de la fidelidad genética en plantas procedentes del cultivo **in vitro** puede ser llevado a cabo a través de distintas metodologías (Harding, 2004). El análisis morfológico se ha utilizado en repetidas ocasiones. La principal ventaja de esta aproximación reside en el hecho de que todo el genoma es estudiado simultáneamente (al menos los genes que son expresados en el fenotipo) frente a las técnicas de marcadores moleculares donde normalmente solo una mínima parte del genoma es evaluado (Vázquez, 2007). Sin embargo, en algunos casos, los cambios que se observan son consecuencia de una plasticidad fenotípica o de cambios epigenéticos no estables, y acaban desapareciendo con el tiempo. Por consiguiente, este tipo de análisis es aconsejable realizarlos cierto tiempo después de que las plantas hayan sido transferidas a condiciones **ex vitro**.

En la presente investigación, se ha llevado a cabo el análisis fenotípico de 316 plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática, un año después de ser transferidas a invernadero. Las plantas procedían de 8 líneas embriogénicas distintas, obtenidas a partir de embriones zigóticos y habían sido mantenidas mediante subcultivos sucesivos durante 4 y 8 años. Los resultados obtenidos se discuten mediante comparación con plantas control procedentes de la germinación de semillas.

Referencias

Harding K (2004) *CryoLetters* 25: 3-22

Larkin PJ, Scowcroft SC (1981) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 2 : 111-122

Vázquez A (2007) 1st Meeting of Working Group 1. Cost 871 Action: Cryopreservation of European Crop Species. Oviedo, Spain.





SESIONES DE POSTERS

S III - TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

SOBREEXPRESIÓN EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE CASTAÑO DEL GEN *CsTL1* QUE CODIFICA UNA TAUMATINA

Elena Corredoira, Ana María Vieitez, y Antonio Ballester

Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC, Apartado 122, 15780, Santiago de Compostela,
E-mail:elenac@iiag.csic.es

Las poblaciones de castaño europeo y americano han sido devastadas por el ataque de dos hongos: **Phytophthora cinnamomi**, causante de la enfermedad de la tinta, y **Cryphonectria parasitica**, causante de la enfermedad del cáncer o chancro. Los programas de mejora existentes se han centrado fundamentalmente en la obtención de híbridos (castaño europeo x castaño asiático) con diferentes grados de resistencia, pero que generalmente suelen mostrar menor calidad de madera y de frutos que el castaño europeo. En este sentido, la transformación genética podría ser una herramienta complementaria a esos programas de mejora convencional con la introducción de genes que puedan incrementar la resistencia a dichas enfermedades. Lamentablemente no se conocen los mecanismos de resistencia tanto a la tinta como al chancro, por lo que la transformación ha de hacerse con genes no específicos que puedan conferir algún tipo de resistencia a la entrada o al movimiento de los patógenos dentro del árbol (Connors y col., 2002), como pueden ser genes tipo osmotina y quitinasa. En este trabajo, se ha utilizado el gen **CsTL1**, aislado en castaño, que codifica para una proteína tipo osmotina (taumatina), y que se ha comprobado que posee actividad antifúngica para **Trichoderma viride** y **Fusarium oxysporum** (García-Casado y col., 2000).

Para la transformación con el gen de la taumatina se han empleado embriones somáticos de castaño de tres líneas embriogénicas, dos de origen zigótico (Cl-3 y Cl-9) y una de origen foliar (C12-H12). El gen **CsTL1** se clonó en el vector pK7WG2D (Karimi y col., 2007) bajo el control del promotor del virus mosaico de la coliflor (CaMV) 35S. Además el vector contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (NPTII) como marcador de selección y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Ese vector binario se obtuvo de la Unidad de Genómica Funcional del Departamento de Sanidad Vegetal Biología de Sistemas (VIB) de la Universidad de Gante. Para la clonación del gen de interés en dicho vector, se ha utilizado el sistema GATEWAY (Invitrogen). Un vez clonado el gen de la taumatina en el vector, se procedió a transformar con él la cepa EHA105 de **Agrobacterium tumefaciens**.

Los embriones de las tres líneas embriogénicas de castaño se transformaron utilizando el procedimiento descrito por Corredoira y col. (2004, 2007). Para ello grupos de 3-4 embriones somáticos en estado globular-torpedo, se co-cultivaron con la bacteria en oscuridad a 25 °C durante 4 días. Transcurrido ese tiempo, se transfirieron a medio de selección que contiene kanamicina 150 mg/l, cefotaxima 200 mg/l y carbenicilina 300 mg/l (medio de selección). Después de seis semanas en medio de selección, con transferencias a medio fresco cada 15 días, se evaluó el porcentaje de explantos resistentes obteniéndose valores de 25% para la línea Cl-9 y del 4,6% para las líneas C12-H1 y Cl-3. La presencia del gen de la taumatina en las diferentes líneas embriogénicas resistentes aisladas fue analizada mediante PCR.

Referencias

- Connors BJ, Miller M, Maynard CA, Powell WA (2002) *Plant Science* 163:771-781
 Corredoira E, Montenegro D, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2004) *Plant Cell Reports* 23: 311-318
 Corredoira E, San-José MC, Vieitez AM, Ballester A (2007) ***Plant Cell Tissue and Organ Culture*** 91: 281-288
 García-Casado G, Collada C, Allona I, Casado R, Rodríguez-Cerezo E, Gómez L, Aragoncillo C (2000) *Physiologia Plantarum* 110:172-180
 Karimi M, Depicker A, Hilson P (2007) *Plant Physiology* 145:1144-1154

Agradecimientos

Los autores quieren expresar su agradecimiento al profesor Cipriano Aragoncillo y a la profesora Isabel Allona (ETSI Montes, Madrid) por la cesión del gen **CsTL1**, y al Dr. Leandro Peña (IVIA) por su asesoramiento en la clonación del mencionado gen. Se agradece a M^a José Cernadas Cernadas su excelente asistencia técnica. Esta investigación ha sido financiada parcialmente por la Xunta de Galicia (Proyecto O9MRU002400PR).



APLICACIÓN DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL A LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE QUERCUS ROBUR L.

Nieves Vidal, Ana M. Vieitez y Rubén Mallón.

Dpto. Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña. E-mail: nieves@iag.csic.es

La transformación genética de roble puede ser una metodología útil para introducir genes de resistencia a las enfermedades que ponen en peligro su supervivencia. Recientemente se ha desarrollado un protocolo de transformación de embriones somáticos de *Quercus robur* con genes marcadores mediante cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* (Vidal et al., 2010), con el que se ha podido transformar un genotipo procedente de hojas de plántula y otro procedente de un árbol de más de 300 años de edad, si bien las tasas de transformación obtenidas son relativamente bajas, sobre todo en el genotipo adulto, y la duración del periodo de selección bastante elevada (entre 20 y 30 semanas tras la infección).

En este trabajo se ha aplicado el sistema de cultivo por inmersión temporal en recipientes RITA® a la transformación de los embriones somáticos de roble con un doble objetivo: 1) optimizar la etapa de selección, con el fin de incrementar las tasas de transformación y disminuir el tiempo requerido para la aparición de explantos transformados con respecto al sistema tradicional de cultivo en medio semisólido (placas), y 2) evaluar el sistema de cultivo en RITA como método de proliferación de las líneas transformadas y de obtención de material embriogénico para su crioconservación.

1) Uso del sistema RITA® para la selección del material transformado con *A. tumefaciens*: Se ha seguido el protocolo descrito en Vidal et al. (2010) hasta que los explantos inoculados cumplieron 4 semanas en el medio selectivo en placa, momento en el que se transfirieron a recipientes RITA® con las condiciones de cultivo descritas por Mallón et al. (2011) pero usando medio adicionado con antibióticos (carbenicilina, cefotaxima y kanamicina [kan]). Puesto que la disponibilidad de antibióticos en medio líquido puede ser superior a la de medio semisólido se realizaron varios experimentos para determinar sus niveles óptimos. Los resultados indican que la concentración de cefotaxima y carbenicilina utilizada en placas no afecta negativamente al crecimiento de los embriones en medio líquido en términos cualitativos ni cuantitativos (forma de los embriones, número, peso fresco y seco, etc.) mientras que la concentración de kan de 75 mg/L resultó excesiva. Tras realizar un barrido en el medio líquido de selección (10, 25, 50 y 75 mg/L) se decidió utilizar una concentración de kan de 25 mg/L o incluso 10 mg/L en algunos experimentos.

Se ha obtenido transformación con genes marcadores (*uidA* y *nptII*) en 3 líneas embriogénicas de roble, 2 de ellas de origen adulto. Como datos más relevantes se señala que, mientras que en placas los explantos transformados aparecieron entre las 24 y 32 semanas tras la infección, y nunca antes de las 20 semanas, con el sistema RITA® ya se han confirmado varios eventos de transformación (mediante prueba histoquímica GUS) a las 12 y a las 16 semanas tras la infección, lo que supone un ahorro de tiempo considerable. Además, las tasas de transformación obtenidas son considerablemente mayores que las descritas para medio semisólido en todos los genotipos testados.

2) Crioconservación de líneas transformadas previamente proliferadas en RITA®: En estos experimentos se comprobó que con el sistema RITA® se consigue una mayor proliferación de las líneas transformadas (aproximadamente el doble de producción que en placas) sin comprometer su capacidad para someterse a la crioconservación mediante vitrificación.

En conclusión, la aplicación del sistema de inmersión temporal a la transformación genética de roble supone un incremento en las tasas de transformación y una disminución del periodo de selección. En la actualidad se está comprobando su utilidad para la introducción en roble de genes de interés, utilizando las construcciones descritas en Corredoira et al. (2011) para castaño.

Referencias:

Corredoira, E., Vieitez, A.M y Ballester, A. 2011, póster en la IX Reunión SECITV, abril 2011
Mallón, R., Covelo, P y Vieitez, A.M. 2011, póster en la IX Reunión SECITV, abril 2011
Vidal N, Mallón R, Valladares S, Meijomín, A.M., Vieitez AM. 2010. Plant Cell Rep 29: 1411-1422.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada parcialmente por la Xunta de Galicia (O9MRU002400PR) y el CSIC (PIE 200940I011). R. Mallón es investigador postdoctoral contratado del programa JAE-Doc (CSIC).

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN PLASTIDIAL DE PATATA (*SOLANUM TUBEROSUM* SSP. *TUBEROSUM*)

Inma Farran, Luis Larraya, Jon Carballeda, Ruth Sanz-Barrio, Alicia Fernández-San Millán y Jon Veramendi

Instituto de Agrobiotecnología, UPNA-CSIC-Gobierno de Navarra, Campus Arrosadía, 31006 Pamplona. E-mail: farran@unavarra.es

La integración y expresión de transgenes en el genoma plastidial de plantas superiores presenta una serie de características interesantes tales como los altos niveles de expresión, la inserción dirigida del transgén por recombinación homóloga, la ausencia de silenciamiento génico y evita también la dispersión del transgén vía polen. Sin embargo, esta tecnología está muy poco extendida entre los cultivos agrónomicamente importantes, utilizándose solo de forma rutinaria en especies tales como tabaco, tomate y lechuga. En el caso de patata, existen muy pocos trabajos de transformación biolística plastidial en los cuales la eficiencia de transformación oscila entre un brote transformado por cada 15 (Nguyen et al, 2005) o 35 (Sidorov et al, 1999) disparos. Esta baja eficiencia ha dificultado el uso de la transformación plastidial de patata en otros genotipos y para determinados fines concretos.

Mediante selección de callos resistentes a espectinomicina, y la consiguiente obtención de brotes en un medio de regeneración optimizado, hemos conseguido mejorar la eficiencia de transformación plastidial en el cultivo de patata variedad Désirée, obteniéndose hasta 7 plantas transplastómicas (transformadas en su genoma plastidial) por disparo. Esta eficiencia es unas 100-250 veces mayor a la obtenida previamente en este cultivo y es comparable a la conseguida habitualmente con tabaco en nuestro laboratorio. Recientemente, otro grupo de investigación ha conseguido mejorar la eficiencia de transformación plastidial de patata utilizando una estrategia muy parecida, obteniendo un brote transformado por disparo (Valkov et al, 2010). En el presente trabajo se ha diseñado y utilizado un vector de transformación plastidial (pST) con las secuencias de recombinación homóloga propias de patata. Este vector, dirige la inserción del transgén en la región invertida del genoma plastidial, entre los genes **trnI** y **trnA**. Como marcador de selección se ha utilizado el gen **aadA** que confiere resistencia a espectinomicina. Con el fin de analizar la expresión del transgén, especialmente en los plastidios no fotosintéticos, se ha estudiado la acumulación de proteína en hojas y tubérculos de las plantas transplastómicas obtenidas. Para ello, se ha utilizado distintos vectores con diferentes promotores (**Prnn** y **PpsbA**) y 5'-UTRs (**psbA** y **G10L**). La correcta integración del transgén se ha demostrado mediante PCR y Southern blot, mientras que los niveles de acumulación de proteína se han determinado por western blot. Los resultados presentados son de particular interés para la producción de plantas transplastómicas de patata y para el desarrollo de un sistema de producción de proteínas heterólogas en tubérculos de patata.

Referencias

Nguyen TT, Nugent G, Cardi T, Dix PJ (2005) **Plant Science** **168**: 1495–1500

Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM, Nehra NS (1999) **Plant J** **19**(2): 209-216

Valkov VT, Gargano D, Manna C, Formisano G, Dix PJ, Gray JC, Scotti N, Cardi T (2010) **Transgenic Res** **20**(1): 137-151



TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CITRANGE CARRIZO ADULTO CON UN VECTOR DE TRANSFORMACIÓN PRECURSOR DE RNA INTERFERENTE FRENTE A GA20-OXIDASA PARA TRATAR DE CONSEGUIR PORTAINJERTOS CÍTRICOS ENANOS

Carmen Fagoaga, Ana Redondo y Leandro Peña

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, (I.V.I.A.) Ctra. Moncada-Náquera, Km 4,5 Apartado oficial 46113 Moncada (Valencia). E-mail: cfagoaga@ivia.es

La utilización de portainjertos enanos, que confieran propiedades enanzantes o semi-enanzantes a la variedad injertada, presenta gran interés en fruticultura ya que permitiría incrementar el número de árboles plantados por unidad de superficie y con ello aumentar la eficacia productiva. Además, el porte pequeño de los árboles facilitaría el manejo de los huertos, tanto para la realización de tratamientos como para el cosechado de la fruta. En citricultura, hay muy pocos portainjertos enanos-enanzantes de calidad y generalmente no se adaptan a todo tipo de suelos o bien no confieren suficiente calidad a la fruta de la variedad injertada. Mediante ingeniería genética, teóricamente se podría incorporar un porte reducido a genotipos bien conocidos y ampliamente utilizados como portainjertos que adolecen de esta característica.

La modificación del contenido endógeno de giberelinas (GA) activas mediante la sobreexpresión en sentido o en antisentido de genes implicados en la síntesis de intermediarios metabólicos de GA ha permitido modificar el tamaño de las plantas. La GA-20 oxidasa es una enzima multifuncional implicada en la biosíntesis de giberelinas activas. En un trabajo previo, incorporamos mediante transformación genética en citrange Carrizo (**Citrus sinensis** L. Osb. X **Poncirus trifoliata** L. Raf.) el transgén precursor de una GA-20 oxidasa (**CcGA20oxi1**), aislado de este mismo genotipo, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y en antisentido. Esto condujo a una disminución en el contenido endógeno de GA₁ en los brotes de las plantas transgénicas y consecuentemente a fenotipos achaparrados y ramificados en comparación con las plantas control (Fagoaga et al., 2007).

Estamos evaluando en un ensayo de campo el efecto que los portainjertos transgénicos de citrange Carrizo **CcGA20oxi1** tienen sobre el crecimiento y la calidad de la fruta de clementino Clementules (**Citrus clementina** Hort. Ex Tan.) no transgénico injertado sobre ellos. El análisis de los datos obtenidos durante 3 años de cultivo indica que algunas líneas transgénicas están ejerciendo un efecto semienanzante sobre la variedad de clementino injertada. Además la calidad de la fruta no se está viendo afectada por la utilización del portainjertos transgénico.

Con el fin de incrementar la capacidad enanzante del portainjertos citrange Carrizo, nos hemos planteado ahora el empleo de una construcción génica tipo horquilla generadora de interferencia de RNA (RNAi) que permitiría obtener un silenciamiento mayor del transcrito del transgén **CcGA20oxi1** que la tecnología antisentido. Hemos generado una construcción tipo horquilla que contiene un fragmento de 600 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia codificante del gen de la **CcGA20oxi1** dispuesta en sentido-intrón-antisentido en el vector binario pHellsgate 8 bajo el control del promotor 35S de CaMV y del terminador OCS, utilizando la tecnología Gateway. Se han realizado varios experimentos de transformación genética de material adulto de citrange Carrizo con la cepa de **Agrobacterium tumefaciens** EHA105 conteniendo el plásmido binario pHellsgate 8-5'-**CcGA20oxi1** y se están regenerando brotes transgénicos.

La obtención e implantación de patrones semienanzantes y enanzantes es de gran interés para citriculturas como la nuestra con un precio del suelo y unos gastos de producción sumamente elevados. El portainjertos citrange Carrizo es el de mayor difusión en España. Aproximadamente el 70% de nuestros cítricos están injertado sobre este portainjertos. La utilización de portainjertos de citrange Carrizo semienanzantes y enanzantes podría aportar importantes beneficios y reducir considerablemente los costes de producción de nuestra citricultura.

Referencias

Fagoaga C. et al., (2007) Engineering of gibberellin levels in citrus by sense and antisense overexpression of a GA 20-oxidase gene modifies plant architecture. **Journal of Experimental Botany**; 58, 1407-1420.



ESTUDIO SOBRE EL EMPLEO DEL CASSETTE MÍNIMO PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VID (*VITIS VINIFERA*).

Laura Sanjurjo, José Ramón Vidal, Rubén Saporita, Antonio Segura y Francisco de la Torre

Dpto. de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Campus Vida, Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela. Email: fran.delatorre@usc.es

La vid (***Vitis vinifera***) es uno de los cultivos más importantes tanto desde un punto de vista económico como cultural. Sin embargo, se desconocen muchos de los aspectos biológicos implicados en el ataque de diversos patógenos que afectan a su cultivo, y también las bases genéticas y moleculares de la mayoría de los caracteres de importancia agronómica. En este contexto, la transformación genética de la vid resulta una herramienta útil para abordar tanto la mejora molecular como el análisis de la función génica (de la Torre **et al.**, 2010).

La transformación genética de plantas viene realizándose habitualmente tanto mediante el uso de **Agrobacterium tumefaciens** como por bombardeo de micropartículas o biolística, usando en ambos casos plásmidos de origen bacteriano. Con ambos métodos, además de las secuencias o genes de interés, se integran en el DNA de los organismos diana secuencias no deseadas del esqueleto del plásmido que se han asociado con efectos negativos, incluyendo posibles problemas de bioseguridad (Kohli **et al.**, 1999, Vidal **et al.**, 2006). La biolística, empleando un cassette mínimo formado por promotor, ORF y terminador, evitando el esqueleto del plásmido permite evitar la transferencia de secuencias plasmídicas indeseadas (Fu **et al.** 2000). Durante este trabajo se han llevado a cabo diversos experimentos para comparar la eficiencia de transformación transitoria utilizando diversas construcciones de DNA: plásmido circular completo (pBI221, conteniendo el gen uidA dirigido por el promotor 35S CaMV y el terminador Nos), plásmido linealizado obtenido con una digestión simple tanto al extremo 5´- como al 3´- del cassette de expresión; y el cassette mínimo, obtenido tanto a partir de doble digestión como a partir de PCR. Una vez obtenidas y purificadas, las diferentes construcciones se transfirieron a suspensiones celulares de la variedad Tempranillo (***Vitis vinifera***) mediante biolística (Kikkert **et al.** 2004). Los resultados obtenidos se discutirán en profundidad; el empleo de la tecnología del cassette mínimo para abordar la transformación genética en esta variedad podría ser una estrategia útil tanto para la mejora molecular como para análisis funcionales.

Referencias:

De la Torre, F., Rama, J., Segura, A., Vidal, J.R. (2010). En: Plant Genetic Transformation and Molecular Markers. Ashwani Kumar (Ed.), pp 119-148. Pointer Publishers, Jaipur, India.

Fu **et al.** (2000). Transgenic Research 9: 11-19

Kikkert **et al.** (2004). Methods in Molecular Biology **286**: 61-78

Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R.M., Vain, P., Laurie, D.A., Christou, P. (1999) The Plant Journal. 17: 591-601.

Vidal, J.R., Kikkert, J.R., Donzelli, B.D., Wallace, P.G. and Reisch, B.I. (2006) Plant Cell Reports. 25: 807-814

Trabajo financiado por los proyectos AGL2009-11481 del MICINN y O8MRUO17200PR, programa INCITE y 2009/054, programa emerxentes, de la Xunta de Galicia.



PROTEÍNAS DE FLUORESCENCIA COMO MARCADORES EN LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE AGUACATE.

Palomo-Ríos, E., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J. A.

Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n, 29071, Málaga.

Las proteínas de fluorescencia pueden ser utilizadas como marcadores para la búsqueda de eventos de transformación, ya que pueden ser visualizadas fácilmente y no afectan al desarrollo ni a la fisiología de los tejidos vegetales; además, tienen la gran ventaja de que no requieren la adición de ningún sustrato o enzima exógenos para su visualización. La planta puede ser objeto de repetidos estudios del marcador en diferentes fases de desarrollo sin verse afectada. Por ello, las proteínas de fluorescencia son unos marcadores visuales de gran interés, que pueden ser utilizados durante las fases iniciales de la transformación genética y en las posteriores fases de regeneración del material transgénico (Hraska et al. 2006).

En este trabajo evaluamos la utilidad de las proteínas de fluorescencia verde (GFP) y roja (RED) como marcadores de transformación. Para ello, se transformó callo embriogénico de aguacate, cv. Duke 7, con tres plásmidos binarios diferentes conteniendo proteínas de fluorescencia: pK7FNF2 (GFP como gen marcador), pK7RNR2 (dsRED como gen marcador) y pK7S*NF2 (con GFP y β -glucuronidasa como genes marcadores). La transformación genética fue llevada a cabo vía **A. tumefaciens**, cepa AGL1, siguiendo el protocolo descrito por Palomo et al. (2007).

Tras finalizar el proceso de transformación se obtuvieron diferentes líneas transgénicas de cada construcción, con eficiencias de transformación que variaron entre el 10% para pK7FNF2 y el 7% para el plásmido pK7RNR2. La expresión de las proteínas de fluorescencia en las líneas transgénicas fue observada en callo embriogénico y en embriones somáticos aislados mediante una lupa de fluorescencia. En ningún caso se observó autofluorescencia en los explantos controles. Después de tres meses en medio de selección, todas las líneas que mostraron crecimiento de callo embriogénico en presencia del agente de selección mostraron fluorescencia, excepto en el caso de la construcción pK7FNF2 que contenía el marcador GFP. Sin embargo, estas líneas GFP negativas mostraron fluorescencia tras ser cultivadas en medio sin agente de selección. En cuanto a los niveles de actividad, se observaron diferentes intensidades de fluorescencia entre las líneas transgénicas de la misma construcción e incluso en diferentes zonas del tejido de una misma línea transgénica. Actualmente, se están regenerando plantas de estas líneas para realizar estudios de fluorescencia en planta.

En este trabajo ha quedado demostrado que el uso de proteínas de fluorescencia GFP y dsRED pueden ser una buena herramienta para estudiar el desarrollo de la transformación genética en callo embriogénico de aguacate.

Referencias:

Hraska M, Rakousky S, Curn V. (2006). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86:303-318.

Palomo-Ríos E, Sánchez-Romero C, Mercado-Carmona JA, Pliego-Alfaro F (2007). *International Conference Plant Transformation Technologies*; Viena, Austria.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido desarrollado en el marco del proyecto AGL-2008-05 453-C02-01, Plan Nacional I+D+I (MEC).

CRE-ATING MARKER-FREE PLANTS BY COMBINING SITE-SPECIFIC RECOMBINATION AND THE DAO1 GENE THAT ALLOWS BOTH POSITIVE AND NEGATIVE SELECTION

García-Almodovar¹, R.C.; Petri, C.¹; Padilla, I.M.G.² and Burgos, L.¹

¹ Departamento de Mejora Vegetal. Grupo de Biotecnología de Frutales. CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia. Email: cpetri@cebas.csic.es

² IFAPA Centro de Churriana, 29410 Málaga.

The gen **dao1** from the yeast **Rhodotorula gracilis** encodes a D-amino acid oxidase (DAAO) that catalyses stereospecifically the oxidative deamination of D-amino acids [Alonso **et al.**, 1998]. It has been successfully used to transform **Arabidopsis** plants by using D-amino acids as selective agents [Erikson **et al.**, 2004].

Site specific recombination has allowed the production of marker-free transgenic plants. The **Cre-loxP** system in the plasmid pX6-GFP [Zuo **et al.**, 2001] uses the recombinase **Cre**, under the control of an inducible promoter tightly regulated by β -estradiol, to remove marker genes between the **lox P** sites.

We have replaced the **nptII** gene, for antibiotic resistance, with the **dao1** gene within the pX6-GFP vector. Transgenic tobacco plants were efficiently produced, by positive selection of **dao1** gene, including D-alanine 6 mM in the regeneration medium. Plants with different number of transgene insertions were selected and T₁ and T₂ generations produced by self-pollination. Excision of marker genes was induced both in leaves from transgenic lines and in homozygous T₂ seeds in the presence of β -estradiol, by negative selection of **dao1** gene, in selective medium containing D-valine 6 mM or 35 mM, respectively.

Selection of marker-free transgenic plants using the pX6-GFP vector relied on **gfp** expression, after excision occurred, and may be difficult in plants where chlorophyll autofluorescence masks marker expression. The **dao1** gene helps to overcome this problem allowing the selection of the marker-free plants more efficiently and independently of marker genes expression.

Referencias

- Alonso J, Barredo JL, Díez B, Mellado E, Salto F, García JL, Cortés E (1998) Microbiology 144: 1095-1101
- Erikson O, Hertzberg M, Näsholm T (2004) Nature Biotechnology 22(4): 455-458
- Zuo J, Niu GW, Moller SG, Chua NH (2001) Nature Biotechnology 19: 157-161



EL SILENCIAMIENTO DE DOS ONCOGENES DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* MEDIANTE UN TRANSGÉN QUIMÉRICO DE PEQUEÑO TAMAÑO INDUCE RESISTENCIA A LA ENFERMEDAD DE LA AGALLA DE CORONA

Nuria Alburquerque, César Petri, Lydia Faize y Lorenzo Burgos

Departamento de Mejora, CEBAS-CSIC, Aptd. 164, 30.100 Murcia. E-mail: nalbur@cebas.csic.es

El "crown gall" o agalla de corona es una enfermedad causada por el patógeno del suelo ***Agrobacterium tumefaciens*** y que afecta de forma muy importante a muchas dicotiledóneas (Aleksseeva *et al.*, 2008). Las estrategias basadas en construcciones de genes quiméricos que generan ARNm en forma de pinza (hairpin ARN ó hpARN) se han utilizado sobre todo para conferir resistencia a enfermedades causadas por virus silenciando distintos genes. Sin embargo, han sido poco explotadas en la inducción de resistencia a enfermedades fúngicas y bacterianas, a pesar de presentar un gran interés.

La construcción que se ha diseñado en nuestro laboratorio induce la formación de hpARN para silenciar los genes de ***Agrobacterium*** implicados en la síntesis de citoquininas y auxinas (**ipt** e **iaaM**), que son responsables de la formación del tumor o agalla. Para silenciar simultáneamente estos oncogenes se ha generado un único transgén quimérico resultado de la fusión de dos fragmentos de unas 250 pares de bases, cada uno de ellos diseñado a partir de zonas muy conservadas de los genes **ipt** e **iaaM**.

En distintas líneas de tabaco transformadas mediante ***Agrobacterium*** se ha evaluado la resistencia *in vivo* a la infección con una cepa silvestre de ***Agrobacterium tumefaciens*** utilizando protocolos descritos previamente (Petri *et al.*, 2004). Cuando se infectaron con la cepa oncogénica C58, 8 de 10 líneas evaluadas mostraron un incremento de diámetro del tallo en la zona infectada menor y 7 de 10 líneas presentaban una reducción de los síntomas respecto de plantas silvestres infectadas con la misma cepa. Una de estas líneas resultó ser resistente a la enfermedad, con un comportamiento similar al mostrado por plantas silvestres infectadas con la cepa no oncogénica EHA105, mientras que las restantes seis líneas fueron tolerantes, presentando una situación intermedia y diferente a las plantas silvestres infectadas con la EHA105.

Para demostrar que la resistencia se debe al silenciamiento de los oncogenes se han detectado los siRNA ("small interference RNAs"), fragmentos de aproximadamente 21 nucleótidos de ARN de doble cadena resultantes de la actividad de la enzima Dicer, mediante una hibridación Northern. Además se han determinado los niveles de ARN derivados del transgén (hpARN) y los derivados de los oncogenes tras la infección con la cepa oncogénica (mARN) mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). Cuando haya un silenciamiento post-transcripcional de los oncogenes se espera que la acumulación de hpARN y de los mARN sea baja debido a su degradación mediante la actividad de DICER. Se han encontrado bajos niveles de hpARN derivados del transgén junto con la acumulación de siRNA en las líneas que muestran resistencia a la enfermedad de la agalla de corona. Tras la infección con la C58, en las líneas resistentes se encontraron niveles de mARN derivados del **ipt** o **iaaM** más bajos que en las plantas silvestres.

La eficiencia de obtención de líneas resistentes con nuestra construcción empleando un transgén quimérico mínimo es similar a las altas eficiencias que se han obtenido anteriormente utilizando las secuencias completas de los oncogenes en sentido y en antisentido (Escobar *et al.*, 2002).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MICINN a través del proyecto AGL2010-20270 (fondos FEDER).

Referencias

- Aleksseeva, V.V., Rukavtsova, E.B., Golubchikova, Y.S., Buryanov, Y.I. 2008. *Molecular Biology*, 42, 153-157.
- Escobar, M. A., Leslie, C. A., McGranahan, G. H., Dandekar, A. M. 2002. *Plant Science*, 163: 591-597.
- Petri, C., Alburquerque, N., García-Castillo, S., Egea, J., Burgos, L. 2004. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 79: 704-712.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO OSMÓTICO SOBRE LA EMBRIOGÉNESIS, REGENERACIÓN Y OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TRIGO

Ozuna C., Caballero L., Barro F.

Departamento de Mejora Genética Vegetal, IAS - CSIC, Apdo. 4084, ES-14080 Córdoba, España.

E-mail: cvozuna@ias.csic.es

El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del tratamiento osmótico sobre la embriogénesis, regeneración y obtención de plantas transgénicas de trigo. Este es uno de los factores que afecta la eficiencia de la transformación mediada por el bombardeo con micropartículas [Vain et al., 1993]. Para el desarrollo del trabajo se utilizó la variedad "Bobwhite" (BW208) de trigo harinero (*Triticum aestivum* L.) suministrada por el CIMMYT. El tratamiento osmótico se ha evaluado mediante el cultivo de los escutelos de trigo (0,5-1,5 mm de longitud) en un medio suplementado con 0,4M de manitol durante 4 y 16 horas, antes o después del bombardeo con micropartículas de oro con el plásmido pAHC25 [Christesen and Quail, 1996] el cual contiene los genes **uidA** y **bar**, ambos bajo el control del promotor de la ubiquitina de maíz. Se han utilizado controles bombardeados con el plásmido (con selección **in vitro** sin tratamiento osmótico) y controles sin bombardear (sin selección **in vitro** ni tratamiento osmótico).

Los resultados se muestran en la tabla. Los mayores porcentajes de embriogénesis se obtuvieron con el pretratamiento de 4h y con el postratamiento de 16h, estos valores fueron similares al control sin bombardear. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos en cuanto a la regeneración, el pretratamiento de 4 horas también proporcionó los mayores porcentajes de regeneración. Con respecto a la eficiencia de la transformación se observa en la tabla claramente que se obtuvo una mayor eficiencia (6,8%) con el postratamiento de 4h, seguido del postratamiento de 16h [1,6%]. No se obtuvo planta transgénica con el control bombardeado. Estos resultados indicarían que el postratamiento osmótico es más eficiente que el pretratamiento en la obtención de plantas transgénicas, pero que postratamientos elevados (16 horas) reducen drásticamente la eficiencia de transformación.

Efecto del tratamiento osmótico con manitol 0,4 M sobre el porcentaje de embriogénesis, regeneración, número de plantas transgénicas y eficiencia de la transformación.

Tratamientos	Embriogénesis (%)	Regeneración (%)	Plantas transgénicas	Eficiencia de la transformación (%)
Pre-4h	68,1 ab	78,4 ab	3	1,2
Pre-16h	38,0 c	68,3 ab	2	0,8
Post-4h	57,3 abc	49,2 b	17	6,8
Post-16h	78,2 a	64,1 ab	4	1,6
Control-B	41,3 bc	63,2 ab	0	0
Control-S	73,1 a	93,4 a	NA	NA

Pretratamiento de 4 horas (Pre-4h), pretratamiento de 16 horas (Pre-16h), postratamiento de 4 horas (Post-4h), postratamiento de 16 horas (Post-16h), control bombardeado (Control-B), control no bombardeado (Control-S). NA, no aplicable. Las medias con la misma letra dentro de una columna no presentan diferencias significativas según el test de Tukey ($p < 0,05$)

No se observó una correlación entre el porcentaje de embriogénesis, regeneración y la eficiencia de la transformación. Esto indicaría que aunque altas capacidades de embriogénesis y regeneración son necesarias para obtener plantas transgénicas, son muchos los factores que influyen en el éxito de la transformación.

En resumen, las mejores condiciones para la transformación de escutelos de trigo se obtienen con un postratamiento de los escutelos de 4 horas con 0,4M de manitol.

Referencias

Vain P, McMullen MD, Finer JJ, (1993) Plant Cell Reports 12: 84-88
Christensen AH, Quail PH, (1996) Transgenic Res 5: 213-218.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2010-19643-C02-02 (MICINN). Carmen Ozuna agradece a la Fundación Carolina y a la Universidad Nacional de Asunción (Paraguay) por la concesión de una beca predoctoral.



SILENCIAMIENTO DE GLIADINAS DE TRIGO RELACIONADAS CON LA ENFERMEDAD CELÍACA MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA

Pistón, F., Gil-Humanes, J., Tollefsen, S., Sollid, L.M. y Barro, F.

Departamento de Mejora Genética Vegetal, IAS - CSIC, Apdo. 4084, ES-14080 Córdoba, España.
E-mail: fbarro@ias.csic.es

La enfermedad celíaca es una enteropatía inducida por la ingesta de proteínas de gluten de trigo o proteínas similares de cebada o centeno. La enfermedad tiene un componente genético muy fuerte, y la mayoría de los enfermos presentan una variante del antígeno leucocitario humano (HLA) DQ2, mientras que el resto tienen el HLA-DQ8 (Sollid, 2002). La inflamación que se produce en el intestino delgado está controlada por células T intestinales reactivas al gluten, que reaccionan ante los péptidos del gluten reconocidos por los HLA-DQ2 o HLA-DQ8. La mayoría de los epítomos tóxicos proceden de la fracción de gliadinas (Arentz-Hansen, *et al.*, 2000; 2002). El único tratamiento posible es una dieta libre de gluten de por vida lo que implica una gran dificultad y empeora sensiblemente la calidad de vida de estos pacientes, ya que el gluten es un aditivo comúnmente utilizado en productos alimenticios.

En el presente trabajo se ha realizado la transformación genética de trigo harinero variedad "Bobwhite" con el fin de obtener variedades transgénicas con silenciamiento mediado por ARN de interferencia de todos los grupos de gliadinas. Para ello se diseñaron vectores en "hairpin" regulados por promotores específicos de endospermo, y que contenían una secuencia de ADN altamente conservada en todos los grupos de gliadinas en sentido y en antisentido separadas por el intrón **Ubi** de la ubiquitina de maíz. Se realizó la co-transformación junto con el vector pAHC25 (Christesen and Quail, 1996), que contiene los genes **uidA** y **bar**, de escutelos aislados del endospermo de trigo y se realizó la selección *in vitro* de las plantas transgénicas. Las plantas regeneradas se analizaron por PCR para comprobar la presencia de los vectores.

La expresión de gliadinas en las líneas obtenidas se redujo drásticamente y no se observaron efectos sobre la morfología y desarrollo de las plantas. A partir de la proteína del gluten extraída de las líneas silenciadas y sus controles se realizaron ensayos con clones de células T obtenidas de pacientes celíacos, específicas para los epítomos DQ2- α -II, DQ2- γ -VII, DQ8- α -I, y DQ8- γ -I. En cinco de las líneas transgénicas se observó una reducción de entre 1,5-2 log en la cantidad de epítomos DQ2- α -II y DQ2- γ -VII, y de un log en los epítomos DQ8- α -I y DQ8- γ -I. Además, también se hicieron pruebas utilizando dos líneas de células T para epítomos de ω -gliadinas. En tres de las líneas transgénicas no se observó respuesta alguna, mientras que en seis de ellas la respuesta fue reducida.

La calidad de las líneas transgénicas se determinó usando el test de sedimentación SDS, ya que los volúmenes de sedimentación están muy correlacionados con la calidad panadera. De las once líneas ensayadas, cinco mostraron valores de sedimentación comparables a las líneas control y cinco tuvieron valores significativamente inferiores a las líneas control.

Este trabajo muestra que el silenciamiento de gliadinas mediante interferencia de ARN puede ser usado para obtener líneas de trigo con niveles muy reducidos de toxicidad para pacientes celíacos, y que las harinas podrían ser utilizadas para la elaboración de productos libres de gluten aptos para celíacos.

Referencias

- Sollid LM, (2002) *Nat Rev Immunol* 2:647-55
 Arentz-Hansen H, *et al.* (2000) *J Exp Med* 191:603-612
 Arentz-Hansen H, *et al.* (2002) *Gastroenterology* 123:803-809
 Christensen AH, Quail PH, (1996) *Transgenic Res* 5: 213-218

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (proyectos AGL2007-65685-C02-01 y AGL2010-19643-C02-02), los fondos FEDER, los fondos EXTRA de la Fundación Noruega para la Salud y Rehabilitación, y la Fundación Novo Nordisk. Javier Gil-Humanes también agradece el apoyo económico del programa I3P de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas, cofinanciado por el Fondo Social Europeo.





SESIONES DE POSTERS

S IV - CULTIVO IN VITRO APLICADO A LA MEJORA GENÉTICA

PROGRAMA DE OBTENCIÓN DE HÍBRIDOS TRIPLOIDES DE CÍTRICOS DEL IVIA

Pablo Aleza, José Cuenca, José Juárez, José Antonio Pina, María Hernández, Carmen Ortega, Antonio Navarro, Violeta Ortega y Luis Navarro

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Moncada, Valencia. E-mail: Inavarro@ivia.es

La producción de frutos cítricos sin semillas es una condición indispensable para el mercado de consumo en fresco ya que los consumidores no aceptan los frutos con semillas. La obtención de nuevas variedades de mandarina sin semilla y que no induzcan la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada es el objetivo prioritario de la citricultura española.

La utilización de variedades triploides es la solución más adecuada a esta problemática. En la meiosis de los genotipos triploides se originan asociaciones multivalentes y como consecuencia se producen gametos masculinos y femeninos con distintas dotaciones cromosómicas que reducen la viabilidad de los mismos. Por ello las plantas triploides tienen muy baja fertilidad y normalmente no producen semillas ni inducen la formación de semillas en otras variedades por polinización cruzada. En cítricos la partenocarpia es un fenómeno común, por lo que la formación de semillas no es necesaria para obtener buenas producciones.

En 1996 se empezó un programa de mejora genética en el IVIA basado en la obtención de híbridos triploides mediante la realización de hibridaciones sexuales $2x \times 2x$, $2x \times 4x$ y $4x \times 2x$, rescate y cultivo de embriones **in vitro**, determinación del nivel de ploidía mediante citometría de flujo y la utilización de diferentes estrategias para la obtención de parentales tetraploides. La obtención de híbridos triploides mediante hibridaciones con parentales diploides es posible debido a la formación de megagametos no reducidos. Actualmente se han identificado mediante citometría de flujo más de 20 plantas tetraploides espontáneas de genotipos apomícticos de cítricos (Aleza **et al.**, 2011) y además se han obtenido seis plantas tetraploides de genotipos no apomícticos de cítricos mediante una técnica puesta a punto en nuestro laboratorio basada en la realización de microinjerto y posterior adición de una solución de colchicina u orizalina en el ápice microinjertado al cabo de una semana de haber realizado el injerto (Aleza **et al.**, 2009). La hibridación somática mediante fusión de protoplastos es otra técnica que también se está utilizando para la obtención de nuevos híbridos alotetraploides.

Hasta el momento hemos obtenido más de 4.190 híbridos triploides a partir de 110 combinaciones entre parentales diploides, 4.300 híbridos triploides a partir de más de 60 combinaciones entre parentales femeninos diploides y parentales masculinos tetraploides y más de 5.460 híbridos triploides a partir de más de 90 combinaciones entre parentales femeninos tetraploides y parentales masculinos diploides.

Recientemente se ha procedido a la propagación comercial de dos nuevas variedades triploides, mandarinos `Garbí` (Aleza **et al.**, 2010) y `Safor` (Cuenca **et al.**, 2010). Se ha realizado la protección de las dos variedades en la Unión Europea y actualmente se están realizando todos los trámites necesarios para protegerlas en Marruecos, Egipto y Turquía y para patentarlas en EE.UU. En junio y julio de 2008 se entregó material vegetal de cada una de las dos variedades para iniciar su propagación comercial y actualmente se estima que se han comercializado más de 94.000 plantas, 53.000 de mandarina `Garbí` y 41.000 de mandarina `Safor`. Este programa de mejora genética se está realizando en colaboración con cuatro empresas privadas y es un claro ejemplo de la aplicación de técnicas de cultivo **in vitro** a la mejora genética de cítricos.

Referencias

Aleza P, Juárez J, Ollitrault P, Navarro L (2009) Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes. Plant Cell Reports. 28: 1837-1846. DOI 10.1007/s00299-009-0783-2

Aleza P, Cuenca J, Juárez J, Pina JA and Navarro L (2010) `Garbí` Mandarin: A New Late-maturing Triploid Hybrid. HortScience, 45(1): 139-141.

Aleza P, Froelicher Y, Schwarz S, Agustí M, Hernández M, Juárez J, Luro F, Morillon R, Navarro L Ollitrault P (2011) Tetraploidization events by chromosome doubling of nucellar cells are frequent in apomictic citrus and are dependent on genotype and environment. Annals of Botany. En revisión.

Cuenca J, Aleza P, Juárez J, Pina JA and Navarro L (2010) `Safor` Mandarin: A New Citrus Mid-late Triploid Hybrid. HortScience, 45(6): 977-980.



REGENERACIÓN RÁPIDA DE PLANTAS DE VID (VITIS VINIFERA L. CV. MENCIA) MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA CON TDZ EN FILAMENTOS ESTAMINALES.

Yosvanis Acanda, M^a Jesús Prado, Manuel Rey

Dpto. Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Universidad de Vigo, 36310 Vigo. mrey@uvigo.es

La vid es el frutal cultivado más importante debido a sus múltiples productos y al alto valor añadido de algunos de ellos (vinos y licores). La preservación de las características vitícolas y la calidad de los vinos se llevan a cabo mediante propagación vegetativa. La mejora genética de los cultivares de vinificación tradicionales que dan lugar a vinos de calidad reconocida se basa solamente en la expresión eventual de la variabilidad existente. Las herramientas biotecnológicas son útiles para el estudio de la biología de esta especie y contribuyen a acelerar la expresión de dicha variabilidad.

Nuestro grupo ha venido trabajando en los últimos años en el establecimiento de protocolos de regeneración de plantas mediante embriogénesis somática para seis cultivares de vid (Mencia, Albariño, Treixadura, Torrontés, Brancellao y Merenzao). Hemos comprobado la competencia embriogénica de los explantos florales y los factores que influyen en la misma (genotipo, momento de recogida de las inflorescencias, la composición hormonal del medio de inducción). De manera general, los protocolos establecidos presentan inconvenientes como la tardía manifestación de la respuesta embriogénica (hasta alrededor de 6 meses), la necrosis de los cultivos embriogénicos mantenidos a largo plazo, la maduración asincrónica y la germinación precoz. Por todo ello es necesario seguir trabajando en la búsqueda de protocolos alternativos que permitan superar algunos de estos inconvenientes.

En este trabajo se estudió el efecto del 2,4-D y el tidiazurón (TDZ) en la inducción de embriogénesis somática a partir de anteras y ovarios del cultivar Mencia. Se ensayaron cuatro combinaciones hormonales (A: 2,4-D 4.5 μ M; B: TDZ 4.5 μ M; C: 2,4-D 4.5 μ M y TDZ 4.5 μ M y D: 2,4-D 1 μ M y TDZ 4.5 μ M) en medio de inducción compuesto por las sales NN (Nitsch J.P.; Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163:85-87) y las vitaminas MS. Los cultivos fueron mantenidos durante tres meses en oscuridad y se subcultivaron cada seis semanas. Las combinaciones C y D (ambas con 2,4-D y TDZ) fueron efectivas en la inducción de embriogénesis somática, pero ésta tuvo lugar únicamente en los filamentos estaminales que quedaban unidos a las anteras y/o los ovarios. Se transfirieron pequeñas porciones de callo embriogénico a medio de diferenciación (sales NN, vitaminas MS, BAP 0.5 μ M, AIA 1 μ M y 0.25% de carbón activo), donde se desarrollaron embriones completamente aunque su maduración ocurrió de forma asincrónica observándose procesos de germinación precoz. Tanto los embriones germinados precozmente como los no germinados se transfirieron a medio MS modificado en el que se desarrollaron plántulas normales con una tasa de conversión del 80%. Los callos embriogénicos se mantuvieron durante dos años en el mismo medio de inducción sin pérdida de su capacidad embriogénica.

En conclusión, se ha establecido un protocolo corto y sencillo de regeneración de plantas de vid a partir de embriogénesis somática con altas tasas de inducción en filamentos estaminales, que permite mantener los cultivos embriogénicos a largo plazo, con una rápida y relativamente eficiente regeneración de plantas.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Xunta de Galicia con los proyectos PGDIT06PXI-B310171PR y 2007/000030-0. Agradecemos a M^a Pilar Grueiro su excelente trabajo de laboratorio. M^a Jesús Prado agradece a la Xunta de Galicia la concesión de un contrato de investigador del Programa Isidro Parga Pondal. Yosvanis Acanda agradece al Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación por la concesión de una beca MAEC-AECID. Agradecemos también a la Consellería de Medio Rural de la Xunta de Galicia las facilidades para la utilización del material vegetal del Centro de Formación y Experimentación de Viticultura y Enología de Ribadumia (Pontevedra) y a Julián Benítez y M^a José Graña, del mismo centro, su colaboración para la recogida del mismo.



CULTIVO IN VITRO Y REGENERACIÓN DE PLANTAS EN TRES CITOTIPOS DE BRACHYPODIUM: INFLUENCIA DEL GENOTIPO Y DEL MEDIO DE CULTIVO

Juan M. González¹, Rifka Hammami¹, Eva Friero¹, Consuelo Soler² y Nicolás Jouve¹

¹ Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares, Madrid. e-mail: juanm.gonzalez@uah.es

² Departamento de Medio Ambiente, S.G.I.T., I.N.I.A., La Canaleja, Apdo.1045 Alcalá de Henares.

La especie **Brachypodium distachyon** ($2n=10$) se ha propuesto como modelo de los cereales de climas templados entre los que se encuentran el trigo, la cebada y el centeno (Draper et al., 2001). Actualmente, se incluyen dentro de esta especie citotipos con $2n=20$ y $2n=30$ cromosomas, aunque estudios recientes indican que el citotipo con $2n=20$ sería una especie diferente y el de $2n=30$ sería un anfiploide entre la especie de 10 y la de 20 cromosomas (Filiz et al. 2009). Además, **Brachypodium** se está comenzando a utilizar en la protección de suelos en terrenos sometidos a erosión por escorrentía como es el caso de los olivares (Soler et al. 2004). En este sentido, se han comercializado líneas de **Brachypodium** con $2n=10$ ('Zulema') y con $2n=30$ ('Ibros').

Para poder aplicar diferentes métodos biotecnológicos como es la obtención de plantas transgénicas, es necesario disponer de sistemas de cultivo *in vitro* y de regeneración de plantas a partir de diferentes explantos de **Brachypodium**. En este trabajo se ha analizado la respuesta al cultivo *in vitro* de seis genotipos de **Brachypodium** (dos genotipos por cada uno de los citotipos), para lo cual se ha partido de embriones cigóticos inmaduros que fueron sembrados en nueve medios de inducción de callos que se diferenciaban entre sí en el regulador de crecimiento (2,4-D, Piclorán o Dicamba) y en su concentración (1, 2 o 4 mg/l). Se realizaron cuatro repeticiones de 20 embriones cada una, para cada uno de los medios y genotipos y se llevo a cabo un ANOVA de las variables: TSC= n° de callos totales/ n° total de embriones; CC= n° de callos compactos/ n° total de callos; SC= n° de callos blandos/ n° total de callos. Se ha observado una respuesta muy variable tanto para el número como para el tipo de callo formado, en función del genotipo y medio de cultivo empleado. Así, los genotipos con $2n=30$ cromosomas son los que dieron lugar a un mayor número de callos totales y también de callos embriogénicos. Los medios de cultivo que mejor respuesta indujeron fueron los que contenían 2,4-D con cualquiera de las concentraciones ensayadas.

Los callos obtenidos se distribuyeron en cuatro repeticiones y se sembraron en un medio de regeneración conteniendo BAP (0,5 mg/l) y se mantuvieron en una cámara climática con un fotoperiodo de 14 h de luz y 22°C de temperatura constante. Al cabo de un mes se contabilizó el número de brotes formados (verdes o albinos) y se calcularon las siguientes variables: TSV= n° de brotes totales (verdes + albinos)/ n° total de callos, TSVC= n° de brotes verdes/ n° total callos, SCC= n° de brotes verdes a partir de callos compactos/ n° total callos compactos, SSC= n° de brotes verdes a partir de callos blandos/ n° total callos blandos, R= Respuesta al cultivo= n° total brotes verdes/ n° total embriones inmaduros. Los ANOVA realizados para cada una de las variables anteriores, muestran la existencia de diferencias significativas entre los genotipos. El estudio de la variable R, que resume la respuesta al cultivo *in vitro*, permitió clasificar los seis genotipos en función de su aptitud para la regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. Así, el genotipo Bd238 es el que mostró un mejor comportamiento junto con el genotipo Bd341 ambos con $2n=30$ cromosomas, mientras que los genotipos Bd160 y 'Zulema' con $2n=10$ cromosomas, son los que mostraron la respuesta más baja.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2009-10373 (Subprograma AGR).

Referencias

Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R and Routledge APM (2001). **Brachypodium distachyon**. A New model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 127: 1539-1555.

Filiz E, Ozdemir BS, Budak F, Vogel JP, Tuna M and Budak H (2009). Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse **Brachypodium distachyon** inbred lines. *Genome* 52: 876-890.

Soler C, Casanova C y Rojo A (2004). Desarrollo de cubiertas vegetales a partir de gramíneas seleccionadas para su explotación en tierras de olivar. *Actas Horticultura* 41: 97-100.



CULTIVO IN VITRO Y REGENERACIÓN DE PLANTAS EN TRES CITOTIPOS DE *BRACHYPODIUM*: INFLUENCIA DEL GENOTIPO Y DEL MEDIO DE CULTIVO

Juan M. González¹, Rifka Hammami¹, Eva Friero¹, Consuelo Soler² y Nicolás Jouve¹

¹ Departamento de Biología Celular y Genética. Facultad de Biología, Universidad de Alcalá. 28871 Alcalá de Henares, Madrid. e-mail: juanm.gonzalez@uah.es

² Departamento de Medio Ambiente, S.G.I.T., I.N.I.A., La Canaleja, Apdo.1045 Alcalá de Henares.

La especie *Brachypodium distachyon* ($2n=10$) se ha propuesto como modelo de los cereales de climas templados entre los que se encuentran el trigo, la cebada y el centeno (Draper et al., 2001). Actualmente, se incluyen dentro de esta especie citotipos con $2n=20$ y $2n=30$ cromosomas, aunque estudios recientes indican que el citotipo con $2n=20$ sería una especie diferente y el de $2n=30$ sería un anfiploide entre la especie de 10 y la de 20 cromosomas (Filiz et al. 2009). Además, *Brachypodium* se está comenzando a utilizar en la protección de suelos en terrenos sometidos a erosión por escorrentía como es el caso de los olivares (Soler et al. 2004). En este sentido, se han comercializado líneas de *Brachypodium* con $2n=10$ ('Zulema') y con $2n=30$ ('Ibros').

Para poder aplicar diferentes métodos biotecnológicos como es la obtención de plantas transgénicas, es necesario disponer de sistemas de cultivo *in vitro* y de regeneración de plantas a partir de diferentes explantos de *Brachypodium*. En este trabajo se ha analizado la respuesta al cultivo *in vitro* de seis genotipos de *Brachypodium* (dos genotipos por cada uno de los citotipos), para lo cual se ha partido de embriones cigóticos inmaduros que fueron sembrados en nueve medios de inducción de callos que se diferenciaban entre sí en el regulador de crecimiento (2,4-D, Piclorán o Dicamba) y en su concentración (1, 2 o 4 mg/l). Se realizaron cuatro repeticiones de 20 embriones cada una, para cada uno de los medios y genotipos y se llevo a cabo un ANOVA de las variables: TSC= n° de callos totales/ n° total de embriones; CC= n° de callos compactos/ n° total de callos; SC= n° de callos blandos/ n° total de callos. Se ha observado una respuesta muy variable tanto para el número como para el tipo de callo formado, en función del genotipo y medio de cultivo empleado. Así, los genotipos con $2n=30$ cromosomas son los que dieron lugar a un mayor número de callos totales y también de callos embriogénicos. Los medios de cultivo que mejor respuesta indujeron fueron los que contenían 2,4-D con cualquiera de las concentraciones ensayadas.

Los callos obtenidos se distribuyeron en cuatro repeticiones y se sembraron en un medio de regeneración conteniendo BAP (0,5 mg/l) y se mantuvieron en una cámara climática con un fotoperiodo de 14 h de luz y 22°C de temperatura constante. Al cabo de un mes se contabilizó el número de brotes formados (verdes o albinos) y se calcularon las siguientes variables: TSV= n° de brotes totales (verdes + albinos)/ n° total de callos, TSVC= n° de brotes verdes/ n° total callos, SCC= n° de brotes verdes a partir de callos compactos/ n° total callos compactos, SSC= n° de brotes verdes a partir de callos blandos/ n° total callos blandos, R= Respuesta al cultivo= n° total brotes verdes/ n° total embriones inmaduros. Los ANOVA realizados para cada una de las variables anteriores, muestran la existencia de diferencias significativas entre los genotipos. El estudio de la variable R, que resume la respuesta al cultivo *in vitro*, permitió clasificar los seis genotipos en función de su aptitud para la regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de embriones inmaduros. Así, el genotipo Bd238 es el que mostró un mejor comportamiento junto con el genotipo Bd341 ambos con $2n=30$ cromosomas, mientras que los genotipos Bd160 y 'Zulema' con $2n=10$ cromosomas, son los que mostraron la respuesta más baja.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL 2009-10373 (Subprograma AGR).

Referencias

Draper J, Mur LAJ, Jenkins G, Ghosh-Biswas GC, Bablak P, Hasterok R and Routledge APM (2001). *Brachypodium distachyon*. A New model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol.* 127: 1539-1555.

Filiz E, Ozdemir BS, Budak F, Vogel JP, Tuna M and Budak H (2009). Molecular, morphological, and cytological analysis of diverse *Brachypodium distachyon* inbred lines. *Genome* 52: 876-890.

Soler C, Casanova C y Rojo A (2004). Desarrollo de cubiertas vegetales a partir de gramíneas seleccionadas para su explotación en tierras de olivar. *Actas Horticultura* 41: 97-100.



CRIOCONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD GENÉTICA DE CULTIVOS DE ÁPICES EN ESPECIES CON MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA: EL CASO DE MENTA Y CRISANTEMO

Carmen Martín y M. Elena González-Benito

Departamento de Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n, 28040-Madrid. E-mail: mariacarmen.martin@upm.es

Las especies cultivadas con multiplicación vegetativa presentan el inconveniente, en la mayoría de los casos, de requerir el mantenimiento de colecciones de campo para su conservación. En su día el cultivo *in vitro* supuso una alternativa a este tipo de conservación, pero presentaba importantes inconvenientes como son la alta mano de obra que requiere y la posibilidad de aparición de variación somaclonal. El desarrollo de las técnicas de criopreservación para tejidos vegetales abrió una nueva alternativa a la conservación de este tipo de material vegetal.

La criopreservación permite la conservación a largo plazo siendo posiblemente una de sus características más importantes la de, en principio, garantizar la estabilidad genética del material conservado. Sin embargo, dicha estabilidad ha sido cuestionada (Harding, 2004) y en algunos cultivos se han detectado casos de inestabilidad genética tras la criopreservación (Müller *et al.*, 2007; Kaity *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2011). El origen de estas variaciones suele atribuirse a la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* durante el proceso más que a las bajas temperaturas empleadas. Asimismo, hay que tener en cuenta a la hora de analizar estas variaciones que el proceso de criopreservación conlleva la exposición a condiciones fisiológicas extremas, como son, no sólo las bajas temperaturas, sino también el bajo potencial osmótico de los medios y soluciones empleadas y la deshidratación a la que se somete a los tejidos, además del empleo de sustancias potencialmente tóxicas y mutagénicas como el DMSO (Panis y Lambardi, 2005).

En este trabajo se comparan los estudios y resultados obtenidos en el análisis de la estabilidad genética en dos cultivos con multiplicación vegetativa en los que se han aplicado técnicas de criopreservación: menta (***Mentha x piperita***) y crisantemo (***Chrysanthemum x morifolium***). Los análisis de estabilidad genética se han llevado a cabo con marcadores moleculares de ADN (RAPD y AFLP). En el caso de menta se ha comparado la estabilidad genética de ápices criopreservados mediante la técnica **droplet** con otras estrategias de conservación a medio-largo plazo (colecciones en campo y cultivo *in vitro* con crecimiento limitado). En crisantemo se estudiaron dos protocolos diferentes de criopreservación (vitricación y encapsulación-deshidratación), realizando en este último un análisis secuencial de los distintos pasos del protocolo.

Referencias

- Harding K (2004) *CryoLetters* 25: 3-22.
- Kaity A, Ashmore SE, Drew RA, Dullo ME (2008) *Plant Cell Reports* 27: 1529-1539.
- Martín C, Cervera MT, González-Benito ME (2011) *Journal of Plant Physiology* 168: 158-166
- Müller J, Day JG, Harding K, Hepperle D, Lorenz M, Friedl T (2007) *American Journal of Botany* 94:799-808.
- Panis B, Lambardi M (2005) En: Ruane J, Sonnino A, editores. *The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forest, Animal and Fishery Genetic Resources in Developing Countries*. Turin: FAO, 2005. p 61-78.
- Sánchez C, Martínez MT, Vidal N, San-Jose MC, Valladares S, Vieitez AM (2008) *CryoLetters* 29:493-504.

Agradecimientos

Trabajo financiado mediante los proyectos AGL2007-65938-C02-01 y AGL2010-21989-C02-01



CARACTERIZACIÓN DE DESCENDENCIAS DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE ESPLIEGO QUE SOBREENPRESAN EL GEN DE LA ENZIMA LINALOL SINTASA

Isabel Mendoza-Poudereux¹, Alicia Navarro¹, Jesús Muñoz-Bertomeu², Juan Segura¹, Isabel Arrillaga¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia
46100, Burjassot, Valencia. ²IBMCP, UPV-CSIC, 46021-Valencia
e-mail: isabel.mendoza@uv.es

Lavandula latifolia Medicus (espliego) es un arbusto con gran interés económico por su aceite esencial y que puede ser también utilizada como cultivo alternativo para zonas degradadas. Aunque la problemática del sector de plantas aromáticas es compleja, su mayor limitación es la baja producción, que impide el acceso a mercados importantes y encarece las instalaciones de elaboración del aceite esencial. En este escenario, la obtención de plantas de espliego capaces de producir una mayor cantidad y calidad de aceite esencial, supondría una mejora sustancial en el sector, al incrementar el rendimiento y abaratar costes de producción.

Los monoterpenos, constituyentes principales del aceite esencial del espliego, se sintetizan en los plastos a través de la ruta del metil eritritol fosfato (MEP) (1 y 2). El incremento en la producción y/o calidad del aceite puede conseguirse mediante la sobreexpresión de las enzimas implicadas en las fases iniciales (Ruta MEP) o finales (terpeno sintasas) de la ruta de biosíntesis de los monoterpenos, respectivamente. En el presente trabajo, se presentan los resultados del análisis de las descendencias T1 de plantas transgénicas de espliego que sobreexpresan el gen de la Linalol sintasa (**LIS**) de **Clarkia breweri**, monoterpeno sintasa que cataliza la transformación de geranil difosfato en linalol.

Se analizaron 5 plantas (Lis6-12, Lis6-14, Lis6-21, Lis6-28 y Lis6-30) todas ellas descendientes de la línea Lis6, obtenidas mediante autopolinización manual. El parental Lis6 contiene 2 inserciones del gen, aunque tras los análisis correspondientes por PCR y Southern Blot, se comprobó que se heredaban como un solo locus. Todas las descendencias T1 analizadas, excepto Lis6-12, heredaron el transgén. Por tanto, esta línea ha sido utilizada como control interno.

El aceite esencial se extrajo mediante dos métodos: hidrodestilación de las hojas maduras (mezcla de hojas del 4º al 10º verticilo) y extracción directa en hexano de hojas procedentes de los verticilos 1 a 10. En ambos casos, los análisis se realizaron con la ayuda de un cromatógrafo de gases, utilizando los patrones y condiciones previamente fijadas (3).

Los análisis de los extractos obtenidos por hidrodestilación demostraron que la sobreexpresión del gen **LIS** no afecta al contenido total de aceite esencial. No obstante, las plantas que heredaron el transgén **LIS** contenían un mayor porcentaje de Linalol que la línea Lis6-12, que no había heredado dicho transgen. Los análisis de los aceites extraídos en hojas de los distintos verticilos demostraron que la sobreexpresión del transgén **LIS** incrementó significativamente el contenido en Linalol en los verticilos más jóvenes. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión de genes implicados en los pasos finales de la ruta biosintética de los terpenos puede modificar el perfil del aceite esencial de espliego sin variar el contenido total del mismo.

Referencias

1. Rodríguez-Concepción M, Boronat A (2002) *Plant Physiol* 130: 1079-1089
2. Mahmoud SS, Croteau RB (2002) *Trends Plant Sci* 7: 366-373
3. Muñoz-Bertomeu J, Ros R, Arrillaga I, Segura J (2008) *Metabolic Engineering* 10: 166-177

Esta investigación ha sido subvencionada por la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/075). I.Mendoza-Poudereux agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación la concesión de una beca FPU para la realización del doctorado.



MADURACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Q. SUBER* L: PROTEÍNAS IMPLICADAS

Arancha Gomez², Beatriz Pintos², Juan Antonio Lopez³, Emilio Camafeita³, Nieves Sánchez¹,

M^a Angeles Bueno¹

1. Departamento de Biotecnología CIFOR-INIA, Ctra de La Coruña, km 7.5 28040 Madrid (España). 2. Dirección actual. Departamento de Biología Vegetal I. Facultad de CC Biológicas. Universidad Complutense. C) José Antonio Novais nº 2. 28040 Madrid. 3. Unidad de Proteómica. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Melchor Fernández Almagro, 3. 28029-Madrid. E-mail: bueno@inia.es

La embriogénesis somática es un método de propagación vegetativa que se ha obtenido con éxito en el alcornoque a partir de embrión cigótico inmaduro. Después de la inducción de la embriogénesis, el embrión somático empieza a desarrollar una alta actividad metabólica caracterizada por la división y proliferación celular dirigidas al establecimiento y desarrollo de estructuras embrionarias, mientras que la acumulación y la deposición de compuestos de reserva (principalmente proteínas y almidón) prevalecen en etapas posteriores. Sin embargo, la conversión de embriones somáticos en plantas a menudo es dificultosa y limita el uso de embriogénesis somática en muchos sistemas.

La proteómica se ha utilizado para identificar las principales proteínas que intervienen a lo largo del proceso embriogénico. Para ello se han analizado embriones en tres etapas de desarrollo. La primera etapa, proliferación, comprende agrupaciones de pequeños embriones translúcidos con alta capacidad embriogénica; la segunda etapa se caracteriza por embriones cotiledonares blancos que derivan de la fase anterior y carecen de capacidad embriogénica y por último la tercera etapa incluye embriones maduros.

Los extractos de proteínas de cada uno de los estados se analizaron por 2D-DIGE y las proteínas con expresión diferencial fueron identificadas mediante MALDI-MS. Estas proteínas pertenecen a los siguientes grupos funcionales: proteínas involucradas en la división de celular, en detoxificación y respuesta al estrés, de reserva, en biosíntesis de poliaminas y etileno y glicólisis. Estas proteínas implicadas en el proceso de embriogénesis somática pueden constituir la base para incrementar la eficiencia de este proceso.

Referencias

Gomez A, Lopez JA, Pintos B, Camafeita E, Bueno M.A. 2009. Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns. *Proteomics* 2009, 9, 4355-4367. DOI 10.1002/pmic.200900179

HAPLOIDES Y DOBLEHAPLOIDES PARA LA MEJORA GENÉTICA DE *Q. ILEX* L OBTENIDOS MEDIANTE CULTIVO IN VITRO.

Nieves Sánchez¹, Beatriz Pintos², Rafael Navarro³, Arancha Gomez², Jesús Jorrín³ y M^a Angeles Bueno¹

¹ Biotecnología Forestal. CIFOR-INIA, Ctra de La Coruña, km 7.5 28040 Madrid. ² Dep. de Biología Vegetal. Facultad de CC Biológicas. Universidad Complutense. C/ Jose Antonio Novais n^o 2. 28040 Madrid. ³ Dep. de Ingeniería Forestal. Dep. Bioquímica y Biología Molecular Universidad de Córdoba. Avda, de Médina Azahara, n^o 5, 14071, Córdoba. E-mail: sqnieves@hotmail.com

Los métodos convencionales de mejora genética para la obtención de haploides o doble-haploides requieren muchas generaciones lo cual es impracticable en especies forestales con largos ciclos de vida como la encina (*Q. ilex*). Esta desventaja ha llevado a enfatizar la búsqueda de alternativas biotecnológicas como las técnicas de cultivo *in vitro*. El cultivo de anteras ha permitido la obtención de haploides y doble-haploides, es decir, líneas puras (homocigóticas) en una sola generación, reduciendo considerablemente el tiempo y el coste para desarrollar nuevos clones. Este material clonal ha hecho posible la obtención de material fijado genéticamente, de gran utilidad en estudios genéticos de mapeo, detección de mutantes, transformación etc.

La obtención de haploides y doble-haploides de encina se ha logrado: estableciendo la correlación entre el tamaño del amento y el estadio de las microsporas con capacidad embriogénica, determinando el medio de cultivo adecuado y el tratamiento de estrés (temperatura y tiempo necesarios) para que la microspora abandone su programa de desarrollo gametofítico redireccionándose hacia una ruta esporofítica que conlleva la formación de embriones. Los primeros embriones se observaron emergiendo del interior de la antera a partir de las microsporas al mes de la puesta en cultivo de las anteras y los últimos a los 3 meses. Los embriones surgidos fueron aislados y transferidos a un medio de cultivo adecuado para su proliferación.

El nivel de ploidía (haploide o diploide) de las diferentes líneas embriogénicas se determinó mediante citometría de flujo. El origen de los embriones se determinó mediante el análisis molecular con microsatélites (SSRs), mostrando que los embriones poseían un único alelo paterno lo que demostró la naturaleza doble-haploide de los embriones diploides. Estos embriones diploides son en consecuencia homocigotos doblehaploide (haploides con duplicación espontánea del genoma) y su origen se encuentra en las microsporas de la antera. Por tanto no hay embriones diploides procedentes de células de la pared de la antera que habrían resultado heterocigotos.

Es la primera vez que se consigue inducir embriogénesis gamética a partir del cultivo *in vitro* de anteras de encina.

Referencias

Pintos B, Manzanera JA, Bueno MA. 2007. Protocol for Doubled Haploid micropropagation in *Quercus suber* L and Marker-assisted verification. IN: Jain SM, Häggman H, [eds]. Protocols for Micropropagation of Woody trees and Fruits. Cp 16 pp 163- 178 . Springer . Dordrecht. The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-6351-0.



EFFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FURANOCUMARINAS EN CALLOS Y PLÁNTULAS DE BITUMINARIA BITUMINOSA

Mercedes Dabauza¹, María Pazos-Navarro¹, David Walker², José Antonio del Río³, Ana M. Ortuño³, Enrique Correal².

¹Departamento de Biotecnología y Protección de Cultivos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) C/Mayor s/n 30150-La Alberca, Murcia (Spain). ²Departamento de Recursos Naturales, IMIDA. ³Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Murcia, Espinardo, 30100-Murcia (Spain). E-mail: mercedes.dabauza@carm.es

Bituminaria bituminosa (L.) C.H. Stirtor (**Psoralea bituminosa** L.) es una leguminosa perenne con múltiples usos potenciales (forrajero, medicinal, medioambiental y ornamental). Estos usos, junto con su amplia distribución en la Cuenca Mediterránea y Macaronesia (Muñoz y Correal 1998) y su gran diversidad genética (Coca y col. 2003), han despertado el interés de diversos grupos de investigación en España, Italia, Grecia, Israel y Australia. Los estudios realizados sobre la composición de **B. bituminosa** revelan la presencia de altas concentraciones de furanocumarinas (FCs) como angelicina y psoraleno (Martínez y col. 2009). Estos compuestos tienen un elevado interés farmacológico: el psoraleno se usa, junto con la luz UV ("PUVA"), en el tratamiento de varias enfermedades de la piel como el vitíligo, la psoriasis y las micosis fungoides (Feldman y col. 2003), mientras que la angelicina demuestra actividad tranquilizante, sedativa y anticonvulsiva y su uso en el tratamiento de la talasemia se ha patentado (Patente US2006111433[A1]). Dado el interés farmacológico de las FCs y que, en la actualidad, no se dispone de un material vegetal con altos contenidos en FCs y debido también al alto coste de la síntesis industrial, hay un gran interés en su producción **in planta**. La acumulación de FCs en las plantas depende de múltiples factores, tales como la temperatura, el estrés hídrico, la exposición a la luz, el estado de desarrollo de la planta, el tratamiento con metales pesados o el suministro de nutrientes (Pecetti y col. 2007). El empleo de diversos elicitores y precursores inducen también la síntesis de FCs tanto en plantas como en cultivos establecidos **in vitro** (Bourgaud y col. 2006).

Nuestro grupo de trabajo del IMIDA, en colaboración con otros grupos españoles (Instituto Canario de Investigaciones Agrarias -ICIA-, Universidad de Murcia y Universidad de Alicante) y grupos australianos (CLIMA, The University of Western Australia y DAFWA) estamos interesados, entre otros objetivos, en optimizar la capacidad de **B. bituminosa** para producir psoraleno y angelicina, a unos costes en los que sea rentable su extracción a partir de este material vegetal. Estos trabajos se encuadran dentro de un proyecto más amplio en el que se pretende estudiar el efecto de distintos elicitores sobre la síntesis y acumulación de FCs en esta especie (UV, estrés hídrico, metales, temperatura salinidad y precursores de la vía de síntesis).

En el presente trabajo, se exponen los resultados preliminares de diversos experimentos realizados **in vitro** para determinar el efecto de la radiación UV en callos organogénicos (Pazos-Navarro y col. en preparación) y plantas de **Bituminaria bituminosa**, sobre la producción de FCs.

Referencias

- Bourgaud F, Hehn A, Larba R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, Matern U. 2006. *Phytochemistry Reviews* 5: 293-308.
- Coca B, Juan A, Ríos S, Crespo MB, Méndez P. 2003. En: **Pastos, Desarrollo y Conservación** (SEEP). Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. 816 pp. Editores: A.B. Robles et al. pp. 601-608.
- Feldman SR, Garton R, Averett W, Balkrishnan R, Vallee J. 2003. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 4, 1525-1533.
- Martínez S, Correal E, Real D, Ortuño A, Del Río JA. 2009. En 'Recent progress in medicinal plants (RPMP) Drug Plants I'. (Eds AS Awaad, JN Govil VK Singh) pp. 307-322.
- Muñoz A, Correal E. 1998. **Actas de la XXXVIII Reunión Científica de la S.E.E.P.** Soria, 87-91.
- Pazos-Navarro M, Correal E, Ortuño A, Del Río JA, Dabauza M. Establishment and micropropagation from apical and nodal segments of **Bituminaria bituminosa** (L.) Stirt.: A source of Furanocoumarins. (En preparación).
- Pecetti, L., Tava, A., Pagnotta, M.A., Russi, L. 2007. *J. Sci. Food Agric.* 87, 985-991.

Agradecimientos

Fundación Séneca (Proyecto nº 11776/PI/09), Fondo Social Europeo, IMIDA.



EXPRESIÓN DEL GEN *CsERF1* EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ENRAIZAMIENTO ADVENTICIO EN CASTAÑO.

Verónica Codesido¹, Silvia Valladares¹, Enrique Ferro¹, Carmen Díaz-Sala² y Conchi Sánchez¹

¹Departamento de Fisiología Vegetal, IAG-CSIC, Apto.122, 15780. Santiago de Compostela.
E-mail: conchi@iag.csic.es

²Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Alcalá, 288271, Alcalá de Henares, Madrid

Los factores de transcripción en respuesta al etileno (ERFs) son exclusivos del reino vegetal y contienen un segmento bien conservado conocido como caja GCC localizado en la región promotora de los genes que se activan en respuesta a estrés biótico o ambiental en plantas. El castaño es una de las especies forestales más económicamente importante en el sur de Europa y, hasta la fecha, no se habían identificado genes con dominios ERF en dicha especie. En este trabajo, a partir de ADNc de embriones somáticos y de brotes de castaño tratados con AIB, hemos clonado y caracterizado un miembro de la subfamilia ERF que hemos denominado **CsERF1 (Castanea sativa ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1)**. Este ADNc contiene 1.4kb y codifica una proteína de 273 aminoácidos que contiene el dominio AP2 constituido por 57 aminoácidos y localizado entre los aminoácidos 110 y 167, el cual muestra un 100% de similitud con las secuencias aminoácídicas que codifican para ERFs en diferentes especies leñosas así como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo que se trata de un dominio muy conservado en estas especies. Estudiamos además la expresión del gen **CsERF1** durante el desarrollo de los embriones somáticos y enraizamiento adventicio, ya que en ambos se produce una rediferenciación y determinación celular con los consecuentes cambios en la expresión de los genes implicados. Durante las diferentes fases del desarrollo de embriones somáticos (globular, cotiledonar temprano y cotiledonar) se observa una localización preferencial en el procambium y en el meristemo caulinar en la fase cotiledonar.

Para la evaluación de la implicación del gen **CsERF1** en el enraizamiento adventicio se dispone de un sistema experimental consistente en dos líneas de brotes en diferente estado ontogénico (juvenil y adulto) del mismo genotipo que difieren en su capacidad de enraizamiento. Los resultados preliminares obtenidos del análisis de la expresión del gen **CsERF1** mediante qPCR muestran que este gen es inducible por auxina exógena en ambos tipos de material. Parece existir una respuesta muy temprana del gen **CsERF1** a la aplicación de auxina en los brotes de origen adulto e incapaces de enraizar en comparación con los brotes de origen juvenil y capaces de enraizar, donde la respuesta del gen al estímulo hormonal es más tardía. Esta diferencia en los patrones de expresión del gen **CsERF1** en ambos tipos de tejido con diferente estado ontogénico podría jugar un papel importante durante los primeros estadios de la formación del proceso de enraizamiento cuando es necesaria la correcta estimulación de las células competentes encaminadas a la formación de raíces.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MEC (Ref. AGL2008-05105-C02/FOR) y la Xunta de Galicia (PGDIT06P-XIB40003PR y 10MRV400033PR)



DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PARA BACTERIAS CONTAMINANTES EN CULTIVOS IN VITRO DE PLANTAS.

César Pérez-Ruiz¹, Emilia López-Solanilla², Nerea Larrañaga¹, Elizabeth Uberhuaga¹, Rosa Armijos³, Eugenia Bolacel⁴ y Santiago Moreno-Vázquez¹

¹ Departamento de Biología Vegetal, ETSI Agrónomos – UPM, Avda Complutense s/n, 28035 Madrid. E-mail: santiago.moreno@upm.es ² CBGP-UPM, Campus de Montegancedo, Ctra. M-40, Km 38, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, ³ Área Biológica Universidad Técnica Particular de Loja, San Cayetano Alto, s/n, Loja, Ecuador,

⁴ Departamento de Botánica y Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, Brasil

La variación somaclonal es la variación genética o epigenética que se genera de forma espontánea durante el cultivo *in vitro* de plantas. Se trató de detectar este tipo de polimorfismo en tres variedades de **Dendrathera grandiflora** Tzevel ("Red Focus", "Red Reagan" y "Pasodoble") mediante PCR con cebadores cortos dirigidos a secuencias conservadas de elementos móviles y a genes de resistencia con dominios NB-ARC. Los cinco fragmentos polimórficos detectados fueron secuenciados. Un fragmento presentó homología con 18S rRNA de plantas, otro con un retrotransposon de tipo Gypsy, los tres restantes con distintos genes de bacterias del género **Bacillus**. Para verificar si los ADN de crisantemo utilizados para el análisis de variación somaclonal estaban contaminados con bacterias del género **Bacillus** se diseñaron cebadores altamente específicos que permitían amplificar 16S rDNA exclusivamente cuando el ADN molde procede de bacterias pertenecientes a ese género. La contaminación por **Bacillus** fue confirmada.

Además de **Bacillus** la bibliografía destaca **Staphylococcus**, **Lactobacillus**, **Dickeya** y **Pectobacterium**, **Pseudomonas** y **Xanthomonas** como los principales contaminantes en cultivos *in vitro* de plantas. Se diseñaron cebadores específicos para dichos géneros y se probaron sobre una colección de cultivos *in vitro* de distintas especies vegetales, con y sin contaminaciones bacterianas detectables de visu. Se presentan los resultados preliminares.

Del estudio se desprende la importancia de verificar la ausencia de contaminaciones bacterianas sobre los ADN obtenidos de plantas de cultivo *in vitro* antes de acometer estudios moleculares de variación somaclonal o de otro tipo. Se hacen públicos los marcadores moleculares que permiten realizar dicha verificación

Referencias

- Buckley PM, DeWilde TN, Reed BM (1995) *In vitro* Cell and Development Biology 31: 58-64
 Leifert C, Ritchie JY, Waites WM (1991) World Journal of Microbiology and Biotechnology 7: 452-469
 Thomas P (2006) Plant Cell Tissue and Organ Culture 87: 155-165

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES DE ARROZ EN ESTRÉS SALINO

César Pérez Ruiz¹, Santiago Moreno-Vázquez¹, Leticia Carvalho Benitez², Luciano Carlos da Maia², Luis Willian Pacheco Arge², Eugenia Jacira Bolacel Braga²

¹Dpt. Biología Vegetal, E.T.S. Ingenieros Agrónomos UPM, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, España. E-mail: cesar.perez@upm.es ²Dpts. Botánica y Fitotecnia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, Brasil. E-mail: lecbenitez@gmail.com

Brasil ocupa el octavo lugar en la producción mundial de arroz (*Oryza sativa* L.). El cultivo es fundamentalmente (75%) en regadío. Entre los estreses abióticos, la salinidad es una de las principales causas de disminución de la productividad de la mayoría de los cultivos, entre ellos, el arroz (*Oryza sativa* L.). Este trabajo tiene como objetivo identificar genotipos de arroz tolerantes a la salinidad mediante el estudio morfológico y molecular de plantas de arroz cultivadas *in vitro* y bajo estrés salino.

Semillas de los genotipos de arroz BRS Bojuru, BRS Talento, Cana Roxa, BRS Atalanta y BRS Ligeirinho fueron germinadas en medio Murashige y Skoog (MS) base y con distintas concentraciones de NaCl. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento durante 21 días. Se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, en esquema factorial con 5 genotipos x 4 concentraciones de NaCl (0, 68, 136 y 204 mM) y con tres repeticiones por tratamiento. Para la caracterización morfológica se evaluó: altura de la planta (cm), número de hojas, la longitud de raíces (cm) y número de raíces. Para la caracterización molecular se realizó la extracción del ADN genómico seguido de reacciones de PCR. Se utilizaron **primers** específicos de cinco genes implicados en la tolerancia a la salinidad, seleccionados por la investigación **in silico** en la base de datos **National Center for Biotechnology Information**. Los genes seleccionados fueron: Os01g0348900, Os03g0251100, Os03g0688300, Os02g0820000 y Os09g0559900.

Se realizó un análisis de varianza para conocer los efectos individuales de las fuentes de variación y sus posibles interacciones. Todas las variables morfológicas mostraron correlaciones, lo que se determinó mediante un análisis de regresión polinomial. El aumento de la salinidad en el medio de cultivo inhibió el desarrollo de todas las características morfológicas, siendo la altura de la planta la más afectada. BRS Ligeirinho no germinó en la concentración de 204 mM y presentó las mayores reducciones en el desarrollo entre las concentraciones de 0 y 136 mM, lo que demuestra su mayor sensibilidad al estrés. Por otra parte, BRS Bojuru presentó los mayores niveles de tolerancia y el nivel más bajo de reducción del desarrollo en la concentración de 204 mM para las variables estudiadas, excepto la longitud de raíces.

En la caracterización molecular el genotipo BRS Ligeirinho no mostró amplificación del gene Os01g0348900 que, según la base de datos InterPro, codifica una proteína inducida por la sal (IPRO01229) y que es dos veces más expresada en plantas tolerantes. El hecho de este genotipo no presente esta secuencia en su genoma podría estar relacionado con su mayor sensibilidad al estrés. En los otros genotipos la amplificación de los genes no presentó polimorfismo y siguieron un patrón de intensidad similar, lo que permite inferir que estas secuencias se han conservado a lo largo del proceso evolutivo y adaptativo.

Con base en estos datos se concluye que entre los cinco genotipos comparados BRS Bojuru es el más indicado en programas de mejora genética para la tolerancia a la salinidad.

Referencias:

Zhang X, Liu S, Takano T (2008) Plant Molecular Biology 68: 131-143

Kumari S, Sabharwal V, Kushwaba H, Sopory S, Singla-Pareek S, Pareek A (2009) Functional & Integrative Genomics 9: 109-123



ESTUDIO DEL CULTIVO DE SUSPENSIONES CELULARES PROEMBRIOGÉNICAS DE ALBARIÑO (*VITIS VINIFERA*) PARA UNA EFICIENTE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA Y REGENERACIÓN DE PLANTAS

María Lorena Fernández, Rubén Saporta, Laura Sanjurjo, Francisco de la Torre, Verónica Fernández, Antonio Segura, María Teresa Herrera y José Ramón Vidal

Dpto. de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Campus Vida, Universidad de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela. Email: joseramon.vidal@usc.es

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de importancia cultural y económica en zonas templadas a pesar de las problemáticas de su cultivo (De la Torre **et al.** 2010). La reciente secuenciación de su genoma (Jaillon **et al.** 2007) permitirá avanzar en el análisis funcional y la mejora molecular de esta especie (Vidal **et al.** 2010) lo que redundará en un mejor manejo del cultivo y una mayor calidad del producto. Para ello, es indispensable disponer de un tejido vegetal competente [cultivos embriogénicos] para una eficiente transformación genética y regeneración de plantas (Vidal **et al.** 2009). La cinética de crecimiento de suspensiones celulares proembriogénicas de vid, su viabilidad celular y el consumo de nutrientes (fosfatos, nitratos, sacarosa) en el medio de cultivo a lo largo del tiempo son parámetros importantes para determinar el momento óptimo para la transformación genética. En este trabajo se estudió durante 21 días de cultivo el crecimiento de suspensiones celulares de la variedad Albariño a las que semanalmente se transfirió mediante el método biolístico (Kikkert **et al.** 2004) el gen de la β -glucuronidasa (gus) clonado en el plásmido de expresión pBI221. Se determinó que la fase exponencial de crecimiento se alcanza entre los días 3 y 6 de cultivo, lo que coincide con el agotamiento de fosfato en el medio de cultivo; y que a los 7 días de cultivo se obtiene el mayor número de eventos transitorios de transformación genética (aprox. 2.800 eventos por placa Petri). Se observó también que el porcentaje de regeneración de plantas a partir de embriones procedentes de estos cultivos varía entre el 13 y el 60% dependiendo de la edad del cultivo y el tipo de embrión desarrollado. Este estudio permitió determinar el periodo óptimo de cultivo de las suspensiones celulares para abordar con éxito la transformación genética y la regeneración de plantas.

Trabajo financiado por los proyectos [AGL2009-11481] del MICINN y [O8MRU017200PR, programa INCITE y 2009/O54, programa emergentes] de la Xunta de Galicia.

Bibliografía:

De la Torre et al. 2010. Plant Genetic Transformation and Molecular Markers, Editorial Pointer **7**: 119-148.

Jaillon et al. 2007. Nature **449**: 463-467.

Kikkert et al. 2004. Methods and Molecular Biology **286**: 61-78

Vidal et al. 2009. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **96**: 85-94.

Vidal et al. 2010. Australian Journal of Grape and Wine Research **16**: 138-151.

CONSERVACIÓN EN FRÍO DE BROTES MICROPROPAGADOS DE OLIVO, CULTIVAR “ARBEQUINA”

Isabel Imbroda, Isabel MG Padilla y Araceli Barceló

IFAPA Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga

La conservación en frío, o frigoconservación, de material introducido **in vitro** es una técnica que permite mantener los materiales durante un periodo moderado de tiempo en frío, siempre por encima de los 0° C, con un ahorro de costes, tiempo y de mano de obra, que tiene una gran utilidad en el mantenimiento de colecciones **in vitro** de las especies de propagación vegetativa y que se utilizan como salvaguarda de las colecciones de campo. En este trabajo se describe un protocolo de frigoconservación de brotes micropropagados de olivo, cv Arbequina, que permite la conservación del material durante al menos un año.

Brotos de olivo procedentes de stocks en proliferación activa de material juvenil (semillas del cv “Arbequina” germinadas **in vitro**) y adulto (cv Arbequina), se cultivaron individualmente en tubos de ensayo conteniendo 25 ml de medio de proliferación (Roussos y Pontikis, 2002). Se testó el efecto de la concentración de reguladores de crecimiento y la temperatura (4/8° C), en luz o en oscuridad. Trascurrido un año, el material se sacó del frío y se tomaron datos de necrosis y aspecto general, transfiriéndose los brotes a medio de proliferación estándar e incubándose a 25° C y fotoperiodo de 16/8 h. Seis semanas más tarde se tomaron datos de supervivencia, longitud de los brotes y número de hojas. El material proliferado fue enraizado con el método de enraizamiento de Revilla y col. (1996), y tras 8 semanas se determinó el porcentaje de enraizamiento de los brotes.

El material juvenil se vio más afectado por el frío que el material adulto y ambos materiales presentaron un mayor porcentaje de necrosis en oscuridad que en luz. Como consecuencia, la supervivencia del material adulto fue mayor (76%) que la del material juvenil (28%), en ambos casos a 8° C luz. Tanto el material juvenil como el adulto presentaron altas tasa de necrosis a la salida de frío a 4° C y sobre todo en oscuridad. Los reguladores de crecimiento en el medio durante la incubación en frío no parece tener una influencia clara sobre la supervivencia. El porcentaje de enraizamiento del material adulto alcanzó el 64%, ligeramente inferior al alcanzado en el control no frigoconservado (71%). Una parte del material proliferado fue colocado de nuevo en frío utilizando el mejor tratamiento obtenido para determinar cuantos ciclos de un año de frío puede recibir este material.

Referencias

- Revilla MA, Pacheco J, Casares A, Rodriguez R (1996). **In vitro** reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L) through micrografting. In *Vitro Cell & Dev Biol-Plant* 32 (4):257-261.
- Roussos PA, Pontikis CA (2002). **In vitro** propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. ‘Koroneiki’. *Plant Growth Reg* 37 (3): 295-304.



AMPLIFICACIÓN DE LA RESPUESTA EMBRIOGÉNICA DE SUSPENSIONES CELULARES DE PLATANERA

Miguel-Apeles Díaz y Juan-Bernardo Pérez

Dptos. de Ornamentales y Horticultura y de Fruticultura Tropical, ICIA.
Apdo. 60 La Laguna, 38200 S/C de Tenerife

Se ha estudiado el potencial de amplificación de la respuesta embriogénica de suspensiones celulares embriogénicas (SCEs) de platanera previamente establecidas. Las líneas SCEs derivan de callos embriogénicos obtenidos a partir flores masculinas inmaduras, procedentes tanto de plantas adultas como de inflorescencias multiplicadas *in vitro*. Como material de partida se emplearon muestras de SCEs tras uno y dos meses desde el inicio de la inducción de la respuesta embriogénica. Se determinó el aumento en peso fresco de los embriones producidos después de un ciclo de 30 días bajo distintas condiciones de cultivo, que incluían variaciones en cuanto a la consistencia del medio (sólido o líquido), sistema de cultivo (estático, agitación o inmersión temporal) y composición de los medios empleados en la multiplicación secundaria de embriones somáticos de platanera.

El empleo de medio líquido de composición básica y vitaminas MS [Murashige y Skoog, 1962], suplementado con BA (0.3 mg/L) y AIA (2 mg/L) [Gómez-Kosky et al., 2002], utilizado bajo agitación continua, resultó en las mayores tasas de aumento, logrando multiplicar masivamente el peso fresco de los embriones inicialmente establecidos. Finalmente se comprobó la capacidad de germinación y de regeneración de plantas completas a partir de los embriones producidos.

Referencias

Gómez-Kosky R., M. de Feria-Silva, L. Posada-Pérez, T. Gilliard, F. Bernal-Martinez, M. Reyes-Vega, M. Chávez-Milian y E. Quijala-Mendoza. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in liquid medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68:21-26.

Murashige T. y T.A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.



MICROPROPAGACIÓN E INJERTO IN VITRO DE PISTACHO

Elena García, Pilar Lorente, Juan A. Marín, Arancha Arbeloa y Pilar Andreu

E. E. de Aula Dei (CSIC). Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza. E-mail:andreu@eead.csic.es

El cultivo del pistachero (**P. vera** L.) ha despertado un gran interés en zonas de España en las que cultivos tradicionales, como la vid o el olivo, han perdido rentabilidad. Sin embargo, su expansión está frenada por la dificultad de propagación por injerto de las variedades de interés y la necesidad de selección de un patrón clonal propagado vegetativamente. La aplicación de las técnicas de cultivo in vitro a las especies de **Pistacia** permitirá la propagación clonal y masiva y también profundizar en el estudio de los problemas que afectan al injerto.

Establecimiento. Se iniciaron cultivos de **P. vera** a partir de explantos nodales y de **P. terebinthus** a partir de semillas germinadas **in vitro**.

Multiplicación. Se ensayaron tres medios diferentes para la multiplicación basados en los medios DKW, MS y WP, añadiendo 0.5 μM IBA, 5 μM BA, 30 g/l de sacarosa, y 7 g/l de agar. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo y se subcultivaron cada tres semanas. Se compararon los diferentes medios de cultivo atendiendo a: necrosis apical (%), tamaño medio del brote (mm), número de entrenudos por brote y tasa de multiplicación (número de brotes a partir de un brote), a las 3 semanas del subcultivo. La multiplicación **in vitro** de ambas especies se aproximó a 2 brotes por brote cada 3 semanas.

Enraizamiento. Se obtuvo un alto enraizamiento del patrón **P. terebinthus** (82 %) en un medio WPM modificado y las plantas fueron trasplantadas a maceta en invernadero con éxito.

Injerto. Ápices de brotes de **P. vera** de 10-20 mm fueron injertados in vitro sobre brotes enraizados o sin enraizar del patrón **P. terebinthus** con ayuda de un microscopio estereoscópico. También se han realizado homoinjertos de **P. terebinthus** para comprobar la idoneidad de la técnica en condiciones de afinidad total (control). El injerto se realizó decapitando el ápice del portainjerto y realizando una hendidura en el tallo donde se encajó el brote de la variedad, cuya base había sido recortada en forma de cuña (Onay et al 2004; Thimmappaiah et al 2002). Para ayudar a mantener el injerto se le aplicó una gota de agarosa al 4% (Jonard et al. 1983). Se realizaron 50 injertos **in vitro**, de los que 34 correspondieron a **P. vera**. Se estudió la evolución de los injertos, que mostraron una alta supervivencia, siendo del 73% en el homoinjerto y del 44% en el **P. vera**/**P. terebinthus** a las 3-5 semanas de cultivo. Se realizó un estudio histológico del injerto mediante cortes longitudinales a mano alzada teñidos con naranja de acridina al 0,01% en agua. Los cortes se observaron en un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de injertos que mostraron una zona de contacto entre variedad y patrón fue del 75% y la proliferación de células de callo en el 87 %. No obstante, un 81% de los injertos mostraron alguna zona con células necróticas que creaban discontinuidades. Estos datos fueron tomados entre la tercera y la quinta semana tras realizar el injerto y el estudio fue destructivo, por lo que es probable que muchos injertos hubieran evolucionado creando mayores conexiones vasculares y un buen prendimiento. Aunque la técnica de injerto utilizada es prometedora, se están realizando nuevos estudios para conocer la evolución de los injertos en etapas más tardías y para mejorar la formación las conexiones vasculares.

Referencias.

Jonard R, Hugard J, Macheix JJ, Martinez J, Mosella-Chancel L, Poessel JL, Villemur, P. 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae*, 20: 147-159

Onay A, Pirinc V, Yildirim H, Basaran D. 2004. In vitro micrografting of mature pistachio (**Pistacia vera** var. Siirt)

Thimmappaiah, Puthra GT, Raichal S. 2002. In vitro grafting of cashew (**Anacardium occidentale** L.). *Scientia Horticulturae*, 92: 177-182

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto RTA2010-00053-C03-03 y por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43.



MICROPROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN EX SITU DE GERMOPLASMA DE LOS OLMOS SINGULARES DE LA COMUNIDAD DE MADRID

Jesús Alegre, David Medel, Mar Ruiz, Cristina Celestino, Luis Gil, y Mariano Toribio

IMIDRA - Finca "El Encín". Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)
jesus.alegre@madrid.org

La grafiosis causada por hongos vasculares (**Ophiostoma ulmi** y **O. novo-ulmi**) ha tenido efectos devastadores en todo el mundo, destruyendo la mayoría de los olmos de diferentes especies. Prácticamente los únicos olmos de la especie **Ulmus minor** que en la actualidad sobreviven a esta enfermedad en el territorio madrileño (como árboles adultos) son 10 ejemplares que figuran junto a otro olmo de la especie **U. laevis** en el Catálogo de Árboles Singulares de la Comunidad de Madrid.

En el año 2009 en el IMIDRA se inició un proyecto que persigue la clonación y conservación **ex situ** de estos genotipos "singulares" de olmo. Son árboles que tienen un notable valor histórico y social, y además algunos de ellos podrían ser especialmente tolerantes a la grafiosis. Por ello este proyecto de clonación se planteó tanto con fines científicos como didácticos. Se pretende asegurar la conservación **ex situ** de los árboles singulares por motivos sentimentales e históricos, divulgar la utilidad de las técnicas de clonación y finalmente evaluar el nivel de tolerancia a la grafiosis de estos "genotipos singulares".

La clonación permite capturar todo el potencial genético de un individuo, por ello se usa de forma tradicional en la propagación de numerosas especies agrícolas y algunas especies forestales. Sin embargo es frecuente que se hagan valoraciones muy negativas del uso del material clonal, ya sea por desconocimiento o por temor a la pérdida de variabilidad genética. Pero una cosa son las reforestaciones de conservación y otra muy distinta las aplicaciones de la clonación en plantaciones productivas, en la silvicultura multivarietal o en programas de mejora y conservación. Por ello es necesario mejorar la percepción social de las biotecnologías de propagación **in vitro**.

Se empleó un protocolo de propagación por vía organogénica que se basa en los trabajos de Diez y Gil (2004), Malá **et al.** (2005), Thakur y Karnosky (2007) y Conde **et al.** (2008). Para iniciar los cultivos se cortaron ramas en invierno-primavera de 2010, antes de la brotación. Estaquillas tomadas de estas ramas, se pusieron a brotar en cámara de cultivo y se trataron semanalmente con fungicidas, alternando de forma cíclica Captazel[®], Antraco[®], Beltanol-L[®] y Previcur[®]. Se obtuvieron brotes de entre 1 a 3 cm que se emplearon como explanto para iniciar los cultivos. Los explantos se esterilizaron superficialmente en etanol al 70 %, durante 30 segundos, y posteriormente en una solución de hipoclorito sódico al 10 % (3,5 % de cloro activo), más dos gotas de Tween 20, durante 10 minutos. Las tasas de contaminación de los explantos superaron, como media, el 70 %. Para la fase de proliferación de los cultivos se utilizó medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad, suplementado con 30 g l⁻¹ de sacarosa, 6 g l⁻¹ de agar y BAP (2,5 µM). Se establecieron cultivos con capacidad de proliferación en 9 de los 11 olmos singulares de la Comunidad de Madrid. Todos los explantos tomados de la Olma de Aranjuez (**U. minor**) dieron cultivos contaminados y los explantos tomados del Olmo del Escorial (**U. laevis**) no generaron nuevos brotes, se desorganizaron y dieron proliferaciones de callo. En el resto de los genotipos los explantos formaron tallos adventicios a partir de meristemoides generados en su parte basal. En la actualidad se llevan a cabo ensayos para evaluar la capacidad de multiplicación de cada genotipo y determinar las tasas de enraizamiento utilizando dos auxinas (ANA e AIB), dos formas de aplicación (pulso vs aplicación continua) y varias concentraciones.

Referencias

- Conde P, Sousa A, Costa A, Santos C (2008) Plant Cell Tiss Organ Cult 92: 113-119
 Diez J, Gil L (2004) Invest Agrar: Sist Recur For 13 (1): 249-254
 Malá J, Gaudinová A, Dobrev P, Eder J, Cvikrová M (2005) Biologia Plantarum 50: 8-14, 2005
 Thakur RC, Karnosky DF (2007) Plant Cell Rep 26: 1171 - 1177
 FINANCIACIÓN: Proyecto FPO9-IA05-CLON



INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ESTABLECIMIENTO EN MEDIO LÍQUIDO DE LÍNEAS EMBRIOGÉNICAS OBTENIDAS DE ÓVULOS EN DESARROLLO DE ENCINA

Azahara Barra¹, Miquel Blasco², Mar Ruiz¹, Cristina Celestino¹, Jesús Alegre¹, Isabel Arrillaga² y Mariano Toribio¹

¹ IMIDRA - Finca "El Encín". Apdo.127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)
azahara.barra@madrid.org

² Dpto. Biología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
46100 Burjassot, Valencia

Para poder implementar la silvicultura multivarietal, entendida como el uso de variedades evaluadas en plantaciones, equilibrando ganancia genética y variabilidad, se debe disponer de un medio de propagación vegetativa con gran capacidad de producción y a bajo coste. La regeneración clonal por embriogénesis somática cumple estos requisitos, pero para ello se han de definir protocolos de multiplicación en medio líquido. La inducción de embriogénesis habitualmente se realiza en embriones cigóticos inmaduros, crioconservándose las líneas embriogénicas mientras se evalúan las variedades. Sin embargo la inducción en tejidos de árboles selectos permite capturar todo su potencial genético, obteniendo mayor ganancia genética.

La encina (*Quercus ilex* L.) es un árbol típicamente mediterráneo, con interés económico por la producción de bellota y la micorrización con hongos comestibles. El presente trabajo tiene como objetivo obtener líneas embriogénicas a partir de árboles adultos de la especie, y determinar las condiciones para iniciar el cultivo en medio líquido de las líneas embriogénicas obtenidas. Para ello se recolectaron bellotas en desarrollo en dos localidades, El Encín (Alcalá de Henares, Madrid) y Quintos de Mora (Toledo), éstas últimas de árboles seleccionados por la producción de bellota. Se extrajeron los óvulos y se evaluaron los efectos de la presencia o ausencia de reguladores del crecimiento (con cinco genotipos de El Encín), y de la formulación de macronutrientes (con seis genotipos de Quintos de Mora) sobre la frecuencia de aparición de respuesta embriogénica. En el estudio para el establecimiento en medio líquido, se utilizaron tres líneas embriogénicas obtenidas el año anterior a partir de dos árboles de El Encín. Para ello se siguió una metodología basada en la adición progresiva de medio de cultivo fresco (Deo *et al.*, 2010). Se evaluó el efecto del tamaño del material de partida, fracción entre 40 y 800 μm (procedimiento 1) frente a masas nodulares de 2-4mm (procedimiento 2), sobre la producción en peso fresco de diferentes estructuras, así como sobre aspectos cualitativos del cultivo.

Se obtuvo respuesta embriogénica en seis de los once genotipos ensayados, tres de El Encín y tres de Quintos de Mora, aunque las frecuencias de inducción fueron muy bajas. La frecuencia media general de inducción en medio sin reguladores de crecimiento fue del 2,3%, frente al 0,8% que se obtuvo en medio con reguladores del crecimiento. En medio con reguladores, al utilizar los macronutrientes de Schenk y Hildebrandt se obtuvo un 1% de respuesta, frente al 0,5% que se obtuvo al utilizar los macronutrientes de Gamborg.

El establecimiento del cultivo en medio líquido se logró con las tres líneas ensayadas, aunque el crecimiento de una de ellas fue diferente y más lento. En el procedimiento 1 se obtuvo un cultivo con el medio limpio, estructuras sin necrosis y aspecto más homogéneo. El procedimiento 2 dio sin embargo un medio turbio, y estructuras muy crecidas y necrosadas. Considerando las dos líneas de mayor crecimiento, a las cuatro semanas de cultivo, el peso fresco total del material obtenido con el procedimiento 1 se multiplicó por 88, frente al del procedimiento 2 que se multiplicó por 64. La mayor parte de este peso correspondió a estructuras mayores de 800 μm , que presentaron diferentes grados de diferenciación. Se formaron embriones en estado cotiledonar en ambos procedimientos, más desarrollados en el procedimiento 2. Las estructuras no diferenciadas y la fracción 40-800 μm (56 mg de media por envase en el procedimiento 1, y de 29 mg en el procedimiento 2) se utilizaron para mantener el cultivo en medio líquido.

Referencias

Deo PC, Taylor M, Harding RM, Tyagi AP, Becker DK (2010). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 283–291.

FINANCIACIÓN: Plan Nacional, AGL 2007- 66345-CO2-01 y 02, y AGL2010-22292-CO3-01 y 02



MICROPROPAGACIÓN DE ASPARAGUS PROSTRATUS MEDIANTE LA INDUCCIÓN DE YEMAS ADVENTICIAS SOBRE YEMAS AXILARES CULTIVADAS IN VITRO

María Luisa González-Castañón

Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA)
Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza. E. mail: mlgonzalezc@aragon.es

Asparagus prostratus es un espárrago silvestre endémico de la costa atlántica en el oeste de Europa. Esta es una especie vulnerable y está recogida como tal en el libro rojo de las especies tanto en Reino Unido como en España (Wilkinson, 1999; Moreno, 2008). Con objeto de aumentar el número de hembras en las escasas poblaciones existentes, se inició un estudio para la multiplicación in vitro de los ejemplares más fructíferos.

Se desarrolló un eficiente protocolo utilizando la proliferación de yemas secundarias adventicias in vitro, sembrando segmentos de tallo con una yema. El medio de cultivo utilizado fue MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con varias concentraciones de reguladores de crecimiento. Los mejores resultados, medidos en los múltiples tallos crecidos directamente en cada una de las yemas sembradas, se obtuvieron en el medio MS sólido suplementado con benzylaminopurina (6.6 μM), 6-naphthaleneacetic ácido (0.053 μM), y sacarosa (6%). Los nuevos tallos adventicios se desarrollaron entre las seis y las ocho semanas, obteniéndose una media de 2.8 tallos por yema sembrada y 9.8 nudos de media por tallo. Estos nudos pueden ser utilizados como nuevos explantes potenciales.

Las pequeñas garras obtenidas se transfirieron, para su enraizamiento, a un medio MS conteniendo 2.5 μM de ácido indol-3-butírico. Este medio mostró mayor número de raíces (3.9) y mayor porcentaje de enraizamiento (54%) frente a un medio MS con ausencia del mismo.

Las plántulas obtenidas se endurecieron transfiriéndolas a una cámara de cultivo con humedad elevada. Una vez que emitieron un nuevo tallo, se pasaron a macetas para su aclimatación en invernadero. La tasa de supervivencia fue 70 %.

Estudios de citometría de flujo para control de ADN (González-Castañón y Schröder, 2002) mostraron que el nivel de ploidía se mantuvo, el conteo cromosómico fue $2n = 40$.

Referencias

- González Castañón, M.L. and Schröder, M. 2002. Rapid determination of nuclear DNA amount and ploidy levels in Germplasm of *Asparagus* using flow cytometry. *Acta Hort.* 589: 193-200
- Moreno, J.C., coord. (2008). Lista Roja 2008 de la flora vascular española. Dirección General de Medio Natural y Política Forestal (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, y Sociedad Española de Biología de la Conservación de Plantas), Madrid, 86 pp.
- Murashige, T, Skoog R (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15:473-493
- Wilkinson, L.K. 1999. *Asparagus prostratus* Dumort. In: Wigginton, M.J., ed. British red data books. I. Vascular plants, 3rd edition. Peterborough: JNCC, 50-51

Trabajo desarrollado dentro del Proyecto subvencionado por el INIA RF 2008-00025

INFLUENCIA DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO Y LA TEMPERATURA DURANTE EL PROCESO EMBRIOGÉNICO EN PINUS PINASTER

Alicia Navarro-Marín, Miquel Blasco, Carmen Brisa, Juan Segura e Isabel Arrillaga

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia
46100 Burjassot, Valencia, e-mail: anama2@alumni.uv.es

La embriogénesis somática en **Pinus pinaster** Aiton (pino marítimo, resinero o negral) es la vía de elección para la micropropagación y la transformación genética. Entre los factores que regulan este proceso destacan el genotipo, el estado de desarrollo del explanto inicial y los reguladores de crecimiento. Recientemente, se han descrito efectos epigenéticos de la temperatura a la que crece el parental materno durante la fase de embriogénesis zigótica y somática sobre el comportamiento de las plantas regeneradas [1, 2]. En pino marítimo, la inducción de embriogénesis somática se produce como respuesta a tratamientos con 2,4-D y BA aunque, recientemente, también se ha demostrado la eficacia de la citoquinina CPPU [3, 4, 5]. Los brasinoesteroides, también se han utilizado con éxito para inducir embriogénesis en algunas coníferas [6]. En este trabajo se estudia el efecto del 24-epibrasinólido [24-epBR] sobre la inducción y proliferación de líneas embriogénicas. Así mismo se determina la influencia de las condiciones de temperatura durante el proceso embriogénico para detectar, en un futuro, posibles efectos epigenéticos sobre las plantas obtenidas.

Se utilizaron conos recogidos en la primera quincena del mes de julio de un banco clonal de semillas que la Dirección General de Biodiversidad (DGB) gestiona en la Granja de San Ildefonso (Segovia, Familias F5, F12 y F23). Los megagametofitos, con el embrión zigótico en estado precotiledonar, se cultivaron en oscuridad en medio mL_V [4] suplementado con 2,4-D/BA, CPPU, BR o CPPU/BR. Transcurridos 45 días, se determinó el porcentaje de inducción (extrusión) embriogénica. Las líneas embriogénicas establecidas se contabilizaron tras cuatro meses de subcultivos periódicos en el mismo medio. De las tres familias ensayadas, F5 mostró mayor capacidad embriogénica [15% de líneas establecidas]. Los resultados obtenidos también demostraron que el 24-epBR puede ser utilizado para el establecimiento de líneas embriogénicas de pino marítimo [media de 10% líneas establecidas frente a 16% obtenidas en medio suplementado con 2,4-D/BA p>0.05]. En la actualidad se estudia su posible influencia sobre la posterior maduración de los embriones somáticos.

Cuatro de las líneas embriogénicas establecidas están siendo utilizadas para estudiar el efecto de diferentes temperaturas [15, 22 y 28°C] en las fases de proliferación recurrente y diferenciación-maduración. Para identificar la fase crítica a la que la temperatura pueda promover un efecto epigenético en las plántulas obtenidas, se ha realizado un diseño factorial [genotipos x temperaturas x fase embriogénica]. Los resultados de la proliferación de callo embriogénico a diferentes temperaturas (medido como incremento de peso tras 30 días de cultivo) muestran que el crecimiento depende tanto del genotipo como de la temperatura, ya que ambos son factores significativos en una regresión múltiple. La temperatura óptima para la proliferación recurrente fue 22°C en tres de las 4 líneas ensayadas [valores entre 120.0-430.0 mg]; el cultivo a 15°C disminuyó significativamente la proliferación [0.0-150.0 mg] y el crecimiento observado a 28°C varió entre 140-270 mg.

[1] Johnsen Ø, Fossdal G, Nagy N, Mølmann J, Daehlen O, Skråppa T. 2005. *Plant Cell Environ* 28:1090-1102.

[2] Kvalen H, Johnsen Ø. (2008) *New Phytol* 177:49-59.

[3] Miguel C, Gonçalves S, Tereso S, Marum L, Maroco J, Oliveira M. 2004. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 76:121-130.

[4] Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K. 2008. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:31-45.

[5] Humanes A. 2009. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.

[6] Pullman GS, Zhang Y, Phan BH. 2003. *Plant Cell Rep* 22:96-104.

Proyecto cofinanciado por el Ministerio de Educación y Ciencia [AGL2007-66345-C02-02; AGL2010-22292-C03-03]; Generalitat Valenciana [Prometeo 2009/075] y por una beca [FPI] del MICINN a M.B.



EVALUACIÓN DE LA APLICABILIDAD DE UN MÉTODO DE CRIOCONSERVACIÓN A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE AGUACATE

Eva Guzmán García¹ y Carolina Sánchez Romero²

¹IFAPA, Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Málaga.

E-mail:eva.guzman.ext@juntadeandalucia.es

²Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n.

E-mail: c.sanchez@uma.es

La embriogénesis somática y la crioconservación se han convertido en componentes importantes en las estrategias de mejora genética de numerosas especies leñosas (Cyr, 1999). Los protocolos de embriogénesis somática unidos a la tecnología de la crioconservación hacen posible no solo la aplicación de herramientas biotecnológicas, sino también la preservación de líneas embriogénicas seleccionadas sin cambios genéticos o pérdida de la capacidad morfogénica mientras los tests en campo están siendo llevados a cabo. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el efecto de un método de crioconservación en la capacidad de regeneración de cultivos embriogénicos de aguacate y comprobar su aplicabilidad a un número elevado de líneas embriogénicas.

Se utilizaron líneas embriogénicas de aguacate (**Persea americana**, Mill.) obtenidas a partir de embriones zigóticos inmaduros. Los cultivos embriogénicos fueron crioconservados utilizando el método de vitrificación en gota desarrollado por Panis **et al.** (2005). La evaluación del efecto de la crioconservación sobre las distintas fases del proceso de embriogénesis somática se llevó a cabo con la línea D2.3, del cultivar 'Duke 7'. Cultivos de esta línea fueron crioconservados y 5 meses después, se comparó su comportamiento con cultivos control no congelados en las fases de proliferación, desarrollo de embriones somáticos y germinación. La aplicabilidad del método de crioconservación fue testada en 12 líneas embriogénicas pertenecientes a 2 variedades distintas y entre las que se incluían líneas SE y PEM, con características diferenciales de crecimiento (Witjaksono y Litz 1999).

A pesar de la similitud morfológica entre cultivos crioconservados y controles, la proliferación de cultivos embriogénicos se vio afectada de forma negativa por la crioconservación, obteniéndose valores de incremento de peso significativamente más bajos en los cultivos que habían sido congelados. En ambos casos se desarrollaron embriones somáticos blanco-opacos, pero los embriones de más de 4 mm fueron menos abundantes en los cultivos crioconservados. Sin embargo, la germinación se vio ligeramente favorecida en aquellos embriones que procedían de cultivos crioconservados, con un 13% de germinación frente a un 5% en embriones procedentes de cultivos control. El método de crioconservación utilizado permitió la recuperación embriogénica en todas las líneas testadas, con valores que oscilaban entre el 80 y el 100%. Aunque con diferencias entre líneas, en todos los casos los cultivos mostraron tasas de crecimiento aceptables después de la congelación.

Referencias

Cyr DR (1999) En: Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Vol. 4. Jain SM, Gupta PK, Newton RJ (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 239-261

Panis B, Piette B, Swenen R (2005) Plant Science 168: 45-55

Witjaksono, Litz RE (1999) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 58: 19-29

EFECTO DE UN PRECULTIVO CON SACAROSA EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE CULTIVOS EMBRIOGÉNICOS DE AGUACATE

Eva Guzmán García¹ y Carolina Sánchez Romero²

¹IFAPA, Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Málaga

E-mail:eva.guzman.ext@juntadeandalucia.es.

²Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n.

E-mail: c.sanchez@uma.es

Las técnicas de vitrificación empleadas en numerosos protocolos de crioconservación implican una deshidratación de los explantos previa a la congelación en nitrógeno líquido. La deshidratación puede conseguirse, entre otras formas, mediante la incubación del material vegetal con soluciones crioprotectoras, como la PVS2 (Sakai *et al.* 1990). Hoy se acepta de modo general que el paso crítico para conseguir supervivencia después de la crioconservación es la desecación y no la congelación. La clave para una crioconservación con éxito reside, por tanto, en la inducción de tolerancia a la deshidratación (Ramon *et al.* 2002). En la práctica, esta tolerancia es inducida por diferentes tratamientos tales como el cultivo en altas concentraciones de azúcares o agentes osmóticos, la aclimatación al frío o el tratamiento con ABA.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un precultivo con sacarosa durante diferentes periodos de tiempo sobre la crioconservación de cultivos embriogénicos de aguacate.

Se utilizó una línea embriogénica iniciada a partir de embriones zigóticos inmaduros de aguacate (*Persea americana*, Mill.). Para el precultivo con sacarosa, cultivos embriogénicos fueron cultivados en medio sólido de mantenimiento (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988) suplementado con 0.3 M de sacarosa durante 3, 7, 14 y 21 días. La crioconservación se llevó a cabo siguiendo el protocolo de vitrificación en gota de Panis *et al.* (2005). Para evaluar, además de la respuesta a la crioconservación, el efecto del precultivo sobre la tolerancia de los explantos al tratamiento con soluciones crioprotectoras, se incluyeron dos controles: uno en el que las muestras no fueron tratadas con soluciones crioprotectoras ni congeladas y otro en el que las muestras fueron tratadas pero no congeladas. Se realizaron 5 muestras por tratamiento y el experimento se repitió dos veces. En cada ocasión, se tomaron datos de supervivencia, recuperación de la capacidad embriogénica y tasa de crecimiento durante dos recultivos de 5 semanas cada uno.

El precultivo con sacarosa no tuvo un efecto significativo sobre la supervivencia o recuperación embriogénica de los cultivos. Sin embargo, provocó un aumento de la tasa de proliferación después de la congelación, con valores significativamente más altos en aquellas muestras que habían sido precultivadas durante 7, 14 ó 21 días. Además, en aquellos explantos precultivados durante 7 y 14 días, se observó un adelanto de la respuesta inicial después de la congelación. En ambos casos, se pudo observar nueva proliferación a los 16 días frente a los 22 días necesarios en los cultivos no pretratados.

Referencias

- Panis B, Piette B, Swenen R (2005) *Plant Science* 168: 45-55
- Pliego-Alfaro F, Murashige T (1988) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 12: 61-66
- Ramon M, Geuns JMC, Swennen R, Panis B (2002) *CryoLetters* 23: 345-352
- Sakai A Kobayashi S, Oiyama I (1990) *Plant Cell Reports* 9: 30-33



ELIMINACIÓN DE UNA CONTAMINACIÓN BACTERIANA ENDÓGENA EN EL CULTIVO IN VITRO DE BROTES DE LA VARIEDAD DE MANZANO 'DOUCE DE DJERBA'

Juan A. Marín, Manel Boudabous*, Pilar Lorente, Elena García, Pilar Andreu, Arancha Arbeloa

E. E. de Aula Dei (CSIC). Av. Montañana 1005. 50059 Zaragoza. E-mail:jmarin@eead.csic.es

* Institut des Régions Arides (IRA), Medenine, Route El Jorf 41 19, Tunisie

Las bacterias endógenas son frecuentes en cultivos *in vitro* iniciados a partir de explantos tomados de árboles adultos crecidos en campo, y afectan tanto al crecimiento de brotes como a la organogénesis de brotes y raíces adventicias. Dado que los efectos de las bacterias endógenas no están controlados, es imprescindible contar con métodos que favorezcan su eliminación, o al menos su control, y este es el objetivo de este trabajo.

Se utilizaron brotes de manzano del cultivar 'Douce de Djerba', originario de la isla de Djerba (Túnez), cultivados *in vitro*, según se ha descrito anteriormente (Boudabous et al, 2010) y que mostraban crecimiento de bacterias en la base de los brotes. Se realizaron dos tipos de tratamientos de desinfección: 1) mediante la inmersión de los brotes de manzano en soluciones de hipoclorito sódico (0.1 % y 1.0 % de cloro activo) durante 1 hora y su paso posterior al medio de cultivo (De Fossard, 2007) y 2) mediante el cultivo en medio con el antibiótico cefotaxima (Cefotaxime sodium, Duchefa, Haarlem, Holanda) a 150 mg l⁻¹ (Licea-Moreno et al., 2007), añadido estéril al medio de cultivo autoclavado.

Tras 3 semanas de cultivo en medio MS modificado (Andreu y Marín, 2005), los brotes tratados con las soluciones de hipoclorito sódico mostraban daños variables e incluso muerte de brotes, por lo que no se continuaron los tratamientos. Sin embargo, los brotes cultivados con cefotaxima mostraron un mayor crecimiento y la ausencia de síntomas de toxicidad. El tratamiento se repitió ocho veces más, cultivando los ápices (< 10 mm) en el mismo medio con cefotaxima cada 3 semanas. Tras el tercer subcultivo, no se encontraron signos visuales de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo, y parte de los brotes fueron subcultivados en medio sin cefotaxima para controlar la posible desaparición del crecimiento bacteriano, repitiendo este procedimiento en los sucesivos subcultivos, de forma que se pudiera establecer el tiempo necesario de cultivo en presencia de antibiótico para la eliminación del crecimiento bacteriano. Al finalizar los 9 subcultivos en medio con cefotaxima, se realizaron siembras de las diferentes líneas de cultivo en placas con medio PYGA modificado para la detección de bacterias (Cornu y Michel, 1987). La eliminación del crecimiento bacteriano por la cefotaxima se produjo a partir del tercer subcultivo y parece ser permanente, ya que en ningún caso ha vuelto a aparecer crecimiento bacteriano, ni ha sido detectado con el medio PYGA, incluso tras 6 subcultivos en medio sin antibiótico o tras 10 semanas de cultivo en un mismo medio. El tratamiento de los brotes con cefotaxima aumentó el crecimiento de los brotes. Los brotes crecieron en longitud el doble que los brotes control (32.7 ± 2.71 mm vs. 15.95 ± 1.48 mm respectivamente) a la vez que mostraron un aspecto más sano y con hojas expandidas (Marín et al., 2010).

Referencias

- Andreu P., Marín J.A., 2005. In vitro culture establishment and multiplication of the **Prunus** rootstock 'Adesoto 101' (**P. insititia** L.) as affected by the type of propagation of the donor plant and by the culture medium composition. *Sci. Hortic.* 106:258-267.
- Boudabous M., Mars M., Marzougui N., Ferchichi A., 2010. Micropropagation of apple (**Malus domestica** L. cultivar Douce de Djerba) through in vitro culture of axillary buds. *Acta Botanica Gallica* 157:513-524.
- Cornu D., Michel M.F., 1987. Bacteria contaminants in shoot cultures of **Prunus avium** L. Choice and phytotoxicity of antibiotics. *Acta Hort.* 212:83-86
- De Fossard R.A., 2007. Plant Tissue Culture Propagation. CD-ROM edition. Magpie Digital.
- Licea-Moreno R.J., Pérez C., González A., Cabrera E., 2007. Saneamiento de un banco de germoplasma de nogal híbrido. VII Reunión Sociedad Española de Cultivo In Vitro de Tejidos Vegetales, Alcalá de Henares 25-27 de Junio de 2007. Libro de resúmenes pp. 84-85
- Marín J.A., Boudabous M., Lorente P., García E., Andreu P., Arbeloa A. 2010. Saneamiento in vitro de 'Douce de Djerba', una variedad de manzano micropropagada. *ITEA* 106:303-307
- Este trabajo ha sido financiado en parte por la ayuda recibida del Gobierno de Aragón como Grupo de Excelencia A-43. M.B. disfrutó de una ayuda del Gobierno de Túnez.

SOLANUM LYCOPERSICUM SALT SENSITIVE - 8, UN MUTANTE INSERCIONAL DE TOMATE CON UNA ELEVADA HIPERSENSIBILIDAD A ESTRÉS SALINO

Benito Pineda³, Teresa Antón¹, Begoña García-Sogo¹, Alejandro Atarés¹, Peter Schleicher¹, Juan Francisco Campos², Belén Morales², Manuel García³, Fernando Pérez³, Trinidad Angosto³, Rafael Lozano³, M^a Carmen Bolari², Moreno V¹

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. 46022 Valencia. E-mail: bpineda@btc.upv.es

² Dpto. Biología del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC. Apdo. 164, 30100 Murcia

³ Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

Las investigaciones encaminadas al aumento de la tolerancia a la salinidad en especies de interés agronómico mediante métodos clásicos de mejora o algunas aproximaciones biotecnológicas han dado escasos resultados (Flowers, 2004; Cuartero *et al.*, 2006), y ello explica las expectativas que se generaron en torno al empleo de una aproximación basada en la transformación. Aunque los trabajos de transformación genética publicados en las últimas décadas ponen de manifiesto que mediante esta vía es factible conseguir un cierto aumento de la tolerancia [revisado en Cuartero *et al.*, 2009], no se puede concluir que se hayan obtenido cultivares verdaderamente halotolerantes (i.e., con un nivel de tolerancia suficiente desde un punto de vista agronómico), probablemente, y entre otras razones, por la falta de conocimiento sobre los genes principales implicados en el carácter. Por este motivo, el descubrimiento de genes clave implicados en los procesos fisiológicos que hacen posible que las plantas puedan adaptarse a ambientes salinos puede permitirnos entender mejor la base genética y fisiológica de los mecanismos relacionados con la tolerancia a la salinidad y sentar las bases para la obtención de plantas más tolerantes.

Entre las diferentes aproximaciones para la identificación de genes implicados en la tolerancia a estrés salino, la detección de mutantes hipersensibles a este tipo de estrés es, en nuestra opinión, la más adecuada. Esta aproximación ya se ha empleado con éxito en especies modelo (Mendoza *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1998). Por lo que respecta al tomate, que nosotros sepamos, sólo se han identificado tres mutantes sensibles al estrés salino obtenidos mediante tratamientos con EMS (Borsani *et al.*, 2001; 2002). De momento, los genes alterados en estos mutantes de tomate no se han conseguido clonar, debido probablemente a las dificultades que plantea, y el tiempo que requiere, llevar a cabo el clonaje posicional del gen alterado en un mutante generado mediante tratamientos químicos.

Nuestro planteamiento en este campo de investigación es identificar los mutantes hipersensibles a la salinidad a partir de líneas de T-DNA de tomate. La principal ventaja de esta aproximación basada en la mutagénesis insercional estriba en que el gen alterado en el mutante queda etiquetado por el T-DNA, lo que facilita la posterior clonación de dicho gen. En este contexto, y con el fin de evitar los problemas que podría ocasionar el escrutinio de la colección de las líneas T-DNA en condiciones de cultivo *in vivo*, nosotros hemos optado por llevar a cabo una evaluación *in vitro*. Para ello, se ha puesto a punto un método que puede ser muy útil para identificar de forma rápida y sencilla posibles mutantes hipersensibles a la salinidad. Con este sistema de evaluación, todas las plantas quedan expuestas a la misma concentración salina y las plántulas perciben la sal en el mismo estadio de desarrollo. La evaluación de 1000 líneas de T-DNA de tomate ha permitido identificar algunos mutantes recesivos hipersensibles al estrés salino. En esta comunicación se presentan los resultados obtenidos con el mutante **Sl salt-sensitive-8**, en el que se ha observado que: i) la mutación confiere una elevada hipersensibilidad al estrés salino en homocigosis, ii) las plantas de fenotipo mutante no exhiben alteraciones en ausencia de sal; iii) hay una correlación entre la respuesta hipersensible a la salinidad *in vitro* e *in vivo*.

Referencias

- Borsani O, Cuartero J, Fernández JA, Valpuesta V, Botella MA (2001) *Plant Cell* 13: 873-887
 Borsani O, Cuartero J, Valpuesta V, Botella MA (2002) *Plant Journal* 32: 905-914
 Cuartero J, Bolariⁿ MC, Asíns MJ, Moreno V (2006) *Journal Experimental Botany* 57 (5): 1045-1058
 Cuartero J, Bolariⁿ MC, Moreno V, Pineda B (2009) en *Molecular techniques for crop improvement*, Chapter 16: 373-405
 Flowers TJ (2004) *Journal Experimental Botany* 55 (396): 307-319
 Mendoza I, Rubio F, Rodríguez Navarro A, Pardo JM (1994) *Journal of Biological Chemistry* 269: 8792-8796.
 Zhu JK, Liu J, Xiong L (1998) *Plant Cell* 10: 1181-1191



ARLEQUÍN, UN MUTANTE INSERCIONAL DE TOMATE QUE DESARROLLA FRUTOS DE MAYOR CALIDAD NUTRICIONAL

Teresa Antón¹, Benito Pineda², Estela Giménez-Caminero¹, Juan Capel², Alejandro Atarés¹, Fernando Pérez-Martín², Begoña García-Sogo¹, Rafael Lozano², Vicente Moreno¹ y Trinidad Angosto²

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. 46022 Valencia. E-mail: maanmar2@hotmail.com

² Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

Arlequín es un mutante insercional de tomate en el que se ha producido una conversión homeótica de los sépalos en órganos suculentos que maduran como un fruto (Pineda *et al.*, 2010).

Los estudios morfológicos, estructurales y metabólicos en el mutante han revelado que los sépalos de **Arlequín** tienen una capacidad intrínseca para cambiar su programa de desarrollo y convertirse en órganos análogos a un fruto. En efecto, los estudios de microscopía electrónica (SEM) indicaron que las células epidérmicas de los sépalos del mutante exhiben características propias de las células del carpelo y a nivel histológico se observó que las células de la parte interna de los sépalos engrosados son indistinguibles de las del pericarpio del fruto. Estos cambios de identidad celular se ven acompañados por profundos cambios metabólicos. La absorción de agua, la acumulación de materia seca y la actividad sacarólítica, con la subsiguiente acumulación de glucosa y fructosa, mostraron que los sépalos del mutante se convertían en órganos con capacidad de sumidero, al igual que ocurre con los frutos verdaderos. Además, los sépalos de las plantas homocigóticas para el gen **ARLEQUÍN (ALQ)** liberan etileno, tal y como sucede en un fruto climatérico, y viran a color rojo debido a la acumulación de licopeno, lo que indica que experimentan un proceso de maduración.

Los análisis moleculares han reflejado que estos cambios en el patrón del desarrollo de los sépalos se deben a una expresión ectópica del gen **ALQ**, promovida por la inserción de un T-DNA truncado en un dominio regulador de la transcripción de dicho gen (Giménez-Caminero *et al.*, 2010). El análisis funcional de **ALQ** ha indicado que el gen no sólo desempeña un papel importante en el proceso de maduración, sino que también cumple una función clave en el desarrollo temprano del fruto.

En esta comunicación se presentan los resultados que revelan que tanto los frutos normales (i.e. derivados del ovario) como los que proceden de los sépalos exhiben caracteres de calidad excepcionales tanto para consumo en fresco como, sobre todo, para procesado industrial. El fruto verdadero y el cáliz de **Arlequín** tienen mayores niveles de azúcares y licopeno y su contenido en grados Brix es prácticamente el doble que el de los frutos del cultivar original. Además, las plantas **Arlequín** poseen una ventaja adicional ya que tienen inhibida la zona de abscisión del fruto, lo que facilita la recolección mecánica.

Referencias

Giménez-Caminero E, Pineda B, Capel J, Antón T, Atarés A, Pérez-Martín F, García-Sogo B, Angosto T, Moreno V, Lozano R (2010) PLoS ONE 5(12): e14427

Pineda B, Giménez-Caminero E, García-Sogo B, Antón T, Atarés A, Capel J, Lozano R, Angosto T, Moreno V (2010) Plant and Cell Physiology 51: 435-447



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SL FRUIT SIZE -12: UN MUTANTE DE TOMATE CON MAYOR CALIBRE DE FRUTO

Geraldine Goergen¹, Benito Pineda³, Alejandro Atarés¹, Begoña García-Sogo¹, Teresa Antón¹, Sibilla Sánchez¹, Manuel García², Juan Capel², Rafael Lozano² y Vicente Moreno¹

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. 46022 Valencia. E-mail: vmoreno@ibmcp.upv.es

² Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

El conocimiento de la base genética y los mecanismos implicados en procesos relacionados con el desarrollo del fruto tiene un enorme interés, tanto en investigación básica como aplicada. **Arabidopsis** ha sido un buen modelo para el estudio de los factores genéticos, moleculares y hormonales que regulan el desarrollo en frutos dehiscentes. Sin embargo, las contribuciones recientes en el campo de la regulación hormonal del crecimiento del ovario, así como en los procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y la maduración del fruto han convertido al tomate en el mejor sistema modelo para el estudio del desarrollo de frutos de tipo carnoso (Giovannoni, 2004; Tanksley, 2004).

Entre los caracteres antes mencionados, el tamaño del fruto ha sido y sigue siendo uno de los de mayor interés agronómico ya que puede ser una de las vías para alcanzar mayores rendimientos en el cultivo. En este contexto y tras un trabajo de muchos años, el grupo del Dr. Tanksley ha conseguido clonar dos genes relacionados con el tamaño del fruto: **fw2.2**, que codifica un regulador negativo de la división celular (Frary et al., 2000) y **FASCIATED**, que codifica un factor transcripcional responsable del número de carpelos en el ovario de la flor de tomate (Cong et al., 2008). Además, se sabe que hay una interacción epistática entre las mutaciones **fasciated** y **locule number** que genera frutos acostillados y de enorme calibre, pero aún se desconoce la naturaleza molecular de este último gen, así como el de otros muchos. Pese al valor científico y el reconocimiento que merecen los trabajos mencionados, lo cierto es que queda por identificar la mayoría de los genes que determinan el tamaño del fruto, y conocer el papel funcional que estos desempeñan durante el desarrollo reproductivo del tomate.

El desarrollo de herramientas genómicas está contribuyendo a que se puedan identificar nuevos genes que controlan estos caracteres de interés agronómico. Entre tales herramientas destaca la mutagénesis insercional, que en los últimos años se ha convertido en una metodología esencial para la identificación y etiquetado de genes, así como para el análisis de su función (Krysan et al, 1999). Respecto a otras estrategias basadas en la generación de mutantes, la mutagénesis insercional tiene la gran ventaja de que facilita que el aislamiento del gen alterado en el mutante ya que dicho gen queda etiquetado por el inserto.

En colaboración con los grupos de los Dres. R. Lozano y T. Angosto (UAL) y de la Dra. MC. Bolarín (CEBAS, CSIC) nuestro grupo está utilizando la mutagénesis insercional por T-DNA como herramienta para la identificación de genes clave implicados en el desarrollo del fruto de tomate. En el contexto de esta colaboración se han identificado algunos mutantes que exhiben alteraciones en procesos relacionados con el desarrollo y maduración del fruto de tomate. En esta comunicación presentamos un nuevo mutante de tomate cuya peculiaridad más sobresaliente respecto a las plantas del cultivar original (Moneymaker) es el desarrollo de frutos de mayor calibre. Los resultados de este trabajo pueden ser de gran utilidad para aumentar nuestros conocimientos en torno a la base genética y los mecanismos fisiológicos y moleculares que controlan el tamaño del fruto, propiciando con ello nuevas aproximaciones para la mejora de este cultivo.

Referencias

Cong B, Barrero LS, Tanksley SD (2008) *Nature Genetics* 40: 800-804

Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K, Tanksley SD (2000) *Science* 289: 85-87

Giovannoni J (2004) *Plant Cell* 16: S170-S180

Tanksley SD (2004) *Plant Cell* 16: S181-S189



ESTUDIO DE RESISTENCIA INDUCIDA POR PRODUCTOS A BASE DE ALGAS (GAMA ALGACAN) EN LÍNEAS CELULARES VEGETALES Y ENSAYOS EN CULTIVOS DE TOMATE

M. Polifrone¹, F. Amil Ruiz², R. Blanco Portales², J. Muñoz Blanco², J.L. Caballero²

1 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Severo Ochoa (C6; Planta-Baja, Ala Norte). Campus Universitario de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071 Córdoba

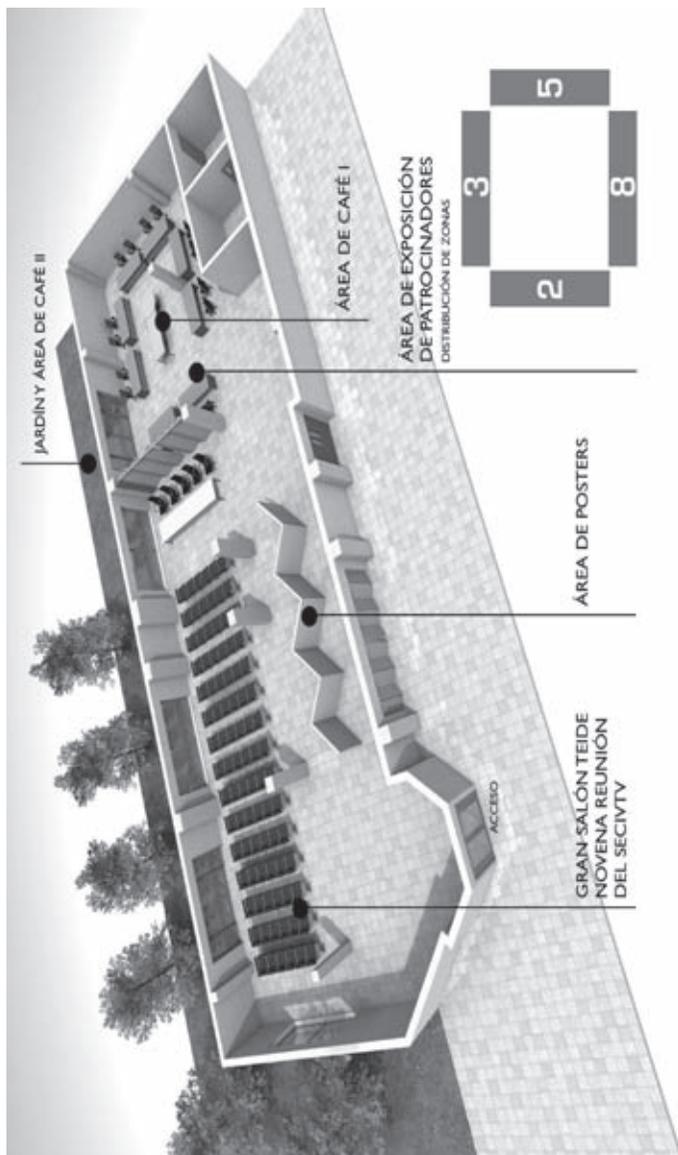
2 Departamento de I+D+i, Seaweed Canarias S.L., C/Herraje 63, Polígono Industrial de Arinaga, 35118 Agüimes Las Palmas

La resistencia de las plantas a las condiciones adversas, bióticas o abióticas, es debida en gran medida a su capacidad de respuesta de defensa en un proceso fisiológico directamente relacionado con genes cuya expresión se induce de manera significativa por moléculas inductoras. En este sentido los estudios realizados, utilizando genes biomarcadores de respuestas de defensa en plantas y cultivos celulares derivados de fresa (**Fragaria x ananassa**), permiten definir las vías de defensa de la planta que se activan por el tratamiento con compuestos elicitors de las mismas. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad inductora de vías de defensa en plantas de algunos productos comerciales, formulados a partir de extractos de algas (Algacan Base, Algacan Plus y Algacan Premium), totalmente naturales, biodegradables y que no dejan ningún residuo, como agentes inductores de la expresión de los genes **FaCAD1**, **FaWKRY** y **FaβGlu**. El estudio en líneas vegetales ha evidenciado una significativa inducción de los genes biomarcadores relacionados con la respuesta de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos fúngicos. Los datos obtenidos sobre la inducción de estos biomarcadores han sido contrastados, sobre tomate (**Lycopersicum esculentum**) en la interacción con **Phytophthora infestans**, mediante ensayos de campo, evidenciando el efecto de estos productos en la prevención y tratamiento de cultivos frente al ataque con patógenos. Los productos testados en campo reducen drásticamente tanto la intensidad como la difusión de la enfermedad y aumentan al mismo tiempo la productividad de los cultivos.

Este estudio ha sido co-financiado con el proyecto PTR1995-0956-OP-04-02 en la parte relativa a los ensayos *in vitro*



STANDS



- | | | |
|----------|---|--|
| STAND N° | 2 | MILLIPORE SAS |
| STAND N° | 3 | LABORATORIOS ANTONIO MATACHANA S.A. |
| STAND N° | 5 | FERNANDEZ RAPADO P.G.S.A. |
| STAND N° | 8 | CANARIAS EXPLOSIVOS |







CESA
CANARIAS
EXPLOSIVOS,
S.A.

Distribuidor
922 59 69 03
canexplo@logiccontrol.es

SOP de Tessenderlo

Cuando la calidad realmente cuenta

Tessenderlo Group es líder en la producción del sulfato potásico (SOP) durante más de 80 años.

Como primer productor en el mundo de SOP, Tessenderlo Group ofrece al agricultor sulfato potásico de calidad en una extensa gama, sulfato potásico standard, soluble y granulado, siempre en función de las necesidades del agricultor.

Además de SOP, el grupo pone a disposición del agricultor una serie de fertilizantes líquidos con azufre como son el tiosulfato amónico, tiosulfato potásico y tiosulfato cálcico, fertilizantes especiales para la agricultura.

Tessenderlo Group Fertilizers
giving nature a helping hand



ÍNDICE DE AUTORES

AUTORES PÁGINAS

Abarca, D.	26
Acanda, Y.	44 - 81
Aguiar, M. E.	63
Alburquerque, N.	76
Alegre, J.	96 - 97
Aleza, P.	80
Alfayete, M. C.	55
Amador, L.J.	24 - 38 - 39 - 40
Amil Ruiz, F.	106
Andreu, P.	60 - 95 - 102
Angosto, T.	103 - 104
Antón, T.	103 - 104 - 105
Arbeloa, A.	60 - 95 - 102
Armijos, R.	90
Arrillaga, I.	62 - 85 - 97 - 99
Atarés, A.	63 - 103 - 104 - 105
Ballester, A.	36 - 47 - 69
Barceló, A.	32 - 59 - 93
Barra, A.	62 - 97
Barro, F.	77 - 78
Blanco Portales, R.	106
Blasco, M.	62 - 97 - 99
Bolacel, E.	90 - 91
Bolarín, M.C.	103
Boudabous, M.	102
Bradaï, F.	67
Brisa, C.	62 - 99
Bueno, M.A.	66 - 86 - 87
Burgos, L.	75 - 76
Caballero, L.	77
Caballero, L.	106
Camafeita, E.	86
Campos, J.F.	103
Cantos, M.	52
Capel, J.	104 - 105
Carballeda, J.	71
Carmona-Martín, E.	57

AUTORES PÁGINAS

Carneros, E.	26
Carrasco, A.	37
Carvalho Benítez, L.	91
Castello, M.C.	50
Castillo, A.M.	58
Celestino, C.	96 - 97
Cerezo, S.	61
Codesido, V.	89
Coig-O'Donnell, M.	42
Corral-Martínez, P.	43 - 82
Corral-Mosquera, P.	54
Correal, E.	50 - 88
Corredoira, E.	47 - 48 - 69
Covelo, P.	46
Croser, J.	50
Cruz Bacallado, M.T.	42 - 51 - 56
Cuenca, B.	36
Cuenca, J.	80
da Maia, L.C.	91
Dabauza, M.	50 - 88
de la Torre, F.	73 - 92
del Amo, A.	26
del Río, J.A.	49 - 88
Díaz, C.E.	38 - 39 - 40
Díaz, L.	49
Díaz, M.A.	94
Díaz-Sala, C.	26 - 89
Dirks, R.	28
Durban, M.	42 - 51 - 56
Elleuch, W.	60
Encina, C.L.	57
Fagoaga, C.	72
Faisal, M.	65
Faize, L.	76
Farrán, I.	71
Fernández, M.L.	92
Fernández, V.	92



AUTORES PÁGINAS

Fernández-San Millán, A.	71
Ferro, E.	89
Fraga, B.M.	38 - 39 - 40
Friero, E.	83
García, E.	95 - 102
García, J.L.	52
García, M.	103 - 105
García-Almodovar, R.C.	75
García-Jiménez, P.	23
García-Sogo, B.	103 - 104 , 105
Gil, L.	96
Gil-Humanes, J.	78
Giménez-Camínero, E.	104
Giraldo, M.C.	52
Goergen, G.	105
Gómez, A.	86 - 87
González, J.M.	83
González, M.L.	54
González-Benito, M.E.	84
González-Castañón, M.L.	98
González-Coloma, A.	38 - 40
González-Padrón, M.Y.	53
Guzmán García, E.	100 - 101
Hammami, R.	83
Hernández, I.	26
Hernández, M.	80
Herrera, M.T.	92
Imbroda, I.	93
Janeiro, L. V.	48
Jorrín, J.	87
Jouve, N.	83
Juárez, J.	80
Larrañaga, N.	90
Larraya, L.	71
Liñán, J.	52
Litz, R.	21
López, J.A.	86

AUTORES PÁGINAS

López-Solanilla, E.	90
Lorente, P.	95 - 102
Lozano, R.	103 - 104 - 105
Luis, J.C.	53
Mallón, R.	45 - 46 - 54 - 70
Manzanera, J. A.	65
Marín, J. A.	60 - 95 - 102
Martín, C.	84
Martínez, T.	45 - 47
Medel, D.	96
Mendoza-Poudereux, I.	85
Menéndez Gutiérrez, M.	36
Mercado, J. A.	61 - 74
Messeguer, J.	34
Morales, B.	103
Moreno, V.	63 - 103 - 104 - 105
Moreno-Vázquez, S.	90 - 91
Muñoz Blanco, J.	106
Muñoz-Amatriáin	58
Muñoz-Bertomeu, J.	85
Navarro, Al.	85 - 99
Navarro, Ant.	80
Navarro, L.	80
Navarro, R.	87
Ortega, C.	80
Ortega, V.	80
Ortuño, A.M.	49 - 88
Ozuna, C.	77
Pacheco Arge, L.W.	91
Padilla, I.M.G.	57 - 59 - 75 - 93
Palomo-Ríos, E.	74
Parra, M.M.	52
Pazos-Navarro, M.	50 - 88
Peña, L.	72
Pérez Francés, J.F.	55
Pérez Hernández, J. B.	51 - 56 - 94
Pérez Navarro, E.	23



AUTORES	PÁGINAS
Pérez, F.	103 - 104
Pérez, I.	49
Pérez-Ruiz, C.	90 - 91
Petri, C.	75 - 76
Pina, J.A.	80
Pineda, B.	30 - 103 - 104 - 105
Pintos, B.	86 , 87
Pistón, F.	78
Pizarro, A.	26
Pliego-Alfaro, F.	61 - 67 - 74
Polifrone, M.	106
Prado, M. J.	44 - 81
Prem, D.	66
Ramón, D.	34
Real, D.	50
Redondo, A.	72
Reina, M.	38 - 40
Rey, M.	44 - 81
Riga, P.	37
Risueño, M.C.	64 - 65 - 66
Robaina, RR.	23
Rodríguez Pérez, J.A.	55
Rodríguez Sanz, H.	64 - 65
Rodríguez-Oubiña, J.	54
Ruiz de Galarreta, J. I.	37
Ruiz, M.	96 - 97
San José, M.C.	48
Sánchez, C.	89
Sánchez, F.	49
Sánchez, M.C.	48
Sánchez, N.	86 - 87
Sánchez, S.	105
Sánchez-Díaz R.A.	58
Sánchez-Romero, C.	67 - 100 - 101
Sanjurjo, L.	73 - 92
Sanz-Barrio, R.	71
Saporta, R.	73 - 92

AUTORES	PÁGINAS
Schleicher, P.	103
Seguí-Simarro, J.M.	43 - 82
Segura, A.	73 - 92
Segura, J.	62 - 85 - 99
Solana, S.P.	26
Soler, C.	83
Sollid, L.M.	78
Sosa, M.B.	42 - 51 - 56
Suárez Toste, E.	55
Tejedor, B.	63
Testillano, P. S.	64 - 65 - 66
Tollefsen, S.	78
Toribio, M.	62 - 96 - 97
Troncoso, A.	52
Uberhuaga, E.	90
Valdés, F.	53
Valladares, S.	89
Vallés, M.P.	58
Veramendi, J.	71
Vidal, J.R.	73 - 92
Vidal, N.	36 - 70
Vidoy-Mercado, I.	59
Vieitez, A.M.	45 - 46 - 47 - 69 70
Walker, D.	88
Westendorp, N.	57
Zarranz-Elso, M.	23





PARTICIPANTES

Apellidos, Nombres	e-mail	Universidad/Institución/Empresa
Acanda Artiga, Yosvanis	yosvani.acanda@gmail.com	Univ. de Vigo
Acevedo Quintana, María Teresa	acevedo@provedo.com	Viveros Provedo S.A.
Alburquerque Ferrando, Nuria	nalbur@cebas.csic.es	CEBAS-CSIC
Aleza Gil, Pablo	aleza@ivia.es	Inst. Valenciano de Investigaciones Agrarias
Amador Díaz, Leonardo Jesús	leonardoad@cultesa.com	CULTESA
Andreu Pujal, Pilar	andreu@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
Antón Martínez, María Teresa	maanmar2@hotmail.com	CEBAS-CSIC
Arbeloa Matute, Arancha	arbeloa@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
Arrillaga Mateos, Isabel	isabel.arrillaga@uv.es	Univ. de Valencia
Atarés Huerta, Alejandro	aatares@ibmcp.upv.es	Univ. Politécnica de Valencia
Ballester Álvarez-Pardiñas, Antonio	aballester@iiag.csic.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Barceló Muñoz, Araceli	araceli.barcelo@juntadeandalucia.es	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
Barra Jiménez, Azahara	azahara.barra@madrid.org	Inst. Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)
Blasco I Carlos, Miquel	miquel.blasco@uv.es	Univ. de Valencia
Bordas Baliú, Mireia	mbordas@agromillora.com	Agromillora
Bueno Pérez, M ^a Ángeles	bueno@inia.es	Inst. Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
Burgos Ortiz, Lorenzo	burgos@cebas.csic.es	CEBAS-CSIC
Caballero Ruano, Manuel	mcruano@icia.es	Inst. Canario de Investigaciones Agrarias
Cantos Barragán, Manuel	cantos@irnase.csic.es	Inst. de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC
Carvalho Benítez, Leticia	lecbenitez@gmail.com	E.T.S.I.A. UPM - Univ. Federal de Pelotas-Capes
Castillo Alonso, Ana María	amcast@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
Cerezo Medina, Sergio	scerezo@uma.es	Univ. de Málaga
Codesido Sampedro, Verónica	verocodesido@yahoo.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Coig O'Donnell Cavallé, Mónica	cultesa@cultesa.com	CULTESA
Corral Martínez, Patricia	patcorma@upvnet.upv.es	COMAV - Univ. Politécnica de Valencia
Corral Mosquera, Patricia	patricia.corral@usc.es	Univ. Santiago de Compostela
Corredoira Castro, María Elena	elenac@iiag.csic.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Cruz Bacallado, M ^a Teresa	direccion@cultesa.com	CULTESA
Dabauza Micó, Mercedes	mercedes.dabauza@carm.es	Inst. Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)



Apellidos, Nombres	e-mail	Universidad/Institución/Empresa
de la Torre Noya, Francisco Luis	fran.delatorre@usc.es	Univ. Santiago de Compostela
Díaz-Sala Galeano, Carmen	carmen.diazsala@uah.es	Univ. Alcalá de Henares
Dirks, Rob	r.dirks@rijkwzwaan.nl	Rijk Zwaan Breeding B.V.
Durban García, María	cultesa@cultesa.com	CULTESA
Ellul, Philippe	pellul@ninsar.com	Ninsar Agrosciences, S.L.
Fagoaga García, Carmen	cfagoaga@ivia.es	Inst. Valenciano de Investigaciones Agrarias
Faisal, Mohamad	faisal@cib.csic.es	Centro Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid, CSIC
Farran Blanch, Inmaculada	farran@unavarra.es	Instituto de Agrobiotecnología (UPNA-CSIC)
García Fernández, José Luis	jlgarcia@irnase.csic.es	Inst. de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC
García Martín, Elena	egarcia@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
García-Blairsy Reina, Guillermo	ggreina@marinebiotechnology.org	Banco Nacional de Algas, Centro de Biotecnología Marina. Univ. Las Palmas de GC
Gil Salas, Ana	a.gil@rijkwzwaan.es	Rijk Zwaan Ibérica S.A.
González Castañón, María Luisa	mlgonzalezc@aragon.es	Centro de Investigación y Tecnología Agraria (CITA), Aragón
González Padilla, Isabel M.	isabelm.gonzalez.padilla@juntadeandalucia.es	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
González Padrón, María Yanet	yanetglepadron@gmail.com	Univ. de La Laguna
González Triguero, Juan M.	juanm.gonzalez@uah.es	Univ. Alcalá de Henares
Hammami, Rifka	rifka.hammami@uah.es	Univ. Alcalá de Henares
Juárez Roldán, José	jjuares@ivia.es	Inst. Valenciano de Investigaciones Agrarias
Litz, Richard E.	relitz@ufl.edu	Universidad de Florida
Mallón Moure, Rubén	rmallon@iiag.csic.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Manzanera, José Antonio	joseantonio.manzanera@upm.es	Univ. Politécnica de Madrid
Marín Velázquez, Juan Antonio	jmartin@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
Martín Fernández, M ^a Carmen	mariacarmen.martin@upm.es	Univ. Politécnica de Madrid
Martínez Santiago, María Teresa	temar@iiag.csic.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Melé Grau, Enric	enric.mele@gmail.com	Inst. Recerca i Tecnològica Agroalimentaria (IRTA)
Mendoza Poudereux, Isabel	isabel.mendoza@uv.es	Univ. de Valencia
Messeguer, Joaquina	joaquina.messeguer@irta.cat	Inst. Recerca i Tecnològica Agroalimentaria IRTA)
Moreno Ferrero, Vicente	vmoreno@ibmcp.upv.es	IBMCP - Univ. Politécnica de Valencia

Apellidos, Nombres	e-mail	Universidad/Institución/Empresa
Moreno Merino, Álvaro	m.baranda@rijkwaaan.es	Rijk Zwaan Ibérica S.A.
Navarro Lucas, Luis	lnavarro@ivia.es	Inst. Valenciano de Investigaciones Agrarias
Navarro Marín, Alicia	anama2@alumni.uv.es	Univ. de Valencia
Orozco Hernández, Delia Aidee	aideeorozco@herradura.com.mx	Brown Forman Corporation
Ortuño Tomás, Ana María	aortuno@um.es	Univ. de Murcia
Ozuna Serafini, Carmen Victoria	cvozuna@ias.csic.es	Inst. Agricultura Sostenible, CSIC
Palomo Ríos, Elena	elepaltro@uma.es	Univ. de Málaga
Parra Alejandro, Maria del Mar	marpal@cica.es	Inst. de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC
Pazos Navarro, María	maria.pazos@carm.es	Inst. Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)
Peña García, Leandro	lpenya@ivia.es	Inst. Valenciano de Investigaciones Agrarias
Peña Ramírez, Yuri Jorge Jesús	yuripena@herradura.com.mx	Brown Forman Corporation
Pérez Francés, Juan Felipe	jfrances@ull.es	Univ. de La Laguna
Pérez Hernández, Juan Bernardo	jbperez@icia.es	Inst. Canario de Investigaciones Agrarias
Pérez Ruiz, César	cesar.perez@upm.es	Univ. Politécnica de Madrid
Petri Serrano, César	cpetri@cebas.csic.es	CEBAS-CSIC
Pineda Chaza, Benito José	bpineda@btc.upv.es	IBMCP - Univ. Politécnica de Valencia
Pistón Pistón, Fernando	fpiston@ias.csic.es	Inst. Agricultura Sostenible, CSIC
Pliego Alfaro, Fernando	ferpliego@uma.es	Univ. de Málaga
Pujol Galofre, Pía	jordi@lavinya.com	Vivers La Vinya
Ramón Vidal, Daniel	daniel.ramon@biopolis.es	Biopolis S.L.
Rey Fraile, Manuel	mrey@uvigo.es	Univ. de Vigo
Risueño Almeida, María del Carmen	risueno@cib.csic.es	Centro Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid, CSIC
Robaina Romero, Rafael	rrobaina@dbio.ulpgc.es	Dept. Biología, Facultad Ciencias del Mar, ULPGC
Rodríguez Sanz, Héctor	hrs@cib.csic.es	Centro Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid, CSIC
Ruiz De Galarreta, José Ignacio	jiruiz@neiker.net	NEIKER
Sánchez Fernández, M ^a Concepción	conchi@iiag.csic.es	Inst. Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Sánchez Quintana, Nieves	bueno@inia.es	Inst. Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
Sánchez Romero, Carolina	c.sanchez@uma.es	Univ. de Málaga



Apellidos, Nombres	e-mail	Universidad/Institución/Empresa
Sánchez Testillano, Pilar	testillano@cib.csic.es	Centro Investigaciones Biológicas (CIB) Madrid, CSIC
Sanjurjo Lourés, Laura	laura.s.loures@gmail.com	Univ. Santiago de Compostela
Saporta Bon, Rubén	windzillo@hotmail.com	Univ. Santiago de Compostela
Seguí Simarro, José María	seguisim@btc.upv.es	COMAV - Univ. Politécnica de Valencia
Segura García del Río, Juan	juan.segura@uv.es	Univ. de Valencia
Sosa Hernández, Belén	cultesa@cultesa.com	CULTESA
Suárez Toste, Emma	ensuarez@ull.es	Univ. de La Laguna
Toribio Iglesias, Mariano	mariano.toribio@madrid.org	Inst.Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA)
Vallés Brau, María Pilar	valles@eead.csic.es	Estación Experimental de Aula Dei, CSIC
Vázquez López-Lomo, Ana M.	anavaz@bio.ucm.es	Univ. Complutense de Madrid
Veramendi Charola, Jon	jon@unavarra.es	Univ. Pública de Navarra
Vidal González, Nieves del Pilar	nieves@iiag.csic.es	Inst.Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Vidal Juvíño, José Ramón	joseramon.vidal@usc.es	Dept. Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Univ. Santiago de Compostela
Vidoy Mercado, Isabel	isabel.vidoy@juntadeandalucia.es	Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA)
Viéitez Martín, Ana María	amvieitez@iiag.csic.es	Inst.Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC
Zárate Méndez, Rafael	gerencia@biotifarm.es	Inst. Canario Investigación Cáncer - Centro Atlántico del Medicamento - Cluster Biotifarm





INSTITUCIONES Y EMPRESAS COLABORADORAS

