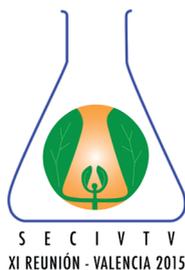


# **XI REUNIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS VEGETALES**



3 y 4 septiembre de 2015  
Fundación Universidad Empresa de Valencia-Adeit  
Plaza Virgen de la Paz, 3  
46001 Valencia

Editado por Isabel Arrillaga y Juan Segura

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

XI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in  
Vitro de Tejidos Vegetales  
Libro de Resúmenes  
Valencia 2015  
ISBN: 978-84-606-8862-4  
Editado por Isabel Arrillaga y Juan Segura

## COMITÉ ORGANIZADOR

Juan Segura García del Río  
Universitat de València

Isabel Arrillaga Mateos  
Universitat de València

Carmina Gisbert Domenech  
Universidad Politécnica de Valencia

Alejandro Atares Huerta  
Universidad Politécnica de Valencia

Anabela Romano  
Universidad del Algarve (Portugal)

Pablo Aleza Gil  
Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA)

Luis Cañas Clemente  
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) CSIC-UPV

José María Seguí Simarro  
Universidad Politécnica de Valencia

## COMITÉ CIENTÍFICO

Fernando Pliego Alfaro  
Universidad de Málaga

Juan Segura García del Río  
Universitat de València

Isabel Arrillaga Mateos  
Universitat de València

Luis Navarro Lucas  
IVIA

Vicente Moreno Ferrero  
UPV

Jorge Canhoto  
Universidad de Coimbra (Portugal)

Milen Ivanov Georgiev  
Academia Bulgara de Ciencias (Bulgaria)

Purificación Corchete Sánchez  
Universidad de Salamanca

Kirsi-Marja Oksman-Caldentey  
VTT Biotechnology, Espoo (Finlandia)

PATROCINAN



COLABORAN





## PROGRAMA

### JUEVES 3 DE SEPTIEMBRE

- 08:00-09:15 h. Entrega de documentación
- 09:15-09:30 h. INAUGURACIÓN XI REUNIÓN SECIVTV
- 09:30-10:30 h. CONFERENCIA DE APERTURA  
Discovery of missing steps of secoiridoid pathway in *Catharanthus roseus*  
**Kirsi-Marja Oksman-Caldentey**, Head of Industrial Biotechnology, VTT Technical Research Centre of Finland Ltd
- 10:30-11:00 h. Café
- 11:00-14:15 h. SESIÓN TEMÁTICA I: PRODUCCIÓN IN VITRO DE METABOLITOS SECUNDARIOS
- 11:00-12:00 h. Visita a los pósters de la sesión Temática I
- 12:00-12:45 h. **Conferencia invitada**  
Cultivos celulares de *Taxus* spp. una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis  
**Javier Palazón**, Universidad de Barcelona  
Moderadora: **Purificación Corchete**, Universidad de Salamanca
- 12:45-14:15 h. Discusión Pósters Sesión Temática I
- 14:15-16:00 h. Comida
- 16:00-19:45 h. SESIÓN TEMÁTICA II: CULTIVO IN VITRO EN MEJORA VEGETAL
- 16:00-17:00 h. Visita a los pósters de la Sesión Temática II

- 17:00-17:45 h. **Conferencia Invitada**  
Estrategias biotecnológicas para el control del Huanglong-  
bing de los cítricos  
**Leandro Peña**, IBMCP, Valencia  
Moderadora: **Nuria Alburquerque**, CEBAS, CSIC, Murcia
- 17:45-18:15 h. Café
- 18:15-19:45 h. Discusión Pósters Sesión Temática II
- 20:00-22:00 h. Visita guiada por el Centro Histórico de la ciudad de  
Valencia y Coctel de Bienvenida en La Nau, Sede Central de  
la Universitat de València

#### VIERNES 4 DE SEPTIEMBRE

- 08:30-09:30 h. CONFERENCIA PLENARIA  
Cryopreservation of plant species; from protocol develop-  
ment to crop cryobanking  
**Bart Panis**, Biodiversity International, Universidad de  
Lovaina, Bélgica
- 09:30-13:15 h. SESIÓN TEMÁTICA III: MICROPROPAGACIÓN Y  
EMPRESAS
- 09:30-10:30 h. Visita a los pósters de la Sesión Temática III
- 10:30-11:15 h. **Conferencia Invitada**  
La micropropagación en empresas y laboratorios de investi-  
gación: realidades y problemas.  
**Araceli Barceló**, IFAPA, Churriana, Málaga  
**Teresa Antón**, Empresa Semilleros Laimud, Almería
- 11:15-11:45 h. Café
- 11:45-13:15 h. Discusión Pósters Sesión Temática III
- 13:15-15:00 h. Comida

- 15:00-19:15 h. SESIÓN TEMÁTICA IV: BASES MOLECULARES Y FISIOLÓGICAS DEL CULTIVO IN VITRO
- 15:00-16:00 h. Visita a los pósters Sesión Temática IV
- 16:00-16:45 h. **Conferencia Invitada**  
The molecular bases of the tissue culture – tamarillo (*Solanum betaceum*) as a case study  
**Jorge M. Canhoto**, University of Coimbra  
Moredadora: **Conchi Sánchez**, IAG-CSIC-Santiago
- 16:45-17:15 h. Café
- 17:15-18:30 h. Discusión Pósters Sesión Temática IV
- 18:30-19:30 h. Asamblea ordinaria SECIVTV
- 19:30-20:00 h. Asamblea Extraordinaria de la SECIVTV: Elección de la nueva Junta Directiva
- 21:30 h. Cena de Clausura



## ÍNDICE DE RESUMENES

### CONFERENCIA DE APERTURA

Kirsi-Marja Oksman-Caldentey

Discovery of missing steps of secoiridoid pathway in *Catharanthus roseus*

### Sesiones temáticas

#### I. Producción in vitro de metabolitos secundarios

SI-CI

Javier Palazón, Rosa M. Cusido, Elisabeth Moyano y Mercedes Bonfill

Cultivos celulares de *Taxus* spp. Una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis

SI-P1

María Torres y Purificación Corchete

Expresión de genes de la ruta de silimarina en frutos y cultivos celulares de *Silybum marianum*

SI-P2

Martínez-Márquez A, Morante-Carriel J, Ramírez-Estrada K, Palazon J, Bru-Martínez R

Metabolic engineering for bioproduction of pterostilbene in elicited grapevine cell culture

SI-P3

Hidalgo, D, Martínez-Márquez A, Corchete P, Bru-Martínez R, Palazon J

Producción biotecnológica de piceatannol en plantas y suspensiones celulares transgénicas de *Nicotiana* sp

SI-P4

Vidal-Limon HR, Ramírez-Estrada K, Osuna L, Moyano E, Bonfill M, Cusidó RM

*Taxus globosa* una nueva fuente biotecnológica para la producción de taxanos. Estudio comparativo entre la producción de taxol y los perfiles transcriptómicos en cultivos elicitados de *T. globosa* y *T. media*

#### SI-P5

Ester Sales, Celia Montaner, Clara Martí, Esther Asensio, José Casanova  
Micropropagación de genotipos de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel) seleccionados en poblaciones naturales de la provincia de Huesca

#### SI-P6

I. Mendoza-Poudereux, J.P Bracho, J. Muñoz-Bertomeu, J. Segura e I. Arrillaga  
La co-expresión de los genes *LIMONENO SINTASA* y *1-DEXOSI-D-XILULO-SA-5-FOSFATO SINTASA* reduce la producción de aceite esencial de espliego

## II. Cultivo in vitro en mejora vegetal

#### SII-CI

Leandro Peña, Berta Alquézar, Ana Rodríguez, Elsa Pons, Josep E. Peris, Viviani V. Marques, Mateus A. Santos, Rodrigo F. Magnani, André G.C. Signoretti, Marcelo P. de Miranda, Nelson A. Wulff, A. Juliano Ayres  
Estrategias biotecnológicas para el control del Huanglongbing de los cítricos

#### SII-P1

A. Rivas-Sendra, P. Corral-Martínez, C. Camacho-Fernández y J.M. Seguí-Simarro  
Regeneración de plantas doble haploides a partir de callos derivados de cultivo de microsporas

#### SII-P2

O. Fayos, M.P. Vallés, A. Garcés-Claver, C. Mallor, A.M. Castillo  
Optimización de la ginogénesis en germoplasma español de cebolla

#### SII-P3

C. Camacho-Fernández, D. Hervás, A. Rivas-Sendra, A.M. Romero, M.P. Marín y J.M. Seguí-Simarro  
Comparación de seis métodos diferentes para calcular la densidad celular en cultivo de microsporas

#### SII-P4

A. Galán-Avila y J.M. Seguí-Simarro  
Estudios previos al desarrollo de un protocolo de inducción de androgénesis en *Cannabis sativa* L.

#### SII-P5

Vicente Vives-Peris, Rosa M. Pérez-Clemente y Aurelio Gómez-Cadenas  
Efecto de la composición salina del medio de cultivo y la temperatura en las etapas de micropropagación y enraizamiento in vitro de *Citrus macrophylla*

#### SII-P6

I. Imbroda, A. Cabeza, A. Barceló Muñoz e IMG Padilla  
Efecto de la iluminación LED en la propagación in vitro de *P. terebinthus* L, *Fragaria x ananassa* Duch, *Rosa* sp. y *Allium sativum*

#### SII-P7

M. Y. González-Padrón; I. Imbroda; M. Barceló Muñoz; I. M.G. Padilla; A. Barceló-Muñoz  
Micropropagación del pistacho: una alternativa a los sistemas convencionales de propagación

#### SII-P8

N. Ramírez-Martín, M. Nisa, P. García Estríngana, F. Molina y J. Alegre  
Introducción in vitro de *Pistacia* spp a partir de material juvenil y de árboles adultos

#### SII-P9

N. Ramírez-Martín, M. Ruiz Galea, J. Alegre y M. Toribio  
Regeneración de plantas de encina por vía organogénica

#### SII-P10

M. T. Martínez, M. C. San José, E. Corredoira, F. J. Vieitez, M. J. Cernadas, R. Montenegro, A. M. Vieitez  
Micropropagación de árboles adultos de encina mediante la multiplicación de brotes axilares y vía inducción de embriogénesis somática

#### SII-P11

N. González-Cabrero, D. López-Vela, M. Toribio y C. Celestino  
Maduración de embriones somáticos de pino piñonero: efecto de la temperatura durante la proliferación y del suplemento de sacáridos durante la maduración

#### SII-P12

C. Sánchez-Díaz, N. González-Cabrero, D. López-Vela, M. Toribio y C. Celestino  
Conservación de líneas embriogénicas de pino piñonero a distintas temperaturas



SII-P13

A. Medina, G. Bernat, T. San Pedro, A. Yuste, R. Peiró, C. Gisbert  
Desarrollo de embriones somáticos de vid (*Vitis vinifera* L.)

SII-P14

M.C. San José, M.T. Martínez, S. Valladares, M.J. Cernadas, R. Montenegro, E. Corredoira  
Crioconservación de embriones somáticos de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn

SII-P15

Fatiha Bradai y Carolina Sánchez Romero  
Mejora de la crioconservación de cultivos embriogénicos de olivo mediante tratamientos de precondicionamiento con sacarosa

SII-P16

P. Muñoz, T. San Pedro, N. Martínez, C. Gisbert  
Conservación in vitro de germoplasma de vid

SII-P17

L. García-Paredes, M. Nisa, N. Ramírez-Martín y J. Alegre  
Diferenciación de embriones somáticos de alcornoque en cultivos de masas proembriogénicas

SII-P18

M. C. San José, V. Cano, M. T. Martínez, S. Valladares, M. J. Cernadas, R. Montenegro, E. Corredoira  
Inducción de embriogénesis somática en *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn

SII-P19

Pablo Aleza, Andrés García-Lor, José Juárez y Luis Navarro  
Obtención de híbridos de cítricos con diferentes combinaciones de los genomas mitocondriales y cloroplásticos mediante fusión de protoplastos y microinjerto in vitro de brotes, raíces y embriones

SII-P20

F. Córdoba, D. Botías, I. Porras y O. Pérez-Tornero  
Métodos de selección in vitro de mutantes de mandarina 'Fortune' resistentes a *Alternaria alternata* pv. citri

#### SII-P21

Fatiha Bradaï y Carolina Sánchez Romero

Identificación de variantes somaclonales de interés para la mejora genética de olivo

#### SII-P22

J. Sánchez, A. Atarés, M. Jáquez, B. Pineda, B. García-Sogo, M.C. Bolarín, F. Borja, J.L. Quispe, J. Capel, R. Lozano y V. Moreno

Identificación de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en el desarrollo radicular

#### SII-P23

M. Jáquez, J. Sánchez, S. Sánchez, B. Pineda, B. García-Sogo, M.C. Bolarín, F. Borja, R. Lozano, V. Moreno y A. Atarés

Identificación de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en su tolerancia a la sequía

#### SII-P24

C.P. Mora, E. Claveria, L. Asín, I. Iglesias, P. Vilardell, J. Bonany, M.H. Simard, F. Laurens, R. Tolrà, C. Poschenrieder, R. Dolcet-Sanjuan

In vitro physiological responses to select new hybrid pear rootstocks tolerant iron chlorosis

#### SII-P25

B. Pineda, C. Ribelles, S. Sánchez, B. García-Sogo, A. Atarés, F. Martínez, MC. Bolarín, R. Lozano y V. Moreno

El análisis del mutante de tomate *dms-1310* revela defectos en la actividad del meristemo apical durante los primeros estadios del desarrollo de la planta

#### SII-P26

C. Ribelles, B. García-Sogo, A. Atarés, R. Nieto, MC. Bolarín, T. Angosto, R. Lozano, V. Moreno y B. Pineda

Caracterización de *lfs-2084*: un mutante dominante de tomate afectado en el cuajado de fruto

#### SII-P27

T. San Pedro, N. Gammoudi, R. Peiró, F. Viana, A. Olmos, C. Gisbert

Saneamiento de plantas de vid infectadas por virus



#### SII-P28

A. Lizárraga Farfán, J. Ascasíbar, M.L. González Caamaño  
Saneamiento y recuperación, mediante cultivo de meristemos y termoterapia, de cv de manzano tradicionales de Galicia infectados por los virus ApMV y ACLSV

#### SII-P29

R. Saporta, C. Gisbert, J.R. Vidal y A. Segura  
Transformación genética de *Vitis vinifera* (cv. Albariño) con genes de floración temprana

#### SII-P30

A. Medina, T. San Pedro, JM Mulet, T. Pardo, M. P. Bernal, C. Gisbert  
Evaluación de tolerancia a metales pesados de líneas transgénicas de *Solanum torvum* Sw. portadoras del gen *BvSAT*

#### SII-P31

C. Paniagua, J.A. García-Gago, A.J. Matas, M. Barceló-Muñoz, R. Blanco-Portales, J. Muñoz-Blanco, F. Pliego-Alfaro, M.A. Quesada y J.A. Mercado  
Efecto del silenciamiento de genes que codifican poligalacturonasas sobre el reblandecimiento del fruto de fresa asociado a la maduración

#### SII-P32

César Petri, Hong Wang, Lorenzo Burgos, Jesús Sánchez-Navarro, Nuria Alburquerque  
Producción de plantas transformadas de albaricoquero a partir de secciones de hipocotilo de semillas maduras

#### SII-P33

Yosvanis Acanda, Michel Canton, Hao Wu and Janice M. Zale  
Pre-screening for transgenic citrus shoots using a temporary immersion bioreactor system

#### SII-P34

E. Corredoira, V. Cano, M. C. San-José, M.T Martínez, M. Toribio, A. Ballester  
Sobre-expresión en embriones somáticos de alcornoque del gen *CsTL1* que codifica una taumatina



SII-P35

M. Cano, I. Mendoza-Poudereux, M. Morcillo, J. Segura, E. Sales e I. Arrillaga  
Genética reversa para el estudio funcional de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en pino marítimo

SII-P36

R.C. García-Almodóvar, B. Gosalvez, M.A. Aranda, L. Burgos  
Efficient production of *eyfp*-expressing *Cucumis melo* diploid plants using different type of explants

SII-P37

M.Y. Chu, C. Quiñonero, H. Akdemir, N. Albuquerque, M.A. Pedreño, L. Burgos  
Transformación mediada por *Agrobacterium* de cultivos celulares de vid

SII-P38

Nuria Albuquerque, Lydia Faize, Lola Nortes, Lorenzo Burgos  
Distintas estrategias para obtener *Prunus* transgénicos resistentes a sharka

SII-P39

S. Cerezo, M.L. Hernández, M.D. Sicardo, J.A. Mercado, C. Sanz, I. Narváez, A. Barceló-Muñoz, J.M. Martínez-Rivas, F. Pliego-Alfaro  
Transformación genética de olivo con el gen *OeHPL* para el análisis funcional del papel de la enzima 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) en la producción de compuestos volátiles

SII-P40

M. Ruiz-Galea y M. Toribio  
Valoración in vitro de elicitores de inducción de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en encina

SII-P41

M. Morcillo, M. Cano, J.B. Peris, J. Segura e I. Arrillaga  
Influencia de la aplicación de exudados de *Phytophthora cinnamomi* y elicitores sobre la proliferación de embriones de encina (*Quercus ilex* L.)

## Conferencia Plenaria

Bart Panis

Cryopreservation of plant species; from protocol development to crop cryobanking

## III. Micropropagación y empresas

SIII-CI

Teresa Antón y A. Barceló Muñoz

La micropropagación en empresas y laboratorios de investigación: Realidades y problemas

SIII-P1

Jesús González-Puelles, M<sup>a</sup> Esther Barreal, Pedro Pablo Gallego

Optimización de la germinación de cultivares verdes de kiwi mediante neuro-fuzzy logic

SIII-P2

B. Cabello Moreno, A. Cabeza, J. Morata Gómez, A. Barceló Muñoz, L. Velasco e IMG Padilla

Saneamiento mediante cultivo de meristemos y micropropagación de una variedad comercial de ajo

SIII-P3

I. Imbroda; I. M.G. Padilla; A. Barceló-Muñoz

Propagación clonal de yellowhorn mediante cultivo in vitro

SIII-P4

S. Rico, JM, Vielba, N. Vidal, C. Sánchez y B. Cuenca

Análisis por qPCR de la respuesta a *P. cinnamomi* en clones de castaño in vitro con diferente nivel de resistencia

SIII-P5

J. A. Marín, E. García, P. Lorente, P. Andreu y A. Arbeloa

Propagación de cultivares de pistacho (*Pistacia vera* L.) aplicando técnicas de cultivo in vitro

#### SIII-P6

E. Alonso , C. Sánchez, A. Aldrey, P. Covelo, R. Martínez, N. Vidal  
Recuperación mediante cultivo in vitro de variedades locales de peral gallego

#### SIII-P7

B. Cuenca, A. Aldrey, B. Blanco, A. Rodríguez, B. Bogo, C. Sánchez y N. Vidal  
Desarrollo de un sistema de cultivo en condiciones fotoautotróficas para la micropropagación de genotipos seleccionados de castaño

#### SIII-P8

Joan Villanova, Elena Espinosa, Ramón Espinosa y José Manuel Pérez-Pérez  
Micropropagación de especies de ágave de uso ornamental

#### SIII-P9

Martín-Closas Ll., Carceller A., Pelacho A.M.  
Análisis de ecotoxicidad de acolchados biodegradables mediante cultivo in vitro de lechuga, *Lactuca sativa* cv. Trocadero

#### SIII-P10

E. García, A. Arbeloa, P. Lorente, J. A. Marín y P. Andreu E. García  
Enraizamiento in vitro de variedades de pistacho (*Pistacia vera* L.)

#### SIII-P11

B. Bogo, C. Sánchez, A. Aldrey, P. Covelo, R. Martínez, N. Vidal  
Conservación de germoplasma de variedades locales de ciruelos del noroeste peninsular

#### SIII-P12

N. Vidal, A. Aldrey, B. Blanco, E. Varas, J. Otero y C. Sánchez  
Efecto del tipo de la intensidad y calidad de luz en la micropropagación de *Salix viminalis* en condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas

#### SIII-P13

Tineo García, L.; Murillo Verduzco, I.; Herrera Sarellano, M; Rivera Pacheco, D.A.; Gutiérrez Coronado, M.A.; Castro Espinoza L  
Diseño de un prototipo de biorreactor de inmersión temporal automatizado para la micropropagación de especies vegetales

#### IV. Bases moleculares y fisiológicas del cultivo in vitro.

##### SIV-CI

Jorge M. Canhoto & Sandra I. Correia

The molecular bases of the tissue culture – tamarillo (*Solanum betaceum*) as a case study

##### SIV-P1

Verónica Parra-Vega, Patricia Corral-Martínez, Alba Rivas-Sendra y Jose M. Seguí-Simarro

La inducción de embriogénesis de microsporas en colza produce paredes celulares anormales con niveles alterados de calosa y celulosa

##### SIV-P2

S. Rico, E. Varas, P. Covelo, M. Pérez, D. Rubianes, N. Vidal y C. Sánchez

Estudio filogenético del gen *TCTP* en diferentes especies y análisis de su expresión en diferentes procesos de desarrollo

##### SIV-P3

E. Varas, N. Vidal, P. Covelo, J.M. Vielba y C. Sanchez

Efecto del NPA en la inducción de raíces adventicias y en la expresión génica en castaño

##### SIV-P4

C. Kremer, M.T. Solis, M.E. Gonzalez-Benito, P.S. Testillano, C. Martin

Estrés oxidativo en los protocolos de criopreservación de *Mentha x piperita*

##### SIV-P5

E. Varas, C. Miguel, B. Jones y C. Sanchez

Regulación hormonal de la respuesta rizogénica de brotes de chopo y de la expresión del gen *PtSHR1*

##### SIV-P6

M.P. Vallés, S. Allué, D. Salcines, A.M. Castillo

Caracterización de los mecanismos implicados en la regeneración de plantas albinas durante la producción de plantas doblehaploides en cebada



#### SIV-P7

M. M. Murillo-Talavera, M. E. Pedraza-Santos, N. Gutiérrez-Rangel, M. N. Rodríguez-Mendoza, P. Lobitl, A. Martínez-Palacios, S. Ochoa-Ascencio  
Micropropagación de plántulas de la orquídea *Laelia autumnalis* iluminadas con diodos emisores de luz

#### SIV-P8

N. Navarro-García, F. Córdoba, D. Martínez-Romero y O. Pérez-Tornero  
Evaluación de la influencia del etileno y sus moduladores en la organogénesis de limonero (*Citrus limon* L. Osbeck)

#### SIV-P9

M.T. Solís, A. A. El-Tantawy, V. Cano, M.C. Risueño y P.S. Testillano  
El tratamiento con 5-azacitidina hipometila el DNA y favorece la reprogramación e inicio de embriogénesis en cultivos de microsporas de colza y cebada

#### SIV-P10

H. Rodríguez-Sanz, M.T. Solís, M.F. López, A. Gómez-Cadenas, M.C. Risueño, P.S. Testillano  
La reprogramación de la microspora por estrés in vitro y el inicio y progresión de la embriogénesis implica biosíntesis y acumulación de auxina, su acción y transporte

#### SIV-P11

S. Hernández-Muñoz, M. E. Pedraza-Santos, S. P. Fernández-Pavía, P. A. López, M. Martínez-Trujillo y A. Martínez-Palacios  
Estimulación del crecimiento de microplantas de *Laelia autumnalis* mediante el tratamiento con rayos gamma

#### SIV-P12

Martínez-Márquez A, Martínez-Esteso MJ, Vilella M, Sellés-Marchart S, Morante-Carriel J, Hurtado E, Almagro L, Palazon J, Pedreño MA, Bru-Martínez R  
The role of glutathione-S-transferases in resveratrol transport out of grapevine cells

#### SIV-P13

J. M. Vielba, E. Varas, P. Covelo, S. Rico y C. Sánchez  
Expresión diferencial del gen *CsGH3-1* y su relación con la formación de raíces adventicias en los brotes de castaño



SIV-P14

C. Martin, C. Kremer, M.E. Gonzalez-Benito

Cambios epigenéticos en ápices crioconservados de *Mentha xpiiperita*

SIV-P15

C. Kremer, M.T. Solis, M.E. Gonzalez-Benito, P.S. Testillano, C. Martin

Estrés oxidativo en los protocolos de criopreservación de *Mentha xpiiperita*

SIV-P16

Montalbán I.A., García-Mendiguren O., Stewart D., Klimaszewska K., Rutledge R.G., Moncaleán P

Comparative study of the gene expression profile in cellular masses from shoots derived of adult radiata pine trees versus seed derived embryonal masses



## **CONFERENCIA DE APERTURA**



## Discovery of missing steps of secoiridoid pathway in *Catharanthus roseus*

Kirsi-Marja Oksman-Caldentey

Head of Industrial Biotechnology, VTT Technical Research Centre of Finland Ltd

Eukaryotes such as higher plants have evolved to produce a diverse range of low-molecular-weight secondary compounds that can be used as food and feed additives, flavours, fragrances, cosmetics, agrochemicals and pharmaceuticals. The dominant role of secondary metabolites in the pharmaceutical industry is demonstrated by the fact that approximately 50% of novel anticancer drugs have been discovered from nature including blockbusters such as taxanes (paclitaxel), terpenoid indole alkaloids and camptothecin. The chemical synthesis of plant-derived compounds is usually challenging and uneconomical because the complex stereospecific structures are difficult to replicate. Sustainable and cost-effective production systems must therefore be developed, and the best outcome can be achieved by integrating biotechnology-based approaches into more sustainable production chains featuring cutting-edge innovative technologies. Spectacular advances in characterizing plant metabolic pathways using functional genomics and through the development of large-scale cultivation processes have offered for the first time unprecedented opportunities to explore the extraordinary complexity of the biochemical capacity of plants in entirely new ways. State-of-the-art genomics tools can now be used to improve the production of known natural compounds or to synthesize entirely novel plant constituents by combinatorial biochemistry in cultivated plants and cells<sup>1</sup>. Therefore, the utilization of plants and cells as green production factories is becoming more realistic and more attractive also from a commercial point of view. Metabolic engineering aspects to discover bottlenecks in the complex biosynthetic pathways, and how the selected pathway can be directed towards the desired end-product will be highlighted using the discovery of missing enzymatic steps in the early seco-iridoid pathway as an example.

### Reference

<sup>1</sup>Rischer H, Häkkinen ST, Ritala A, Seppänen-Laakso T, Miralpeix B, Capell T, Christou P, Oksman-Caldentey K-M (2013): Plant cells as pharmaceutical factories. *Curr Pharm Design* 19: 5640-5660.







## **CONFERENCIA PLENARIA**



## **Cryopreservation of plant species; from protocol development to crop cryobanking**

Bart Panis

Senior Researcher, Bioversity International c/o KU Leuven Willem de Croylaan  
42 bus 2455,  
3001 Leuven, BELGIUM. bart.panis@biw.kuleuven.be

Classically, plant germplasm is stored through seed at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Such seed conservation is however not an option for those plant species that are sterile (do not produce viable seeds, like banana), produce only recalcitrant (non-storable) seed (like cocoa) or species for which it is important that specific gene combinations are maintained during propagation (many fruit species such as apple and potato). In such cases, vegetative material needs to be maintained in field or in vitro collections (micro plants grown in test tubes). The ultimate storage method is cryopreservation (or freeze preservation) at ultralow temperatures where biological material is stored in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) or in its vapor phase ( $-150^{\circ}\text{C}$ ). These temperatures are low enough to arrest all metabolic and physical processes. As such the material can be kept safely for hundreds of years in liquid nitrogen tanks.

Publications on cryopreservation of different plant species are available since the 1980s but the technique was only in a few cases applied to store larger collections. It was only with the development of vitrification based protocols such as droplet vitrification and more recently plate vitrification that cryopreservation is becoming a routine practice in important collections of vegetatively propagated crops like banana, cassava and potato that are stored at the CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) centres. For example, 905 banana accessions (63% of the in vitro collection) belonging to 30 different genomic banana groups are now safely stored in liquid nitrogen by Bioversity International in Leuven, Belgium.

In this presentation, the state of the art of plant cryopreservation will be presented and the following question will be answered; Is cryopreservation a realistic conservation tool for all crops? Since the development of “generic” cryopreservation protocols are all technical problems solved? How long does it take to develop a suitable cryopreservation protocol for a given plant species?







## ***SESIÓN TEMÁTICA***

### **I. PRODUCCIÓN IN VITRO DE METABOLITOS SECUNDARIOS**



## **Cultivos celulares de *Taxus* spp. Una eficaz herramienta biotecnológica para la producción de taxanos y el desarrollo de estudios básicos sobre su biosíntesis**

Javier Palazón, Rosa M. Cusido, Elisabeth Moyano y Mercedes Bonfill

Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. javierpalazon@ub.edu

Cuando la fuente natural de un fitofármaco no puede satisfacer su demanda en el mercado o es cada vez más limitada debido a la sobreexplotación o el deterioro de su hábitat natural, la biotecnología vegetal puede proporcionar un sistema alternativo para su producción.

En este sentido, los cultivos *in vitro*, pueden ser considerados como “Biofactorías Vegetales”. Son, sin duda, sistemas biosostenibles y respetuosos con el medio ambiente al no competir con los cultivos agronómicos por grandes extensiones de terreno y en consecuencia, ayudan a economizar agua y agroquímicos. Sin embargo, y a pesar de sus ventajas, todavía son pocos los procesos de producción basados en biofactorías vegetales que se han desarrollado a nivel industrial; entre ellos destacan la producción de siconina y paclitaxel; con muchos otros no ha sido posible, debido, probablemente, al escaso conocimiento que se tiene sobre el metabolismo secundario vegetal. En este contexto, los cultivos de células, tejidos y órganos vegetales constituyen también una excelente plataforma tecnológica para realizar estudios básicos sobre las rutas metabólicas secundarias y su control.

Para conseguir con éxito la producción biotecnológica de fitofármacos se requiere, en cualquier caso, la optimización del sistema, ya sea por métodos empíricos o racionales. De manera empírica, se puede mejorar la productividad del sistema mediante la selección de líneas celulares altamente productivas, variando la composición del medio y las condiciones del cultivo, por adición de inductores y precursores, un correcto diseño del biorreactor, perfeccionando los procesos de extracción y aislamiento del producto, etc.

Complementariamente, en las aproximaciones de tipo racional es preciso identificar los genes, enzimas y rutas biosintéticas y el control al que está sometida una ruta metabólica determinada. El descubrimiento de nuevos genes y proteínas potencialmente implicadas en el metabolismo secundario se ha simplificado con las herramientas “ómicas” actuales, así como la evaluación de las posibles funciones de las secuencias candidatas, mediante estudios *in silico* y herramientas de genómica funcional.

El interés en los taxanos, un grupo de compuestos diterpénicos con actividad antitumoral, es cada vez mayor en la medida en que es posible descubrir nuevos derivados semisintéticos con acciones mejoradas y/o menos efectos secundarios, así como nuevas formas de administración más efectivas. Los taxanos se forman a partir del difosfato de geranilgeranilo mediante una compleja ruta metabólica, con más de 19 pasos, no todos ellos conocidos hasta el momento. Su creciente demanda requiere la búsqueda de nuevas fuentes alternativas y la mejora de la productividad de los procesos ya establecidos, una mejora que pasa por un mayor conocimiento del metabolismo de los taxanos y, con la ayuda de las técnicas de ingeniería metabólica, el desarrollo de nuevas líneas celulares sobreproductoras. El grupo de “Biotecnología Vegetal: Producción de Fitofármacos” de la Universidad de Barcelona, tiene una larga experiencia en la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* spp. Mediante aproximaciones de tipo empírico nuestro grupo ha logrado una de las mayores producciones de paclitaxel conseguida hasta el momento a nivel académico, utilizando un sistema de cultivo basado en la inmovilización de las células de *Taxus baccata* en alginato, elicitadas con jasmonato de metilo (MeJA) y en un biorreactor de tipo “airlift”. Resultados más recientes han demostrado que el tratamiento combinado con un nuevo elicitor, coronatina, junto con el agente permeabilizante b-metilciclodextrina aumenta significativamente la producción de taxanos en cultivos celulares de *Taxus* sp. Aproximaciones de tipo empírico a los tratamientos de elicitación nos han permitido demostrar también que en condiciones inductivas son los genes que participan en los últimos pasos de la biosíntesis de taxanos los que se encuentran menos expresados y por ello nos han permitido conocer las dianas que pueden ser activadas por ingeniería metabólica.

Por otro lado, el estudio del perfil transcriptómico mediante cDNA-AFLP, de los cultivos celulares de *Taxus* spp. elicitados combinado con el análisis *in silico* de los genes con expresión diferencial en condiciones de elicitación, nos ha permitido identificar una serie de genes candidatos a participar en la biosíntesis de taxanos y su regulación. El análisis funcional de los candidatos más probables, nos ha llevado a caracterizar una nueva enzima, la  $\beta$ -fenilalanina CoA ligasa que participa en la formación de la cadena lateral del paclitaxel, y el Taximin, un pequeño péptido rico en residuos de cisteína y altamente conservado en el reino vegetal, que actúa como un regulador maestro induciendo la activación transitoria de los genes que participan en la biosíntesis de taxanos y en otras rutas metabólicas secundarias. En su conjunto estos resultados demuestran que los cultivos celulares de *Taxus* elicitados constituyen una excelente plataforma biotecnológica para la producción de taxanos y para el desarrollo de estudios básicos sobre la biosíntesis de estos compuestos y su control.

## Expresión de genes de la ruta de silimarina en frutos y cultivos celulares de *Silybum marianum*

M. Torres, P. Corchete\*

Área de Fisiología Vegetal. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca. Campus Miguel de Unamuno, 37007-Salamanca.

Silimarina (Sm) es una mezcla isomérica de flavonolignanós de los frutos de *Silybum marianum* que se emplea como medicamento para enfermedades hepáticas. Ensayos clínicos recientes han ampliado su aplicación terapéutica a la prevención, quimioprotección y tratamiento de ciertos cánceres.

In vivo, la biosíntesis de Sm ocurre por acoplamiento oxidativo entre el flavonoi-de taxifolina (Tx) y el monolignol alcohol coniferílico (CA); está asociada a la maduración del fruto y los productos sólo se acumulan en el pericarpio

En comparación con el fruto intacto, la producción de Sm en cultivos celulares es muy baja. En trabajos previos determinamos que la elicitación era una buena opción para incrementar la producción, no obstante, la productividad no es comercialmente viable.

Debido al desconocimiento de los genes de la ruta, un aumento basado en la manipulación de genes que limitan la biosíntesis no es posible todavía. Hasta la fecha, sólo se ha publicado la secuencia de un gen, el de chalcona sintasa (CHS). En este estudio, y a partir de cDNA sintetizado del RNA aislado de frutos maduros, se ha logrado conocer la secuencia parcial de chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3' hidroxilasa (F3H), flavonol 3' hidroxilasa (F3'H) (síntesis de Tx) y cinamoil alcohol deshidrogenasa (síntesis de CA)

Durante la maduración del fruto, los transcritos de genes de flavonoides estuvieron bien representados; sin embargo, los de CAD sólo se detectaron al final del proceso, coincidiendo con la lignificación de la cubierta, lo que concuerda con la acumulación de Sm en esta fase.

Los niveles de expresión de los genes en cultivos celulares fueron extraordinariamente bajos. La elicitación incrementó significativamente la expresión de CHS y CHI, no así la de los últimos genes de la ruta F3H, F3'H o CAD.

Esta nueva información sobre recursos genéticos de *S. marianum* y el efecto de elicitors permitirá el desarrollo de estrategias para aumentar eventualmente la producción *in vitro* de Sm mediante la manipulación de los pasos finales limitantes.

## Metabolic engineering for bioproduction of pterostilbene in elicited grapevine cell culture

Martínez-Márquez A<sup>a</sup>, Morante-Carriel J<sup>ab</sup>, Ramírez-Estrada K<sup>c</sup>, Palazon J<sup>c</sup>, Bru-Martínez R<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Plant Proteomics and Functional Genomics Group, Department of Agrochemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of Alicante, Alicante, Spain. <sup>b</sup>Biotechnology and Molecular Biology Group, Quevedo State Technical University, Quevedo, Ecuador. <sup>c</sup>Laboratory of Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII sn, E-08028 Barcelona, Spain

Stilbenes in grapevine are thought to play important roles in defence responses in several plant species. The main stilbenes in grapevine are resveratrol and its derivatives and, among these, pterostilbene (3',5'-dimethoxy-resveratrol; t-Pt) produced in small amounts by a specific resveratrol O-methyltransferase (VvROMT) (Schmidlin et al., 2008). t-Pt has attracted much attention due both to its antifungal and pharmacological properties. Indeed, pterostilbene is 5 to 10 times more fungitoxic than resveratrol *in vitro* and recent studies have shown that pterostilbene exhibits anticancer, hypolipidemic, and antidiabetic properties. We demonstrated that grapevine cell cultures are able to accumulate more than 4 mg/L of stilbenoid *trans*-resveratrol in the extracellular medium as end product when the culture is elicited with cyclodextrins alone or combined with methyl jasmonate (Almagro et al., 2013). Making use of such enhanced metabolic capacity of grapevine cells we have designed a metabolic engineering strategy to obtain t-Pt as a way to diversify the metabolic capacities of grapevine cell cultures. Recombinant enzymes studies carried out using a previously characterized ROMT sequence from *Vitis vinifera* demonstrated its ability to catalyze pterostilbene from resveratrol. Binary vectors were constructed for the co-expression of ROMT with a stilbene synthase sequence from grapevine induced by elicitation with 50 mM methylated cyclodextrin and 100 µM for methyl jasmonate using the agro-infiltration technique and used for the generation of stable transformation grapevine cv Gamay and Monastrell cells culture using *agrobacterium*-mediated transformation, resulting in the accumulation of pterostilbene both in planta and transformation cells culture, when was investigated by HPLC-MS analysis. As a conclusion, these results demonstrate the potential utility of this strategy for the generation of pterostilbene-producing transgenic cells culture accumulating a natural product of health-promoting properties and opens up the way to exploit the system to produce new resveratrol derivatives.

**Acknowledgements:** Work supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-29856-C02-01, BIO2011-29856-C02-02 and BIO2014-51861-R), FEDER and Conselleria d'Educacio, Cultura I Sport de la Generalitat Valenciana (FPA/2013/A/074). J.M.C. holds a postdoctoral grant from SENESCYT-GOVERNMENT OF ECUADOR (006-IECESMG5-GPLR-2012).

1. Almagro L, Belchí-Navarro S, Sabater-Jara AB, Vera-Urbina JC, Selles-Marchart S, et al. (2013) Bioproduction of trans-resveratrol from grapevine cell cultures. In: Ramawat KG and Merillon JM, editors. Handbook of Natural Products. Heidelberg, Springer. 1683–1713.
2. Schmidlin L, Poutaraud A, Claudel P, Mestre P, Prado E, Santos-Rosa M, et al. (2008) A stress-inducible resveratrol o-methyltransferase involved in the biosynthesis of pterostilbene in grapevine. *Plant Physiology* 148, 1630–1639.

## Producción biotecnológica de piceatannol en plantas y suspensiones celulares transgénicas de *Nicotiana* sp.

Hidalgo, D<sup>1</sup>, Martínez-Márquez A<sup>2</sup>, Corchete P<sup>3</sup>, Bru-Martínez R<sup>2</sup>, Palazon J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII sn, E-08028 Barcelona, España. javierpalazon@ub.edu.

<sup>2</sup>Plant Proteomics and Functional Genomics Group, Department of Agrochemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Alicante, Alicante, Spain.

<sup>3</sup>Department of Plant Physiology, Campus Miguel de Unamuno, University of Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain.

El Piceatannol (3,5,3',4'-tetrahydroxiestilbeno) (Pt) es un análogo hidroxilado del resveratrol (R), un producto natural conocido por sus propiedades anti-envejecimiento, anti-inflamatorias y efectos quimiopreventivos del cáncer. Estudios recientes atribuyen a Pt mayor bioactividad que R. Se ha descrito que R actúa como un pro-fármaco, siendo convertido en Pt en el hígado humano por CYP1B1, una hidroxilasa dependiente de P450. En contraste con R, no hay ninguna fuente natural abundante conocida de Pt adecuada para utilizarla como sistema para su bioproducción. En este trabajo, se ha estudiado el potencial de producir Pt en las plantas a través de la expresión del gen *HsCYP1B1* en dos sistemas heterólogos. En primer lugar, hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrada con dos cepas de *Agrobacterium* que llevan respectivamente, una estilbeno sintasa y la CYP1B1 de hígado humano, el resultado fue la acumulación de tres estilbenos: R, Pt y piceido (un derivado glicosilado de R). En segundo lugar, se obtuvieron líneas de raíces transformadas sobreexpresadoras del gen *HsCYP1B1* después de la infección de con *A. rhizogenes* A4 que contiene el plásmido pK7WG2 portador del gen indicado. Posteriormente, se han obtenido líneas celulares mediante la dediferenciación de las raíces transformadas por el tratamiento con IAA y kinetina. Las suspensiones celulares fueron alimentadas con R, con o sin ciclodextrinas. Nuestros resultados muestran la capacidad de las líneas celulares de tabaco para acumular R intracelularmente y convertirlo en Pt. El tratamiento con ciclodextrina mejoró la biotransformación R conduciendo a la acumulación extracelular de Pt.

Los resultados obtenidos demuestran la síntesis de Pt mediada por CYP1B1 en las hojas y los cultivos celulares transgénicos de *Nicotiana* y pueden representar una prometedora plataforma para su producción biotecnológica en el futuro.

## ***Taxus globosa* una nueva fuente biotecnológica para la producción de taxanos. Estudio comparativo entre la producción de taxol y los perfiles transcriptómicos en cultivos elicitados de *T. globosa* y *T. media*.**

Vidal-Limon HR<sup>1</sup>, Ramírez-Estrada K<sup>1</sup>, Osuna L<sup>2</sup>, Moyano L<sup>3</sup>, Bonfill M1, Cusidó RM.

<sup>1</sup>Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII sn, E-08028 Barcelona, España. <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Morelos, México. <sup>3</sup>Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain.

Recientemente se ha demostrado que *Taxus globosa* (tejo mexicano) podría representar una nueva fuente biotecnológica de taxol y taxanos derivados. En este trabajo hemos estudiado, en dos cultivos celulares de *Taxus* spp., la acción de los elicitores ciclodextrina (CD) y coronatina (CORO), suministrados al medio de cultivo, ya sea por separado o juntos. Para ello, se ha utilizado un cultivo en dos etapas de *T. globosa* y otro de *T. media*, en los que tras un período en un medio de cultivo optimizado para la producción de biomasa las líneas celulares se transfirieron a un medio óptimo de producción añadiéndose los elicitores al inicio de esta segunda etapa. En condiciones de elicitación se determinó la capacidad de crecimiento, producción de taxanos, y el nivel de expresión de diferentes genes involucrados en la biosíntesis de taxol. Aunque la CORO redujo la capacidad de crecimiento de ambas líneas celulares, CD aparentemente contrarrestó este efecto negativo. La producción de taxanos se mejoró significativamente por la adición simultánea de CD y CORO al medio. La producción total de taxanos en la línea celular de *T. media* era más del doble que la de *T. globosa*, pero en esta línea celular, más de 90% de los taxanos producidos se excretaron al medio de cultivo. El patrón de acumulación de los taxanos individualmente también difirió: en el momento de máxima producción, los principales taxanos en cultivos de *T. globosa* eran cefalomanina y 10 deacetiltaxol, y en *T. media*, taxol y bacatina III. Los bajos niveles de expresión de genes de la biosíntesis de taxanos encontrados en las células *T. globosa*, en respuesta a la elicitación reflejan la producción de taxanos también menor en estos cultivos, mientras que una alta expresión génica fue fuertemente correlacionada con una alta producción de taxano en *T. media*. Los resultados evidencian la falta de efectividad de los tratamientos elicitores en el tejo mexicano y corroboran que el efecto positivo de los elicitores sobre la producción de taxanos se debe al menos en parte a su activación de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de estos compuestos.

## Micropropagación de genotipos de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel) seleccionados en poblaciones naturales de la provincia de Huesca.

E. Sales<sup>1</sup>, C. Montaner<sup>1</sup>, C. Martí<sup>1</sup>, E. Asensio<sup>2</sup> y J. Casanova<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. Ciencias agrarias y del Medio natural y <sup>2</sup>Dpto. Química Analítica, Universidad de Zaragoza. Escuela Politécnica Superior, Ctra. Cuarte s/n 22071 Huesca.

La gayuba, *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel, es una ericácea con porte rastro y follaje perenne que tradicionalmente ha sido empleada para tratar infecciones del tracto urinario, recolectándose en varios países, entre ellos España. Sus principios activos son fenólicos y poseen interés para las industrias farmacéutica, alimentaria y cosmética por sus propiedades antibióticas, antioxidantes e inhibidoras de la síntesis de melanina. La sustancia más relevante es la arbutina (hidroquinona  $\beta$ -D-glucopiranosido), de la cual las hojas secas de *A. uva-ursi* contienen hasta un 12%, aunque existe amplia variación entre las poblaciones de esta especie (American Herbal Pharmacopoeia, 2008). La principal limitación que presenta la gayuba es su problemática propagación, tanto por semillas como por esquejes. Existen dos estudios sobre la micropropagación de variedades ornamentales (Mkada *et al.*, 1991; Rodríguez *et al.*, 1998).

En este trabajo presentamos resultados preliminares del establecimiento *in vitro* de cultivos de tallos de gayuba a partir de ápices (2-5 cm) de brotes de plantas multiplicadas en maceta o de plantas de campo, correspondientes a individuos de poblaciones de la provincia de Huesca cuya producción de fenoles y arbutina ha sido caracterizada. La respuesta de los ápices dependió de la adición al medio de citoquininas (benciladenina o zeatina) o carbón activo, así como del origen de los explantos y del genotipo. La adición de citoquininas al medio de cultivo sin carbón activo indujo la proliferación de las yemas axilares en los ápices de gayuba, obteniéndose en promedio  $3,5 \pm 1,7$  tallos por explanto procedente de plantas de maceta, independientemente de la fitohormona empleada. Los ápices procedentes de las plantas adultas, sin embargo, respondieron mejor a la benciladenina (promedio  $2,1 \pm 0,8$  tallos por explanto). El contenido en arbutina de los tallos cultivados *in vitro* ha sido también evaluado.

American Herbal Pharmacopoeia. 2008. Uva-ursi leaf. Upton, R (Ed.), 30 pp.

Mkada, J.; Dorion, N.; Bigot, C. 1991. Plant Cell Tissue & Organ Culture 24: 217-222.

Rodríguez, N.; Martín, C.; Pérez, C. 1998. Phyton-International Journal of Experimental Botany 63: 111-117.

## La co-expresión de los genes *LIMONENO SINTASA* y *1-DEOXI-SI-D-XILULOSA-5-FOSFATO SINTASA* reduce la producción de aceite esencial de espliego

I. Mendoza-Poudereux<sup>1</sup>, J.P Bracho<sup>1</sup>, J. Muñoz-Bertomeu<sup>1</sup>, J. Segura<sup>1</sup> e I. Arrillaga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, ERI Biotec/Med, Facultad de Farmacia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n -46100-Burjasot-Valencia. isabel.mendoza@uv.es

Los monoterpenos son los constituyentes principales del aceite esencial de espliego (*Lavandula latifolia* Med). En esta especie, las unidades C5 (IPP y DMAPP), básicas para la biosíntesis de monoterpenos son producidas principalmente a través de la ruta MEP (plastidial) de síntesis de terpenos. Hemos demostrado anteriormente que la sobreexpresión de la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS), que cataliza el primer paso de la ruta MEP, aumenta la producción de monoterpenos sin por ello alterar el perfil del aceite esencial en el espliego (Plant Physiol 171: 1564-1570, 2006). Sin embargo, la sobreexpresión de la limoneno o linalol sintasa (LS o LIS, respectivamente; Metab Eng 10: 166-177, 2008; Metab Eng 23: 136-144, 2014) altera el perfil de monoterpenos al aumentar el contenido de limoneno o linalol en hojas jóvenes. En un intento de aumentar la producción de aceite esencial y al mismo tiempo alterar el perfil de monoterpenos, obtuvimos, por polinización cruzada, plantas transgénicas que contienen los transgenes *DXS* y *LIS*. Sin embargo, el rendimiento de aceite esencial y el contenido linalol en estas doble transgénicas eran más bajos que los de sus parentales (Metab Eng 23: 136-144, 2014).

En este trabajo presentamos la caracterización molecular y fenotípica de 3 plantas de espliego transgénicas para los genes *DXS* y *LS*. Los análisis mediante RT-PCR muestran una reducción significativa en la expresión del gen *DXS* en las plantas *DXS-LS*, en comparación con la línea parental *DXS6*. En consecuencia, las plantas *DXS-LS* tienen un menor contenido de aceite esencial total y de limoneno que los de la *DXS6* parental, especialmente en una de las líneas, lo que podría ser debido a la cosupresión ligada a las estructuras de las construcciones utilizadas y que concuerda con lo obtenido en líneas *DXS-LIS* (Metab Eng 23: 136-144, 2014).

Trabajo financiado por la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052).





## ***SESIÓN TEMÁTICA***

### **II. CULTIVO IN VITRO EN MEJORA VEGETAL**



## Estrategias biotecnológicas para el control del Huanglongbing de los cítricos

Leandro Peña<sup>1,2</sup>, Berta Alquézar<sup>2</sup>, Ana Rodríguez<sup>2</sup>, Elsa Pons<sup>2</sup>, Josep E. Peris<sup>2</sup>, Viviani V. Marques<sup>1</sup>, Mateus A. Santos<sup>1</sup>, Rodrigo F. Magnani<sup>1</sup>, André G.C. Signoretti<sup>1</sup>, Marcelo P. de Miranda<sup>1</sup>, Nelson A. Wulff<sup>1</sup>, A. Juliano Ayres<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), Av. Dr. Adhemar de Barros Pereira, 201, 14807-040 Vila Melhado, Araraquara, Sao Paulo, Brazil. Email: lpenya@fundecitrus.com.br

<sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad Politécnica de Valencia (UPV). Av. Ingeniero Fausto Elio, s/n, Ciudad de la Innovación. Ed. E8. Pt. 0. Esc. G. 46022 Valencia, Spain. Email: lpenya@ibmcp.upv.es

La citricultura mundial se encuentra seriamente amenazada hoy en día por una enfermedad que, a diferencia de otras enfermedades graves de los cítricos, no se puede controlar a medio plazo ni mediante programas de erradicación, ni mediante el uso de agresivos tratamientos insecticidas, ni mediante excelentes prácticas viverísticas. Aunque todo ello resulta esencial en estos momentos para poder mitigar los efectos de la enfermedad, son medidas muy recomendables a corto plazo, pero resulta prácticamente imposible la convivencia a medio-largo plazo entre una citricultura rentable y a la vez respetuosa con el ambiente y la presencia endémica del Huanglongbing (HLB).

En los últimos diez años, el HLB más agresivo (inducido por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, transmitida por el insecto *Diaphorina citri*) ha pasado de ser una enfermedad prácticamente restringida a ciertas partes de China y el Sudeste asiático, a aparecer y difundirse rápidamente por casi todo el continente americano y la península arábiga. Donde el HLB estaba presente en Asia, ha sido imposible el desarrollo de una industria citrícola. En América, el HLB golpea y sigue amenazando actualmente de forma muy grave a las más importantes citriculturas del mundo. Recientemente se ha detectado en Galicia y norte de Portugal el insecto *Trioza erytrae*, vector que transmite el HLB africano, inducido por *Candidatus Liberibacter africanus*. Aunque el HLB africano no es tan agresivo como el asiático, también se trata de una enfermedad importante. Además, en condiciones apropiadas, *Trioza erytrae* puede ser vector de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

En este caso, no valen los tratamientos paliativos o la sustitución de unos genotipos o por otros. La única forma eficaz, de largo plazo, de hacer frente a HLB es

consiguiendo obtener plantas resistentes/tolerantes a la bacteria y/o a su insecto vector. A pesar de los muchísimos estudios realizados, no se ha encontrado en el germoplasma de cítricos ninguna fuente de resistencia genética a esta enfermedad. Por lo tanto, resulta imposible conseguir resistencia mediante la generación de nuevos genotipos por mejora genética clásica, mediante cruzamientos. Además, las particulares características genéticas y reproductivas de los cítricos harían esto extraordinariamente difícil en caso de que se encontrase en el futuro una fuente de resistencia en géneros sexualmente compatibles.

Creemos que la única vía duradera y sostenible a medio plazo para lograr resistencia al HLB consiste en incorporar resistencia genética en aquellas variedades y portainjertos cítricos que se pretende proteger. En cítricos, la única vía de mejora dirigida de genotipos bien conocidos sin alterar su fondo genético es la ingeniería genética, es decir la incorporación de caracteres únicos de mejora en variedades o portainjertos de élite. Presentaremos aquí las estrategias biotecnológicas planteadas y los resultados más recientes de los esfuerzos realizados en este sentido a través de la colaboración entre los equipos de biotecnología de cítricos de Fundecitrus (Brasil) y del IBMCP-UPV (España).

## **Regeneración de plantas doble haploides a partir de callos derivados de cultivo de microsporas**

A. Rivas-Sendra\*, P. Corral-Martínez, C. Camacho-Fernández y J.M. Seguí-Simarro

Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n 46022 (Valencia)

\*alriis@upv.es

La producción de haploides y dobles haploides (DHs) androgénicos permite la obtención rápida y económica de líneas puras para mejora genética. En berenjena, el cultivo de microsporas aisladas ha demostrado ser mucho más eficiente que el cultivo de anteras. Sin embargo, todavía no es posible obtener embriones maduros, listos para germinar. Tras un desarrollo inicial de los embriones, estos se transforman en callos. Por ello, la obtención de DHs pasa por la regeneración de plantas a partir de estos callos mediante organogénesis. En este contexto, este trabajo aborda uno de los principales pasos limitantes que impiden la producción eficiente de haploides y DHs de berenjena: la regeneración de DHs a partir de callos obtenidos en cultivo de microsporas.

Tras probar diferentes medios usados previamente para regenerar callos de berenjena a partir de explantes de diferentes orígenes, nuestros resultados apuntan claramente al subcultivo de los brotes en medio MS basal sin sacarosa ni reguladores de crecimiento, tras inducir el desarrollo organogénico en medio suplementado con ácido indolacético y zeatina (Miyoshi, 1996). De esta forma conseguimos promover el desarrollo de órganos sanos y el enraizamiento de los brotes y, por lo tanto, la formación de plantas completas. La ploidía de las plantas regenerantes fue analizada con citometría de flujo, y el 75% de ellas resultaron ser haploides o DHs.

En conclusión, el protocolo desarrollado en este trabajo proporcionó una eficiencia de 7.6 plantas regeneradas de cada 100 callos transferidos a medio sólido, con un procedimiento simple y de costes reducidos, ya que la adición de reguladores de crecimiento únicamente es necesaria al comienzo del proceso. Este resultado representa una importante mejora respecto a los estudios previos que existen sobre regeneración de plantas a partir de callos derivados de cultivo de microsporas de berenjena, en los que se obtuvo una eficiencia de 0.1-2%.

## Optimización de la ginogénesis en germoplasma español de cebolla

O. Fayos<sup>1</sup>, M.P. Vallés<sup>2</sup>, A. Garcés-Claver<sup>1</sup>, C. Mallor<sup>1</sup>, A.M. Castillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Hortofruticultura, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Avda Montañana 930, 50059 Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Departamento de Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza, España.

Mediante la ginogénesis *in vitro* se pueden obtener plantas de cebolla doblehaploides (DH), facilitándose así la producción de híbridos estables y de gran vigor. El objetivo del presente trabajo es aumentar las frecuencias de inducción de la ginogénesis y la obtención de plantas DH de cebolla. Se utilizaron tres cultivares españoles: Fuentes de Ebro, seleccionado por su baja pungencia, BGHZ1354 y Recas, ambos de alta pungencia, y como control la población sintética OH-1, caracterizada por su alta capacidad ginogenética. Las flores se cultivaron según los protocolos descritos por Jakše y Bohanec (2003) (protocolo A) y por Michalik y col. (2000) (protocolo B). Se obtuvieron embriones de todos los cultivares, siendo las frecuencias de embriogénesis variables en función del cultivar y del protocolo ensayado. En el germoplasma español el protocolo B dio lugar a porcentajes de inducción de ginogénesis hasta tres veces mayores que el protocolo A. Los cultivares Fuentes de Ebro y BGHZ1354 produjeron los porcentajes más bajos y más altos de ginogénesis, respectivamente. Sin embargo, se obtuvieron frecuencias similares con los dos protocolos en la población OH-1 (Fayos y col., 2015). Con los embriones obtenidos de OH-1 se ensayaron contenedores con diferentes niveles de aireación, para mejorar las frecuencias de regeneración. Los menores porcentajes de plantas hiperhidratadas y los mayores porcentajes de plantas aclimatadas se obtuvieron con el protocolo B y las cajas Eco2Box. Los embriones obtenidos se trataron con aminoprosfometil para la duplicación cromosómica, obteniéndose plantas haploides, DH y mixoploides. Como método alternativo de duplicación cromosómica, se utilizó con éxito la embriogénesis somática a partir de las flores de las plantas haploides y mixoploides (Jakše y col., 2010), obteniéndose plantas DH de todas las líneas regeneradas. Los porcentajes de duplicación dependieron del genotipo, alcanzándose hasta un 88% en una de las líneas del cultivar BGHZ1354 (Fayos y col., 2015).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) (RTA2011-00118-C02-00), por un Convenio CITA-CSIC y por el Gobierno de Aragón (GrupoA16 y A06). O Fayos es beneficiaria de una beca pre-doctoral del INIA.

Referencias:

- Fayos O, Vallés MP, Garcés-Claver A, Mallor C, Castillo AM (2015). *Front Plant Sci* 384 (6):1-11.
- Jakše M Bohanec B (2003). En: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled haploid production in crop plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London, pp 281-285.
- Jakše M, Hirschegger P, Bohanec B, Havey MJ (2010). *J Amer Soc Hort Sci* 135:67–73.
- Michalik B, Adamus A, Nowak E (2000). *J Plant Physiol* 156(2):211-216.

## Comparación de seis métodos diferentes para calcular la densidad celular en cultivo de microsporas

C. Camacho-Fernández<sup>1</sup>, \*, D. Hervás<sup>2</sup>, A. Rivas-Sendra<sup>1</sup>, A.M. Romero<sup>2</sup>, M.P. Marín<sup>2</sup> y J.M. Seguí-Simarro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n, 46022 (Valencia)

<sup>2</sup> Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Av. Fernando Abril Martorell 106, 46026 (Valencia)

\*cacafer@posgrado.upv.es

Para el cultivo *in vitro* de células vegetales, uno de los primeros pasos es ajustar la densidad inicial de células. Para los cultivos de microsporas aisladas, se han de determinar densidades o rangos de densidades óptimas que permitan la inducción de androgénesis, y fuera de los cuales no hay inducción o la hay con una frecuencia muy baja.

Para el ajuste de densidades celulares se suelen utilizar cámaras de recuento, como la cámara de Neubauer, pero no hay muchos estudios que definan la precisión y exactitud de este método. En el presente estudio se evaluó la precisión y exactitud de seis métodos para calcular la densidad celular: (i) Un contador automático que realiza un análisis de imagen para determinar la densidad celular, (ii) un conteo manual por campos, a partir de imágenes tomadas al microscopio, (iii) una cámara de recuento (hemacitómetro) y (iv) un citómetro de flujo, en el que se tomaron datos de autofluorescencia de las células sin teñir, de fluorescencia de las células teñidas con yoduro de propidio y de dispersión lateral de la luz (SSC). Nuestros resultados señalan que, a pesar de su facilidad, bajo coste y amplio uso, el hemacitómetro no es un método fiable y preciso. Su uso, por lo tanto, es poco recomendable. Los contadores automáticos representan un buen compromiso entre precisión, exactitud y coste. Sin embargo, el método más fiable, reproducible y preciso es con diferencia la detección y conteo de células por citometría, aunque también es el más caro. Dentro de los métodos basados en la citometría, la medida de SSC fue la elegida por presentar las características antes mencionadas, y evitar además la necesidad de teñir la muestra. Por ello, fue el método utilizado para ensayar diferentes densidades celulares en cultivos de microsporas de berenjena para mejorar la eficiencia del protocolo.

## Estudios previos al desarrollo de un protocolo de inducción de androgénesis en *Cannabis sativa* L.

A. Galán-Avila\* y J.M. Seguí-Simarro

Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n 46022 (Valencia)

\*algaav@upvnet.upv.es

En general, los mayores rendimientos en horticultura intensiva se dan mediante el uso de híbridos entre líneas homocigotas (puras) con los caracteres deseados. Como alternativa a las técnicas clásicas de autofecundación y selección, se pueden generar también líneas puras mediante la tecnología de los dobles haploides, derivados de microsporas (haploides) reprogramadas hacia embriogénesis. Este proceso reduce la creación de líneas puras a una sola generación, lo que supone un enorme ahorro de tiempo y de recursos económicos. Estas ventajas hacen que este abordaje tenga un enorme interés para las empresas del sector, que ya lo utilizan en aquellos cultivos en los que es posible su aplicación. Sin embargo, hay cultivos en los que esto todavía no es posible, por no disponerse aún de protocolos eficientes para inducir este proceso. Uno de estos cultivos es el cáñamo (*Cannabis sativa* L.), especie de gran importancia industrial y farmacológica, pero en la que todavía no es posible inducir este cambio de programa de desarrollo. En el marco de un proyecto que pretende poner a punto las condiciones que permitan obtener individuos dobles haploides androgénicos en cáñamo, en este estudio analizamos una serie de aspectos previos a la inducción en sí, pero que tienen un peso determinante en el éxito de dicha inducción. En concreto, se estudió la correlación que existe entre el estadio de la microspora/polen y el tamaño de la antera durante la microsporogénesis y la microgametogénesis en distintas variedades, estableciendo una relación entre la longitud de las flores estaminadas y las etapas idóneas para aislar las anteras. Además, examinamos el contenido en almidón de las microsporas en diferentes etapas, como posible marcador de recalcitrancia a la inducción y aplicamos un tratamiento de reversión sexual para aumentar el número de flores estaminadas en variedades monoicas donde abundan las flores femeninas.

## **Efecto de la composición salina del medio de cultivo y la temperatura en las etapas de micropropagación y enraizamiento *in vitro* de *Citrus macrophylla***

Vicente Vives-Peris<sup>1</sup>, Rosa M. Pérez-Clemente<sup>1</sup> y Aurelio Gómez-Cadenas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Universitat Jaume I. Avda. Sos Baynat s/n, 12071, Castellón de la Plana, Spain

El portainjerto de cítricos *Citrus macrophylla* es uno de los más empleados para limonero debido a los beneficios que confiere a la variedad. No obstante, la baja disponibilidad de semillas manifiesta la necesidad de emplear métodos alternativos, no solo para la propagación a escala comercial sino para llevar a cabo a estudios básicos relacionados con su fisiología, por lo que el establecimiento de protocolos de propagación utilizando técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es de gran interés. En este trabajo se determinó la importancia de la composición salina del medio de cultivo y de la temperatura en las fases de micropropagación y enraizamiento *in vitro*. La micropropagación se llevó a cabo en medio suplementado con BAP y GA<sub>3</sub>, con sales de Murashige y Skoog (MS), o de Quoirin y Le Poivre (QL). El material vegetal se mantuvo a 25 o 28°C. Los brotes aislados se enraizaron en medio suplementado con ANA y GA<sub>3</sub> (0.1 y 2 mg/L respectivamente). Los resultados mostraron que los brotes micropropagados a 25°C estuvieron más cloróticos que los cultivados a 28°C, viéndose un mayor contenido de clorofilas en los cultivados en medio MS a 28°C. Además, la tasa de propagación fue mayor en los brotes cultivados con sales MS que en los micropropagados con sales QL, siendo mayor en los cultivados a 28°C. Paralelamente, la longitud de los brotes también fue mayor en los micropropagados con sales MS a 28°C. En el enraizamiento, los brotes enraizados en medio MS produjeron mayor cantidad de raíces, pero más cortas que las cultivadas en medio QL. Además, los cultivados a 28°C dieron una mayor cantidad de raíces de mayor longitud.

Agradecimientos: Trabajo financiado por la Universitat Jaume I a través del proyecto P11B2012-06. VV-P ha sido financiado por un contrato predoctoral FPI de la Universitat Jaume I.

## **Efecto de la iluminación LED en la propagación *in vitro* de *P. terebinthus* L, *Fragraria x ananassa* Duch, *Rosa* sp. y *Allium sativum*.**

I Imbroda, A. Cabeza, A. Barceló Muñoz e IMG Padilla  
Laboratorio de cultivo *in vitro* y biotecnología  
IFAPA Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga

Los tubos fluorescentes con luz fría son el sistema más ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, pero conlleva unos altos costes en consumo eléctrico, pierden intensidad con el tiempo y aportan calor. Las lámparas de diodo (LEDES) se han incorporado al cultivo *in vitro* debido a su eficiencia eléctrica, reduciendo costes y manteniendo la intensidad en el tiempo.

El espectro lumínico de las luces LEDES parece afectar a los cultivos de forma diferencial. Por ello, en este trabajo se estudia el efecto del uso de las luces LEDES como fuente de luz alternativa en el crecimiento y desarrollo de brotes *in vitro* de: *Pistacia terebinthus*, *Fragaria x ananassa* cv “Chandler”, *Rosa* sp y *Allium sativum*. Durante cinco subcultivos, brotes de *Pistacia*, *Fragaria* y *Rosa* se mantuvieron en sus respectivos medios de proliferación a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  y 16 horas de fotoperiodo. Se comparó un sistema de luz compuesto por tubos fluorescentes Grolux, y dos sistemas de dispositivos LEDES, uno emite luz blanca y el otro una mezcla de luz blanca y roja (7:3). En cada subcultivo se tomaron datos de longitud del brote principal y número y longitud de los brotes axilares. En el tercer subcultivo se tomaron muestras de hojas para evaluar el contenido en clorofilas y carotenos de las mismas, y en el cuarto subcultivo se tomaron datos de peso fresco y seco. En *Allium* se comparó la multiplicación del material bajo lámparas Grolux frente a las mantenidas en luces LEDES blancas. Se tomaron datos durante tres subcultivos sucesivos.

Se observó una respuesta diferencial en el crecimiento y desarrollo de los brotes de todas las especies, con mayores tasas de crecimiento, multiplicación y desarrollo de los brotes con luces LEDES.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado con fondos INIA-FEDER (proyectos RTA2010-00013-C02-01; RF2012-00002-C02-00).



## Micropropagación del pistacho: una alternativa a los sistemas convencionales de propagación

M. Y. González-Padrón; I. Imbroda; M. Barceló Muñoz; I. M.G. Padilla; A. Barceló-Muñoz

Laboratorio de cultivo in vitro y biotecnología.

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

El cultivo del pistachero está en auge en los últimos años en España, con un gran incremento de superficie cultivada. Se trata de un cultivo que se adapta a grandes superficies de nuestro territorio y que se complementa con otros cultivos como el olivar o el almendro.

El portainjerto más empleado en España es el terebinto o “cornicabra” (*Pistacia terebinthus* L.). El vigor de este pie es menor que el de otras especies del género, también utilizadas como patrones del pistachero, pero es el más rústico y resistente a caliza, frío y sequía.

A pesar del gran interés, existe un desequilibrio entre la gran demanda de plantas de pistacho y la reducida oferta y alto coste actual, debido principalmente a la dificultad del injerto en esta especie. Para abordar esta problemática, estamos trabajando en la selección de material, por caracteres de interés para el injerto, en el desarrollo de protocolos de micropropagación, como sistema de clonación del portainjerto, y en el mini-injerto en invernadero, como alternativa a los sistemas convencionales de propagación.

En esta Reunión se presenta el estado actual del protocolo de propagación *in vitro* de terebinto, tanto en fase juvenil como adulta. En las fases de inicio y multiplicación se han solventado las mayores dificultades descritas en la bibliografía en esta especie: la contaminación, producción de exudados, necrosis apical y producción de callo. Actualmente, se trabaja en la mejora de las fases de enraizamiento y aclimatación.

### Agradecimientos

M. Y. González Padrón posee una beca predoctoral del INIA. Este trabajo ha sido financiado con fondos INIA-FEDER (proyecto RTA2010-00013-C02-01).

## Introducción in vitro de *Pistacia* spp a partir de material juvenil y de árboles adultos

N. Ramírez-Martín<sup>1</sup>, M. Nisa<sup>1</sup>, P. García Estríngana<sup>1</sup>, F. Molina<sup>2</sup> y J. Alegre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín. Ctra N-II km 38,200. 28800 Alcalá de Henares (Madrid) <sup>2</sup>Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA) C/ Alcalá 16, 1ª planta. 28014 Madrid

En España comenzó a ponerse atención en el pistachero (*Pistacia vera* L.) en los años 80, y en la última década se ha consolidado como un cultivo alternativo que ocupa ya más de 6.000 ha. El patrón más utilizado en el cultivo del pistacho es la cornicabra (*P. terebinthus* L) propagada por semilla, un material heterogéneo y generalmente poco vigoroso. La clonación de cornicabras seleccionadas permitiría mejorar el cultivo. Sin embargo en las especies del género *Pistacia* la propagación por estacilla es inviable y las técnicas de cultivo in vitro presentan dificultades desde la fase de iniciación del cultivo (Onay, 2000; García et al. 2010). Los cultivos se iniciaron empleando segmentos terminales y nodales tomados en plantas de diferentes especies de *Pistacia*, con diferentes edades y en diferentes momentos del año. En *P. terebinthus* se emplearon brinzales de 1 y 2 años, brotes de cepa y brotes terminales tomados de la copa árboles adultos. En *P. atlantica*, *P. integerrima* y UCB1 se emplearon estacas de madera en las que se forzó la brotación, brotes de cepa y brotes terminales tomados de la copa de los árboles. Los resultados fueron muy dependientes del genotipo y de la metodología empleada. Se logró el establecimiento en cultivo tanto con material juvenil como con material adulto, siendo crucial el empleo de antioxidantes antes de la desinfección superficial del material. A partir de estacas de madera sólo se lograron establecer cultivos en un genotipo de UCB1. En las tres especies en las que se utilizó este sistema la brotación de las estacas fue muy pobre, y los brotes emitidos presentaron grandes problemas de fenolización y contaminación. Se establecieron cultivos de cornicabra a partir de brotes de cepa y de la copa de árboles adultos utilizando antioxidantes y el método de tindalización en la desinfección. Financiación: proyecto IMIDRA FP15-PCH.

### Referencias

- Onay (2000) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 60: 159–162  
 García et al. (2010) ITEA 106: 294-302

## Regeneración de plantas de encina por vía organogénica

N. Ramírez-Martín, M. Ruiz Galea, J. Alegre y M. Toribio

IMIDRA. Finca “El Encín”. Apdo. postal 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

La encina (*Quercus ilex* L.) es una de las especies arbóreas más importantes de la dehesa, por lo que tiene gran interés ecológico y económico. Se considera muy recalcitrante a la propagación vegetativa, y en particular a la regeneración de plantas por vía organogénica (Liñán et al 2011). Aunque se ha descrito la regeneración de plantas siguiendo la vía embriogénica, incluso a partir de tejidos de árboles adultos (Barra-Jiménez et al 2014), la regeneración por vía organogénica tiene interés como medio para incrementar la producción de planta, y resolver cuellos de botella como la aclimatación de las mismas.

En el presente estudio se determina el efecto de la concentración de una citoquinina (BA, 0.89 y 4.44  $\mu\text{M}$ ) combinada con dos auxinas (IAA y NAA) en relación 10:1 sobre la producción de brotes axilares, y del tiempo de tratamiento con IBA (122.5  $\mu\text{M}$ ) sobre la frecuencia de enraizamiento y aclimatación de dichos brotes. El material de partida fueron epicótilos de embriones cigóticos germinados *in vitro*. Las determinaciones sobre proliferación se realizaron con dos genotipos y las de enraizamiento y aclimatación con uno de ellos. El medio base fue GD.

La proliferación estuvo muy condicionada por el genotipo, obteniéndose mejores respuestas con la concentración más baja de BA, sobre todo cuando se combinó con IAA. La duración del tratamiento con IBA (48 vs 24 h) determinó la frecuencia de enraizamiento (86 vs 65 %), pero sobre todo la de aclimatación (0 vs 33 %) de las plantas regeneradas.

Financiación: proyecto nacional AGL2013-47400-C4-1R.

### Referencias

Barra-Jiménez et al (2014) *Trees* 28: 657-667. DOI 10.1007/s00468-014-0979-0  
Liñán et al (2011) *Cent. Eur. J. Biol.* 6: 359-364. DOI: 10.2478/s11535-011-0007-y

## Micropropagación de árboles adultos de encina mediante la multiplicación de brotes axilares y vía inducción de embriogénesis somática

M. T. Martínez, M. C. San José, E. Corredoira, F. J. Vieitez, M. J. Cernadas, R. Montenegro, A. M. Vieitez

Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC), Avd. de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña.

email: temar@iiag.csic.es

La encina, *Quercus ilex L.*, una de las Fagáceas más representativas del bosque Mediterráneo, sufre un decaimiento progresivo, debido entre otras causas, a la enfermedad conocida como “la seca”. Esta problemática ha provocado una reducción de sus masas forestales originando un problema ambiental grave que amenaza su sostenibilidad.

El objetivo del trabajo es el establecimiento y mantenimiento *in vitro* de cultivos de encina, mediante la proliferación de yemas axilares y posterior utilización de hojas y ápices de los brotes micropropagados como explantos iniciales para inducir embriones somáticos (ES), como vía eficaz para la multiplicación rápida de individuos seleccionados.

Se han recogido estacas (25-30 cm) de la copa de ocho encinas seleccionadas en Quintos de Mora (Toledo), genotipos Q2, Q3, Q6, Q7, Q8 y Q10 y en el Encín (Alcalá de Henares), genotipos E00 y E2. Las estacas se trataron con fungicida y se sometieron a brotación forzada en condiciones controladas. Los nuevos brotes se esterilizaron con aplicación sucesiva de etanol de 70% y diferentes concentraciones/tiempos de hipoclorito sódico; seguidamente se seccionaron segmentos nodales que fueron establecidos *in vitro*. El proceso de esterilización fue crítico, siendo necesario la eliminación del etanol y el uso de concentraciones/tiempos bajos de hipoclorito (0.3% de cloro libre 2-3 min.) para conseguir el crecimiento *in vitro* de estos genotipos. Las tasas de contaminación oscilaron entre 0-8%. Según el genotipo, entre 11-70% de los explantos respondieron positivamente formando brotes.

La estabilización de los cultivos se ha logrado en seis de los ocho genotipos seleccionados permitiéndonos utilizarlos como fuente de explantos para la inducción embriogénica. Los primeros estudios realizados con material del Q3 y Q10 mostraron la posibilidad de inducir ES en ápices caulinares cultivados en medios

## SII-P10

sin reguladores de crecimiento o adicionados con AIA o ANA en combinación con BA, con tasas del 2-4% de inducción.

Se agradece al Dr. M. Toribio el suministro del material vegetal utilizado en este trabajo.

Este trabajo fue parcialmente financiado por el MINECO (España) mediante el proyecto AGL 2013-47400-C4-3R.



## **Maduración de embriones somáticos de pino piñonero: efecto de la temperatura durante la proliferación y del suplemento de sacáridos durante la maduración**

N. González-Cabrero, D. López-Vela, M. Toribio y C. Celestino

IMIDRA. Finca “El Encín”. Apdo. postal 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

En la regeneración de plantas de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) mediante embriogénesis somática (Carneros et al. 2009) se ha observado que al aumentar el tiempo en cultivo se produce una disminución en la capacidad para formar embriones maduros con morfología normal. Los sacáridos influyen mediante diferentes acciones en la maduración de embriones (Lipavská & Konrádová 2004) y la temperatura puede tener un efecto regulador de la vía embriogénica (Prem et al. 2012). Se planteó mejorar la obtención de embriones cotiledonares normales en líneas embriogénicas establecidas en 2005 (1F11), 2006 (2F47) y 2011 (1F62, 5F62), mediante la disminución de la temperatura durante la proliferación o el suplemento de diferentes sacáridos al medio de maduración. En el control, los cultivos se mantuvieron en proliferación a 23°C en presencia de 2,4-D y BA, efectuándose la maduración a la misma temperatura en el medio mLV2 (nutrientes de mLV, con 121 µM ABA, 60 g/l maltosa y 10 g/l Gelrite) previamente establecido. El efecto de baja temperatura durante la proliferación se estudió cultivando las masas embriogénicas a 18°C durante 18 semanas antes de la maduración. El efecto de la adición de sacáridos durante la maduración se evaluó suplementando el medio mLV2 con 15 g/l maltosa (mLV2-m), 15 g/l sacarosa (mLV2-s) ó 15 g/l mioinositol (mLV2-i). Para cada uno de los genotipos ensayados se determinó el número de embriones con morfología normal y anormal producidos tras 16 semanas en medio de maduración.

En conjunto, la proliferación a 18°C incrementó 3 veces la producción de embriones normales respecto de la proliferación a 23°C, observándose interacción con el genotipo. El suplemento de distintos sacáridos tuvo diferentes efectos. El mioinositol inhibió el crecimiento del tejido embriogénico y la maduración. En conjunto, en el medio mLV2-m se produjo 5.7 veces más embriones normales que en el control, observándose también interacción con el genotipo.

## Conservación de líneas embriogénicas de pino piñonero a distintas temperaturas

C. Sánchez-Díaz, N. González-Cabrero, D. López-Vela, M. Toribio y C. Celestino

IMIDRA. Finca “El Encín”. Apdo. postal 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

La conservación a largo plazo de material genético en nitrógeno líquido (NL) es una parte importante de los programas de mejora genética, sobre todo en biotecnologías basadas en la embriogénesis somática como sistema de regeneración clonal (Engelmann 2011). Con la criopreservación se preserva el potencial regenerativo de los cultivos mientras se realiza el testado de los clones en campo. Para conservar líneas embriogénicas de pino piñonero (*Pinus pinea* L.) se ha establecido un protocolo utilizando la mezcla 0.4M sorbitol-5% PSD (polietilenglicol-sacarosa-dimetilsulfoxido) como crioprotector, con un proceso controlado de enfriamiento lento a  $-80^{\circ}\text{C}$  previo a la inmersión en NL. Para evitar las dificultades inherentes al almacenamiento en tanques criogénicos con NL, como la frecuente reposición del NL, se ha descrito el almacenamiento en ultra-congelador a  $-150^{\circ}\text{C}$  (Álvarez et al 2012) y a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Barra-Jiménez et al 2015). En este estudio se plantea la posibilidad de conservar a medio plazo cultivos embriogénicos de pino piñonero en congelador a  $-25^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ . A fin de reducir la labor intensiva de los ciclos de subcultivo, también se ha evaluado el almacenamiento a corto plazo de los cultivos a  $4^{\circ}\text{C}$ , utilizando medios que incluyen ácido abscísico y altas concentraciones de sacarosa y gelificante. La capacidad de recuperación de los cultivos tratados con crioprotectores y almacenados durante 2 meses a  $-25^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , y de los cultivos mantenidos a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses, se midió a través del porcentaje de muestras que manifestaron crecimiento y del incremento relativo en peso fresco de las muestras recuperadas a lo largo de tres subcultivos bisemanales. Tras el almacenamiento, se observó en general un periodo de reposo de 2 semanas. Al término del ensayo en conjunto se recuperaron un 60% de las muestras almacenadas a  $-25^{\circ}\text{C}$ , un 19% las de  $-80^{\circ}\text{C}$  y un 46% las de  $4^{\circ}\text{C}$ . Se observó interacción con el genotipo.

## Desarrollo de embriones somáticos de vid (*Vitis vinifera* L.)

A. Medina<sup>1</sup>, G. Bernat<sup>1</sup>, T. San Pedro<sup>2</sup>, A. Yuste<sup>3</sup>, R. Peiró, C. Gisbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Ctra. Moncada a Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España.

<sup>3</sup>Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universitat Politècnica de València.

La vid es un cultivo de gran importancia a nivel mundial que utiliza clones que han sido seleccionados a lo largo de los años en base a su calidad y rendimiento. Como otros cultivos, la vid ve mermada su producción a consecuencia de distintos tipos de estreses entre los que destacan las virosis y los estreses de tipo abiótico. La técnica de la embriogénesis somática se ha utilizado en vid con el fin de sanear clones infectados con virus y es la metodología de regeneración que se utiliza para introducir distintas características de interés utilizando técnicas biotecnológicas. Sin embargo, en distintos trabajos publicados se puede observar que la tasa de conversión de embriones en plantas en muy baja. En este trabajo se han estudiado el posible efecto de la concentración del regulador tidiazuron (TDZ) utilizado para la inducción de la embriogénesis en el posterior desarrollo de los embriones. Se han utilizado embriones somáticos de las variedades: Cariñena, Crujidera, Esclafacherre, Garnacha, Garnacha peluda, Mencía, Negramoll, Pinot Meunier, Rossetti y Royal obtenidos siguiendo la metodología descrita en Peiró et al. (2015) utilizando el medio de inducción EIM2 al que se adicionó el regulador de crecimiento TDZ en una concentración de 0.9  $\mu\text{M}$  y a la mitad de concentración: 0.45  $\mu\text{M}$ . A los 20 días de la transferencia a tubos con medio MW se observó variabilidad en cuanto al porcentaje de embriones anómalos que presentaban las distintas variedades. A los 40 días de cultivo, algunos de estos embriones mostraron aspecto normal pero la mayoría detuvieron el desarrollo. Aunque con diferente efecto según la variedad, en promedio, una concentración 0.9  $\mu\text{M}$  de TDZ resultó más adecuada para el desarrollo de los embriones que una concentración de 0.45  $\mu\text{M}$  por lo que concluimos que esta concentración es suficiente para la inducción de los embriones pero no para su correcto desarrollo.

Peiró R., Gammoudi N., Yuste A., Olmos A. Gisbert C. (2015). Mature seeds for in vitro sanitation of the Grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.). Spanish Journal of Agricultural Research, 13(2), e1005, 7 páginas. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2015132-709>

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-00067-C04 cofinanciado con fondos FEDER.



## Crioconservación de embriones somáticos de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn

M.C. San José<sup>1</sup>, M.T. Martínez<sup>1</sup>, S. Valladares<sup>2</sup>, M.J. Cernadas<sup>1</sup>, R. Montenegro<sup>1</sup>, E. Corredoira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela

<sup>2</sup>BIOMIVA, Ctra M-501, vía de servicio de Vilaviciosa de Odón a Boadilla del Monte, Vilaviciosa de Odón, 28670 Madrid

La embriogénesis somática (ES) es actualmente uno de los principales métodos biotecnológicos para la propagación en masa de material vegetal y con un gran potencial en los programas de mejora genética. La combinación de la ES con la crioconservación de los cultivos embriogénicos puede evitar los efectos perjudiciales que se producirían durante el mantenimiento de los cultivos, como la contaminación, variación somaclonal o pérdida de la competencia embriogénica. El uso integrado de la embriogénesis somática y la crioconservación permitirá el almacenamiento a largo plazo y la recuperación de los clones obtenidos.

Grupos de embriones somáticos de *Alnus glutinosa* (2-5 mm) mantenidos en cultivo mediante embriogénesis secundaria fueron precultivados durante 3 días en medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad (MS1/2; Murashige y Skoog 1962) suplementado con 0.3 M de sacarosa y posteriormente tratados con una mezcla de 2M de glicerol y 0.4 M de sacarosa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los embriones somáticos fueron entonces deshidratados con la solución de vitrificación PVS2 (Sakai et al. 1990) durante distintos periodos de tiempo (0-90 min), obteniendo los mejores resultados cuando el PVS2 fue aplicado durante 60 min a 0°C. Después del tratamiento con PVS2 los embriones fueron directamente introducidos en los tanques con nitrógeno líquido a -196°C durante al menos 2 horas, descongelados en un baño de agua a 40°C durante 2 minutos y transferidos a MS1/2 con 0.1 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> benciladenina. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad durante una semana y posteriormente fueron transferidos a una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16h/8h. Los porcentajes de supervivencia obtenidos mediante esta técnica superan el 90% y no se observaron modificaciones en las plantas desarrolladas a partir de los embriones somáticos crioconservados.

Murashige T, Skoog F (1962) *Physiol. Plant.* 15: 473

Sakai et al. (1990) *Plant Cell Rep.* 9: 30

## **Mejora de la crioconservación de cultivos embriogénicos de olivo mediante tratamientos de precondicionamiento con sacarosa**

Fatiha Bradai y Carolina Sánchez Romero

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga

El éxito de la crioconservación está ligado en muchas ocasiones a la aplicación de tratamientos previos de acondicionamiento de los explantos. Una de las estrategias más utilizadas es el precultivo con altas concentraciones de sacarosa. Los efectos de este tipo de tratamientos parecen darse a diferentes niveles: 1) un efecto directo, induciendo una reducción del contenido hídrico o vitrificación por sí mismos, 2) un efecto protector, estabilizando proteínas y membranas celulares, y 3) un efecto a nivel fisiológico, induciendo distintos tipos de cambios.

La crioconservación de cultivos embriogénicos de olivo utilizando el método de vitrificación en gota sobre tiras de aluminio después de 30 minutos de incubación en PVS2 dio lugar a tasas de recuperación del cultivo que oscilaron entre el 0 y el 60%, dependiendo del genotipo.

Con el objetivo de mejorar los resultados obtenidos, se testó el efecto de un precultivo con distintas concentraciones de sacarosa durante diferentes periodos de tiempo. Dada la influencia que el método de cultivo había mostrado en experiencias anteriores, el experimento se llevó a cabo en medio líquido y medio sólido. El precultivo con alta concentración de sacarosa mejoró de forma significativa la recuperación del cultivo después de la crioconservación. Los mejores resultados se obtuvieron con explantos incubados 7 días en medio ECO sólido suplementado con sacarosa 0,2 M, con un 100% de los cultivos recuperados seis semanas después de la descongelación. El efecto de este tratamiento sobre la viabilidad celular después de la descongelación fue monitorizado mediante tinción con diacetato de fluoresceína.

## Conservación *in vitro* de germoplasma de vid

P. Muñoz<sup>1</sup>, T. San Pedro<sup>2</sup>, N. Martínez<sup>1</sup>, C. Gisbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad (COMAV-UPV), Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

<sup>2</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Ctra. Moncada a Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España.

La vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos frutales más importantes a nivel mundial que destaca por su alto valor económico consumiéndose como uva de mesa y utilizándose principalmente para la obtención de vino. La conservación de germoplasma de vid es de gran importancia para preservar la variabilidad genética y poder utilizarla con fines de mejora. En este sentido, el cultivo *in vitro* se presenta como una herramienta biotecnológica para la conservación ex situ de material vegetal saneado que permite el almacenamiento de un número elevado de plantas en un espacio reducido y en condiciones controladas. Este tipo de metodología requiere de la adecuación de medios y condiciones de cultivo que permitan minimizar el crecimiento sin causar daños fisiológicos. En este estudio se ha evaluado: 1) el crecimiento y desarrollo *in vitro* de 11 variedades de vid de uva blanca en el medio de cultivo MW (Peiró et al. 2015), 2) el efecto de reducir la concentración de sacarosa del medio a la mitad de concentración, en aquellas variedades que presentaban un buen ritmo de crecimiento en este medio y 3) la eliminación de la auxina del medio de cultivo en las variedades que presentaron formación de callo a nivel de la raíz. Las distintas variedades han mostrado variabilidad de crecimiento en medio MW. Con la reducción de la concentración de sacarosa se ha conseguido ralentizar el crecimiento: se ha reducido la altura, el número de hojas y desarrollo radicular. Similar ralentización se ha observado con la eliminación de la auxina del medio de cultivo en aquellas plantas que mostraron formación de callo que no se ha producido en estas condiciones. Tras este estudio se dispone de las condiciones adecuadas para conservar *in vitro* las 11 variedades de vid estudiadas.

Peiró R., Gammoudi N., Yuste A., Olmos A. Gisbert C. (2015). Mature seeds for *in vitro* sanitation of the Grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape (*Vitis vinifera* L.). Spanish Journal of Agricultural Research, 13(2), e1005, 7 páginas. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2015132-709>

Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-00067-C04 cofinanciado con fondos FEDER.

## Diferenciación de embriones somáticos de alcornoque en cultivos de masas proembriogénicas

L. García-Paredes, M. Nisa, N. Ramírez-Martín y J. Alegre

Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín. Ctra N-II km 38,200. 28800 Alcalá de Henares (Madrid)

El desarrollo de cultivos embriogénicos en medio líquido ha permitido desarrollar suspensiones de masas proembriogénicas (PEMs) que, en presencia de 2,4-D, proliferan sin diferenciar. Habitualmente la diferenciación de embriones somáticos en medio líquido se logra retirando la auxina y variando factores como la densidad del cultivo (Fujimura, 2014). En el alcornoque se han desarrollado suspensiones embriogénicas que en ausencia de reguladores proliferan en forma de PEMs. Las PEMs de alcornoque diferencian embriones en medio gelificado pero no se ha logrado que diferencien embriones en medio líquido, lo que dificulta el desarrollo de cultivos eficientes.

Mediante un ensayo factorial se estudiaron los efectos del tamaño de inóculo (41- 800  $\mu\text{m}$  y  $>800 \mu\text{m}$ ), la velocidad de agitación (40 rpm y 110 rpm) y la presencia de carbón activo (CA, 0  $\text{g l}^{-1}$  y 10  $\text{g l}^{-1}$ ) sobre la proliferación y la histodiferenciación en suspensiones de dos genotipos de alcornoque (ALM80 y TRG3). La densidad de inoculación fue de 8  $\text{g l}^{-1}$  y las condiciones de cultivo semejantes a las descritas por Alegre et al (2014).

La proliferación estuvo muy determinada por el genotipo y la velocidad de agitación. Para el conjunto de los tratamientos la biomasa final en el genotipo ALM80 (33,7  $\text{g l}^{-1}$ ) fue menor que en TRG3 (83,6  $\text{g l}^{-1}$ ) y a 40 rpm la biomasa final fue 4 veces menor que a 110 rpm (24,1  $\text{g l}^{-1}$  vs 96,2  $\text{g l}^{-1}$ ). Los efectos del tamaño de inóculo y el CA sobre la proliferación, aunque significativos, fueron mucho menores. El CA promovió la histodiferenciación dando lugar a estructuras esféricas, de bordes bien definidos y/o con acumulación de almidón. Sus efectos no fueron independientes del tamaño de inóculo, el genotipo y la velocidad de agitación. Sin embargo la presencia de CA no dio lugar en ningún caso a la formación de embriones corazón o torpedo.

Financiación: proyecto nacional AGL2013-47400-C4-1R.

Referencias:

Fujimura (2014) Plant Biotechnol. Rep. 8:23–28.

Alegre et al (2014) Proceedings of the Third International Conference of the IUFRO unit 2.09.02 108-111



## Inducción de embriogénesis somática en *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn

M. C. San José<sup>1</sup>, V. Cano<sup>1</sup>, M. T. Martínez<sup>1</sup>, S. Valladares<sup>2</sup>, M. J. Cernadas<sup>1</sup>, R. Montenegro<sup>1</sup>, E. Corredoira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. IIAG-CSIC. Avda de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela <sup>2</sup>Fundación Promiva, Ctra M-501, Vía de Servicio de Villaviciosa de Odón a Boadilla del Monte, Villaviciosa de Odón, 28670 Madrid

email: sanjose@iiag.csic.es

En los últimos años, las poblaciones de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. se han visto seriamente afectadas por el ataque del hongo *Phytophthora alni*, lo que ha causado la muerte de miles de ejemplares de aliso. La embriogénesis somática puede contribuir no sólo a la conservación y propagación en masa de genotipos resistentes/tolerantes, sino también a la obtención de árboles transformados con genes que puedan conferir algún tipo de tolerancia al hongo. El objetivo de este trabajo fue la inducción, por primera vez, de embriones somáticos en aliso común.

Para ello se recogieron frutos de árboles (20-25 años), en intervalos semanales, entre los meses de agosto y septiembre (1-6 semanas post-antesis, SPA). Los embriones cigóticos, una vez aislados, fueron esterilizados y cultivados en medio de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 0,5 mgL<sup>-1</sup> de benciladenina (BA) y 0,2-2 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Después de 4 semanas en oscuridad, los explantos fueron transferidos a luz en medio MS con 0,1 mgL<sup>-1</sup> BA donde se desarrollaron los primeros embriones somáticos. Los mayores porcentajes de inducción (16,6%) se obtuvieron con los embriones cigóticos recogidos durante la 3ª SPA y cultivados con 0,2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D + 0,5 mgL<sup>-1</sup> BA.

Las diferentes líneas embriogénicas establecidas se mantienen mediante embriogénesis secundaria en medio MS con los macronutrientes reducidos a la mitad (½MS) y adicionado con 0,1 mgL<sup>-1</sup> BA. Para la obtención de plantas, los embriones somáticos, en estado cotiledonar, se maduraron en medio ½MS suplementado con 30 gL<sup>-1</sup> de maltosa. Después de 5 semanas en medio de maduración, los embriones se transfirieron al medio de germinación que consistió en medio mineral WPM (Lloyd y McCown 1980) suplementado con 0,1 mgL<sup>-1</sup> BA y 0,1 mgL<sup>-1</sup> zeatina. En estas condiciones, se obtuvieron tasas del 20% de germinación y del 8% de conversión a planta.

Lloyd G, McCown BH (1980) Proc. Inter. Plant Propagator's Soc. 30: 421-427  
Murashige T, Skoog F (1962) Physiol. Plant. 15:473-497



## **Obtención de cíbridos de cítricos con diferentes combinaciones de los genomas mitocondriales y cloroplásticos mediante fusión de protoplastos y microinjerto *in vitro* de brotes, raíces y embriones**

Aleza P., García-Lor A., Juárez J., Navarro L.

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, Spain

La embriogénesis somática y posterior regeneración de plantas son procesos básicos en la hibridación somática mediante fusión de protoplastos. En muchos casos un número reducido de embriones se desarrollan normalmente y el número de plantas regeneradas es escaso. El desarrollo de metodologías que permitan aumentar la regeneración de plantas es de gran interés para mejorar la eficiencia de la hibridación somática mediante fusión de protoplastos. En este trabajo se explora la capacidad para la regeneración de plantas mediante microinjerto *in vitro* de raíces y embriones obtenidos a partir de la fusión eléctrica de protoplastos aislados de callos embriogénicos de mandarina Chios con protoplastos de mesófilo de hoja de clementina Clemenules y protoplastos de callo embriogénico de naranjo pigmentado Sanguinelli, respectivamente. Las plantas regeneradas se analizaron mediante citometría de flujo y con marcadores microsatélites e InDel. Se regeneraron un número elevado de cíbridos diploides y un cíbrido tetraploide que presentaron diferentes combinaciones entre los genomas mitocondriales y cloroplásticos.

## Métodos de selección *in vitro* de mutantes de mandarina ‘Fortune’ resistentes a *Alternaria alternata* pv. *citri*

F. Córdoba, D. Botias, I. Porras y O. Pérez-Tornero\*

Equipo de Citricultura, IMIDA. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

\*Email: olalla.perez@carm.es

Los cítricos son muy susceptibles de ser atacados por los hongos. En este sentido cabe mencionar por su importancia las infecciones fúngicas producidas por hongos pertenecientes al género *Alternaria* que dan lugar a la enfermedad denominada mancha marrón o ‘brown spot’. En los últimos años, en las plantaciones de mandarina ‘Fortune’ cada vez son más frecuentes y abundantes los daños de mancha marrón en las hojas y frutos de este cítrico, siendo una enfermedad destructiva desde el punto de vista comercial, ya que los frutos con una o más manchas se deprecian parcial o totalmente. El objetivo de este trabajo fue la puesta a punto de un método de selección *in vitro* de mutantes de mandarina ‘Fortune’ tolerantes a *Alternaria alternata* pv. *citri*. Este objetivo se abordó a través de dos vertientes: uso de diferentes concentraciones de un filtrado del cultivo del hongo (FCH) en el medio de cultivo o la aplicación de las micotoxinas producidas por el hongo. Los resultados obtenidos muestran que el FCH difunde desde el medio de cultivo a las células de los explantos y daña o llega a necrosar a las células. En explantos en proliferación, se pudo observar que tanto el número de brotes como la productividad disminuyeron significativamente con el aumento de la concentración de FCH y este aumento produjo un importante daño celular como se pudo observar con el aumento de las hojas dañadas y caídas y del porcentaje de ápices necrosados. En cuanto al uso de la micotoxina, no se obtuvieron resultados positivos cuando se añadió al medio de cultivo ni cuando se aplicó directamente a explantos en proliferación, sin embargo, la aplicación de 75 mg/l de micotoxina a hojas aisladas de explantos de mandarina ‘Fortune’ cultivados *in vitro*, produjo daños significativos en las hojas. El uso de FCH en el medio de cultivo y la aplicación de altas concentraciones de micotoxina a hojas aisladas de explantos de ‘Fortune’ podrían ser herramientas muy eficaces para la selección *in vitro* de plantas mutantes de ‘Fortune’ resistentes a *Alternaria alternata* pv. *citri*.

## Identificación de variantes somaclonales de interés para la mejora genética de olivo

Fatiha Bradai y Carolina Sánchez Romero

Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga

El olivo es uno de los cultivos de mayor importancia económica en los países de la cuenca mediterránea, lo que justifica el desarrollo de programas de mejora encaminados a resolver algunos de los problemas que limitan su producción y a adaptarse a las nuevas necesidades del cultivo, dirigidas al establecimiento de olivares más precoces y de menor longevidad que en el pasado. En los últimos años, distintas herramientas biotecnológicas han sido ensayadas en esta especie para mejorar el rendimiento de los programas de mejora convencionales. La variación somaclonal puede constituir una alternativa útil frente a otras más controvertidas y de difícil aplicación práctica en los países de la Unión Europea. El objetivo de este trabajo fue evaluar la aparición de fenotipos variantes de interés agronómico en plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática. Con este propósito, se regeneraron plantas de olivo a partir de líneas embriogénicas independientes mantenidas mediante subcultivos repetitivos durante diferentes periodos de tiempo. Tres años y medio después de su aclimatación, se llevó a cabo un análisis morfológico y biométrico de diferentes características relacionadas con el hábito de crecimiento y la reproducción.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto alteraciones morfológicas relacionadas con la estructura de la ramificación y la disposición del tallo principal. El análisis mediante diagrama de cajas de los datos biométricos permitió identificar individuos con valores atípicos y extremos de variables relacionadas con la forma de crecimiento. Distintas plantas procedentes de dos líneas embriogénicas florecieron precozmente, poniendo de manifiesto un acortamiento significativo del periodo juvenil. Aunque las flores desarrolladas presentaron distintas alteraciones estructurales, varias de ellas dieron lugar a frutos que maduraron normalmente.

Algunos de los variantes somaclonales identificados pueden ser de gran interés para su incorporación en los programas de mejora genética que en la actualidad se están llevando a cabo.

## Identificación de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en el desarrollo radicular

J. Sánchez<sup>1</sup>, A. Atarés<sup>1</sup>, M. Jáquez<sup>1</sup>, B. Pineda<sup>1</sup>, B. García-Sogo<sup>1</sup>, M.C. Bolarín<sup>2</sup>, F. Borja<sup>2</sup>, J.L. Quispe<sup>3</sup>, J. Capel<sup>3</sup>, R. Lozano<sup>3</sup> y V. Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, 46022 Valencia.

<sup>2</sup> Dpto. Biol. del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC, Apdo. 164, 30100 Murcia.

<sup>3</sup> Dpto. de Biol. Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

El conocimiento del desarrollo radicular podría contribuir a afrontar algunos de los desafíos que tiene la agricultura hoy en día: productividad sostenida en condiciones de estrés abiótico, uso más eficiente de fertilizantes y agua, etc. La detección de mutantes puede ser la mejor estrategia para identificar genes clave en el desarrollo radicular.

Tras el escrutinio de una colección de 689 líneas T-DNA de tomate, se han identificado cinco mutantes afectados en el enraizamiento. El mutante Tom-1317 tiene alterado el desarrollo radicular adventicio. El mutante Tom-1662 presenta necrosis de los meristemos apicales *in vivo* y no es capaz de formar raíces secundarias *in vitro*. En el mutante Tom-2576 el desarrollo de la raíz primaria se detiene tras la germinación de la semilla, pero puede seguir creciendo gracias a la emisión de raíces adventicias. Los mutantes Tom-1608 y Tom-1862 presentan alteraciones en el enraizamiento desde las primeras etapas de crecimiento y tienen dificultades también para el desarrollo de raíces adventicias.

Los análisis de segregación indican que los cinco mutantes están afectados en un único gen y son de tipo recesivo. Se ha hecho un estudio para determinar la existencia o no de co-segregación del fenotipo con un inserto con *nptII* funcional. Por último, se ha evaluado la respuesta de algunos de estos mutantes en medios con distintas auxinas, así como el desarrollo en condiciones de cultivo *in vivo*.

### Agradecimientos:

Los autores agradecen al MINECO la concesión del proyecto AGL2012-40150-C03-01, -02, -03, que ha sido cofinanciado con fondos FEDER. Jorge Sánchez y Marybel Jáquez agradecen a CONACYT y la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca.

Benito Pineda agradece al CSIC la concesión de un contrato JAE-doc cofinanciado por el FSE.

## Identificación de mutantes de tomate (*Solanum lycopersicum*) afectados en su tolerancia a la sequía

M. Jáquez<sup>1</sup>, J. Sánchez<sup>1</sup>, S. Sánchez<sup>1</sup>, Pineda, B<sup>1</sup>. García-Sogo<sup>1</sup>, M.C. Bolarín<sup>2</sup>, F. Borja<sup>2</sup>, R. Lozano<sup>3</sup>, V. Moreno<sup>1</sup> y A. Atarés<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, 46022 Valencia. <sup>2</sup> Dpto. Biol. del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS, CSIC, Apdo. 164, 30100 Murcia. <sup>3</sup> Dpto. de Biol. Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería.

La identificación de genes con efectos principales que determinan la tolerancia a estrés hídrico podría sentar las bases para emprender programas de mejora dirigidos a la obtención de plantas con mayor nivel de tolerancia en especies cultivadas. La mutagénesis insercional con T-DNA se ha convertido en una de las herramientas más eficaces para poder conocer cuáles son los genes clave que intervienen en este carácter. En el marco del proyecto que llevamos a cabo en colaboración con los grupos del Dr. Lozano (UAL, Almería) y la Dra. Bolarín (CEBAS, Murcia) se ha puesto a punto una nueva metodología que nos permite evaluar este carácter de forma rápida y eficaz. En este protocolo se parte de plantas de un mes crecidas en invernadero. Tras regar las macetas en el día 0 del tratamiento sólo se efectúan dos riegos, los días 10, 20 y 30 del tratamiento. Treinta días con tres ciclos de deshidratación-rehidratación se realizan diferentes medidas para analizar el desarrollo de las plantas. Tras un primer escrutinio a partir de plantas TG2 de 52 líneas T-DNA se ha identificado un mutante que presenta una clara sensibilidad a los procesos de déficit hídrico. Entre las plantas TG2 de la línea 1389 ET MM se podían observar dos fenotipos diferentes cuando el estrés hídrico era más agudo, plantas que se comportaban como el parental y plantas con una pérdida de turgencia evidente en las hojas. Tanto unas como otras eran capaces de recuperarse de forma similar cuando se regaban al final de cada ciclo. La segregación observada en esta línea nos hace pensar que se trata de una mutación recesiva controlada por un gen. Actualmente se está profundizando en el fenotipado y se está estudiando la existencia de cosegregación entre el gen que causa la mutación y un inserto de T-DNA.

### Agradecimientos:

Los autores agradecen al MINECO la concesión del proyecto AGL2012-40150-C03-01, -02, -03, que ha sido cofinanciado con fondos FEDER. Jorge Sánchez y Marybel Jáquez agradecen a CONACYT y a la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca. Benito Pineda agradece al CSIC la concesión de un contrato JAE-doc cofinanciado por el FSE.



## In vitro physiological responses to select new hybrid pear rootstocks tolerant iron chlorosis.

C.P. Mora<sup>1</sup>, E. Claveria<sup>1</sup>, L. Asín<sup>2</sup>, I. Iglesias<sup>2</sup>, P. Vilardell<sup>3</sup>, J. Bonany<sup>3</sup>, M.H. Simard<sup>4</sup>, F. Laurens<sup>4</sup>, R. Tolrà<sup>5</sup>, C. Poschenrieder<sup>5</sup>, R. Dolcet-Sanjuan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>IRTA, Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Campus UAB, Edifici CRAG, Bellaterra, E-08193, Spain.

<sup>2</sup>IRTA, Fruitcentre, PCiTAL, Parc de Gardeny, Edifici Fruitcentre, E-25003 Lleida, Spain.

<sup>3</sup>IRTA, Estació Experimental Agrícola Mas Badia, E-17134 La Tallada, Spain.

<sup>4</sup>INRA, UMR GenHort INRA – INH-UA, BP 60057, 49071 Beaucozé Cedex, France.

<sup>5</sup>Laboratori Fisiologia Vegetal, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma Barcelona, E- 08193 Bellaterra, Spain.

Key words: *Pyrus*, rootstocks, lime induced chlorosis, in vitro selection.

Physiological responses under *in vitro* culture conditions of different interspecific *Pyrus* hybrids were compared in this work. Hybrids derived from crosses between the INRA pear rootstock selection ‘Pyriam’ and four *Pyrus* species of the Mediterranean region, a *Pyrus communis* var. *cordata* (Desv.) Hook. f. hybrid, *P. amygdaliformis* Vill., *P. amygdaliformis* var. *persica* Bornme., and *P. elaeagrifolia* Pall., which are known for their tolerance to iron-chlorosis, drought, hot summers, sandy soil and various pests and diseases. These hybrids were cloned and rooted, and plantlets were used for their *in vitro* characterization as well as for their field evaluation after acclimation. Rooted plantlets were transferred to a paper bridge in a Magenta flask containing a liquid medium with 2  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$ -DTPA and 10 and 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Physiological responses were analyzed at four different times (0, 3, 7 and 28 days) during the *in vitro* assay. Chlorophyll level, phenolic acid exudation,  $\text{Fe}^{2+}$  reduction and medium pH were analyzed in each date. The responses of all clones, derived from the same inter-specific hybrid, were pooled together to analyze the results. Along the 4-week-long assay, and for both bicarbonate treatments, the leaf chlorophyll level for the clones derived from *P. amygdaliformis* and *Pyrus communis* var. *cordata* were similar, and always higher than those for clones derived from *P. elaeagrifolia*. These results are in accordance to what was previously observed in field plots, after grafting with a pear variety, as well as in previous *in vitro* assays. The same pattern was observed with the exudation of phenolic acids into the culture medium. During

the first two weeks of the in vitro assay, the exudation of phenolic acids was higher for *P. amygdaliformis* and *Pyrus communis* var. cordata, when the pH was buffered with 10mM bicarbonate. At the highest bicarbonate level, *P. amygdaliformis* also maintained the highest level of phenolic acids, while the other two species inverted their behavior. The ability to acidify the culture medium was only observed for the 10mM bicarbonate concentration, during the first week of culture, and only significantly for clones derived from the *Pyrus communis* var. cordata. When bicarbonate was at 20mM, none of the clones was able to lower the medium pH, and only the clones derived from the *Pyrus communis* var. cordata were able to maintain the pH to the initial level. After the 14 day of culture the pH decreased but never to the initial values. On the other hand, clones derived from *P. elaeagrifolia* showed a higher  $\text{Fe}^{3+}$  reduction activity than clones derived from *P. amygdaliformis* or *Pyrus communis* var. cordata. This was observed during the four weeks of assay and for both bicarbonate concentrations. While a higher ability to reduce iron at the root level should be related with a higher tolerance iron deficiency in calcareous soils, it might not be sufficient to have a higher availability of reduced iron in the leaf cells, and avoid the chlorosis symptoms. In consequence, shortening the assay to the first two weeks of culture and using a 10mM bicarbonate concentration seem to be sufficient to select the best adapted clones. Besides the leaf chlorophyll level, the exudation of phenolic acids and acidification of the culture medium, seem to be the best physiological responses to predict the tolerance to lime induced chlorosis.

Research funds: INIA RTA2012-00049; MICINN BFU2013-42839-R

## El análisis del mutante de tomate *dms-1310* revela defectos en la actividad del meristemo apical durante los primeros estadios del desarrollo de la planta

I. B. Pineda<sup>1</sup>, C. Ribelles<sup>1</sup>, S. Sánchez<sup>1</sup>, B. García-Sogo<sup>1</sup>, A. Atarés<sup>1</sup>, F. Martínez<sup>2</sup>, MC. Bolarín<sup>3</sup>, R. Lozano<sup>2</sup> y V. Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. 46022 Valencia. <sup>2</sup> Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería. <sup>3</sup> Dpto. Biol. del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC. Apdo. 164, 30100 Murcia.

El meristemo apical (SAM) es un pequeño domo de células indiferenciadas responsable de la arquitectura de la parte aérea de la planta. El SAM se caracteriza por un equilibrio entre la organogénesis (diferenciación) y el mantenimiento de la actividad meristemática. Estudios en *Arabidopsis* han revelado que para la normal actividad del SAM debe funcionar un circuito dinámico de retroalimentación entre los genes *CLAVATA* y *WUSCHEL*, aunque se requieren otros muchos genes para la funcionalidad del meristemo apical. La detección de mutantes de *Arabidopsis* con defectos en el SAM ha permitido identificar alguno de estos genes. Nosotros hemos encontrado diversos mutantes de tomate afectados en la integridad del SAM, entre los que destaca el mutante recesivo *dms-1310* (*disorder of shoot apical meristem on seedlings*). Este mutante exhibe defectos en el meristemo apical al inicio del desarrollo de la plántula, concretamente a partir del momento de la expansión de los cotiledones. Sin embargo, a los 25-35 días de la germinación, el mutante recupera la actividad meristemática, lo que permite el desarrollo de una planta que vegeta y se reproduce normalmente. Lo más atractivo es que, aunque las plantas mutantes que han recuperado el fenotipo silvestre nunca vuelven a tener defectos en la actividad de los meristemas, su progenie vuelve a exhibir alteraciones en el SAM en los primeros estadios de desarrollo. Con el fin de identificar el gen responsable del fenotipo mutante se ha obtenido la F2 del cruce entre el mutante y *Solanum pimpinellifolium*, toda vez que los análisis genéticos han determinado la ausencia de cosegregación entre la mutación y cualquier inserto de T-DNA. La identificación del gen alterado en el mutante *dms-1310* permitirá estudiar un nuevo mecanismo implicado en la funcionalidad del meristemo en los primeros estadios del desarrollo de la planta.

Agradecimientos: Los autores agradecen al MINECO la concesión del proyecto AGL2012-40150-C03-01-02, que ha sido cofinanciado con fondos FEDER. Benito Pineda agradece al CSIC la concesión de un contrato JAE-doc cofinanciado por el FSE.

## Caracterización de *lfs-2084*: un mutante dominante de tomate afectado en el cuajado de fruto

I. C. Ribelles<sup>1</sup>, B. García-Sogo<sup>1</sup>, A. Atarés<sup>1</sup>, R. Nieto<sup>2</sup>, MC. Bolarín<sup>3</sup>, T. Angosto<sup>2</sup>, R. Lozano<sup>2</sup>, V. Moreno<sup>1</sup> y B. Pineda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. UPV-CSIC. 46022 Valencia. <sup>2</sup>Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior, 04120 Almería. <sup>3</sup>Dpto. Biol. del Estrés y Patología Vegetal, CEBAS-CSIC. Apdo. 164, 30100 Murcia.

El cuajado representa la primera etapa del desarrollo de un fruto y depende del éxito de la polinización y de la fecundación (Gillaspi, 1993). Pese a que es un factor determinante en la producción de un cultivar, es muy poco lo que se sabe en torno a los genes que determinan la conversión del ovario en fruto. Existe un conocimiento aceptable sobre cómo las hormonas regulan el cuajado (de Jong et al, 2009) y se han descrito diversos genes que se activan o reprimen a lo largo de las primeras etapas del desarrollo del fruto (Wang et al, 2009), pero aún no se han identificado los que tienen un papel clave en este proceso. El análisis de mutantes afectados en la tasa de cuajado podría ser la mejor estrategia para lograr este propósito. Nosotros estamos utilizando nuestra colección de líneas T-DNA de tomate para identificar mutantes alterados en la tasa de cuajado. En esta comunicación presentamos la caracterización de un mutante dominante de tomate (*lfs-2084*; *lower fruit setting*) con menor tasa de cuajado. La progenie del cruce entre el mutante y el WT se ajusta a una segregación fenotípica 1M:1WT, acorde con lo esperado. La caracterización fenotípica indica que la arquitectura de las plantas mutantes es similar a la de las plantas WT, mientras que la tasa de cuajado es del 6-7% (35-40% en plantas WT). La viabilidad del polen de las plantas mutantes está afectada y el análisis de cosegregación parece indicar que la mutación es insercional. La identificación molecular de la mutación, actualmente en curso, permitirá avanzar en el conocimiento de la base genética que determina el cuajado del fruto de tomate.

### Referencias:

- Gillaspy G et al, 1993. *Plant Cell* 5: 1439-1451.  
de Jong M et al, 2009. *Journal of Experimental Botany* 60 (5): 1523-1532.  
Wang H et al, 2009. *Plant Cell* 21:1428-1452

Agradecimientos: Los autores agradecen al MINECO la concesión del proyecto AGL2012-40150-C03-01-02, que ha sido cofinanciado con fondos FEDER. Benito Pineda agradece al CSIC la concesión de un contrato JAE-doc cofinanciado por el FSE.

## Saneamiento de plantas de vid infectadas por virus

T. San Pedro<sup>1</sup>, N. Gammoudi<sup>2</sup>, R. Peiró<sup>3</sup>, F. Viana<sup>4</sup>, A. Olmos<sup>1</sup>, C. Gisbert<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Ctra. Moncada a Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España. <sup>2</sup>Arid and Oases Cropping Laboratory, Arid Lands Institute (IRA), Medenine 4119, Tunisia <sup>3</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España. <sup>4</sup>Fundación de la Comunidad Valenciana para la Investigación Agroalimentaria (AGROALIMED), Ctra. Moncada a Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España.

La transmisión de virus por multiplicación vegetativa es muy frecuente en vid (*Vitis vinifera* L.). Según la Directiva Europea 2005/43/EC, el material vegetal certificado de vid debe estar libre de los virus del entrenudo corto infeccioso (GFLV), virus del mosaico del arabis (ArMV), virus del enrollado 1 (GLRaV-1), virus del enrollado 3 (GLRaV-3) y virus del jaspeado (GFKV). En vid, el saneamiento de material infectado con virus se ha realizado utilizando el cultivo de meristemos y la embriogénesis somática. En nuestro grupo de investigación se han realizado distintas prospecciones que han mostrado una alta incidencia de vides virosadas y se ha desarrollado un protocolo de embriogénesis para su saneamiento (San Pedro et al. 2014; Peiró et al. 2015). Aplicando este protocolo se han saneado plantas de vid infectadas con los virus GFLV, GLRaV-1 y GLRaV-3. En este trabajo se ha utilizado el protocolo desarrollado para obtener planta sana a partir de plantas infectadas con GFLV o con este virus y el virus GFKV en las variedades Monastrell, Moravia Dulce, Petit Verdot, Pinot Meunier y Tempranillo. Se han obtenido embriones somáticos y se han analizado las plantas germinadas y cultivadas *in vitro* utilizando la RT-PCR a tiempo real. Un alto porcentaje de las plantas analizadas (60- 82%) ha resultado libre de virus. Este resultado, junto con los obtenidos anteriormente, muestra que el protocolo desarrollado por la unidad asociada COMAV-IVIA permite el saneamiento de un gran espectro de variedades de vid infectadas con distintos virus.

San Pedro T., Peiró R., Medina A., Yuste A., Olmos A., Gisbert C. 2014. Desarrollo de un protocolo de embriogénesis somática para el saneamiento de las variedades de vid infectadas con GLRaV-3 y GFKV. *Acta Horticultura* 69:133-134

Peiró R., Gammoudi N., Yuste A., Olmos A. Gisbert C. 2015. Mature seeds for *in vitro* sanitation of the Grapevine leafroll associated virus (GLRaV-1 and GLRaV-3) from grape

(*Vitis vinifera* L.). Spanish Journal of Agricultural Research, 13(2), e1005, 7 páginas.  
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5424/sjar/2015132-709>  
Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2011-00067-C04, RTA2011-00067-C04-01  
cofinanciado con fondos FEDER.

## **Saneamiento y recuperación, mediante cultivo de meristemos y termoterapia, de cv de manzano tradicionales de Galicia infectados por los virus ApMV y ACLSV**

A. Lizárraga Farfán<sup>1</sup>, J. Ascasíbar<sup>2</sup>, M.L. González Caamaño<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM)

E-mail: mluz.gonzalez@usc.es

Se seleccionaron 8 cultivares de manzano, de interés comercial para Galicia, del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo-La Coruña (CIAM) que alberga el mayor número de accesiones de manzano todas con un grave problema fitosanitario causados principalmente por los virus ACLSV (Apple chlorotic leaf trichovirus) y ApMV (Apple mosaic ilarvirus). El objetivo de este trabajo es sanear el material vegetal seleccionado mediante cultivo de meristemos apicales y termoterapia, para su conservación a largo plazo y propagación. Se pretende obtener cultivares de manzanos autóctonos gallegos, de calidad, adaptados a las condiciones ambientales de Galicia para su reintegración en el banco de germoplasma del CIAM, su reintroducción en cultivo y su comercialización. Se recogieron estaquillas en campo de 8 cv gallegos de manzano (Cacharela, Camoesa, Repinaldo, Tres en cunca, Gravillán, Ollo mouro, José Antonio, y Príncipe grande) en 2012-13-14, en los meses de enero/ febrero. Una vez establecidos todos en cultivo in vitro sobre medio mineral [1] Murashige y Skoog (MS) con BA (1 mgL<sup>-1</sup>) GA3 (0.2 mgL<sup>-1</sup>) y AIB (0.3 mgL<sup>-1</sup>), pasaron a la fase de multiplicación en la que se probaron diferentes concentraciones de BA (0, 0.25, 0.5 y 1 mgL<sup>-1</sup>) con o sin AIB (0,1 mgL<sup>-1</sup>). Todos los cultivos se transfirieron a medio fresco cada cuatro semanas. Se aplicó termoterapia in vitro en [2] los cinco primeros cv hasta alcanzar los 40oC, aislando posteriormente los meristemos apicales, de 0.5- 1.0 mm de longitud que se cultivaron en placa Petri sobre medio mineral sólido, específico para cada uno de ellos. Se aplicaron técnicas de detección inmunoenzimáticas como el test ELISA utilizado en el diagnóstico de enfermedades virales para comprobar la ausencia de virus en el material recuperado [3]. El enraizamiento se hizo con Repinaldo y Tres en cunca, mediante inmersión basal de los brotes. Se probó AIB y ANA a 200, 400 y 1000 mgL<sup>-1</sup> en una solución acuosa durante 30 seg y se cultivaron sobre medio basal MS y MS BA 0.125 mgL<sup>-1</sup>. Realizamos análisis estadístico de los datos obtenidos del número de brotes conseguidos con los diferentes concentraciones de BA con o sin AIB,

para cada cultivar estableciendo la mejor combinación para la tasa de multiplicación; asimismo se establecieron los porcentajes de enraizamiento para los dos cultivares. La capacidad de enraizamiento difiere entre diferentes genotipos de la misma especie. En los % de enraizamiento, con aplicación de AIB se obtuvieron mejores resultados que con ANA.

#### REFERENCIAS:

- [1] T.Murashige & F.Skoog. *Physiologia Plantarum*, vol 15 (1962): 473- 497.
- [2] Koubouris G.C., Maliogka V.I., Eftimiou K., Katis N.I., Vasilakakis M.D., 2007. *J Gen Plant Pathol*, vol.73: 370-37
- [3]. Xiangquian Li; Mingliang Xu; Schuylers Korban, 2002. *Journal of Plant Physiology*, vol 159: 1229-1234.

## Transformación genética de *Vitis vinifera* (cv. Albariño) con genes de floración temprana.

R. Saporta<sup>1</sup>, C. Gisbert<sup>2</sup>, J.R. Vidal y A. Segura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioteconoloxía da Vide, Departamento de Fisioloxía Vexetal, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela. Rúa Lope Gómez de Marzoa s/n 15782-Santiago de Compostela, A Coruña.

<sup>2</sup>Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Edificio 8E: Escalera J, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

Las metodologías de transformación genética son de gran interés puesto que ofrecen la posibilidad de modificar plantas tanto para mejorar caracteres agronómicos como para realizar estudios de genómica funcional. En la vid y especies relacionadas (*Vitis sp.*) esta metodología es de especial interés debido a que las variedades que se utilizan no son líneas puras sino genotipos con alto grado de heterocigosis seleccionados a lo largo de los años por sus cualidades y que se mantienen por reproducción vegetativa (Kikkert et al. 2001). La transformación de vid se realiza principalmente mediante la inducción de callos proembriogénicos y su subsiguiente infección utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) portadoras del gen o genes de interés. En este trabajo se han obtenido, siguiendo esta metodología y según se describe en Torregrosa et al. (2015), plantas transgénicas de una de las variedades de mayor importancia en las denominaciones de origen de Galicia, la variedad Albariño. Para ello se han elaborado dos construcciones portadoras de los genes *VvFT* y *Vvgai* utilizando el plásmido pGreenII 179, que contiene el gen de selección *hpt-I* que confiere resistencia a la higromicina. Estos genes están implicados en la inducción floral (Carmona et al. 2007) y podrían conferir a las plantas una floración temprana. Puesto que la vid tiene una fase juvenil de varios años un adelanto de la floración sería de gran interés. La inserción de estos genes ya se ha confirmado por PCR por lo que se espera continuar con la evaluación de las plantas obtenidas para determinar si se produce el fenotipo esperado.

Kikkert JR, Thomas MR, Reisch BI (2001) Grapevine genetic engineering. In: Roubelakis-Angelakis KA (de) Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands pp 393-410

Carmona MJ, Cubas P, Calonje M and Martinez-Zapater JM (2007). Flowering transition in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Canadian journal of Botany. 85: 701-711.

Torregrosa L, Vialet S, Adivèze A, Iocco P, Thomas MR. (2015). Kan Wang (ed.). *Agrobacterium* Protocols: Volume 2. Methods in Molecular Biology. Vol 1224. 177-194.

## Evaluación de tolerancia a metales pesados de líneas transgénicas de *Solanum torvum* Sw. portadoras del gen *BvSAT*

A. Medina<sup>1</sup>, T. San Pedro<sup>2</sup>, JM Mulet<sup>3</sup>, T. Pardo<sup>4</sup>, M.P. Bernal<sup>4</sup>, C. Gisbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España.

<sup>2</sup> Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Ctra. Moncada a Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España. <sup>3</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - Universidad Politècnica de Valencia (UPV), Edificio 8E: Escalera. G, Av. Ingeniero Fausto Elio, s/n 46022 Valencia, España. <sup>4</sup> Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, España

*Solanum torvum* es un pariente silvestre de la berenjena común (*Solanum melongena* L.) y se utiliza habitualmente como portainjerto de ésta y de otros vegetales por su vigor y resistencia a estreses de tipo biótico. En el presente trabajo se parte de tres líneas transgénicas de *Solanum torvum* Sw. transformadas con el gen *BvSAT* (que codifica una serina acetiltransferasa), procedente de la remolacha (*Beta vulgaris* L.). El enzima serina acetiltransferasa (SAT) es limitante en la síntesis de cisteína, la cual es necesaria para la síntesis de glutatión. Este compuesto reductor es imprescindible para mantener el equilibrio redox de la célula y paliar los daños causados por el estrés oxidativo, estrés producido como consecuencia de cualquier otro; por ejemplo, el estrés por exposición a metales pesados, lo cual supone un problema cada vez más grave debido a la alta contaminación de los suelos de cultivo. Se ha realizado una caracterización de tolerancia a estrés por metales en las plantas transgénicas obtenidas con el fin de determinar la posible tolerancia a metales conferida por el transgén. Se llevó a cabo un primer ensayo para establecer las concentraciones de  $\text{CdCl}_2$  y  $\text{NiSO}_4$  que inhiben el crecimiento de las plantas de *S. torvum* *in vitro*. Con las concentraciones seleccionadas se comparó el crecimiento de las plantas transgénicas y las control en medios con y sin metales, y se cuantificó el contenido de Ni y Cd en las raíces y la parte aérea de las plantas. Los genotipos transgénicos han mostrado mayor tolerancia a Cd y Ni con respecto al genotipo control y acumulan una mayor cantidad de ambos metales en las raíces, al contrario de lo que ocurre en la parte aérea. Los resultados indican que se está produciendo una menor translocación de metales a la parte aérea, lo cual es de gran interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

Este trabajo se inició en el marco del proyecto PAID-05-10 financiado por la UPV

## Efecto del silenciamiento de genes que codifican poligalacturonasas sobre el reblandecimiento del fruto de fresa asociado a la maduración

C. Paniagua<sup>1</sup>, J.A. García-Gago<sup>1</sup>, A.J. Matas<sup>1</sup>, M. Barceló-Muñoz<sup>2</sup>, R. Blanco-Portales<sup>3</sup>, J. Muñoz-Blanco<sup>3</sup>, F. Pliego-Alfaro<sup>1</sup>, M.A. Quesada<sup>1</sup> y J.A. Mercado<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Dpto. de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071, Málaga. mercado@uma.es

<sup>2</sup>IFAPA Centro de Churriana, 29140, Málaga

<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, 14071, Córdoba

La degradación de las pectinas de la pared celular mediada por poligalacturonasas juega un papel clave en el reblandecimiento de la fresa. Así, el silenciamiento del gen *FaPG1* incrementa la firmeza del fruto maduro y alarga su vida postcosecha. Además de *FaPG1*, en fresa se ha descrito otro gen que codifica una poligalacturonasa específica de maduración, *FaPG2*. Con el fin de profundizar en el papel de estos genes, se han obtenido plantas transgénicas con el gen *FaPG2* silenciado (líneas BPG), así como plantas con *FaPG1* y *FaPG2* silenciados (líneas ABPG), obtenidas mediante retransformación de una línea anti*FaPG1* (APG29) que mostraba un fuerte silenciamiento del gen y un incremento en la firmeza de fruto. Se obtuvieron 24 líneas BPG y 15 ABPG. Estas plantas, junto con la línea APG29 y controles sin transformar, fueron analizadas durante 3 años consecutivos. El 50% de las líneas BPG mostraron mayor firmeza de fruto rojo que el control sin transformar, aunque el incremento en firmeza fue similar al obtenido en la línea APG29. Todas las líneas dobles transformantes dieron frutos de mayor firmeza que el control, siendo los valores ligeramente superiores a los de la línea APG29 en alguna de ellas. A nivel de expresión, las líneas BPG seleccionadas mostraron un silenciamiento del gen *FaPG2* que varió entre el 60-70%, e inesperadamente, un silenciamiento significativo de *FaPG1*, a pesar de la baja homología entre ambos genes. El silenciamiento de *FaPG1* en las líneas ABPG fue superior al 95%; sin embargo, el silenciamiento de *FaPG2* fue similar al obtenido en las plantas BPG. Estos resultados confirman el papel clave de las poligalacturonasas en el reblandecimiento de la fresa y sugieren la existencia de una regulación compleja en la expresión de ambos genes.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2011-24814 y Fondos FEDER

## Producción de plantas transformadas de albaricoquero a partir de secciones de hipocotilo de semillas maduras

C. Petri<sup>1</sup>, H. Wang<sup>2</sup>, L. Burgos<sup>3</sup>, J. Sánchez-Navarro<sup>4</sup>, N. Albuquerque<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Vegetal. Universidad Politécnica de Cartagena. Paseo Alfonso XIII, 48. 30203 Cartagena (Murcia)

<sup>2</sup>Institute of Fruit and Floriculture Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Anning, Lanzhou, 730070, China

<sup>3</sup>Grupo de Biotecnología de Frutales. Departamento de Mejora Vegetal. CE-BAS-CSIC. Campus de Espinardo. Apartado de correos 164. 30100 Espinardo (Murcia)

<sup>4</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP), CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, CPI Ed. 8E, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es una de las especies de frutales más recalcitrantes para la transformación genética. En este trabajo hemos obtenido por primera vez plantas transgénicas de albaricoquero a partir de secciones de hipocotilos de semillas maduras de dos variedades de albaricoquero ('Canino' y 'Moniquí'). Tras la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, se aplicaron dos agente selectivos diferentes: antibióticos aminoglucósidos y el herbicida fosfinitricina, según la construcción empleada. Cada uno de los agentes selectivos requirió el desarrollo de una estrategia de selección de las yemas transformadas específica. Las estrategias desarrolladas permitieron alcanzar una eficiencia de transformación del  $1,5 \pm 0,5\%$  en el caso de la selección con antibióticos, mientras que cuando se utilizó herbicida para seleccionar, se consiguió obtener una eficiencia de transformación del  $3,8 \pm 1,4\%$ .

Los eventos de transformación fueron monitorizados mediante la detección de la expresión de los genes marcadores *eyfp* o *gus*. La presencia e integración estable de los transgenes fue confirmada mediante PCR y Southern blot.

Algunos brotes transgénicos fueron enraizados en medio selectivo, aclimatados y cultivados en invernadero, bajo condiciones controladas.

El sistema de transformación establecido se puede utilizar de forma eficiente para realizar estudios de genómica funcional, así como para obtener patrones de albaricoquero transgénicos.

## **Pre-screening of transgenic citrus shoots using a temporary immersion bioreactor system.**

Y. Acanda, M. Canton, H. Wu and J. Zale

Mature Citrus Biotechnology Facility, University of Florida, IFAS, Citrus Research and Education Center, 700 Experiment Station Road, Lake Alfred, Florida 33850, USA

The genetic transformation of mature citrus is a useful protocol for generating genetically improved citrus that will flower and fruit early. Mature citrus transformation is typically accomplished with *Agrobacterium* and *nptII* selection on solid media containing 100 mg l<sup>-1</sup> kanamycin. However, selection on solid kanamycin medium generates a high frequency of escaped shoots that do not receive the transgene. The relatively low transformation efficiency of mature citrus combined with inefficient selection makes for an arduous endeavor, particularly if genetic constructs contain no reporter genes to identify transgenic shoots. As an example, PCR screening of 500 putative transgenics might yield 5 transgenic shoots, which is an expensive and tedious task. In the present study, pre-screening putative transgenic shoots was optimized using a temporary immersion bioreactor (RITA) system in liquid media. Internodal explants (450) of the mature rootstock “Carrizo” were co-cultured with the *Agrobacterium* strain EHA105 harboring either pTLAB21-GFP or pBI121-AtNPR vectors. Micro-shoots were initiated from explants on solid medium containing 100 mg l<sup>-1</sup> kanamycin for two months, and then transferred to the RITA bioreactors with liquid medium and 200 mg l<sup>-1</sup> kanamycin for an additional two weeks of selection. Transgenic shoots could be distinguished from escaped shoots by their dark green color. PCR screening and GFP fluorescence confirmed that 77% of the green shoots were transgenic. Pre-screening putative transgenics in liquid medium in a temporary immersion bioreactor is a simple and a cost-effective method to identify transgenics from escaped shoots.

## Sobre-expresión en embriones somáticos de alcornoque del gen *CsTL1* que codifica una taumatina

E. Corredoira<sup>1</sup>, V. Cano<sup>1</sup>, M. C. San-José<sup>1</sup>, M.T Martínez<sup>1</sup>, M. Toribio<sup>2</sup>, A. Ballester<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC), Avda. de Vigo s/n, Apartado 122, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña

<sup>2</sup>Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca “El Encín”, Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares, Madrid  
e-mail: vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es

El alcornoque está seriamente afectado por “la seca”, enfermedad causada, entre otras factores, por los hongos *Phytophthora cinnamomi*, *Diplodia mulila* y *Biscogniauxia mediterranea*. La transformación genética podría ser una herramienta complementaria a los programas de mejora convencional con la introducción de genes que incrementen la resistencia a dicha enfermedad. Dado que no se conocen los mecanismos de resistencia a la seca, una alternativa sería lograr la sobreexpresión de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), como las quitinasas o las proteínas tipo osmotina (taumatina). El objetivo de este estudio fue definir el protocolo de transformación de embriones somáticos (ES) de alcornoque con el gen *CsTL1*, identificado en embriones zigóticos de castaño y que codifica una taumatina.

Se utilizaron tres líneas embriogénicas de alcornoque, aislándose grupos de 2-3 ES en estado globular o torpedo como explantos diana. Estos explantos se cultivaron durante 5 días con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 que porta el vector binario pK7WG2D-*CsTL1*. Este plásmido contiene además el gen de neomicina fosfotransferasa (*nptII*) como gen de selección, y el gen de la proteína verde fluorescente (*egfp*).

En experimentos previos, se determinó por un lado la concentración letal de kanamicina (agente de selección) y por otro el antibiótico para eliminar *Agrobacterium* después de la transformación. Para ello, los ES se cultivaron en medio de proliferación suplementado con diferentes concentraciones de kanamicina y diferentes concentraciones/combinaciones de carbenicilina y cefotaxima. La dosis de 125 mg/l de kanamicina ó superiores provocan la inhibición casi completa de la embriogénesis secundaria. La carbenicilina (300 mg/l) fue seleccionada como agente bactericida pues no afecta a la proliferación de los ES.

Aunque se ha obtenido la transformación genética en ES de las tres líneas evaluadas, la eficiencia de transformación, fue claramente genotipo dependiente obteniéndose los mejores resultados (14%) en la línea TGR-3.

Esta investigación ha sido parcialmente subvencionada por el Ministerio de Economía y Competitividad (España) mediante el proyecto AGL2013-47400-C4-3-R. Los autores agradecen a la Dra. I. Allona y al Dr. C. Aragoncillo la cesión del gen CsTL1.

## Genética reversa para el estudio funcional de genes implicados en el metabolismo del nitrógeno en pino marítimo

M. Cano<sup>1</sup>, I. Mendoza-Poudereux<sup>1</sup>, M. Morcillo<sup>1</sup>, J. Segura<sup>1</sup>, E. Sales<sup>2</sup> e I. Arrillaga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, ERI BiotecMed, Facultad de Farmacia, Universitat de València. Av. Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjasot, Valencia

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universidad de Zaragoza, Escuela Politécnica Superior. Ctra. Cuarte s/n 22071 Huesca  
maria.cano@uv.es

*Pinus pinaster* Ait. es una conífera que presenta un amplio rango de distribución y una elevada plasticidad fenotípica que le permite crecer en ambientes muy variables. Por ello, se ha utilizado como especie modelo para estudios de adaptación a diferentes estreses bióticos y abióticos. A partir del transcriptoma obtenido en el proyecto SUSTAINPINE ([www.scbi.uma.es/sustainpine](http://www.scbi.uma.es/sustainpine)) de plantas y tejidos bajo distintas condiciones de estrés se han aislado un elevado número de secuencias génicas que excede al número de genes con función biológica conocida. El objetivo de la genética reversa es caracterizar funcionalmente estos genes candidatos mediante la producción de individuos en las que su actividad haya sido alterada. En este trabajo se presentan los resultados preliminares de la caracterización molecular y bioquímica de líneas embriogénicas de pino marítimo obtenidas mediante la sobreexpresión o el silenciamiento de 2 genes candidatos a regular el metabolismo del nitrógeno: la arginasa (*ARS20*) y la ornitina-delta-aminotransferasa (*dOAT*). La primera cataliza la hidrólisis de arginina y la segunda, la conversión de ornitina en un intermediario de la síntesis de glutamato en la mitocondria.

Mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens* se obtuvieron las líneas transgénicas para *ARS20* y *dOAT* (sobreexpresión e RNAi interferente). La expresión de los transgenes, determinada mediante RT-PCR permitió caracterizar al menos 3 líneas sobreexpresoras y silenciadas para cada gen. El número de copias insertadas de los genes de interés se realizó mediante PCR cuantitativa. Esta técnica presenta ventajas frente al Southern Blot tradicional, ya que requiere menor cantidad de ADN es más rápida y evita el uso de sondas radiactivas. El perfil del contenido en aminoácidos libres se realizó mediante HPLC.

Trabajo subvencionado por el MINECO, la UE (AGL2013-47400-C4-4-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052) y por la Universitat de València (Ayuda a la investigación concedida a María Cano).



## Efficient production of *eyfp*-expressing *Cucumis melo* diploid plants using different type of explants

R.C. García-Almodóvar<sup>1</sup>, B. Gosalvez<sup>1</sup>, M.A. Aranda<sup>1</sup> and L. Burgos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Patología Vegetal. Departamento de Biología del Estrés y Patología.

<sup>2</sup>Grupo de Biotecnología de Frutales. Departamento de Mejora Vegetal. CEBAS-CSIC. Apartado de Correos 164, 30.100-Murcia, Spain.

Melon (*Cucumis melo* L.) is consensually considered as a recalcitrant species for genetic transformation. Additionally, many works describe that regenerated transgenic plants are polyploids. Here we studied the effect of using different type of explants from the proximal portion of the BGV-130 melon seeds on the ploidy status (evaluated by flow cytometry) of regenerated plants. Several explants from the half proximal part of cotyledon, with or without hypocotyl stump, leaves and hypocotyl sections were used. Explants consisting of cotyledon and hypocotyl stump were prepared by removing radicle meristem and disrupting the structure of caulinar meristem, which produced regeneration of multiple shoots from the remaining meristematic cells. Regeneration was obtained from all type of explants with the exception of hypocotyl slices. Only 67% of plants regenerated from leaves were diploid, however, explants from quiescent seeds (1 day-old seeds) produced more than 80% of diploid plants from all type of regenerating explants, whereas only half of plants regenerated from older-seed cotyledons were diploids. Plants regenerated from meristematic cells were diploid at 100%. Highest *eyfp* expression was found in hypocotyl slices, then in explants maintaining the hypocotyl stump and followed by cotyledon explants from the most proximal part of the seed. Positive EYFP buds were recovered with average transformation efficiencies from 2.3% to 5.1%, depending on the explant used. Using quiescent seeds has allowed the recovery of diploid transformed plants with high efficiency, however using meristematic cells produced 100% diploid plants with similar transformation efficiencies. Some of the transgenic plants were chimeric but coupling regeneration from chimeric leaves in high selection pressure produced uniformly transformed plants. Additionally, this type of explant has permitted successful transformation of different genotypes.

## Transformación mediada por *Agrobacterium* de cultivos celulares de vid

M.Y. Chu<sup>1, 2</sup>, C. Quiñonero<sup>2</sup>, H. Akdemir<sup>1</sup>, N. Albuquerque<sup>1</sup>, M.A. Pedreño<sup>2</sup>, L. Burgos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Biotecnología de Frutales. Departamento de Mejora Vegetal. CE-BAS-CSIC. Campus de Espinardo. Apartado de correos 164. 30100 Espinardo (Murcia), Spain <sup>2</sup> Departamento de Biología Vegetal (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo (Murcia), Spain

La transformación genética de cultivos celulares de vid puede permitir la modificación de determinadas rutas bioquímicas y la alteración del metabolismo secundario induciendo la producción elevada de determinados compuestos de interés como el resveratrol. Los protocolos más utilizados para su transformación se basan en los mediados por *Agrobacterium*, utilizando como material vegetal callos y cultivos celulares embriogénicos. Sin embargo, prácticamente no existen estudios que describan la transformación de cultivos celulares indiferenciados.

En la presente comunicación se han optimizado diferentes factores que incrementan el proceso de transformación mediada por *Agrobacterium* de cultivos celulares de vid, variedad Monastrell. Se ha utilizado la cepa LBA4404 conteniendo el plásmido pMOG800 portador del gen de resistencia a antibióticos aminoglicósidos (*nptII*) y un gen que codifica una proteína fluorescente (*eyfp*), este último conteniendo un intrón para evitar su expresión en la bacteria. Además, se han realizado infecciones en diferentes momentos del crecimiento de los cultivos celulares con el fin de determinar cuándo las células son más receptivas a la infección y a la transferencia de los transgenes. El co-cultivo se realizó sobre papel de filtro humedecido con medio de cultivo y se optimizó la densidad celular, la eliminación posterior de la bacteria y la selección de las células transformadas. Para esto último se han realizado estudios de viabilidad celular en presencia de diferentes concentraciones de los antibióticos aminoglicósidos kanamicina y paromomicina. La kanamicina resultó ineficaz mientras que con paromomicina se pudieron seleccionar las células transformadas a relativamente bajas concentraciones, que han dependido de la densidad celular utilizada en las placas de Petri. Todos estos estudios han permitido obtener células expresando la proteína fluorescente que se han dividido y dado lugar a microcallos transgénicos en medio selectivo. Los microcallos han sido cultivados en medio líquido con diferentes concentraciones de antibióticos con el fin de determinar las condiciones que permitan restablecer las líneas de cultivos celulares transgénicos. Mientras las célu-



las control no fueron capaces de crecer en ningún medio con antibiótico, incluso a bajas concentraciones, las líneas transgénicas crecieron en las concentraciones más elevadas probadas como el control en medio sin antibiótico.

## Distintas estrategias para obtener *Prunus* transgénicos resistentes a sharka

N. Albuquerque, L. Faize, L. Nortés, L. Burgos

<sup>1</sup>Departamento de Mejora de Frutales, CEBAS-CSIC. Aptd. 164, 30100 Murcia.  
e-mail: burgos@cebas.csic.es

La enfermedad causada por el virus de la sharka (Plum pox virus, PPV) produce graves daños a los frutales del género *Prunus* y afecta seriamente la producción. El objetivo del estudio ha sido obtener plantas de albaricoquero y de ciruelo resistentes al virus de la sharka mediante distintas estrategias biotecnológicas.

Por una parte, se ha utilizado una construcción diseñada para silenciar genes del virus de la sharka, que ha sido probada con éxito en tabaco y en ciruelo, para obtener plantas de albaricoquero resistentes a la enfermedad. Se infectaron secciones de hipocotilos de semillas maduras de la variedad ‘Canino’ con la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* portando el vector binario h-UTR/PI (Di Nicola-Negri et al., 2005), siguiendo un protocolo previamente descrito (Wang et al., 2011). Este vector genera un ARNm autocomplementario que contiene, además de la región no traducible 5’ del PPV-M ISPaVe44, parte del gen P1 (nt 1-733). Se obtuvieron líneas transgénicas según un análisis PCR.

Por otra parte, los microARNs (miRNAs) están constituidos por ARN de cadena simple de entre 20-24 nucleótidos. Son generados a partir de precursores (pre-miRNA) más largos y reclutados por el complejo RISC, el cual degrada de manera específica una secuencia de ARN mensajero. Tratando de explorar nuevas estrategias para conseguir plantas resistentes a sharka, el grupo de la Dra. Carmen Simón ha diseñado construcciones moleculares introduciendo en estructuras pre-miRNAs secuencias complementarias del virus: de la región de la replicasa (amiR-C), la región de la cápsida del virus (amiR-D) o ambas (amiR-CD). Estas construcciones se han probado con éxito en plantas transformadas de *Nicotiana benthamiana*. En este trabajo hemos utilizado la construcción que expresa los amiRNA-CD para producir plantas transgénicas a partir de hipocotilos de semillas de ciruelo europeo (Petri et al., 2008). Se han obtenido distintas líneas y se ha confirmado la presencia de los transgenes mediante PCR.

Para la evaluación *in vitro*, ápices de todas las líneas transformadas se injertarán sobre brotes de melocotonero GF-305 infectados con el virus de la sharka, y mantenidos *in vitro* (García-Almodovar et al., 2015).

## Referencias

Di Nicola-Negri, E., Brunetti, A., Tavazza, M., Ilardi, V., 2005. Hairpin RNA-mediated silencing of Plum pox virus P1 and HC-Pro genes for efficient and predictable resistance to the virus. *Transgenic Res.* 14, 989-994.

García-Almodovar, R.C., Clemente-Moreno, M.J., Díaz-Vivancos, P., Petri, C., Rubio, M., Padilla, I.M.G., Ilardi, V., Burgos, L., 2015. Greenhouse evaluation confirms in vitro sharka resistance of genetically engineered h-UTR/P1 plum plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 120, 791-796.

Petri, C., Webb, K., Hily, J.M., Dardick, C., Scorza, R., 2008. High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): a new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Mol. Breeding* 22, 581-591.

Wang, H., Albuquerque, N., Burgos, L., Petri, C., 2011. Adventitious shoot regeneration from hypocotyl slices of mature apricot (*Prunus armeniaca* L.) seeds: A feasible alternative for apricot genetic engineering. *Sci. Hortic. -Amsterdam* 128, 457-464.

## Transformación genética de olivo con el gen *OeHPL* para el análisis funcional del papel de la enzima 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) en la producción de compuestos volátiles.

S. Cerezo<sup>1</sup>, M.L. Hernández<sup>2</sup>, M.D. Sicardo<sup>2</sup>, J.A. Mercado<sup>1</sup>, C. Sanz<sup>2</sup>, I. Narváez<sup>1</sup>, A. Barceló- Muñoz<sup>3</sup>, J.M. Martínez-Rivas<sup>2</sup>, F. Pliego-Alfaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora” (IHSM-UMA-CSIC), Dpto.de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071, Málaga (España). ferpliego@uma.es <sup>2</sup>Instituto de La Grasa (CSIC), Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Vegetales, 41013, Sevilla (España). <sup>3</sup>IFAPA Centro de Churriana, 29140, Málaga (España).

Palabras clave: *Olea europaea*, olivo transgénico, contenido en volátiles, aroma.

La 13-hidroperóxido liasa es una enzima implicada en la biosíntesis de compuestos volátiles y tiene un papel fundamental sobre la composición y propiedades del aceite de oliva virgen. La expresión del gen *OeHPL* muestra una regulación temporal durante la maduración y desarrollo del fruto; además, la expresión es alta en hojas y tejido de mesocarpo y baja en semillas. En este trabajo se aborda el análisis funcional de este gen mediante su sobreexpresión y silenciamiento en plantas transgénicas de olivo. La transformación se llevó a cabo vía *Agrobacterium*. Se utilizó la cepa AGL-1 con tres construcciones distintas: pHPLs para sobreexpresión (orientación sentido), pHPLas (orientación antisentido) y pHPLi (ARN-interferente) para silenciamiento. Se recuperaron plantas procedentes de 27 líneas transgénicas independientes, 6 HPLs, 10 HPLas y 11 HPLi. El análisis de la expresión del gen *OeHPL* en hojas de estas líneas mostró los siguientes resultados, a) líneas sentido: en una de ellas aumentó la expresión 24 veces mientras que en otras tres, aumentó en el rango 4-7X; b) líneas antisentido: sólo en dos de ellas disminuyó su expresión un 20% y c) líneas RNAi: en tres de ellas, se redujo la expresión entre 25-35% mientras que en otras dos, disminuyó un 50%. Estas líneas RNAi muestran un crecimiento ralentizado y, en general, presentan menor vigor que las controles. Próximamente, se iniciarán los trabajos para cuantificar la actividad enzimática 13-HPL y el contenido de volátiles en hojas con diferentes perfiles de expresión del gen. Asimismo, dado el papel que los volátiles de hoja verde, formados vía HPL, juegan en la resistencia a estrés también se evaluará la tolerancia a verticilosis en las plantas de las líneas seleccionadas.

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los proyectos OLEAGEN (FUNDACIÓN GENOMA ESPAÑA) y AGR-7992 (P11-Junta de Andalucía)

## Valoración in vitro de elicitors de inducción de resistencia a *Phytophthora cinnamomi* en encina

M. Ruiz-Galea y M. Toribio

IMIDRA. Finca “El Encín”. Apdo. postal 127. 28800 Alcalá de Henares (Madrid).  
mdelmar.ruiz@madrid.org

El oomiceto *Phytophthora cinnamomi* se asocia con la mortalidad de alcornoques (*Quercus suber*) y encinas (*Quercus ilex*) en la región mediterránea.

Varios activadores de defensa o elicitors como benzothiadiazole (BTH), ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA), ácido salicílico (SA), metiljasmonato (mJA) o filtrados de cultivos fúngicos (FCF), han demostrado efectos protectores y cierto potencial para el control de enfermedades provocadas por *Phytophthora* spp. Para activar la Resistencia Sistémica en tres líneas de encina (E00, Q8 y E2) se cultivaron masas embriogénicas en medio SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) con 50 $\mu$ M de cada uno de los elicitors anteriores y un 10% y 30% de FCF de *Phytophthora cinamomi*. Tras dos ciclos de 30 días a 23 °C y fotoperiodo de 16h de luz, se obtuvieron embriones somáticos para regenerar plantas con los que comprobar posteriormente la resistencia al patógeno.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad del cultivo dual del oomiceto y el material embriogénico para conseguir una técnica rápida y eficaz en la detección precoz de la resistencia al patógeno.

En placas Petri de 90mm con medio SH se dispusieron 500 mg de masas embriogénicas en dos extremos de la placa, y 10 días después un fragmento de 0,5 x 0,5 cm de medio PDA con micelio en el centro de la placa. Se hicieron 3 repeticiones por tratamiento y genotipo que se cultivaron a 23 °C y fotoperiodo de 16h luz durante una semana. Se valoró diariamente la necrosis de las líneas embriogénicas en cada tratamiento.

En todos los casos la presencia de tejidos de encina estimuló el crecimiento de *Phytophthora cinamomi*. Respecto a la necrosis, hubo diferencias entre genotipos y tratamientos. El genotipo E2 fue el más tolerante. Los tratamientos con 10% FCF y sobre todo con BTH, redujeron la necrosis final respecto al blanco y los demás elicitors en todos los genotipos.

Financiación: proyecto nacional AGL2013-47400-C4-1R.

### Referencias

Schenk RU, Hildebrandt AC (1972) Can J Bot 50:199-204



## Influencia de la aplicación de exudados de *Phytophthora cinnamomi* y elicitores sobre la proliferación de embriones de encina (*Quercus ilex* L.)

M. Morcillo<sup>1</sup>, M. Cano<sup>1</sup>, J.B. Peris<sup>2</sup>, J. Segura<sup>1</sup> e I. Arrillaga<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, y <sup>2</sup> Botánica, <sup>1</sup>ERI BiotecMed, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100, Burjassot, Valencia angeles.morcillo@uv.es

El objetivo de nuestro proyecto de investigación actual es la obtención de plantas de encina (*Quercus ilex* L.) con una mayor tolerancia al oomiceto *Phytophthora* spp. mediante el tratamiento de líneas embriogénicas de esta especie con exudados del oomiceto o con los elicitores Metil jasmonato (Me-Ja), Benzotriazol (BTH) y ácido para amino benzoico (PABA). En este trabajo se evalúa el efecto del exudado y los elicitores sobre el crecimiento de la línea embriogénica Ha 13, obtenida mediante el cultivo de amentos aislados de árboles del Monte La Hunde, Ayora (Valencia).

La línea embriogénica (200 mg) se cultivó en matraces que contenían 40 ml de medio ESM (Elicitin Secretion Medium, Horta et al 2008; Ioos et al 2007) con el exudado de *Phytophthora* (10 ó 30%) o 50 µM de Me-JA, BTH o PABA durante 3 ó 5 días. Los exudados se obtuvieron mediante la filtración y posterior esterilización de cultivos en medio líquido de *Phytophthora*. Seguidamente, los embriones se transfirieron a placas con medio de cultivo de proliferación (MS + STS + CA, Martínez et al, 2015). Al cabo de 30 días se evaluó el crecimiento. Tratamientos prolongados con la concentración mayor del exudado (30%) parecen inhibir el crecimiento de la línea embriogénica. Por el contrario, no se observa una correlación evidente entre la duración del tratamiento con los elicitores y el crecimiento relativo de la línea embriogénica.

### Agradecimientos

La cepa (1630) de *Phytophthora cinnamomi* ha sido cedida por el grupo de investigación de la Dra. Abad (Hongos Fitopatógenos) del Instituto Agroforestal Mediterráneo de la Universidad Politécnica de Valencia.

### Referencias

Horta et al. 2008. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 73: 48–57

Ioos et al. 2007. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5587–5597

Martínez et al. 2015. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* DOI 10.1007/s11240-015-0722-6

Proyecto cofinanciado por el MINECO, UE (AGL2013-47400-C4-4-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052) y contrato predoctoral M.M.





## ***SESIÓN TEMÁTICA***

### **III. MICROPROPAGACIÓN Y EMPRESAS**



## La micropropagación en empresas y laboratorios de investigación: Realidades y problemas

Teresa Antón<sup>1</sup> y A. Barceló Muñoz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Semillero Laimund S.L. Cuatro Vientos 289, El Ejido 04700

<sup>2</sup>Laboratorio de cultivo in vitro y biotecnología. IFAPA Centro de Churriana, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga

La palabra ciencia proviene del latín “sciere”, saber. La ciencia es conocimiento, y avanza a través de la investigación científica. Existe también la investigación tecnológica, que emplea el conocimiento científico para desarrollar tecnologías, tecnologías que permiten diseñar y crear bienes y servicios de utilidad práctica. Es importante preguntarse dónde se encuentra actualmente el cultivo de tejidos vegetales in vitro, y concretamente la micropropagación; cuáles son sus principales problemas, y de qué rama del conocimiento se alimenta para resolverlos, y si la micropropagación es un ejemplo de cómo la ciencia se convierte en tecnología, y la tecnología en negocio:

Semillero Laimund S.L., con 30 años de experiencia, destaca en el sector por ser pionera en la introducción del injerto de tomate en España, lo que ha permitido que de los 40-50 millones de plántula agrícola que produce, aproximadamente 8 correspondan a planta injertada.

La tecnología y la innovación son pilares fundamentales de esta empresa contando con software para control del riego, nebulizadores, calefacción por CO<sub>2</sub> y/o agua caliente y desde diciembre de 2013 con un laboratorio de cultivo in Vitro de tejidos vegetales.

Gracias al traslado a empresa, fui consciente de lo aprendido durante la realización de una tesis doctoral sirviéndome para iniciar el laboratorio, empezando a trabajar con materiales de interés para la empresa y enfrentarme a barreras técnicas a las que no me había enfrentado nunca directamente, o al menos nunca sola. En el laboratorio se realizan trabajos de investigación, no producción a gran escala. En cualquier caso, con ciertos materiales, resultaría interesante establecer protocolos de micropropagación eficaces. En definitiva, con el claro objetivo de seguir avanzando en innovación dentro de una empresa establecida en los sectores hortofrutícola y ornamental, el laboratorio está llenando los posibles huecos o completando ciertas carencias para fortalecer a la empresa con tecnología y conocimiento.

## Optimización de la germinación de cultivares verdes de kiwi mediante neurofuzzy logic

J. González-Puelles, M.E. Barreal y P.P. Gallego

Departamento de Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Facultad de Biología, Universidad de Vigo. Campus Universitario, s/n, 36310 Vigo, Pontevedra.

Los procesos biológicos son normalmente muy complejos y difíciles de describir con precisión mediante simples ecuaciones o algoritmos. Por esta razón la tecnología de inteligencia artificial (*Neurofuzzy logic*, NL) puede ser una alternativa eficaz para una interpretación objetiva y fiable mediante modelos matemáticos. La germinación en plantas es un proceso increíblemente complejo influenciado por una gran variedad de factores y que además varían con cada especie. En este estudio, la respuesta germinativa a la estratificación fría (4°C) durante varias semanas (0, 2, 4, 6, 8, 10) en condiciones húmedas o secas, a diferentes temperaturas (18/13°C y 24°C), y diferentes condiciones lumínicas (fotoperiodos 12/12h, 16/8h o en completa oscuridad) y el efecto de la presencia o ausencia de 1mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en semillas de diferentes cultivares de kiwi, fue evaluada semanalmente durante 10 semanas. El análisis mediante NL permitió modelizar simultáneamente todos los factores y los parámetros medidos, incluidos en una única base de datos de forma fiable y con alta predictibilidad. El modelo permitió identificar los factores, (Cultivar; Tiempo de estratificación; Tipo de estratificación; GA<sub>3</sub> y Temperatura) que significativamente explican el mayor porcentaje de la variabilidad y, por tanto, son los más importantes para obtener la mejor tasa de germinación en kiwi en nuestras condiciones experimentales. Además, NL permite modelizar y optimizar el proceso para estimar las mejores condiciones de germinación, lo cual será beneficioso para investigadores y para la industria del kiwi la cual es altamente dependiente de la obtención de nuevas plántulas para ser usadas como patrones. Finalmente, se discutirá cómo esta tecnología puede ser empleada para otras especies, variedades y/o cultivares.

## **Saneamiento mediante cultivo de meristemos y micropropagación de una variedad comercial de ajo**

B. Cabello Moreno<sup>1</sup>, A. Cabeza<sup>2</sup>, J. Morata Gómez<sup>1</sup>, A. Barceló Muñoz<sup>2</sup>, L. Velasco<sup>2</sup> e IMG Padilla<sup>2</sup>

1. SAT 9989 Peregrin, Pulpi . 04640-Almería
2. Laboratorio de Cultivo in vitro y Biotecnología. IFAPA Centro de Churriana. Cortijo de la Cruz sn. 29140-Málaga

El cultivo del ajo (*Allium sativum* L.) en Andalucía tiene un especial interés socio-económico. Generalmente, el ajo no forma semilla botánica viable, su propagación es asexual, por lo que es necesario mantener las colecciones propagadas vegetativamente en parcelas. Ello provoca graves problemas de contaminaciones, ya que los bulbos se infectan por virus tras varios ciclos en el campo.

Desde hace 3 años, la empresa Peregrin (Pulpi, Almería), dedicada al cultivo y producción de ajo, contrata con el laboratorio de Cultivo in vitro y Biotecnología del IFAPA de Churriana (Málaga) la puesta a punto de un protocolo de saneamiento, mediante cultivo de meristemos, y micropropagación de una variedad comercial de ajo morado. Este protocolo contempla la detección de virus antes del aislamiento de los meristemos, la obtención de la planta a partir del meristemo y la confirmación de que está libre de virus, tanto mediante ELISA como qPCR. Una vez saneadas, las líneas son multiplicadas in vitro, enraizadas y aclimatadas a invernadero. Actualmente, estamos llevando a cabo el escalado comercial de dicho protocolo, siendo el objetivo final de la empresa disponer de un laboratorio propio de cultivo in vitro para explotar dicho protocolo.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado con el contrato IFAPA- Peregrin CAICEM14-113.

## Propagación clonal de yellowhorn mediante cultivo in vitro

I. Imbroda; I. M.G. Padilla; A. Barceló-Muñoz

Laboratorio de cultivo in vitro y biotecnología.

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

Yellowhorn (*Xanthoceras sorbifolium* L.) es una especie leñosa de la familia Sapindaceae, originaria de China, donde está ampliamente extendida por varias regiones del norte y noreste del país. Su fruto es una drupa con un número variable de semillas que poseen diferentes usos como biocombustibles, cosméticos, biofertilizantes, biomasa, pienso para ganado, etc., en su lugar de origen también tiene uso medicinal y alimentario.

En el año 2012 comenzó un ambicioso proyecto cuyo objetivo general es la “INVESTIGACIÓN PARA LA ADAPTACIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL YELLOWHORN EN EUROPA” (Proyecto ITC-20111053). Se trata de una investigación multidisciplinar para estudiar el cultivo de esta nueva especie en España y Europa Occidental, y su potencial como fuente de aceite para la elaboración de biodiesel y para otros usos como el cosmético o la producción de proteínas. Para ello, se está estudiando su comportamiento y adaptación en diferentes zonas climáticas y edafológicas de Andalucía. De estos estudios se seleccionarán los individuos élite que serán propagados vegetativamente para el establecimiento de plantaciones clonales.

Dentro de este proyecto, el Laboratorio de Cultivo in vitro y Biotecnología del IFAPA de Málaga se ha encargado de la puesta a punto del protocolo de propagación in vitro de yellowhorn que se presenta en esta Reunión.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado con fondos CDTI (Programa FEDER-INNTER-CONECTA).

## Análisis por qPCR de la respuesta a *P. cinnamomi* en clones de castaño *in vitro* con diferente nivel de resistencia

S. Rico<sup>1</sup>, JM, Vielba<sup>1</sup>, N. Vidal<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup> y B. Cuenca<sup>2</sup>

1.- Departamento de Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC). Av. de Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña). 2.- TRAGSA. Vivero de Ourense. Ctra Maceda-Valdrey Km 2. 32700 Maceda. Orense

El hongo *Phytophthora cinnamomi* es responsable de infectar a diferentes especies leñosas, y en particular de causar la enfermedad de la tinta del castaño. Esta enfermedad provoca serios daños a las poblaciones de esta especie, sobre todo a aquellos individuos que crecen en suelos saturados de agua y poco aireados. Es también una enfermedad habitual en plántulas, generando serias pérdidas en viveros.

Las poblaciones de castaño muestran diferentes niveles de susceptibilidad a la infección, sugiriendo la existencia de un componente genético determinante de esa resistencia. Con el propósito de identificar genes relacionados con la respuesta al ataque por *P. cinnamomi*, se utilizaron 4 clones de castaño con diferente grado de resistencia al hongo. Las plántulas enraizadas se inocularon *in vitro* con el hongo y se recogieron las hojas a las 24, 48 y 72 horas tras la infección. Mediante qPCR se evaluó la variación de la expresión de diferentes genes, incluyendo factores de transcripción y genes de señalización, entre otros.

Los patrones de expresión detectados para los 9 genes analizados mostraron diferencias según el nivel de resistencia del clon analizado. El nivel de expresión de *CsGH3-1* a las 72 horas guarda una relación directa con dicho nivel de resistencia, al igual que *CsGH3-2*, aunque este último con menor variación. La actividad de *CsCPE* se relaciona también directamente con una mejor defensa. En el caso de los factores de transcripción analizados, su respuesta es más variable si bien sus mayores niveles de expresión se encuentran en el clon con mayor resistencia. Los resultados indican que la inoculación provoca un cambio en el patrón general de expresión génica de los brotes, en los que una mayor y más rápida respuesta en forma de actividad transcripcional guarda relación con una mejor resistencia a la infección. Dicha resistencia parece sustentarse sobre una base multigénica.

Este trabajo fue financiado por el CDTI a través del programa FEDER- INTER-CONECTA 2013/2014 (proyecto INTEGRACASTANEA EXP00064828/ITC-20133040)



## Propagación de cultivares de pistacho (*Pistacia vera* L.) aplicando técnicas de cultivo in vitro

J. A. Marín, E. García, P. Lorente, P. Andreu y A. Arbeloa

Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avenida Montañana 1005. 50059 Zaragoza.

e-mail: jmarin@eead.csic.es

El injerto del pistacho muestra un alto grado de incertidumbre, con resultados variables e inconsistentes en patrones de uso común, dando lugar a plantaciones irregulares y a la necesidad de reinjertos frecuentes. Además, el tamaño de las yemas de los cultivares de pistacho es muy superior al del portainjerto cornicabra (*Pistacia terebinthus* L.) juvenil, ampliamente utilizado en España, lo que dificulta el injerto de pistacho.

Aquí, aplicamos las técnicas de cultivo in vitro para la obtención de plantas de tamaño reducido que coincidan con el tamaño del portainjerto pocas semanas después de la germinación, con el fin de poder injertarlos. Hemos cultivado con éxito los cultivares hembras 'Larnaka', 'Kerman' y 'Sirora', así como el cultivar macho Peters y la selección AD15.

El injerto se realizó en plantas juveniles, de cuatro semanas, de terebinto provenientes de semilla, cultivadas en pequeños contenedores utilizando a) plantas de pistacho AD15 micropropagadas y aclimatadas, o b) ápices de brotes cultivados in vitro como fuente de injerto debido a las dificultades presentes durante el enraizamiento y la aclimatación (ver poster 'García et al.'). Se han logrado porcentajes de éxito de injerto desde el 57.6% al 75.7% según la variedad, salvo en el caso de Peters (16.7%) con yemas derivadas de técnicas in vitro. Además, las yemas injertadas reanudaron el crecimiento pocos días después del injerto, por lo que el tiempo requerido para obtener nuevas plantas se acortó significativamente. Plántulas de cornicabra fueron utilizadas como portainjertos en todos los casos, pero la técnica se puede extender a otros patrones.

La posibilidad de injertar plantas pequeñas, que crecen en contenedores, añade una gran flexibilidad a la producción. Los trabajos continúan para aumentar el número de variedades cultivadas in vitro.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A-43).

## Recuperación mediante cultivo in vitro de variedades locales de peral gallego.

E. Alonso<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup>, A. Aldrey<sup>1</sup>, P. Covelo<sup>1</sup>, R. Martínez<sup>2</sup>, N. Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña. <sup>2</sup>Asociación Galega de Froita Autóctona do Eume (agfaeume@gmail.com) nieves@iiag.csic.es

El cultivo in vitro facilita la multiplicación, conservación y almacenamiento de recursos genéticos de especies de propagación vegetativa como es el caso de los frutales. En Galicia, el cultivo de sus variedades locales se encuentra en regresión debido al abandono del medio rural y a la introducción de otras variedades comerciales.

El objetivo de este trabajo es la conservación, mediante micropropagación, de variedades locales de perales caracterizados por la “Asociación Galega de Froita Autóctona do Eume” y mantenidos en su huerto de conservación en San Sadurniño (A Coruña). Se han establecido in vitro dos genotipos (Manteiga País (MP) y Manteiga Blanca (MB)), a partir de brotes axilares inducidos en estaquillas recogidas de árboles de 3-4 años de edad.

Los brotes obtenidos se utilizaron para determinar la composición hormonal más adecuada para su propagación en medio semisólido. Se estudió el crecimiento en diferentes condiciones de iluminación, y la capacidad de multiplicación y elongación en medio líquido en biorreactores RITA®. Además, se realizaron pruebas inducción de raíces adventicias in vitro y ex vitro con mezclas de turba y perlita y diferentes sustratos inertes.

Los resultados indican que el medio MS con BA 1 mg/l y AIB 0,5 mg/l es adecuado para la propagación de MP, mientras que con esta concentración de BA los brotes de MB desarrollan necrosis apical y presentan hojas muy estrechas. Los brotes de estas variedades pueden cultivarse tanto en medio semisólido como en medio líquido, y responden mejor a luz blanca que a mezclas de luz roja y azul. Aunque se han obtenido brotes enraizados con varias técnicas y sustratos, es necesario mejorar los porcentajes de enraizamiento y aclimatación.

Los autores agradecen a José A. Bellas su colaboración en la recogida del material vegetal. Esta investigación ha sido financiada parcialmente por el Ministerio de Educación (PIE 200940I011).

## **Desarrollo de un sistema de cultivo en condiciones fotoautotróficas para la micropropagación de genotipos seleccionados de castaño**

B. Cuenca<sup>1</sup>, A. Aldrey<sup>2</sup>, B. Blanco<sup>2</sup>, A. Rodríguez<sup>2</sup>, B. Bogo<sup>2</sup>, C. Sánchez<sup>2</sup> y N. Vidal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> TRAGSA. Vivero de Ourense. Ctra. Maceda-Valdrey km 2. 32700 Maceda. Ourense. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña. bcuenca@tragsa.es

El objetivo de este estudio es la propagación de brotes axilares de castaño en condiciones fotoautotróficas (sin aporte exógeno de azúcares) para mejorar su estado fisiológico con vistas a mejorar su aclimatación. Se ha utilizado un prototipo equipado con una unidad de ventilación forzada para suministrar aire enriquecido en CO<sub>2</sub> y obtener flujos fotosintéticos de fotones (PPF) de 50 a 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> dentro de los envases de cultivo.

Los brotes se cultivaron en biorreactores de 10 litros de capacidad fabricados a partir de envases de polipropileno de uso alimentario Lock&Lock® y equipados con filtros de 0.2 μm. Para mantener los explantos en posición vertical se utilizaron cubos de lana de roca de 1 cm de lado. Se utilizó MS con los nitratos reducidos a la mitad y 0,05 mg/l de BA. Se evaluaron 4 concentraciones de sacarosa (30, 10, 5 y 0 g/l) y 2 niveles de intensidad lumínica (50 y 150 PPF) durante 16 horas de fotoperiodo. Los cultivos fueron sometidos a aireaciones de 1 minuto de duración cada hora. Durante las horas de luz se suministró además aire enriquecido en CO<sub>2</sub> (2000 ppm dentro de los biorreactores). Los controles sin aporte exógeno de CO<sub>2</sub> recibieron este gas en la concentración existente en la cámara de crecimiento (400-450 ppm).

Como explantos se utilizaron 5 clones de castaño resistentes a la tinta. Modificando la intensidad lumínica, el aporte de CO<sub>2</sub> y el tipo y tamaño de los explantos todos los clones han podido propagarse con 5 g/l de sacarosa, y en cuatro genotipos se ha conseguido la propagación fotoautotrófica (sin aplicación exógena de este carbohidrato).

Los autores agradecen la asistencia técnica de Maite García, Begoña Pato y Begoña Correa. Esta investigación ha sido financiada parcialmente mediante el programa FEDER ININTERCONECTA 2013/2014 (proyecto INTEGRACASTANEA EXP00064828/ITC- 20133040).

## Micropropagación de especies de ágave de uso ornamental

Joan Villanova<sup>1</sup>, Elena Espinosa<sup>2</sup>, Ramón Espinosa<sup>2</sup> y José Manuel Pérez-Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández de Elche, Avda. de la Universidad s/n, 03202 Elche, Alicante.

<sup>2</sup>Departamento de cultivo *in vitro*, Viveros Canos S.L., Ctra. Vall de Uxó s/n 12520 Nules, Castellón.

Se conocen más de 300 especies de ágave (*Agave* spp.), muchas de las cuales se cultivan como plantas ornamentales debido a que, por su carácter xerofítico, requieren muy poco mantenimiento. A pesar de su importancia económica, los programas de mejora genética del ágave ornamental son escasos, debido a que su ciclo de vida es muy largo y la reproducción sexual ineficiente por la falta de polinizadores naturales. Además, algunas especies de ágave son muy difíciles de propagar vegetativamente, lo que limita su producción a gran escala. Con la finalidad de establecer un método adecuado para su propagación *in vitro*, se seleccionaron diferentes tipos de explantes en 5 variedades de ágave ornamental que presentaban unos índices muy bajos de regeneración, y se cultivaron en medios asépticos conteniendo distintas concentraciones de reguladores de crecimiento y en distintas condiciones de cultivo (intensidad de luz, fotoperiodo y temperatura).

Dado que los explantes procedían de tallos y hojas obtenidos de plantas adultas, se determinaron en primer lugar las condiciones óptimas para la descontaminación de bacterias y de hongos. A continuación se determinó la combinación de reguladores de crecimiento, fundamentalmente auxinas y citoquininas, que permitía la obtención de callos. La transferencia de estos callos a un medio conteniendo 2,4-D y 6-BAP indujo la regeneración de yemas, pero únicamente a partir de tejidos del tallo. A los 60 días, las yemas se transfirieron a un medio con IBA y NAA para su enraizamiento y finalmente se trasplantaron a macetas para su aclimatación en el invernadero.

Nuestros resultados confirman que la regeneración *in vitro* de nuevas especies de ágave ornamental es factible y abre las puertas a la mejora genética de esta especie.

## **Análisis de ecotoxicidad de acolchados biodegradables mediante cultivo *in vitro* de lechuga, *Lactuca sativa* cv. Trocadero**

Martín-Closas Ll., Carceller A., Pelacho A.M.

Dpto. Hortofruticultura, Botánica y Jardinería. Universidad de Lleida. Avda. Alcalde Rovira Roure 191. 25198 Lleida, España. pelacho@hbj.udl.cat

A la vez que el uso de acolchados plásticos de polietileno (PE) para mejorar la productividad de los cultivos en campo es cada vez mayor, aumenta la preocupación por la acumulación en el ambiente de estos plásticos estables y altamente persistentes. Los plásticos biodegradables y el papel son prometedores sustitutivos de los acolchados de PE. Durante su degradación interactúan con la microbiota del suelo y van liberando intermediarios. Para valorar su potencial ecotoxicidad en plantas existen ensayos de germinación y primeras etapas del desarrollo, y se ha propuesto un sistema *in vitro* que permite evaluar sus efectos un periodo de tiempo más prolongado. Este trabajo presenta el efecto de extractos de acolchados plásticos en la germinación y desarrollo *in vitro* de lechuga, y la implementación de Microtox®, sistema que utiliza bacterias para detectar toxinas en aguas, suelos y sedimentos, para cuantificar su potencial de toxicidad ambiental. Para ello, se incubaron cuatro acolchados negros biodegradables, de base polibutilen–adipato-tereftalato que incorporan otros compuestos (PLA-1; PLA-2; TPSMaíz/AceitesVegetales-TPS-M/AV; TPSPatata-TPS-P), de PE (control no degradable), de papel negro, y un control sin acolchado. Con los extractos se elaboraron medios MS sobre los que se sembraron semillas de lechuga, *Lactuca sativa* cv. Trocadero. Se analizó germinación y desarrollo de las plántulas durante cinco semanas. Los extractos se utilizaron también para el análisis Microtox®.

No se detectaron diferencias significativas en la germinación entre tratamientos. A las cinco semanas de cultivo el desarrollo de las plantas era significativamente menor en los medios con PLA-2 y TPS-P y en menor grado en el medio con extracto de PLA-1. Aunque las cultivadas en TPS-M/AV eran algo menores que las control, para la mayoría de parámetros los extractos TPS-M/AV, PE y papel no tuvieron efectos significativos en su desarrollo. En base a Microtox® ninguno de los tratamientos fue ecotóxico, si bien la EC50 difirió entre tratamientos, con la menor EC50 para el papel.

Se ha demostrado que los acolchados biodegradables de plástico y de papel ensayados no son ecotóxicos en base a Microtox®, pero también que componentes liberados de acolchados PLA-2 y TPS-P reducen el desarrollo *in vitro* de las plantas de lechuga.

## **Enraizamiento in vitro de variedades de pistacho (*Pistacia vera* L.).**

E. García, A. Arbeloa, P. Lorente, J. A. Marín y P. Andreu

Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avenida Montañana 1005. 50059 Zaragoza.

e-mail: egarcia@eead.csic.es

El enraizamiento in vitro de variedades de pistacho se ha estudiado con el objetivo de obtener plantas de reducido tamaño que proporcionen yemas adecuadas para ser injertadas en patrones procedentes de semillas recién germinadas. Para esto se ha utilizado su micropropagación.

En trabajos previos iniciamos con éxito el cultivo de las variedades Kerman, Larnaka, Peters y la selección AD15 a partir de árboles crecidos en campo, al menos durante 10 años. Con el protocolo resultante hemos incorporado la variedad Sirora, y estos cultivos se mantienen en un medio de multiplicación. El enraizamiento, sin embargo, mostró dificultades tanto en la escasa aparición de raíces y en su falta de sincronía, como en la detención del crecimiento del brote debido al cese de la actividad del ápice caulinar, lo que ocasionaba pobres tasas de supervivencia durante la aclimatación de los brotes enraizados.

Dado que el enraizamiento ex vitro no tuvo éxito, se estudió el efecto de diferentes combinaciones de factores en el enraizamiento in vitro. En este trabajo se presenta una selección de los resultados obtenidos que han puesto de manifiesto la gran influencia del genotipo, así como de diferentes factores estudiados entre los que destacan el paclobutrazol (una antigiberelina) o la reducción de la concentración de sacarosa. Sin embargo, la mayor parte de los brotes enraizados cesaron su actividad apical frenando su desarrollo. Los trabajos continúan para obtener información de los factores que influyen en el crecimiento y en la actividad del meristemo apical en la fase de enraizamiento y aclimatación y paralelamente se ha desarrollado un método de injerto ex vitro de ápices de brotes cultivados in vitro (ver poster Marín et al.)

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A-43).



## Conservación de germoplasma de variedades locales de ciruelos del noroeste peninsular.

B. Bogo<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup>, A. Aldrey<sup>1</sup>, P. Covelo<sup>1</sup>, R. Martínez<sup>2</sup>, N. Vidal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña.

<sup>2</sup>Asociación Galega de Froita Autóctona do Eume (agfaeume@gmail.com).  
nieves@iiag.csic.es

Durante las últimas décadas, el cultivo de variedades locales de frutales del noroeste peninsular ha disminuido debido al abandono del medio rural y a su desplazamiento por variedades comerciales procedentes de zonas con diferentes condiciones edafoclimáticas.

El objetivo de este trabajo es la conservación, mediante cultivo *in vitro*, de germoplasma de ciruelos caracterizados por la “Asociación Galega de Froita Autóctona do Eume” y mantenidos en su huerto de conservación en San Sadurniño (A Coruña). Se han establecido *in vitro* dos genotipos (Collón de Frade Negro (CFN) y Claudia Blanca del País (CBP)), a partir de brotes axilares inducidos en estaquillas recogidas de árboles de 3- 4 años.

Una vez obtenidos cultivos estabilizados y libres de microorganismos se determinó la composición hormonal más adecuada para su propagación en medio semisólido en diferentes condiciones de iluminación, y en medio líquido en biorreactores RITA®. Además, se realizaron pruebas de almacenamiento del material vegetal a 4-6 °C, así como de crioconservación por vitrificación.

Los resultados indican que el medio MS con BA 0,5 mg/l y AIB 0,5 mg/l es adecuado para ambas variedades tanto en medio semisólido como en medio líquido, aunque las hojas más grandes se obtienen con menos BA. El cultivo en biorreactores produce más brotes y más largos que el medio semisólido. Los experimentos de crioconservación muestran que CFN tolera mejor la exposición a la disolución de vitrificación PVS2 que CBP. Mientras que con CFN se han obtenido brotes a partir de explantos crioconservados, con CBP deben hacerse más pruebas para obtener porcentajes de viabilidad efectivos. Se han obtenido brotes enraizados de ambas variedades que se aclimataron fácilmente.

Los autores agradecen a José A. Bellas su colaboración en la recogida del material vegetal. Esta investigación ha sido financiada parcialmente por el Ministerio de Educación (PIE 200940I011).

## **Efecto del tipo de la intensidad y calidad de luz en la micropropagación de *Salix viminalis* en condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas.**

N. Vidal<sup>1</sup>, A. Aldrey<sup>1</sup>, B. Blanco<sup>1</sup>, E. Varas<sup>1</sup>, J. Otero<sup>1</sup> y C. Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, A Coruña.

nieves@iiag.csic.es

En este estudio se han propagado brotes axilares de mimbre (*Salix viminalis*) en condiciones fotoautotróficas (sin aporte exógeno de azúcares). Se ha utilizado un prototipo diseñado para el cultivo de castaño y descrito en este mismo libro de resúmenes (Cuenca et al. 2015), que permite suministrar aire enriquecido en CO<sub>2</sub> y está equipado con luces LED de diferentes longitudes de onda.

Los brotes se cultivaron en jarras en medio semisólido o en medio líquido en biorreactores de 1 o 10 litros de capacidad equipados con filtros de 0.2 µm. Se utilizó MS con los nitratos reducidos a la mitad y 0,05 mg/l de BA con o sin 30 g/l de sacarosa y 2 niveles de intensidad lumínica a nivel de los explantos (flujo fotosintético de fotones de 50 y 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) durante 16 horas de fotoperiodo. En los biorreactores de mayor tamaño, y para mantener los explantos en posición vertical, se utilizaron cubos de lana de roca de 1 cm de lado o cajas de plástico provistas de orificios circulares, y se suministró aire enriquecido o no en CO<sub>2</sub> (400 o 2000 ppm). El efecto de la calidad de la luz fue estudiado suministrando luz blanca o una mezcla de luz roja y azul a los brotes cultivados en jarras o en biorreactores de 10 litros.

Seis semanas después de la inoculación se determinó la altura de los brotes, la capacidad de multiplicación, la presencia de raíces y el contenido en pigmentos fotosintéticos entre los brotes sometidos a los distintos tratamientos.

Los autores agradecen la asistencia técnica de Begoña Correa y Estiben Becerra. Esta investigación ha sido financiada parcialmente por el Ministerio de Educación (PIE 200940I011).

## Diseño de un prototipo de biorreactor de inmersión temporal automatizado para la Micropropagación de especies vegetales

<sup>1</sup>Tineo García, L.; <sup>2</sup>Murillo Verduzco, I.; <sup>2</sup>Herrera Sarellano, M; <sup>1</sup>Rivera Pacheco, D.A.; <sup>1</sup>Gutiérrez Coronado, M.A.; <sup>1</sup>Castro Espinoza L.

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias, <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Eléctrica y Electrónica <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Sonora, Unidad Obregón, Campus Náinari. Avenida Antonio Caso 2266, Fraccionamiento Villa Itson, C.P. 85130Cd. Obregón, Sonora, México. email: lorena.tineo@itson.edu.mx

Actualmente el empleo de técnicas *in vitro* para la propagación masiva de plantas se ha convertido en una potencial herramienta biotecnológica en el área vegetal por su aplicación en la obtención de diversos cultivos vegetales. Estas técnicas pueden aplicarse prácticamente a cualquier especie de plantas para la producción rápida de grandes cantidades de éstas, generando materiales genéticamente homogéneos idénticos a la planta madre (Clones) y libres de enfermedades. Las aplicaciones de estas técnicas son múltiples: propagación de cultivares élite, rescate, conservación e intercambio de germoplasma, multiplicación de materiales con problemas de propagación por otras vías, control de enfermedades, así como el apoyo al mejoramiento genético. La utilización del sistema de biorreactores modulares de inmersión temporal automatizado se justifica porque es una técnica innovadora que puede ser aplicada en biofábricas de plantas elites, vía organogénesis o embriogénesis somática, para incrementar los coeficientes de multiplicación en comparación con las formas convencionales de propagación *in vitro*. La automatización del sistema permite un proceso reproducible y rentable para tener mayor control de las variables de operación así como un registro de funcionamiento del sistema por ello se tiene una visión a futuro más económicamente rentable. La aplicación de estos sistemas de biorreactores tiene un alto potencial biotecnológico puesto que ha mostrado buenos resultados en la micropropagación de varias especies como: *Stevia*, *Aloe*, *Agave*, *Cocus*, *Capsicum*, Cedro rojo y algunas cactáceas. El cultivo de plantas en los biorreactores de inmersión brinda condiciones homogéneas durante el cultivo *in vitro* ya que facilitan la disponibilidad de nutrimentos y ofrece ventajas adicionales como una mayor simplicidad en el manejo de la mano de obra y elimina el uso del sustrato gelificante. El objetivo de este proyecto fue diseñar un prototipo de biorreactor modular de inmersión temporal automatizado con sus contenedores que funcionaran para la multiplicación *in vitro* de una gran variedad de especies de plantas a gran escala aumentando los rendimientos y productividad con respecto a la

propagación vegetativa tradicional y con ello satisfacer la demanda de plantas importantes económicamente. En conclusión si se logró el diseño del bioreactor con un sistema operativo totalmente autónomo, movido por electricidad sin requerir instalaciones especiales. Las unidades modulares de los biorreactores son completamente independientes y son fácilmente transportables de las áreas estériles a las áreas de cultivo. Su tamaño permite una mayor capacidad operativa manteniendo su fácil manejo. Los contenedores de policarbonato para el material biológico en crecimiento son autoclaveables y re-usables, su diseño de boca amplia y sus partes fácilmente ensamblables permiten una fácil y rápida transferencia de materiales y cambios de medios de cultivo.





## ***SESIÓN TEMÁTICA***

### **IV. BASES MOLECULARES Y FISIOLÓGICAS DEL CULTIVO IN VITRO**



## The molecular bases of the tissue culture – tamarillo (*Solanum betaceum*) as a case study

Jorge M. Canhoto & Sandra I. Correia

Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal. jorgecan@ci.uc.pt

Plant tissue culture is a set of techniques with a wide range of applications both in plant cloning and plant development analysis. Protocols for cloning thousands of species have been developed using axillary shoot proliferation, organogenesis or somatic embryogenesis. Moreover, tissue culture is of major importance for plant conservation, production of secondary metabolites and plant genetic transformation. In spite of the important achievements made on tissue culture in the last years, the understanding of the molecular events underlying the processes of dedifferentiation and acquisition of totipotency remain largely unclear. It is true that genes directly involved on plant regeneration, mainly on somatic embryogenesis induction, have been found and characterized, such as a *SERK* and *LEC1* among some others. However, this was achieved mainly for a few model species including *Arabidopsis* and carrot. During the last years we have been working in plant tissue culture of several species, from annuals to trees and from ferns to angiosperms. From these species we have found that tamarillo (*Solanum betaceum*, syn. *Cyphomandra betacea*), a tree of the solanaceous family has particular features that make it an interesting system for plant tissue culture and molecular analysis. Tamarillo can be regenerated through axillary shoot proliferation, organogenesis and somatic embryogenesis. Protocols for protoplast isolation and culture have been developed and a method for genetic transformation was also established. Somatic embryogenesis in this species is particularly interesting since embryogenic and non-embryogenic cells can be obtained from the same explant (leaves or zygotic embryos and in the same culture conditions: high sucrose levels and an auxin such as 2,4-D or picloram. On these conditions, embryogenic and non-embryogenic calli can be separated from each other and propagated at will to obtain large amounts of embryogenic and non-embryogenic cells showing the same genetic background but a different developmental potential. Based on this system proteomic and transcriptomic approaches have been used trying to identify proteins and transcripts related with somatic embryogenesis induction. The results have shown that a putative tRNA/rRNA methyltransferase (NEP-TC 26.5 kDa, GenBank accession number JQ766254) with a high degree of homology with the *Arabidopsis thaliana* tRNA/rRNA methyltransferase



(SpoU) family is mainly expressed on non-embryogenic calluses. NEP-TC is a cytosolic protein mainly expressed around the nucleus of non-embryogenic cells and NEP-TC orthologous in *Arabidopsis* showed a reduced expression in embryos when compared with leaves or callus. Besides, non-embryogenic samples with high NEP-TC expression levels show enhanced methyltransferase activity. The data so far obtained point to an inhibitory role of *NEP-TC* on somatic embryogenesis induction contrasting with the promoter effect of other genes already identified on somatic embryo formation.

## **La inducción de embriogénesis de microsporas en colza produce paredes celulares anormales con niveles alterados de calosa y celulosa**

Verónica Parra-Vega, Patricia Corral-Martínez, Alba Rivas-Sendra y Jose M. Seguí-Simarro

COMAV - Universitat Politècnica de València. CPI, Edificio 8E - Escalera I, Camino de Vera, s/n, 46022. Valencia, Spain.

e-mail: [seguisim@btc.upv.es](mailto:seguisim@btc.upv.es)

La inducción de embriogénesis en microsporas produce cambios dramáticos en diferentes aspectos de la fisiología celular y la estructura, siendo los cambios en la pared celular unos de los más interesantes y poco conocidos. En este trabajo, hemos utilizado criofijación por alta presión y criosustitución (HPF/FS), inmunolocalización y microscopía confocal y electrónica para analizar la estructura y composición de las primeras paredes de las células formadas tras la inducción de embriogénesis en cultivos de microsporas de colza (*Brassica napus*) tanto convencionales como tratados con agentes que alteran los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Nuestros resultados revelan que uno de los primeros signos de la entrada en embriogénesis es la formación, mediada por  $\text{Ca}^{2+}$ , de una capa rica en calosa y sin celulosa justo debajo de la intina. En paralelo, las primeras divisiones dan lugar a la formación de paredes celulares irregulares, con huecos e incompletas. Proponemos que las paredes celulares anormales se producen por la deposición masiva de material excretado del citoplasma, la síntesis masiva de calosa, y la inhibición de la síntesis de celulosa en paralelo. La calosa sería producida por calosa sintetas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , y activadas por un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular debido al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática como resultado del choque térmico utilizado como inductor. Todas estas características están ausentes en las estructuras tipo polen y en los embriones derivados de microsporas pocos días tras el final del choque térmico, que presentan paredes celulares convencionales de tipo somático. En conjunto, nuestros resultados proporcionan una explicación a una serie de aspectos relevantes de la embriogénesis de microsporas incluida la función del  $\text{Ca}^{2+}$  y la aparición de las paredes celulares anormales, la fusión nuclear y la duplicación del genoma.

## Estudio filogenético del gen *TCTP* en diferentes especies y análisis de su expresión en diferentes procesos de desarrollo

S. Rico<sup>1</sup>, E. Varas<sup>1</sup>, P. Coveló<sup>1</sup>, M. Pérez<sup>1</sup>, D. Rubianes<sup>1</sup>, N. Vidal<sup>1</sup> y C. Sánchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Av. De Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña)

La proteína TCTP (*translationally controlled tumour protein*) es una proteína multifuncional altamente conservada en eucariotas que parece estar implicada en diversos procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, control del ciclo celular, apoptosis, y protección contra diversos tipos de estrés incluyendo mecanismos de defensa en respuesta a la infección con patógenos.

En este trabajo se ha aislado, secuenciado y analizado la región codificante del gen TCTP en más de 20 especies herbáceas y leñosas de diferentes familias, incluyendo gimnospermas. Además se analizó su expresión mediante qPCR e hibridación in situ en diferentes procesos morfogénéticos, así como la respuesta del gen *CsTCTP* a la infección in vitro con *Phytophthora cinnamomi* de plántulas de castaño que presentan diferentes niveles de resistencia frente al patógeno.

Las secuencias obtenidas codifican una proteína de 168 aminoácidos, que muestra alta homología con la proteína TCTP de otras especies. Se identificaron varios dominios conservados: los dominios TCTP1 y TCTP2, las regiones de unión a microtúbulos, a calcio, y a Rab GTPasa, además de nueve posibles lugares de regulación por miristilación y fosforilación. La poca distancia evolutiva que muestra el árbol filogenético indica que esta proteína está altamente conservada. Los análisis de expresión del gen durante el desarrollo de embriones somáticos de castaño y alcornoque muestran un aumento de los niveles del transcrito a medida que avanza el estado de diferenciación de los embriones, con localización preferencial en el meristemo caulinar y polo radicular del embrión. En material postembrionario, también se expresa abundantemente en tejidos en división activa, como yemas, ápices, primordios foliares y primordios de raíz durante la inducción de raíces adventicias. Finalmente, *TCTP* parece estar implicado en mecanismos de defensa frente a *P. cinnamomi*, mostrando los niveles de expresión más elevados 48 h tras la infección con el patógeno en el clon que presenta más resistencia.

Financiación: Este trabajo fue financiado parcialmente por la Xunta de Galicia (10MRU400033PR).

## Efecto del NPA en la inducción de raíces adventicias y en la expresión génica en castaño

E.Varas<sup>1</sup>, N. Vidal<sup>1</sup>, P. Covelo<sup>1</sup>, J.M. Vielba<sup>1</sup> y C. Sanchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Av. De Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña)

Los programas de propagación in vitro de especies forestales de genotipos elite se ven limitados por la escasa capacidad morfogénica de los tejidos adultos, siendo especialmente compleja la fase de enraizamiento. Las auxinas juegan un papel fundamental en la desdiferenciación y reprogramación celular necesarias para la formación de raíces adventicias regulando la expresión de genes involucrados en el proceso.

En este trabajo, hemos utilizado el sistema de hojas procedentes de brotes in vitro de dos líneas de castaño con diferente estado ontogénico (juvenil y adulto), lo que determina su diferente capacidad rizogénica (90% vs 10%), en respuesta a la aplicación de 25  $\mu\text{M}$  de ácido indolbutírico (AIB) durante 5 días en oscuridad. En primer lugar, mediante la aplicación de 50  $\mu\text{M}$  de ácido napftil-p-talámico (NPA) durante 5 días, a diferentes tiempos desde que se inició el tratamiento con AIB (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h), se determinó el momento en el cual la inhibición del transporte polar de auxinas ejerce un efecto determinante en la capacidad rizogénica de las hojas.

Además, utilizando muestras de las dos líneas tratadas y no tratadas con AIB, así como hojas juveniles tratadas con AIB y NPA y recogidas a las 6, 12 y 24 h, se evaluaron los niveles de expresión de putativos genes involucrados en el enraizamiento adventicio, como son los genes de la familia GRAS (*CsSHR1*, *CsSHR2*, *CsSCL3*), y/o en la homeostasis de las auxina, como es el caso del gen *CsGH3-2*. Los resultados mostraron que la capacidad rizogénica se reduce a valores inferiores a un 50% durante las primeras 48 h de aplicación del NPA, momento en que ocurre la desdiferenciación y determinación del destino de las futuras células iniciales de raíz. Por otra parte, los niveles de expresión de dichos genes se ven alterados por los distintos tratamientos.

Financiación: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia (10MRU400033PR). EV fue becaria predoctoral del CSIC (JAEPre).

## Estrés oxidativo en los protocolos de criopreservación de *Mentha x piperita*

C. Kremer<sup>1</sup>, M.T. Solis<sup>2</sup>, M.E. Gonzalez-Benito<sup>1\*</sup>, P.S. Testillano<sup>2</sup>, C. Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología- Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. <sup>2</sup> Grupo de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid. [me.gonzalezbenito@upm.es](mailto:me.gonzalezbenito@upm.es)

La crioconservación ofrece una serie de ventajas sobre otros métodos para la conservación a largo plazo del germoplasma de especies de propagación vegetativa. En comparación con la conservación *in vitro* tiene la ventaja de reducir los posibles cambios genéticos que pueden ocurrir. Sin embargo, hay algunos trabajos en los que se ha encontrado inestabilidad genética y epigenética después de la criopreservación. Estos cambios podrían estar relacionados con el estrés impuesto durante la aplicación de tratamientos para la crioprotección del material vegetal. Algunas de estos estreses están relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden causar daño oxidativo y reducir la viabilidad de los tejidos. Las ROS pueden ser detectadas y localizadas *in situ* mediante el uso de sondas fluorescentes, como el DHE, que reacciona *in vivo* con ROS, preferentemente con los aniones superóxido, y permite su localización *in situ* mediante análisis con microscopía confocal (Rodríguez-Serrano et al. 2012).

Se procedió a cuantificar y detectar el estrés oxidativo con el uso de estas técnicas después de diferentes pasos de un protocolo de crioconservación por encapsulación-deshidratación: endurecimiento de los segmentos nodales a 25 ° C 16 h de luz / -1 ° C 8 h oscuridad durante 3 semanas (N); ápices cultivados en 0,3 M de sacarosa por 1 día (P); ápices encapsulados en cuentas de alginato cultivados en medio con 0,75 M de sacarosa por 1 noche (S). También se evaluó el efecto de la adición de ácido ascórbico 0,43 mM, como un inhibidor / eliminador de ROS, en dos pasos (P y S).

Después de la etapa S se observó con DHE un aumento de la señal de fluorescencia, lo que indica la producción de radicales superóxido. Dicha señal disminuyó con la inclusión de ácido ascórbico en el medio. Estos resultados confirmaron que el daño producido por la oxidación podría mitigarse con la inclusión de antioxidantes en las etapas críticas del protocolo de crioconservación.

Investigación llevada a cabo dentro del proyecto AGL2010-21989-C02-01, y parcialmente financia-

da con proyectos BFU2011-23752 y AGL2014-52028-R del MINECO..

Rodríguez-Serrano M, Barany I, Prem D, Coronado MJ, Risueño MC, Testillano PS. (2012). NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Botany*, 63, 2007-2024.

## Regulación hormonal de la respuesta rizogénica de brotes de chopo y de la expresión del gen *PtSHR1*.

E. Varas<sup>1</sup>, C. Miguel<sup>2</sup>, B. Jones<sup>3</sup> y C. Sanchez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Av. de Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña)

<sup>2</sup>Forest Biotech Laboratory in Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (iBET) / Instituto de tecnología Química e Biológica- Universidade Nova de Lisboa (ITQB-UNL). Av. da República, EAN, 2780-157 Oeiras (Portugal).

<sup>3</sup>A20 John Woolley Building, 2006 University of Sydney –Australia / UPSC, Sweden.

El enraizamiento adventicio es una de las etapas limitantes en los programas de propagación vegetativa de especies forestales. Este proceso está regulado por múltiples factores, entre ellos, las rutas de señalización hormonal que juegan un papel crucial en la regulación de la transcripción de ciertos genes implicados en la reprogramación celular necesaria para la iniciación de los meristemas de raíces adventicias. El estudio de las vías de señalización hormonal, que modifican la expresión génica y con ella su capacidad rizogénica, podría mejorar la capacidad de propagación vegetativa de árboles adultos.

El gen *Short Root (SHR)* además de estar implicado en el mantenimiento del centro quiescente, en la especificación del destino celular durante la formación de las raíces y en la formación de raíces laterales, también parece jugar un papel importante en la iniciación de raíces adventicias. Además, el gen *SHR* participa en otros procesos como el establecimiento del patrón vascular, el desarrollo del protoxilema y del floema, y el crecimiento y desarrollo de la planta.

En este trabajo se emplearon plantas transgénicas de chopo, como especie modelo, que contienen el promotor del gen *PtSHR1* fusionado al gen reportero GUS para analizar el efecto de la manipulación hormonal de las rutas de señalización auxínica y del ácido giberélico. Para ello se realizaron 4 tratamientos: 2  $\mu\text{M}$  ácido indol butírico, 5  $\mu\text{M}$  ácido napftil-p-talámico (un inhibidor del transporte auxínico) 2  $\mu\text{M}$  ácido giberélico y 5  $\mu\text{M}$  paclobutrazol (inhibidor de la ruta de biosíntesis del ácido giberélico). Mediante estos tratamientos se alteró la respuesta rizogénica de los brotes así como el patrón de expresión del gen durante la reprogramación celular e iniciación del proceso de enraizamiento adventicio (a las 24 horas), durante el desarrollo de los primordios (a los 7 y 14 días) y en el desarrollo de la raíz.

Financiación: EV fue becaria predoctoral del CSIC (JAEpre) y becada por la Xunta de Galicia (beca IN809A).

## **Caracterización de los mecanismos implicados en la regeneración de plantas albinas durante la producción de plantas doblehaploides en cebada**

M.P. Vallés<sup>1</sup>, S. Allué<sup>2</sup>, D. Salcines<sup>3</sup>, A.M. Castillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza.

<sup>2</sup>Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Carretera Cuarte,s/n, 22071 Huesca.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Calle Menéndez Pelayo 24, 50009 Zaragoza.

Uno de los fenómenos asociados a la producción de plantas doblehaploides (DH) en cereales, mediante el cultivo de anteras o de microsporas aisladas, es la regeneración de plantas deficientes en clorofila, plantas albinas. En el proceso de embriogénesis de la microspora, la microspora sometida a un tratamiento de estrés cambia su patrón de desarrollo de la vía gametofítica a la vía esporofítica. Los orgánulos presentes en la microspora también reaccionan al tratamiento de estrés. Los plástidos de las microsporas, que en desarrollo normal a polen degenerarían o se transformarían en amiloplastos, acaban convirtiéndose en cloroplastos funcionales en las plantas DH regeneradas. Sin embargo, en muchos casos la transformación de los plástidos no es eficiente, obteniéndose plantas albinas.

El albinismo se ha estudiado desde distintas áreas como la citología, la genética y la genómica, observándose tanto influencia del genotipo como del ambiente. Sin embargo, se desconoce qué mecanismos intervienen en la regeneración de plantas albinas. En este trabajo se presenta la caracterización de la expresión génica de genes asociados funcionalmente con los plástidos en dos líneas DHs, casi isogénicas, de una población especialmente diseñada para el estudio genético del albinismo en cebada y que tienen distinto porcentaje de regeneración de plantas albinas. Esta caracterización tiene como objetivo la determinación de los mecanismos moleculares asociados al albinismo a lo largo de la embriogénesis de la microspora y en plantas DH regeneradas.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los Proyectos AGL2010-17509 y AGL2013-46698-R del Plan Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias y por el Gobierno de Aragón (Grupo A06).

## Micropropagación de plántulas de la orquídea *Laelia autumnalis* iluminadas con diodos emisores de luz

M. M. Murillo-Talavera<sup>1</sup>, M. E. Pedraza-Santos<sup>1</sup>, N. Gutiérrez-Rangel<sup>2</sup>, M. N. Rodríguez-Mendoza<sup>3</sup>, P. Lobit<sup>1</sup>, A. Martínez-Palacios<sup>1</sup>, S. Ochoa-Ascencio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Santiago Tapia No. 403, Col. Centro. CP 58 000. Morelia, Michoacán, México. miriam.murillo9@hotmail.com

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Puebla. Puebla, México

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Estado de México, México

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la influencia de diferentes espectros de iluminación LED sobre el desarrollo *in vitro* de *Laelia autumnalis*. Plántulas de tres meses de edad desarrolladas *in vitro*, fueron subcultivadas en frascos de vidrio de 100 mL con 20 mL de medio Murashige y Skoog más tiamina (0.4 mg L<sup>-1</sup>), inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarosa (30 g L<sup>-1</sup>), agar (6 g L<sup>-1</sup>) a un pH ajustado de 5.7. Los cultivos se incubaron en cuatro tratamientos con luz LED: 75% rojo + 25% azul, 50% rojo + 50% azul, 25% rojo + 75% azul y 100% blanco más un tratamiento control con luz blanca fluorescente, cada tratamiento se repitió seis veces. Las longitudes de onda emitidas por las fuentes de iluminación fueron: LEDs rojos a 660 nm, LEDs azules a 450 nm y luz LED blanca y fluorescente con un rango de 400 a 760 nm. Para la evaluación se registró la longitud de plántula, longitud de raíz, número de hojas y raíces, materia fresca y seca y contenido de clorofila a, b y total. Los resultados obtenidos mostraron que la iluminación con LEDs blancos fue más eficiente en el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Laelia autumnalis* al obtener valores del doble o más de acumulación de clorofila a, b y total, y hasta 2% más acumulación de biomasa, por lo que fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos y al control. Los tratamientos con iluminación rojo/azul no indujeron la formación de raíces en ninguna de sus combinaciones y plantas hasta 1.38 cm más pequeñas se registraron bajo condiciones del tratamiento control. De acuerdo a los resultados se confirma que los LEDs son una eficaz alternativa para la micropropagación de *Laelia autumnalis*; además su calidad e intensidad son fácilmente ajustables y su emisión térmica es baja.

## Evaluación de la influencia del etileno y sus moduladores en la organogénesis de limonero (*Citrus limon* L. Osbeck)

N. Navarro-García, F. Córdoba, D. Martínez-Romero y O. Pérez-Tornero\*

Equipo de Citricultura, IMIDA. C/ Mayor s/n, 30150 La Alberca (Murcia).

\*Email: olalla.perez@carm.es

Uno de los factores físicos medioambientales más importantes que afectan al cultivo *in vitro* de plantas es el etileno ( $C_2H_4$ ), una hormona gaseosa que juega un papel significativo en el crecimiento y el desarrollo de las plantas. Sin embargo, su efecto en la organogénesis de limonero no ha sido analizado. El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de diferentes compuestos que afectan a la producción del etileno, sobre la organogénesis de explantos de material adulto de limonero cultivado *in vitro*. Para llevar a cabo el estudio, se emplearon segmentos nodales procedentes de brotes de limonero de las variedades Fino 49 y Verna 51. Estos explantos fueron cultivados en un medio de regeneración con distintas concentraciones de diferentes moduladores del etileno: los activadores de la producción de etileno ácido 1- aminocilopropano-1-carboxílico (ACC) y Etefón, y los inhibidores de su acción como el tiosulfato de plata (STS) o de su producción como el  $CoCl_2$ . Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el etileno juega un importante papel en la organogénesis de explantos maduros de limonero. Altas concentraciones en la fase gaseosa dentro del recipiente del cultivo produjo la disminución de la regeneración en esta especie. Entre los activadores del etileno utilizados, el ACC produjo un efecto negativo mayor que el Etefón en la tasa de regeneración y el número de yemas por explanto regenerante, y este efecto estuvo asociado con una mayor producción de etileno por los explantos. De los inhibidores del etileno, el cloruro de cobalto no produjo ninguna mejora en la organogénesis de los explantos de limonero y por otra parte se observaron efectos tóxicos en las concentraciones más altas. El STS mejoró de manera significativa la regeneración de los explantos, sin embargo el aumento de la concentración de este compuesto en el medio de cultivo produjo también un aumento del etileno lo que está relacionado con su modo de acción. El STS produjo los porcentajes de regeneración más altos en este estudio.

## **El tratamiento con 5-azacitidina hipometila el DNA y favorece la reprogramación e inicio de embriogénesis en cultivos de microsporas de colza y cebada**

M.T. Solís, A. A. El-Tantawy, V. Cano, M.C. Risueño y P.S. Testillano

Grupo de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas, Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid

La embriogénesis de microsporas inducida por estrés *in vitro* es un excelente ejemplo de plasticidad y totipotencia celular, y una herramienta biotecnológica en mejora vegetal. La metilación del DNA interviene en la regulación de la expresión génica durante la diferenciación y proliferación de células vegetales. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado cambios en la metilación del DNA tras la reprogramación de la microsporas a embriogénesis (1).

En este trabajo se analizan los efectos de tratamientos de corta y larga duración con el agente demetilante 5-azacitidina (AzaC) sobre la inducción y progresión de embriogénesis de microsporas en dos especies, la dicotiledónea *Brassica napus* (colza) y la monocotiledónea *Hordeum vulgare* (cebada). Se ha analizado el porcentaje de proembriones después de la inducción y la producción final de embriones, los niveles de metilación global del DNA, la distribución de 5-metil-deoxi-citosina (5mdC), mediante inmunofluorescencia y análisis confocal, y los patrones de condensación cromatínica. Los tratamientos cortos con AzaC aumentaron la inducción de embriogénesis, disminuyendo la metilación del DNA y modificando los patrones de distribución de 5mdC. Los tratamientos largos disminuyeron drásticamente la producción de embriones. Los resultados fueron similares en ambas especies y sugieren que la hipometilación del DNA favorece la reprogramación, adquisición de totipotencia e inicio de embriogénesis, pero impide la posterior diferenciación del embrión, que requiere metilación de novo del DNA (2). Estos hallazgos muestran el potencial del uso de inhibidores epigenéticos, como AzaC, en el diseño de nuevos protocolos *in vitro* para mejorar la eficiencia de inducción de embriogénesis de microsporas.

1.Solís et al. 2012. J. Exp. Bot. 63, 6431-6444.

2.Solís et al. 2015. Front. Plant Sci. 6, 472.

Financiado con proyectos BFU2011-23752 y AGL2014-52028-R (MINECO, FEDER).

## La reprogramación de la microspora por estrés *in vitro* y el inicio y progresión de la embriogénesis implica biosíntesis y acumulación de auxina, su acción y transporte

H. Rodríguez-Sanz<sup>1</sup>, M.T. Solís<sup>1</sup>, M.F. López<sup>2</sup>, A. Gómez-Cadenas<sup>2</sup>, M.C. Risueño<sup>1</sup>, P.S. Testillano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas, Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid <sup>2</sup> Dep. CC Agrarias y del Medio Natural, Univ.Jaume I, Campus Riu Sec, Castellón.

E-mail: testillano@cib.csic.es

Es ampliamente conocido el papel de las auxinas en numerosos procesos de desarrollo incluyendo la formación del embrión, sin embargo no hay prácticamente información sobre su función y dinámica en la embriogénesis de microsporas *in vitro*.

En este trabajo se han analizado los cambios en la concentración de auxina endógena y su acumulación celular, la expresión de *TAA1* y *NIT2* que codifican enzimas de dos vías biosintéticas de auxina, la expresión del transportador de auxina PIN1 y los efectos de la inhibición del transporte y la acción de auxina con N-1-naftilftalámico ácido (NPA) y  $\alpha$ - (p-clorofenoxi) ácido isobutírico (PCIB) respectivamente durante la embriogénesis de microsporas de *Brassica napus*, sistema *in vitro* que se desarrolla en un medio de cultivo sin auxina ni reguladores de crecimiento exógenos.

Los resultados muestran el incremento y acumulación de auxina tras la reprogramación e inicio de embriogénesis, desde las primeras divisiones, así como su aumento con el desarrollo del embrión. Los patrones de expresión de los genes de biosíntesis de auxina *TAA1* y *NIT2* y del transportador PIN1 muestran un perfil similar, induciéndose desde las primeras etapas y aumentando progresivamente. La distribución de auxina en el embrión es uniforme en las primeras etapas, mientras que en los embriones corazón y torpedo se acumula en las regiones apical y basal. Los tratamientos con NPA y PCIB inhiben el desarrollo y reducen drásticamente la producción de embriones, indicando que el transporte polar y la acción de la auxina son necesarios para la formación de los embriones derivados de microsporas. Estos hallazgos indican que la biosíntesis y acumulación de auxina endógena, su acción y transporte polar son necesarios para la reprogramación de microsporas inducida por el estrés, el inicio y la progresión de la embriogénesis.

Rodríguez-Sanz et al. 2015. *Plant Cell Phys.* Advance Access published April 22.  
DOI: 10.1093/pcp/pcv058.

Financiado con proyectos BFU2011-23752 y AGL2014-52028-R (MINECO, FEDER).

## Estimulación del crecimiento de microplantas de *Laelia autumnalis* mediante el tratamiento con rayos gamma

S. Hernández-Muñoz<sup>1</sup>, M. E. Pedraza-Santos<sup>1</sup>, S. P. Fernández-Pavía<sup>1</sup>, P. A. López<sup>2</sup>, M. Martínez-Trujillo<sup>1</sup> y A. Martínez-Palacios<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Santiago Tapia No. 403, Col. Centro, CP 58000. Morelia, Michoacán, México. selene451a@hotmail.com.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados Campus Puebla. Carretera México-Puebla.

La exposición de tejidos *in vitro* a radiación ionizante con rayos gamma a dosis altas puede generar variación, aunque a dosis bajas acelera el desarrollo vegetal. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la radiación gamma (<sup>60</sup>Co) sobre el desarrollo de plántulas de *L. autumnalis*, una orquídea mexicana con atractivas características florales que presenta un largo periodo vegetativo *in vitro*. Protocormos de 45 días se sometieron a diez dosis de irradiación (5 a 50 Gy con intervalos de 5 Gy y un testigo sin irradiar); posteriormente, se transfirieron durante tres ocasiones a medio Murashige y Skoog fresco sin fitohormonas. Siete meses después de la radiación, se evaluaron las variables longitud, peso de materia fresca y seca de plántulas, ancho de hojas y número de raíces. Se realizó análisis de varianza y la prueba de Tukey. Las plántulas irradiadas con 5 Gy fueron 32 % más largas e incrementaron su peso de materia fresca, peso de materia seca, ancho de las hojas y número de raíces en 29, 53, 13 y 31 %, respectivamente, con relación al tratamiento sin irradiar. Al aplicar las dosis de 10 Gy se aumentó el peso de materia fresca y la longitud de plántula en 20 y 10 %, respectivamente. Por el contrario, al incrementar la dosis de radiación a 45 Gy el peso de materia fresca, peso de materia seca y número de raíces disminuyó en 55, 34 y 52 %, respectivamente, con relación a las plántulas no expuestas a la radiación. Con la dosis de 50 Gy la altura de plántula y el ancho de la hoja se redujo 34 y 29 %, respectivamente, con relación al tratamiento sin irradiar. Estos resultados confirman que dosis bajas de radiación (5 a 10 Gy) aceleran el crecimiento de las plántulas de *Laelia autumnalis*.

## The role of glutathione-S-transferases in resveratrol transport out of grapevine cells

Martínez-Márquez A<sup>a</sup>, Martínez-Esteso MJ<sup>a</sup>, Vilella M<sup>a</sup>, Sellés-Marchart S<sup>a,b</sup>, Morante-Cariel J<sup>ac</sup>, Hurtado E<sup>a</sup>, Almagro L<sup>d</sup>, Palazon J<sup>e</sup>, Pedreño MA<sup>d</sup>, Bru-Martínez R<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Plant Proteomics and Functional Genomics Group, Department of Agrochemistry and Biochemistry, Faculty of Science, University of Alicante, Alicante, Spain.

<sup>b</sup>Research Technical Facility, Proteomics and Genomics Division, University of Alicante, Alicante, Spain. <sup>c</sup>Biotechnology and Molecular Biology Group, Quevedo State Technical University, Quevedo, Ecuador. <sup>d</sup>Plant Peroxidases Group, Department of Plant Physiology, University of Murcia, Murcia, Spain. <sup>e</sup>Laboratory of Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII sn, E-08028 Barcelona, Spain.

*Vitis vinifera* cell cultures response to elicitors synthesizing and extracellularly accumulating stilbenoid phytoalexins, particularly, large amounts of trans-resveratrol (tR) are produced when cells are challenged with methylated cyclodextrins (MBCD) alone or combined with methyl jasmonate (MeJA). The pathways for transport of tR to the extracellular medium in grapevine cells, being of utmost biotechnological relevance, are mostly unknown. Glutathione-S-transferases (GSTs) are a large protein family with different classes that carry out an array of functions including the trafficking and accumulation of plant secondary metabolites. Upon MBCD/MeJA treatments, both microarray transcriptome analysis (Almagro et al. 2014) and, especially DIGE proteome analysis (Martínez-Esteso et al. 2011; unpublished results), display strong abundance profile correlation of several  $\tau$  subclass GSTs with several stilbene synthase (StSy), and phenylalanine ammonia lyase (PAL) isoforms and paralogs and the tR metabolite itself. Further, qRT-PCR gene expression analysis provides evidence of co-expression of 5 StSy paralogs and 2 specific  $\tau$ -GSTs subclass paralog genes but not with 2 GSTs from other clades. This accumulated evidence strongly points to a role for GST in tR accumulation, potentially be related to the transport of the metabolite. To analyze the functionality of these specific GSTs, we have cloned one of the elicitor-induced grapevine GST genes and used for the generation of stably transformed grapevine cv Gamay cell lines using *Agrobacterium*-mediated transformation. In contrast to wild lines, only transformed cell lines were shown to accumulate extracellular of tR for more than 12 days when an absorbent compound such as PVP or beta-CD was added in the culture medium at low concentration. As a conclusion, the co-expression GSTs in relation to StSy and accumulation extra-



cellular of tR provide strong evidence of its role in tR trafficking within the cell in its way to the extracellular medium.

Acknowledgements: Work supported by Spanish Ministry of Science and Innovation (BIO2011-29856-C02-01, BIO2011-29856-C02-02 and BIO2014-51861-R), FEDER and Conselleria d'Educacio, Cultura I Sport de la Generalitat Valenciana (FPA/2013/A/074). J.M.C. holds a postdoctoral grant from SENES-CYT-GOVERNMENT OF ECUADOR (006-IECESMG5-GPLR-2012)

#### References cited

1. Almagro L, Carbonell-Bejerano P, Belchi'-Navarro S, Bru R, Marti'nez-Zapater JM, et al. (2014) Dissecting the Transcriptional Response to Elicitors in *Vitis vinifera* Cells. PLoS ONE 9(10): e109777. doi:10.1371/journal.pone.0109777.
2. Martinez-Esteso MJ, Sellés-Marchart S, Vera-Urbina JC, Pedreño MA, Bru-Martinez R (2011) DIGE analysis of proteome changes accompanying large resveratrol production by grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to methyl- $\beta$ -cyclodextrin and methyl jasmonate elicitors. J Proteomics. 74(8):1421-36.

## **Expresión diferencial del gen *CsGH3-1* y su relación con la formación de raíces adventicias en los brotes de castaño.**

J. M. Vielba, E. Varas, P. Covelo, S. Rico y C. Sánchez.

Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Av. de Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña).

La formación de raíces adventicias en especies forestales es un proceso complejo en el que las señales externas, los niveles endógenos de reguladores del crecimiento y otros factores deben ser integrados para un correcto desarrollo del nuevo órgano. El estado ontogenético del árbol también es muy relevante pues al alcanzar la madurez muchos árboles pierden la capacidad de formar raíces adventicias. Las auxinas están en el núcleo de todos estos aspectos.

En nuestro sistema *in vitro* de brotes de castaño con el mismo genotipo pero diferente estado ontogenético (Copa y Renuevos basales), los brotes adultos no enraízan al ser tratados con ácido indol-butírico, mientras que los de carácter juvenil responden un 90%. Usando este sistema hemos aislado una secuencia perteneciente a la familia GH3 de genes de respuesta temprana a auxina. Los genes de esta familia están relacionados con la homeostasis de esta hormona en los tejidos y con la integración de otros estímulos.

Los análisis *in silico* de la secuencia y de la putativa proteína derivada de ella, así como los análisis de expresión sugieren que esta proteína actúa catalizando la formación de conjugados de auxinas con varios aminoácidos, en principio mostrando una tendencia a formar aquellos destinados para ser catabolizados, y por tanto actuaría reduciendo los niveles de auxinas en los tejidos. *CsGH3-1* muestra una expresión diferencial en los brotes dependiendo de su origen ontogenético, siendo la expresión mayor y más sostenida en los brotes adultos en respuesta a la auxina. Además, el patrón de expresión en los tejidos varía también a nivel espacial, mostrando una relación directa con la formación de los gradientes de auxina necesarios para desencadenar la respuesta morfogénica. Nuestros resultados sugieren un papel fundamental para esta proteína en el diferente comportamiento de las dos líneas de brotes en respuesta a la auxina.

Financiación: Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia (10MRU400033PR).

## Cambios epigenéticos en ápices crioconservados de *Mentha x piperita*

C. Martín\*, C. Kremer, M.E. Gonzalez-Benito

Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid.

El análisis de los cambios epigenéticos que pueden aparecer durante el cultivo de tejidos y la crioconservación de plantas está ocupando un lugar importante en los estudios de la estabilidad genética de estos procesos. Aunque la crioconservación ofrece una estabilidad genética mayor en comparación con otras técnicas de conservación, se han detectado algunas variaciones genéticas y epigenéticas en cultivos crioconservados. La metilación del ADN es un importante regulador epigenético de la expresión de genes implicados en el desarrollo vegetal. Se piensa que la metilación modula la expresión de genes bloqueando el acceso de factores de transcripción a secuencias promotoras y mediante la alteración de la estructura secundaria del ADN (Ng y Bird, 1999). La herencia epigenética de los patrones de metilación del ADN es especialmente relevante en cultivos propagados vegetativamente, ya que la metilación alterada en las plantas recuperadas puede persistir somáticamente en las generaciones posteriores, posiblemente causando inestabilidad genética (Johnston et al, 2009).

En este trabajo, se han utilizado marcadores MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) para detectar los cambios epigenéticos en el patrón de metilación de citosina durante todo el proceso de criopreservación, mediante un protocolo de encapsulación-deshidratación, de ápices de menta (*Mentha x piperita*): en el control *in vitro* (A); endurecimiento de los segmentos nodales a 25 °C 16 h luz / -1 °C 8 h oscuridad durante 3 semanas (N); ápices cultivados en 0,3 M de sacarosa por 1 día (P); ápices encapsulados en cuentas de alginato cultivadas en medio con 0,75 M de sacarosa por 1 noche (S); después de 5 h desecación (D); después de un día de la recuperación de nitrógeno líquido (Cr). También se evaluó el efecto de la adición de vitamina E o 0,43 mM de ácido ascórbico en el paso P. Se llevó a cabo un estudio de la estabilidad genética mediante marcadores RAPD y AFLP en esos mismos pasos del protocolo.

El análisis mediante marcadores RAPD y AFLP reveló un aumento del porcentaje de los marcadores variables durante todo el proceso de criopreservación. La mayoría de las muestras variables correspondían a los ápices después de la desecación (D) y de la crioconservación (Cr), sin influencia de la utilización de antioxidantes. Del mismo modo, se observó una disminución de la metilación de las muestras a lo largo del proceso. No se detectó ningún efecto de la utilización

de antioxidantes en los cambios de metilación.

Johnston JW, Benson EE, Harding K. *Plant Physiology and Biochemistry* 47 (2009) 123–131

Ng H-H, Bird A. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 (1999) 158–163.

Investigación llevada a cabo dentro del proyecto AGL2010-21989-C02-01.

## Estrés oxidativo en los protocolos de criopreservación de *Mentha x piperita*

C. Kremer<sup>1</sup>, M.T. Solis<sup>2</sup>, M.E. Gonzalez-Benito<sup>1\*</sup>, P.S. Testillano<sup>2</sup>, C. Martin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología- Biología Vegetal, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid. <sup>2</sup> Grupo de Biotecnología del Polen de Plantas Cultivadas, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid. me.gonzalezbenito@upm.es

La crioconservación ofrece una serie de ventajas sobre otros métodos para la conservación a largo plazo del germoplasma de especies de propagación vegetativa. En comparación con la conservación *in vitro* tiene la ventaja de reducir los posibles cambios genéticos que pueden ocurrir. Sin embargo, hay algunos trabajos en los que se ha encontrado inestabilidad genética y epigenética después de la criopreservación. Estos cambios podrían estar relacionados con el estrés impuesto durante la aplicación de tratamientos para la crioprotección del material vegetal. Algunas de estos estreses están relacionados con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden causar daño oxidativo y reducir la viabilidad de los tejidos. Las ROS pueden ser detectadas y localizadas *in situ* mediante el uso de sondas fluorescentes, como el DHE, que reacciona *in vivo* con ROS, preferentemente con los aniones superóxido, y permite su localización *in situ* mediante análisis con microscopía confocal (Rodríguez-Serrano et al. 2012).

Se procedió a cuantificar y detectar el estrés oxidativo con el uso de estas técnicas después de diferentes pasos de un protocolo de crioconservación por encapsulación-deshidratación: endurecimiento de los segmentos nodales a 25 ° C 16 h de luz / -1 ° C 8 h oscuridad durante 3 semanas (N); ápices cultivados en 0,3 M de sacarosa por 1 día (P); ápices encapsulados en cuentas de alginato cultivados en medio con 0,75 M de sacarosa por 1 noche (S). También se evaluó el efecto de la adición de ácido ascórbico 0,43 mM, como un inhibidor / eliminador de ROS, en dos pasos (P y S).

Después de la etapa S se observó con DHE un aumento de la señal de fluorescencia, lo que indica la producción de radicales superóxido. Dicha señal disminuyó con la inclusión de ácido ascórbico en el medio. Estos resultados confirmaron que el daño producido por la oxidación podría mitigarse con la inclusión de antioxidantes en las etapas críticas del protocolo de crioconservación.

## SIV-P15

Investigación llevada a cabo dentro del proyecto AGL2010-21989-C02-01, y parcialmente financiada con proyectos BFU2011-23752 y AGL2014-52028-R del MINECO.

Rodríguez-Serrano M, Barany I, Prem D, Coronado MJ, Risueño MC, Testillano PS. (2012). NO, ROS and cell death associated with caspase-like activity increase in stress-induced microspore embryogenesis of barley. *J. Exp. Botany*, 63, 2007-2024.

## **Comparative study of the gene expression profile in cellular masses from shoots derived of adult radiata pine trees versus seed derived embryonal masses**

Montalbán I.A.<sup>1</sup>, García-Mendiguren O.<sup>1</sup>, Stewart D.<sup>2</sup>, Klimaszewska K.<sup>2</sup>, Rutledge R.G.<sup>2</sup>, Moncaleán P.<sup>1\*</sup>

1. Neiker, Centro de Arkaute, E-01080 Vitoria-Gasteiz

2. Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, 1055 du PEPS G1V4C7, Sainte-Foy, Quebec, Canada.

Although somatic embryogenesis (SE) has an unprecedented potential for large-scale clonal propagation of conifers, it is not possible to clone individual trees from vegetative explants at a commercial scale. For this reason, the aim of this study was to investigate how shoot explants of adult radiata pine would respond to SE induction. To achieve this main goal, we used different tissues as initial explant: a/pre-flush shoot buds from two somatic trees. b/in vitro generated axillary shoots from adult trees obtained following the method described in Montalbán et al. 2013. Four induction media differing in plant growth regulators (2,4-D, NAA or picloram, varying concentrations) composition were used to obtain callus lines. In order to provide additional insights into the developmental character of the induced tissues, gene expression profiling was conducted using real-time qPCR. Specifically, transcriptional factors whose expression is reflective of tissue identity were targeted, along with genes linked to cellular metabolism, mitotic and meristematic activity, etc. Three embryogenic cell lines induced from immature zygotic embryos following the method of Montalbán et al. (2012) were analyzed as controls.

The results showed the utility of expression profiling for characterizing tissues in culture. In this sense, although the biological significance of LEC1 expression is unclear, it does show the possibility that these callus lines possess some level of embryogenic character.

Acknowledgements: DECO (Departamento de Desarrollo Económico y Competitividad del Gobierno Vasco (61.0369.0)).

### References:

Montalbán IA, De Diego N, Moncaleán P (2012) Enhancing initiation and proliferation in radiata pine (*Pinus radiata* D. Don) somatic embryogenesis through

seed family screening, zygotic embryo staging and media adjustment. *Acta Physiol. Plant.* 34(2): 451-460.

Montalbán IA, Novák O, Rolčík J, Strnad M, Moncaleán P (2013) Endogenous cytokinin and auxin profiles during in vitro organogenesis from vegetative buds of *Pinus radiata* adult trees. *Physiol. Plant.* 148(2): 214-231.

## **ÍNDICE DE AUTORES**



Acanda, Yosvanis .....	85	Carceller, A. ....	110
Akdemir, H. ....	90	Casanova, José .....	38
Albuquerque, Nuria .....	84-90-92	Castillo, A.M. ....	46-127
Aldrey, A. ....	107-108-112 -113	Castro Espinoza L. ....	114
Alegre, J. ....	53-54-63	Celestino, C. ....	57-58
Aleza, Pablo .....	65	Cerezo, S. ....	94
Allué, S. ....	127	Cernadas, M. J. ....	55-64-60
Almagro, L. ....	134	Chu, M.Y. ....	90
Alonso, E. ....	107	Clavería, E. ....	70
Alquézar, Berta .....	43	Corchete, Purificación .....	33-36
Andreu, P. ....	106-111	Córdoba, F. ....	66-129
Angosto, T. ....	74	Corral-Martínez, Patricia .....	45 -120
Antón, Teresa .....	101	Correioira, E. ....	55-60-64-86
Aranda, M.A. ....	89	Correia, Sandra I. ....	119
Arbeloa, A. ....	111-106	Covelo, P. ....	136-107-112-122-123
Arrillaga, I. ....	39-88-96	Cuenca, B. ....	105-108
Ascasíbar, J. ....	78	Cusido, Rosa M. ....	31-37
Asensio, Esther .....	38	De Miranda, Marcelo P. ....	43
Asín, L. ....	70	Dolcet-Sanjuan, R. ....	70
Atarés, A. ....	69-74-68-72	El-Tantawy, A. A. ....	130
Ballester, A. ....	86	Espinosa, Elena .....	109
Barceló Muñoz, A. ....	51-101-103-104-52-94	Espinosa, Ramón. ....	109
Barceló Muñoz, M. ....	52-83	Faize, Lydia .....	92
Barreal, M <sup>a</sup> Esther .....	102	Fayos, O. ....	46
Bart Panis .....	27	Fernández-Pavía, S. P. ....	133
Bernal, M. P. ....	82	Galán-Avila, A. ....	49
Bernat, G. ....	59	Gallego, Pedro Pablo .....	102
Blanco-Portales, R. ....	83	Gammoudi, N. ....	76
Blanco, B. ....	108-113	Garcés-Claver, A. ....	46
Bogo, B. ....	108-112	García-Almodóvar, R.C. ....	89
Bolarín, M.C. ....	68-69-72-74	García Estringana, P. ....	53
Bonany, J. ....	70	García-Gago, J.A. ....	83
Bonfill, M. ....	37-31	García-Lor, Andrés. ....	65
Borja, F. ....	68-69	García-Mendiguren O. ....	141
Botias, D. ....	66	García-Paredes, L. ....	63
Bracho, J.P. ....	39	García-Sogo, B. ....	68-72-69-74
Bradaí, Fatiha .....	61-67	García, E. ....	106-111
Bru-Martínez, R. ....	34-36-134	Gisbert, C. ....	59-62-76-80-82
Burgos, Lorenzo .....	89-90-84-92	Gómez-Cadenas, Aurelio .....	50-131
Cabello Moreno, B. ....	103	González Caamaño, M.L. ....	78
Cabeza, A. ....	51-103	Gonzalez-Benito, M.E. ....	124-137-139
Camacho-Fernández, C. ....	45-48	González-Cabrero, N. ....	57-58
Canhoto, Jorge M. ....	119	González-Padrón, M. Y. ....	52
Cano, M. ....	88-96	González-Puelles, Jesús .....	102
Cano, V. ....	130-64-86	Gosalvez, B. ....	89
Canton, Michel .....	85	Gutiérrez Coronado, M.A. ....	114
Capel, J. ....	68	Gutiérrez-Rangel, N. ....	128

Hernández-Muñoz, S. ....	133	Moncaleán P. ....	141
Hernández, M.L. ....	94	Montalbán I.A. ....	141
Herrera Sarellano, M. ....	114	Montaner, Celia ....	38
Hervás, D. ....	48	Montenegro, R. ....	55-60-64
Hidalgo, D. ....	36	Mora, C.P. ....	70
Hurtado, E. ....	134	Morante-Carriel, J. ....	34-134
Iglesias, I. ....	70	Morata Gómez, J. ....	103
Imbroda, I. ....	51-52-104	Morcillo, M. ....	88-96
Jáquez, M. ....	68-69	Moreno, V. ....	68-69-72-74
Jones, B. ....	126	Moyano, Elisabeth ....	31-37
Juárez, José ....	65	Mulet, JM ....	82
Juliano Ayres, A. ....	43	Muñoz-Bertomeu, J. ....	39
Kirsi-Marja ....	23	Muñoz-Blanco, J. ....	83
Klimaszewska K. ....	141	Muñoz, P. ....	62
Kremer, C. ....	124-137-139	Murillo Verduzco, I. ....	114
Laurens, F. ....	70	Murillo-Talavera, M. M. ....	128
Lizárraga Farfán, A. ....	78	Narváez, I. ....	94
Lobit, P. ....	128	Navarro-García, N. ....	129
López-Vela, D. ....	57-58	Navarro, Luis ....	65
López, M.F. ....	131	Nieto, R. ....	74
López, P. A. ....	133	Nisa, M. ....	53-63
Lorente, P. ....	106-111	Nortes, Lola. ....	92
Lozano, R. ....	68-69-72-74	Ochoa-Ascencio, S. ....	128
Magnani, Rodrigo F. ....	43	Oksman-Caldentey ....	23
Mallor, C. ....	46	Olmos, A. ....	76
Marín, J. A. ....	106-111	Osuna, L. ....	37
Marín, M.P. ....	48	Otero, J. ....	113
Marques, Viviani V. ....	43	Padilla, I. M.G. ....	51-52-103-104
Martí, Clara ....	38	Palazón, Javier ....	31-34-36-134
Martín-Closas, L. ....	110	Paniagua, C. ....	83
Martin, C. ....	124-137-139	Pardo, T. ....	82
Martínez-Esteso, MJ. ....	134	Parra-Vega, Verónica. ....	120
Martínez-Márquez, A. ....	34-36-134	Pedraza-Santos, M. E. ....	128-133
Martínez-Palacios, A. ....	128-133	Pedreño, M.A. ....	90-134
Martínez-Rivas, J.M. ....	94	Peiró, R. ....	59-76
Martínez-Romero, D. ....	129	Pelacho, A.M. ....	110
Martínez-Trujillo, M. ....	133	Peña, Leandro ....	43
Martínez, F. ....	72	Pérez-Clemente, Rosa M. ...	50
Martínez, M. T. ....	55-60-64-86	Pérez-Pérez, José Manuel ...	109
Martínez, N. ....	62	Pérez-Tornero, O. ....	66-129
Martínez, R. ....	107-112	Pérez, M. ....	122
Matas, A.J. ....	83	Peris, J.B. ....	96
Medina, A. ....	59-82	Peris, Josep E. ....	43
Mendoza-Poudereux, I. ....	39-88	Petri, César ....	84
Mercado, J.A. ....	83-94	Pineda, B. ....	68-69-72-74
Miguel, C. ....	126	Pliego-Alfaro, F. ....	83-94
Molina, F. ....	53	Pons, Elsa ....	43

Porras, I. ....	66	Torres, María .....	33
Poschenrieder, C. ....	70	Valladares, S. ....	60-64
Quesada, M.A. ....	83	Vallés, M.P. ....	46-127
Quiñonero, C. ....	90	Varas, E. ....	113-122-123-126-136
Quispe, J.L. ....	68	Velasco, L. ....	103
Ramírez-Estrada, K. ....	34-37-53-54	Viana, F. ....	76
Ramírez-Martín, N. ....	63	Vidal-Limon, HR .....	37
Ribelles, C. ....	72-74	Vidal, J.R. ....	80
Rico, S. ....	105-122-136	Vidal, N. ....	105-107-108-112-113- 122-123
Risueño, M.C. ....	130-131	Vieitez, A. M. ....	55
Rivas-Sendra, Alba .....	48-45-120	Vieitez, F. J. ....	55
Rivera Pacheco, D.A. ....	114	Vielba, J. M. ....	105-123-136
Rodríguez-Mendoza, M. N. ....	128	Vilardell, P. ....	70
Rodríguez-Sanz, H. ....	131	Vilella, M. ....	134
Rodríguez, Ana .....	43-108	Villanova, Joan .....	109
Romero, A.M. ....	48	Vives-Peris, Vicente .....	50
Rubianes, D. ....	122	Wang, Hong .....	84
Ruiz Galea, M. ....	54-95	Wu, Hao .....	85
Rutledge R.G. ....	141	Wulff, Nelson A. ....	43
Salcines, D. ....	127	Yuste, A. ....	59
Sales, Ester .....	38-88	Zale, Janice M. ....	85
San José, M. C. ....	55-60-64-86		
San Pedro, T. ....	59-62-76-82		
Sánchez, C. ....	105-107-108-112-113- 122-123-126-136		
Sánchez, J. ....	68-69		
Sánchez-Díaz, C. ....	58		
Sánchez-Navarro, Jesús .....	84		
Sánchez Romero, Carolina. ....	61-67		
Sánchez, S. ....	69-72		
Santos, Mateus A. ....	43		
Sanz, C. ....	94		
Saporta, R. ....	80		
Seguí-Simarro, J.M. ....	45-48-49		
Seguí-Simarro, Jose M. ....	120		
Segura, A. ....	80		
Segura, J. ....	39-88-96		
Sellés-Marchart, S. ....	134		
Sicardo, M.D. ....	94		
Signoretti, André G.C. ....	43		
Simard, M.H. ....	70		
Solis, M.T. ....	124-130-131-139		
Stewart D. ....	141		
Testillano, P.S. ....	124-130-131-139		
Tineo García, L. ....	114		
Tolrà, R. ....	70		
Toribio, M. ....	54-57-58-86-95		

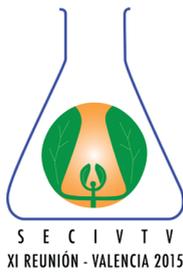


## **PARTICIPANTES**



NOMBRE	APELLIDOS	EMAIL
Yosvanis	Acanda Artiga	yosvani.acanda@gmail.com
Nuria	Albuquerque Ferrando	nalbur@cebas.csic.es
Jesús	Alegre Álvaro	jesus.alegre@madrid.org
Pablo	Aleza Gil	aleza@ivia.es
Pilar	Andreu Puyal	andreu@eead.csic.es
María Teresa	Antón Martínez	teresa@laimund.es
Arancha	Arbeloa Matute	arbeloa@eead.csic.es
Isabel	Arrillaga	isabel.arrillaga@uv.es
Alejandro	Atarés Huerta	aatares@ibmcp.upv.es
Antonio	Ballester	aballester43@gmail.com
Gerardo	Bernat Segarra	geberse@aaa.upv.es
Lorenzo	Burgos Ortiz	burgos@cebas.csic.es
Carolina	Camacho Fernández	cacafer@posgrado.upv.es
Jorge	Canhoto	jorgecan@ci.uc.pt
María	Cano García	maria.cano@uv.es
Vanesa	Cano Lázaro	vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es
Ana María	Castillo Alonso	amcast@eead.csic.es
Cristina	Celestino Mur	cristina.celestino@madrid.org
Sergio	Cerezo Medina	scerezo@uma.es
Ruth	Cid	ruth.cid.s@gmail.com
Mónica	Coig O'Donnell Cavalle	cultesa@cultesa.com
Purificación	Corchete Sánchez	corchpu@usal.es
Elena	Corredoira Castro	elenac@iiag.csic.es
María Teresa	Cruz Bacallado	direccion@cultesa.com
Beatriz	Cuenca Valera	buenca@tragsa.es
Rosa María	Cusido Vidal	rcusido@ub.edu
Mercedes	Dabauza Micó	mercedes.dabauza@carm.es
Ramón	Dolcet Sanjuan	ramon.dolcet@irta.cat
Oreto	Fayos Avellán	ofayos@cita-aragon.es
Marga	Fraga Ares	info@cultigar.es
Alberto	Galán Ávila	albertogalanavila@gmail.com
Pedro Pablo	Gallego Veigas	pgallego@uvigo.es
María Elena	García Martín	egarcia@eead.csic.es
Ana Belén	Gil Salas	m.baranda@rijkwaaan.es
Carmina	Gisbert Doménech	cgisbert@btc.upv.es
M. Elena	González Benito	me.gonzalezbenito@upm.es
María Luz	González Caamaño	mluz.gonzalez@usc.es
Nuria	González Cabrero	nuria.gonzalez.cabrero@madrid.org
Jesús Eugenio	González-Puelles De Antonio	jgonzalezpuelles@gmail.com
Diego Alberto	Hidalgo Martínez	diegoahmz@hotmail.com
Isabel	Imbroda Solano	elimbroy@hotmail.com
Marybel	Jaquez Gutiérrez	mary_ja_gu@hotmail.com
Manuela	Luna González	manolilunagonzalez@hotmail.com
Juan	Marín Velázquez	jmarin@eead.csic.es
Carmen	Martín Fernández	mariacarmen.martin@upm.es
Ascensión	Martínez Márquez	asun.martinez@ua.es

Teresa	Martínez Santiago	temar@iiag.csic.es
Aurora	Medina Herranz	mmeher@ibmcp.upv.es
Isabel	Mendoza Poudereux	isabel.mendoza@uv.es
Paloma	Moncaleán Guillén	pmoncalean@neiker.net
Itziar Aurora	Montalbán Pérez	imontalban@neiker.net
Marian	Morcillo Benlloch	angeles.morcillo@uv.es
Vicente	Moreno Ferrero	vmoreno@ibmcp.upv.es
Luis	Navarro	lnavarro@ivia.es
Marina	Nisa Sarceda	marina.nisa@madrid.org
Kirsi-Marja	Oksman-Caldentey	kirsi-marja.oksman@vt.fi
Javier	Palazón Barandelaq	javierpalazon@ub.edu
Bartholomeus	Panis	b.panis@cgiar.org
Martha Elena	Pedraza Santos	marelpesa@yahoo.com.mx
Ana María	Pelacho Aja	pelacho@hbj.udl.cat
Leandro	Peña	lpenya@ibmcp.upv.es
Olaya	Pérez Tornero	olalla.perez@carm.es
Benito José	Pineda Chaza	bpineda@btc.upv.es
Ignacio	Porras Castillo	ignacio.porras@carm.es
Pia	Pujol Galofre	jordi@lavinya.com
Noelia	Ramírez Martín	noelia.ramirez.martin@gmail.com
Carlos	Ribelles Alfonso	carrial1@etsmre.upv.es
Saleta	Rico Santos	saleta@iiag.csic.es
María Carmen	Risueño Almeida	risueno@cib.csic.es
Alba	Rivas Sendra	alriis@upv.es
María Del Mar	Ruiz Galea	mdelmar.ruiz@madrid.org
Ester	Sales Clemente	esalesc@unizar.es
Mª Del Carmen	San José Capilla	sanjose@iiag.csic.es
Tania	San Pedro	sanpedro_tan@gva.es
Conchi	Sánchez	conchi@iiag.csic.es
Carolina	Sánchez Romero	c.sanchez@uma.es
Pilar	Sánchez Testillano	testillano@cib.csic.es
José María	Seguí Simarro	seguisim@btc.upv.es
Juan	Segura García Del Río	juan.segura@uv.es
Nuria	Soler Calvo	nuria.soler@granadacoating.com
Mercedes	Soriano Castan	msoriano@semillasfito.com
Lorena	Tineo García	lorena.tineo@itson.edu
Mariano	Toribio Iglesias	mariano.toribio@madrid.org
Mª Pilar	Vallés Brau	valles@eead.csic.es
Elena	Varas García	elena.varas@iiag.csic.es
Nieves Pilar	Vidal González	nieves@iiag.csic.es
Heriberto Rafael	Vidal Limón	bioraf@hotmail.com
Susana	Vilariño Rodríguez	svilarino@algosur.com
Joan	Villanova Calatayud	jvilla734@gmail.com
Vicente	Vives Peris	tico_vives@hotmail.com



 **Sumilab, s. l.**  
Material Médico Hospitalario