



Plants *in vitro* for the future

Madrid, 13th-15th september 2017

SECIVTV2017



www.secivtv2017.com

SECIVTV2017
Plants in vitro for the future

XII Congress of the Spanish Society of Plant
In Vitro Culture

XII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo
In Vitro de Tejidos Vegetales

Madrid
September 13-15, 2017

National Research Council, CSIC
CSIC campus of 117 Serrano street

Organized by

Biological Research Center CIB-CSIC
ETSIAAB, Polytechnic Madrid University
Spanish Society of Plant *In Vitro* Culture, SECIVTV

© **Coordinadoras y Editoras Científicas:**

Pilar Sánchez Testillano
Carmen Martín Fernández
Elena González Benito
María del Carmen Risueño

© **De los textos:** sus autores.

Diseño, maquetación y corrección: Solana e Hijos, A.G., S.A.U.

© **De esta edición:** Fundación General de la Universidad de Alcalá, 2017

Calle Imagen, 1 y 3 • 28801, Alcalá de Henares (Madrid), España.
Página web: www.fgua.es

No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, ni su préstamo, alquiler o cualquier otra forma de cesión de uso del ejemplar, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del *copyright*.

ISBN.: 978-84-88754-73-8

Depósito Legal: M-26087-2017

Imprime: Solana e Hijos, A.G., S.A.U.

Impreso en España / Printed in Spain

Índice general

Presentación	7
Comités	9
Programa científico	13
Índice de comunicaciones	25
Conferencias plenarias e invitadas	37
Comunicaciones orales	51
Comunicaciones en formato póster	61
Índice de autores	137
Lista de participantes	149

Presentación

La **Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV)** invita a participar en la “**XII Reunión de la SECIVTV**” que tendrá lugar en Madrid entre los días 13 y 15 de Septiembre de 2017, organizada conjuntamente por el Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CIB-CSIC) y la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas de la Universidad Politécnica de Madrid (ETSIAAB-UPM). Bajo el lema “**Plantas *In Vitro* para el Futuro**”, la reunión tratará los temas más actuales en la investigación del cultivo *in vitro* vegetal, mediante Conferencias Plenarias, Ponencias Invitadas, Sesiones Científicas Orales y Pósters. El congreso reunirá expertos sobre las siguientes áreas temáticas: Totipotencia celular, Organogénesis y regeneración, Embriogénesis *in vitro*, Micropropagación, Conservación y crioconservación *in vitro*, Aplicaciones del cultivo *in vitro* en mejora vegetal, Estabilidad genética y epigenética, Transformación, Protoplastos, Biofactorías, Metabolitos secundarios y Avances tecnológicos en cultivo *in vitro*. Además habrá una sesión especial sobre Ciencia y empresa, el reto de la transferencia del conocimiento al sector productivo del cultivo *in vitro*.

En nombre de la SECIVTV, animamos a participar activamente a todos los interesados en el cultivo *in vitro* de plantas, científicos, empresas, jóvenes investigadores, miembros y no miembros de la SECIVTV.

El Comité Organizador

Pilar S. Testillano (CIB-CSIC), Presidenta

Carmen Martín (ETSIAAB-UPM), Vicepresidenta

Elena González Benito (ETSIAAB-UPM)

María del Carmen Risueño (CIB-CSIC)

Presentation

The **Spanish Society of Plant *In Vitro* Culture (SECIVTV)** invites to participate in the “**XII Congress of the SECIVTV**” which will be held in Madrid, from 13th to 15th September 2017. It will be jointly organized by the Biological Research Center of the National Research Council (CIB-CSIC) and the Higher Technical School of Agronomic, Alimentary and Biosystems Engineering of the Polytechnic University of Madrid (ETSIAAB-UPM). Under the main topic of “**Plants *In Vitro* for the Future**”, the meeting will address the current hot topics in the field of plant *in vitro* culture through Plenary and Invited Lectures, and Scientific Sessions of oral communications and posters. The congress will bring together experts on the following scientific topics: Cell totipotency, Organogenesis and regeneration. *In vitro* embryogenesis, Micropropagation, Conservation and cryoconservation *in vitro*, *Applications of in vitro* culture to plant breeding, Genetic and epigenetic stability, Transformation, Protoplasts, Biofactories and secondary metabolites, and Technological advances in *in vitro* culture. Moreover, there will be a special session on Science and Companies: The challenge of the transfer of knowledge to the productive sector of *in vitro* culture.

On behalf of the SECIVTV, we encourage all people interested in plant *in vitro* culture, researchers, companies, young scientists, members and non-members of the SECIVTV, to participate in the meeting.

The Organizing Committee

Pilar S. Testillano (CIB-CSIC), President
Carmen Martín (ETSIAAB-UPM), Vice-president
Elena González Benito (ETSIAAB-UPM)
María del Carmen Risueño (CIB-CSIC)

Comité
organizador y
científico

Organizing
and scientific
committee

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidente:

Pilar Sánchez Testillano
CIB-CSIC

Vice-presidente:

Carmen Martín Fernández
ETSIAAB-UPM

Miembros del Comité:

Elena González Benito
ETSIAAB-UPM

María del Carmen Risueño
CIB-CSIC

COMITÉ CIENTÍFICO

Isabel Arrillaga
Universidad de Valencia, España

Jorge Canhoto
Universidad de Coimbra, Portugal

Antonietta Germaná
Universidad de Palermo, Italia

Elena González-Benito
ETSIAAB-UPM, Madrid, España

Joachim Keller
IPK, Gatersleben, Alemania

Carmen Martín
ETSIAAB-UPM, Madrid, España

Leandro Peña
Fundecitrus, Sao Paulo, Brasil

Salomé Pais
Universidad de Lisboa, Portugal

Klaus Palme
Universidad de Freiburg, Alemania

María del Carmen Risueño
CIB-CSIC, Madrid, España

Pilar Sánchez Testillano
CIB-CSIC, Madrid, España

Mariano Toribio
IMIDRA, Madrid, España

Programa
científico

Scientific
programme

PROGRAMA RESUMIDO

Horario preliminar				
Hora	Miércoles 13	Jueves 14	Hora	Viernes 15
	08:30 h	Conferencia plenaria: Joachim Keller	09:00 h	<u>Sesión Especial:</u> Cultivo <i>In Vitro</i> y Empresas
	09:30 h	<u>Sesión II:</u> Conservación, estabilidad y mejora (continuación)	10:15 h	Café y Pósters
	10:15 h	Café y Pósters	11:00 h	Conferencia plenaria: Salomé Pais
	11:15 h	<u>Sesión II:</u> Conservación, estabilidad y mejora (continuación)	12:00 h	<u>Sesión IV:</u> Micropropagación y Avances Tecnológicos
12:30 h	Entrega de Documentación	Almuerzo y Pósters	12:30 h	Almuerzo y Pósters
14:30 h	Inauguración	<u>Sesión III:</u> Transformación y Biofactorías	14:15 h	<u>Sesión IV:</u> Micropropagación y Avances Tecnológicos (continuación)
14:45 h	Conferencia plenaria: Klaus Palme	Café y Pósters	16:15 h	Clausura
15:45 h	<u>Sesión I:</u> Totipotencia, organogénesis y embriogénesis	<u>Sesión III:</u> Transformación y Biofactorías (continuación)	17:00 h	
16:45 h	Café y Pósters	Asamblea SECIVTV	18:15 h	
17:45 h	<u>Sesión I:</u> Totipotencia, organogénesis y embriogénesis (continuación)			
19:15 h	Cocktail de Bienvenida	Cena del Congreso	21:00 h	

SUMMARY PROGRAM

Preliminary Schedule				
Time	Wednesday 13	Thursday 14	Time	Friday 15
	08:30 h	Plenary Lecture: Joachim Keller	09:00 h	Special Session: <i>In Vitro</i> Culture and Companies
	09:30 h	Session II: Conservation, stability and breeding Coffee and Posters	10:15 h	Coffee and Posters
	10:15 h	Coffee and Posters	11:00 h	Plenary Lecture: Salomé Pais
	11:15 h	Session II: Conservation, stability and breeding (continued)	12:00 h	Session IV: Micropropagation and Technological Advances
12:30 h	Registration	Lunch and Posters	12:30 h	Lunch and Posters
14:30 h	Opening	14:30 h	14:15 h	Session IV: Micropropagation and Technological Advances (continued)
14:45 h	Plenary Lecture: Klaus Palme	16:00 h	16:15 h	Closing
15:45 h	Session I: Totipotency, organogenesis and embryogenesis	17:00 h		
16:45 h	Coffee and Posters	Session III: Transformation and Biofactories (continued)		
17:45 h	Session I: Totipotency, organogenesis and embryogenesis (continued)	18:15 h		
19:15 h	Welcome Cocktail	21:00 h		
		Congress Dinner		

PROGRAMA DETALLADO

Miércoles 13 de septiembre

- 12:30 h** Entrega de documentación
- 14:30 h** Inauguración
- 14:45 h** Conferencia plenaria inaugural
Klaus Palme (Freiburg University, Germany)
“4D-high-resolution phenotyping of single cells and organs enables systems biology insights into cell differentiation”
- 15:45 h** Sesión Científica I: **“Totipotencia, organogénesis y embriogénesis”**
 Moderadores: Jorge Canhoto (Univ. Coimbra, Portugal),
 M^a Carmen Risueño (CIB-CSIC)
- 15:45 h Charla Invitada:
 Miguel A. Moreno-Risueño (CBGP, UPM-INIA, Montegancedo, Madrid)
“Regulation of organogenesis and tissue patterning during postembryonic development of Arabidopsis roots”
- 16:15 h Comunicación oral
Yolanda PÉREZ-PÉREZ, María Teresa SOLÍS,
 Ahmed A. EL-TANTAWY, Marta PITARCH,
 Aurelio GÓMEZ-CADENAS, María C. RISUEÑO,
 Pilar S. TESTILLANO (CIB, CSIC, Madrid, Univ. Jaume I, Castellón)
“Auxin biosynthesis and transport are required for stress-induced microspore embryogenesis whereas the gametophytic pathway progresses with decreasing auxin in rapeseed and barley”
- 16:30 h Comunicación oral
Marina CARRASCO ACOSTA, Robaina R.R.,
 Pilar GARCÍA-JIMÉNEZ (Univ. Las Palmas)
“Establecimiento de cultivos celulares de fanerógamas marinas”
- 16:45 h **CAFÉ Y POSTERS**
- 17:45 h **Discusión de posters de Sesión I**
- 19:15 h** **Cocktail de bienvenida**
-

Jueves 14 de septiembre

- 08:30 h Conferencia Plenaria**
Joachim Keller (IPK, Gatersleben, Alemania)
“Ultra-cold but alive – achievements, chances and problems of plant cryo-preservation”
- 09:30 h Sesión Científica II: “Conservación, estabilidad y mejora”**
Moderadores: Isabel Arrillaga (Univ. Valencia),
Fernando Pliego (Univ. Málaga)
- 09:30 h Charla Invitada
Fernando Pliego (Univ. Málaga)
“Aproximaciones biotecnológicas a la mejora de olivo para inducir resistencia a Verticilosis”
- 10:00 h Comunicación oral
Marian MORCILLO, Lorena PONCE, María CANO,
Leonardo ORLANDO, Álex ALBORCH, Eva CAÑIZARES,
Juan BAUTISTA PERIS, Juan SEGURA, Mariano TORIBIO,
Isabel ARRILLAGA (Univ. Valencia, IMIDRA, Alcalá de Henares)
“Estimación de la eficacia de tratamientos elicitores para la inducción de tolerancia a estrés biótico en Quercus ilex L.”
- 10:15 h **CAFÉ Y POSTERS**
- 11:15 h Comunicación oral
Miguel F. GARAVELLO; Pablo ALEZA GIL (IVIA, Valencia)
“Análisis genético de granos de polen de Lima Mexicana cultivados in vitro con marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism)”
- 11:30 h **Discusión de posters de Sesión II**
- 12:30 h COMIDA Y PÓSTERS**
- 14:30 h Sesión Científica III: “Transformación y biofactorías”**
Moderadores: Lorenzo Burgos (CEBAS, CSIC; Murcia),
M^a Ángeles Pedreño (Univ. Murcia)
-

14:30 h	Charla Invitada Francisco Cánovas (Univ. Málaga) “Transgénesis y nutrición nitrogenada en coníferas”
15:00 h	Charla Invitada M ^a Ángeles Pedreño (Univ. Murcia) “Biofactorías celulares para la producción de metabolitos secundarios”
15:30 h	Comunicación oral Carmen MARTÍN-PIZARRO, <u>David POSÉ</u> (IHSM La Mayora, CSIC-Univ Málaga) “Genome editing of the octoploid <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> using the CRISPR/Cas9 system”
15:45 h	Comunicación oral <u>Vanesa CANO</u> , Elena CORREDOIRA, Teresa MARTÍNEZ, José Luis COUSELO, Antonio BALLESTER, Elena VARAS, Mariano TORIBIO, M ^a Carmen SAN JOSÉ (IIAG-CSIC, Santiago de Compostela, Univ. Vigo, EFA-Pontevedra, IMIDRA, Alcalá de Henares) “Transformation of <i>Quercus suber</i> somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein”
16:00 h	CAFÉ Y POSTERS
17:00 h	Discusión de posters de Sesión III
18:15h	Asamblea SECIVTV
21:00 h	Cena del Congreso

Viernes 15 de septiembre

09:00 h	Sesión especial: “Ciencia y empresa, el reto de la transferencia del conocimiento al sector productivo” Moderador: Francisco Cánovas (Univ. Málaga) Ponentes: <ul style="list-style-type: none"> • Francisco Cánovas (Univ. Málaga) • Lorenzo García (COTEVISA, Valencia) • Inés Mataix (INVISA Biotecnología Vegetal, Murcia) • Gonzaga Ruiz de Gauna (BIOVEGEN, Plataforma Tecnológica de Biotecnología Vegetal, Madrid)
----------------	---

- 10:15 h** **CAFÉ Y POSTERS**
- 11:00 h** **Conferencia Plenaria**
Salomé Pais (Univ. Lisboa, Portugal)
“In vitro plant cell culture. A challenge for the future?”
- 12:00 h** **Sesión Científica IV: “Micropropagación y avances tecnológicos”**
Moderadores: Teresa Cruz Bacallado (Cultesa, Tenerife)
Juan Segura (Univ. Valencia)
- 12:00 h Charla Invitada
Ana Pelacho (Univ. Lleida)
“Agricultura, contaminación ambiental por plásticos, ¿cultivo in vitro?”
- 12:30 h** **COMIDA Y PÓSTERS**
- 14:15 h Charla Invitada
Juan Segura (Univ. Valencia)
“Retos actuales en micropropagación”
- 14:45 h Comunicación oral
Verónica CODESIDO SAMPEDRO, Salvatore CASANO,
Stefan MEYER (Parque Científico y Tecnológico, Córdoba)
“Cultivo in vitro low cost: maximizando la productividad”
- 15:00 h Comunicación oral
Diego GAGO MESEJO, Anxela ALDREY VILLAR,
Beatriz CUENCA VALERA, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ,
Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA, Nieves VIDAL GONZÁLEZ
(Univ. La Coruña, IIAG-CSIC, Santiago de Compostela, TRAGSA-Orense)
“Efecto del aporte de sacarosa sobre el crecimiento y el estado fisiológico de brotes de especies leñosas cultivadas in vitro”
- 15:15 h **Discusión de posters de Sesión IV**
- 16:15 h** **Clausura**

DETAILED PROGRAM

Wednesday 13th September

- 12:30 h** **Registration**
- 14:30 h** **Opening Ceremony**
- 14:45 h** **Opening Plenary Lecture**
Klaus Palme (Freiburg University, Germany)
“4D-high-resolution phenotyping of single cells and organs enables systems biology insights into cell differentiation”
- 15:45 h** **Scientific Session I: “Totipotency, organogenesis and embryogenesis”**
 Chairpersons: Jorge Canhoto (Univ. Coimbra, Portugal),
 M^a Carmen Risueño (CIB-CSIC)
- 15:45 h Invited Lecture
 Miguel A. Moreno-Risueño (CBGP, UPM-INIA, Montegancedo, Madrid)
“Regulation of organogenesis and tissue patterning during post-embryonic development of Arabidopsis roots”
- 16:15 h Oral communication
Yolanda PÉREZ-PÉREZ, María-Teresa SOLÍS,
 Ahmed A. EL-TANTAWY, Marta PITARCH,
 Aurelio GÓMEZ-CADENAS, María C. RISUEÑO,
 Pilar S. TESTILLANO (CIB, CSIC, Madrid, Univ. Jaume I, Castellón)
“Auxin biosynthesis and transport are required for stress-induced microspore embryogenesis whereas the gametophytic pathway progresses with decreasing auxin in rapeseed and barley”
- 16:30 h Oral communication
Marina CARRASCO ACOSTA, Robaina R.R.,
 Pilar GARCÍA-JIMÉNEZ (Univ. Las Palmas)
“Establecimiento de cultivos celulares de fanerógamas marinas”
- 16:45 h **COFFEE AND POSTERS**
- 17:45 h **Poster Discussion of Session I**
- 19:15 h** **Welcome Cocktail**
-

Thursday 14th September

- 08:30 h** **Plenary Lecture**
Joachim Keller (IPK, Gatersleben, Germany)
“Ultra-cold but alive – achievements, chances and problems of plant cryo-preservation”
- 09:30 h** **Scientific Session II: “Conservation, stability and breeding”**
Chairpersons: Isabel Arrillaga (Univ. Valencia),
Fernando Pliego (Univ. Málaga)
- 09:30 h Invited Lecture
Fernando Pliego (Univ. Málaga)
“Biotechnological approaches in olive breeding to induce Verticillium wilt resistance”
- 10:00 h Oral communication
Marian MORCILLO, Lorena PONCE, María CANO,
Leonardo ORLANDO, Álex ALBORCH, Eva CAÑIZARES,
Juan Bautista PERIS, Juan SEGURA, Mariano TORIBIO,
Isabel ARRILLAGA (Univ. Valencia, IMIDRA, Alcalá de Henares)
“Estimación de la eficacia de tratamientos elicitores para la inducción de tolerancia a estrés biótico en Quercus ilex L.”
- 10:15 h **COFFEE AND POSTERS**
- 11:15 h Oral communication
Miguel F. GARAVELLO; Pablo ALEZA GIL (IVIA, Valencia)
“Análisis genético de granos de polen de Lima Mexicana cultivados in vitro con marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism)”
- 11:30 h **Poster Discussion of Session II**
- 12:30 h** **LUNCH AND POSTERS**
- 14:30 h** **Scientific Session III: “Transformation and Biofactories”**
Chairpersons: Lorenzo Burgos (CEBAS, CSIC, Murcia),
M^a Ángeles Pedreño (Univ. Murcia)

-
- 14:30 h Invited Lecture
Francisco Cánovas (Univ. Málaga)
“Transgenesis and nitrogen nutrition in conifers”
- 15:00 h Invited Lecture
M^a Ángeles Pedreño (Univ. Murcia)
“Cell biofactories for secondary metabolites production”
- 15:30 h Oral communication
Carmen MARTÍN-PIZARRO, David POSÉ (IHSM La Mayora, CSIC-Univ Málaga)
“Genome editing of the octoploid *Fragaria* × *ananassa* using the CRISPR/Cas9 system”
- 15:45 h Oral communication
Vanesa CANO, Elena CORREDOIRA, Teresa MARTÍNEZ, José Luis COUSELO, Antonio BALLESTER, Elena VARAS, Mariano TORIBIO, M^a Carmen SAN JOSÉ (IIAG-CSIC, Santiago de Compostela, Univ. Vigo, EFA-Pontevedra, IMIDRA, Alcalá de Henares)
“Transformation of *Quercus suber* somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein”
- 16:00 h **COFFEE AND POSTERS**
- 17:00 h **Poster Discussion of Session III**
- 18:15 h SECIVTV General Assembly**
- 21:00 h Congress Dinner**
-

Friday 15th September

- 9:00 h Special Session: “Science and Companies: The challenge of the transfer of knowledge to the productive sector”**
Chairperson: Francisco Cánovas (Univ. Málaga)
Speakers:
- **Francisco Cánovas** (Univ. Málaga)
 - **Lorenzo García** (COTEVISA, Valencia)
 - **Inés Mataix** (INVISA Biotecnología Vegetal, Murcia)
 - **Gonzaga Ruiz de Gauna** (BIOVEGEN, Plataforma Tecnológica de Biotecnología Vegetal, Madrid)
-

Índice de
comunicaciones

Communications
index

INDÍCE DE COMUNICACIONES

Conferencias plenarias

PL1	Klaus PALME <i>4D-high-resolution phenotyping of single cells and organs enables systems biology insights into cell differentiation</i>	39
PL2	E. R. Joachim KELLER <i>Ultra-cold but alive – achievements, chances and problems of plant cryopreservation</i>	40
PL3	Maria Salomé S. PAIS <i>In vitro plant cell culture. A challenge for the future?</i>	41

Conferencias invitadas

INV1	<u>Miguel-Ángel MORENO-RISUENO</u> , Estefano BUSTILLO AVENDAÑO, Juan PERIAÑEZ-RODRIGUEZ, Álvaro SÁNCHEZ-CORRIONERO, Sergio IBÁÑEZ, Jose Manuel PÉREZ-PÉREZ, Juan C. DEL POZO <i>Regulation of organogenesis and tissue patterning during postembryonic development of Arabidopsis roots</i>	45
INV2	Fernando PLIEGO-ALFARO <i>Aproximaciones biotecnológicas a la mejora de olivo para inducir resistencia a Verticilliosis</i>	46
INV3	María Teresa LLEBRÉS, María Belén PASCUAL, Vanessa CASTRO-RODRÍGUEZ, Concepción ÁVILA, <u>Francisco M. CÁNOVAS</u> <i>Transgénesis y nutrición nitrogenada en coníferas</i>	47
INV4	<u>María A PEDREÑO</u> , Begoña MIRAS-MORENO, Pedro-Joaquín SÁNCHEZ-PUJANTE, Laura DI PATRIA, Ana-Belén SABATER-JARA, Lorena ALMAGRO <i>Biofactorías celulares para la producción de metabolitos secundarios</i>	48
INV5	<u>Ana M. PELACHO</u> , Hadaly SERRANO-RUÍZ, Lluís MARTÍN-CLOSAS <i>Agricultura, contaminación ambiental por plásticos, ¿cultivo in vitro?</i>	49
INV6	Juan SEGURA <i>Retos actuales en micropropagación</i>	50

Comunicaciones orales

S1-O1	<u>Yolanda PÉREZ-PÉREZ</u> , María Teresa SOLÍS, Ahmed A. EL-TANTAWY, Marta PITARCH, Aurelio GÓMEZ-CADENAS, María C. RISUENO, Pilar S. TESTILLANO <i>Auxin biosynthesis and transport are required for stress-induced microspore embryogenesis whereas the gametophytic pathway progresses with decreasing auxin in rapeseed and barley</i>	53
-------	--	----

S1-O2	<u>Marina CARRASCO ACOSTA</u> , Robaina R.R., Pilar GARCÍA-JIMÉNEZ <i>Establecimiento de cultivos celulares de fanerógamas marinas</i>	54
S2-O3	<u>Miguel F. GARAVELLO</u> , Pablo ALEZA GIL <i>Análisis genético de granos de polen de Lima Mexicana cultivados in vitro con marcadores SSR (Simple Sequence Repeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism)</i>	55
S2-O4	<u>Marian MORCILLO</u> , Lorena PONCE, María CANO, Leonardo ORLANDO, Álex ALBORCH, Eva CAÑIZARES, Juan Bautista PERIS, Juan SEGURA, Mariano TORIBIO, Isabel ARRILLAGA <i>Estimación de la eficacia de tratamientos elicitors para la inducción de tolerancia a estrés biótico en Quercus ilex L.</i>	56
S3-O5	Carmen MARTIN-PIZARRO, <u>David POSÉ</u> <i>Genome editing of the octoploid Fragaria × ananassa using the CRISPR/Cas9 system</i>	57
S3-O6	<u>Vanesa CANO</u> , Elena CORREDOIRA, Teresa MARTÍNEZ, José Luis COUSELO, Antonio BALLESTER, Elena VARAS, Mariano TORIBIO, M ^a del Carmen SAN JOSÉ <i>Transformation of Quercus suber somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein</i>	58
S4-O7	<u>Diego GAGO MESEJO</u> , Anxela ALDREY VILLAR, Beatriz CUENCA VALERA, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ, Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA, Nieves VIDAL GONZÁLEZ <i>Efecto del aporte de sacarosa sobre el crecimiento y el estado fisiológico de brotes de especies leñosas cultivadas in vitro</i>	59
S4-O8	<u>Verónica CODESIDO SAMPEDRO</u> , Salvatore CASANO, Stefan MEYER <i>Cultivo in vitro low cost: maximizando la productividad</i>	60

Comunicaciones en formato póster

Sesión I

S1-P1	<u>Ivett BÁRÁNY</u> , María-Teresa SOLÍS, Eduardo BERENGUER, Yolanda PÉREZ-PÉREZ, Estrella SANTAMARÍA, Isabel DÍAZ, María C. RISUEÑO, Pilar S. TESTILLANO <i>Activation of autophagy and cystein proteases related to cell death during microspore embryogenesis induction in Hordeum vulgare</i>	65
S1-P2	<u>Eduardo BERENGUER</u> , Ivett BÁRÁNY, María-Teresa SOLÍS, Yolanda PÉREZ-PÉREZ, María C. RISUEÑO, Pilar S. TESTILLANO <i>The inhibitor of histone H3K9 methylation, BIX-01294, promotes stress-induced microspore totipotency and enhances in vitro embryogenesis initiation</i>	66

S1-P3	<u>Carolina CAMACHO FERNÁNDEZ</u> , Alba RIVAS I SENDRA, Rosa PORCEL ROLDÁN, Jose María SEGUÍ SIMARRO <i>Efecto de la reducción de hormonas en el medio de cultivo de microsporas de berenjena</i>	67
S1-P4	Yolanda PÉREZ-PÉREZ, <u>Elena CARNEROS</u> , Ivett BÁRÁNY, Beatriz PINTOS, Aránzazu GÓMEZ-GARAY, María C. RISUEÑO, Pilar S. TESTILLANO <i>Modifications of pectin esterification and AGPs distribution patterns suggest the remodeling of cell wall during somatic embryogenesis initiation and progression in Quercus suber</i>	68
S1-P5	<u>Ander CASTANDER</u> , Itziar Aurora MONTALBÁN, Paloma MONCALEÁN <i>El estrés térmico favorece el proceso embriogénico en Pinus spp</i>	69
S1-P6	<u>Alberto GALÁN ÁVILA</u> , Jose María SEGUÍ SIMARRO <i>Inducción de androgénesis en Cannabis sativa L.</i>	70
S1-P7	<u>Nuria GONZÁLEZ-CABRERO</u> , Mar RUIZ-GALEA, Mariano TORIBIO, Cristina CELESTINO <i>Inducción de embriogénesis secundaria en embrión somático inmaduro y maduro de Pinus pinea L.</i>	71
S1-P8	<u>Alejandro IBARRA LÓPEZ</u> , Héctor LOZOYA SALDAÑA, Emilio OLIVARES SÁENZ, José E. TREVIÑO RAMÍREZ, Rigoberto E. VÁZQUEZ ALVARADO, M. ^a del Carmen OJEDA ZACARÍAS <i>Inducción de embriogénesis somática y maduración in vitro de ébano Ebenopsis ebano [Berland.] Barneby & J.W. Grimes)</i>	72
S1-P9	<u>Juan A. MARÍN</u> , E. GARCÍA, P. ANDREU, P. LORENTE, A. ARBELOA <i>Inhibidores de la giberelina afectan positivamente al enraizamiento adventicio de Pistacia vera L.</i>	73
S1-P10	<u>Isabel NARVÁEZ</u> , Carmen MARTÍN, Jose Ángel MERCADO, Rafael JIMENEZ-DÍAZ, Fernando PLIEGO-ALFARO <i>Regeneración de plantas, vía embriogénesis somática, a partir de material adulto de olivo silvestre</i>	74
S1-P11	<u>M.^a del Carmen OJEDA ZACARÍAS</u> , Jaime M. CAVAZOS GALINDO, José A. SANTOS HALISCAK, Virgilio MOJICA MARIN, Gilberto RODRÍGUEZ PÉREZ <i>Propagación in vitro de vid (Vitis vinifera L.) cultivar Merlot</i>	75
S1-P12	<u>Jacobo PÉREZ-PASTRANA</u> , Susana AVILÉS-VIÑAS, Adriana CANTO FLICK, Dulce I.G. ÁLVAREZ-LÓPEZ, Ignacio ISLAS-FLORES, Nancy SANTANA BUZZY <i>La recalcitrancia del género Capsicum: el efecto de las auxinas sobre la morfología en el desarrollo de los embriones somáticos de Capsicum spp.</i>	76
S1-P14	<u>Matilde SANCHES</u> , Eduardo BERENGUER, Sandra CORREIA, María C. RISUEÑO, Jorge CANHOTO, Pilar S. TESTILLANO <i>Changes in global DNA methylation during induction of leaf somatic embryogenesis and long-term multiplication of embryogenic cultures of tamarillo</i>	77

S1-P15	<u>Álvaro SÁNCHEZ-CORRIONERO</u> , Rossangela SOZZANI, Miguel-Ángel MORENO-RISUEÑO <i>Post embryonic organogenesis of lateral roots of Arabidopsis thaliana involves stereotypic changes in cell fate associated to formative divisions of pluripotent founder cells or their developmental time</i>	78
S1-P16	Alba RIVAS I SENDRA, <u>José María SEGUÍ-SIMARRO</u> <i>Dinámica del calcio durante inducción de embriogénesis en microsporas de Brassica napus</i>	79
S1-P17	<u>M^a Pilar VALLES BRAU</u> , Luís M ^a VILLAR MARTIN, Ana M. ^a CASTILLO ALONSO <i>Identificación y caracterización de genes implicados en la acetilación de histonas durante la inducción de la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo panadero</i>	80

Sesión II

S2-P18	<u>Olfá AYED SLAMA</u> , Hajer SLIM AMARA <i>A useful tool of breeding in durum wheat: production of doubled haploid lines by microspores culture</i>	83
S2-P19	P. LORENTE, J.A. MARÍN, P. ANDREU, E. GARCÍA, <u>A. ARBELOA</u> <i>Conservación in vitro de clones de pistacho en condiciones de crecimiento ralentizado</i>	84
S2-P20	<u>María CANO</u> , Ester SALES, Álex ALBORCH, Marian MORCILLO, Leonardo ORLANDO, Isabel MENDOZA-POUDEREUX, Eva CAÑIZARES, Francisco DIAZ, Juan SEGURA, Isabel ARRILLAGA <i>Efecto de la temperatura y la disponibilidad de agua en la respuesta embriogénica de Pinus pinaster Aiton</i>	85
S2-P21	<u>Judith CANO-RUIZ</u> , Mari Cruz AMORÓS, Mar RUIZ-GALEA, Juan ALONSO, M. Carmen LOBO, Pedro Vicente MAURI <i>Evaluation of Arundo donax tolerance to Cr, Cd, Ni or Pb in an in vitro culture assay</i>	86
S2-P22	<u>María CASANOVAS</u> , Elisabet CLAVERIA, Sandra FRANQUESA, Carlos R. MENDOZA, Cristian FONTICH, Celia CANTÍN, Simó ALEGRE, Ramón DOLCET-SANJUAN <i>Reducción de los costes en el proceso de rescate in vitro de embriones inmaduros de Prunus spp.</i>	87
S2-P23	<u>Ana M^a. CASTILLO ALONSO</u> , Sandra ALLUÉ DURANGO, Asún COSTAR CASTÁN, Fanny ALVARO SÁNCHEZ, M ^a Pilar VALLÉS BRAÚ <i>Embriogénesis de la microspora de trigo espelta de origen español, centroeuropeo y líneas de trigo panadero x trigo espelta</i>	88
S2-P24	<u>M. Elena GONZÁLEZ BENITO</u> , Carolina KREMER, Iván GONZÁLEZ, Carmen MARTÍN <i>Ultraestructura celular durante el proceso de crioconservación mediante vitrificación</i>	89

S2-P25	<u>Carmen MARTÍN</u> , Fatiha BRADAI, Juan Bautista MARTÍNEZ-LABORDE <i>Estabilidad genética y capacidad de regeneración en callos de maíz conservados in vitro</i>	90
S2-P26	<u>Isabel MENDOZA-POUDEREUX</u> , María CANO, María Teresa SOLÍS, Francisco ESTEVE, Juan SEGURA, Pilar S. TESTILLANO, Isabel ARRILLAGA <i>Assessment of molecular genetic stability during the cryopreservation process of Pinus pinaster Aiton embryogenic calli</i>	91
S2-P27	<u>Paloma MONCALEÁN GUILLEN</u> <i>Red CYTED: Biotecnología para fortalecer programas de mejora de especies de interés socioeconómico</i>	92
S2-P28	<u>Itziar Aurora MONTALBÁN</u> , Paloma MONCALEÁN <i>Regeneración de planta somática a partir de líneas embriogénicas conservadas a -80°C durante más de un año</i>	93
S2-P29	Leonardo VELASCO, Araceli BARCELÓ, <u>Isabel M.G. PADILLA</u> <i>Saneamiento y conservación de ajo mediante técnicas de cultivo in vitro</i>	94
S2-P30	<u>Elena PALOMO-RÍOS</u> , Almudena PELÁEZ, Sergio CERESO, Titouh KHAYREDDINE, Carlos LÓPEZ-HERRERA, José Ángel MERCADO, Fernando PLIEGO-ALFARO <i>Evaluación del efecto del filtrado crudo del hongo Rosellinia necatrix en el crecimiento de brotes y cultivos embriogénicos de olivo</i>	95
S2-P31	<u>César PÉREZ</u> , Alberto ROURA, César TAPIA, Marcelo TACÁN <i>Estrés oxidativo durante la criopreservación de ejes embrionarios de tres especies con diferente tolerancia a la deshidratación: Phaseolus vulgaris (ortodoxa), Arachis hypogaea (subortodoxa) y Theobroma cacao (recalcitrante)</i>	96
S2-P32	Fernando CÓRDOBA, Antonio J. LÓPEZ-PÉREZ, N. NAVARRO-GARCÍA, José M. GAMBÍN, <u>Olaya PÉREZ-TORNERO</u> <i>Mutantes de patrones de cítricos tolerantes a la salinidad. Evaluación in vitro de los cambios en el crecimiento producidos por la sal</i>	97
S2-P33	Fatiha BRADAÏ, <u>Carolina SÁNCHEZ-ROMERO</u> <i>Efecto de la criopreservación y de un precultivo con alta concentración de sacarosa sobre la embriogénesis somática de olivo</i>	98
S2-P34	Cristina CELESTINO MUR, Bárbara FERNÁNDEZ GUIJARRO, Inmaculada HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Marta BALLESTEROS GUTIÉRREZ, Mar RUIZ GALEA, Luis CARDO MAYA, <u>Mariano TORIBIO IGLESIAS</u> <i>Crecimiento de plantas de alcornoque regeneradas a partir de árboles selectos mediante embriogénesis somática</i>	99
S2-P35	<u>Vicente VIVES-PERIS</u> , Rosa M. PÉREZ-CLEMENTE, Aurelio GÓMEZ-CADENAS <i>Estudio de la respuesta de cítricos cultivados in vitro a diferentes estreses abióticos</i>	100

- S2-P36 Eva ŽIŽKOVÁ, Pavlína MÁCHOVÁ, Jiří ZÁMEČNÍK, Miloš FALTUS
New effective cryopreservation approach for grey poplar in vitro cultures 101

Sesión III

- S3-P37 Jorge SÁNCHEZ LÓPEZ, Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ, Begoña GARCÍA-SOGO, Benito PINEDA CHAZA, Carlos RIBELLES ALFONSO, Fernando YUSTE-LISBONA, Trinidad ANGOSTO TRILLO, Rafael LOZANO RUIZ, Vicente MORENO FERRERO, Alejandro ATARÉS HUERTA
Identificación de mutantes de tomate afectados en diferentes etapas de la organogénesis adventicia 105
- S3-P38 Marta BARCELÓ-MUÑOZ, Ana MORENO, Clara PLIEGO, Fares BELLAMECHE, Elena PALOMO-RÍOS, Miguel GOMEZ-LIM, David RUANO-ROSA, Carlos LÓPEZ-HERRERA, José Ángel MERCADO, Fernando PLIEGO-ALFARO
Obtención de plantas de fresa transformadas con una doble construcción glucanasa-quitinasa y evaluación de su tolerancia a patógenos fúngicos 106
- S3-P39 Liliana LALALEO, Pilar TESTILLANO, María-Carmen RISUEÑO, Rosa M. CUSIDO, Javier PALAZON, Ruben ALCAZAR, Mercedes BONFILL
In vitro conditions to induce organogenesis and also promote lignan production in Linum album 107
- S3-P40 Vanesa CANO, Elena CORREDOIRA, Laura BOUZA, Teresa MARTÍNEZ, Antonio BALLESTER, Mariano TORIBIO, M^a del Carmen SAN JOSÉ
Transformation of Quercus ilex somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein 108
- S3-P41 Nuria ALBURQUERQUE, Pedro DÍAZ-VIVANCOS, Lydia FAIZE, José Antonio HERNÁNDEZ, Lorenzo BURGOS ORTIZ
Preliminary results on rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on sharka resistance in non-transgenic fruit trees 109
- S3-P42 Sandra CORREIA, Diana AUGUSTO, Inês RIBEIRO, Jorge CANHOTO
Efficient isolation and purification of tamarillo (Solanum betaceum Cav.) leaf mesophyll cells and protoplasts 110
- S3-P43 Manuel CANTOS BARRAGÁN, José Luis GARCÍA FERNÁNDEZ, Leticia FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, José Julio ORTEGA CALVO
K and P supply modifies root amino acid exudation by sunflower in vitro. Effect on chemotactic behavior of PAHs degrading microorganisms 111

- S3-P44 Purificación CORCHETE, Isabel MATEOS-WHITE, Diego HIDALGO, Javier PALAZON
Producción heteróloga de resveratrol en cultivos celulares de Silybum marianum transformados genéticamente con estilbeno sintasa de Vitis vinifera y el factor de transcripción MYB12 de Arabidopsis thaliana 112
- S3-P45 Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ, Jorge SÁNCHEZ LÓPEZ, Benito PINEDA CHAZA, Begoña GARCÍA-SOGO, Carlos RIBELLES ALFONSO, Fernando YUSTE-LISBONA, Alba RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Rafael LOZANO RUIZ, Vicente MORENO FERRERO, Alejandro ATARÉS HUERTA
Caracterización de un mutante insercional de tomate afectado en el desarrollo del meristemo apical 113
- S3-P46 Lucie DE SOUSA, João MARTINS, María Teresa BATISTA, Jorge CANHOTO
Biotransformation assays using callus and shoot cultures of Arbutus unedo L. 114
- S3-P47 Begoña GARCÍA-SOGO, Carlos RIBELLES ALFONSO, Victoria ALBALAT PERAITA, Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ, Alejandro ATARÉS HUERTA, Vicente MORENO FERRERO, Benito PINEDA CHAZA
Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la obtención de plantas transgénicas de melón 115
- S3-P48 Beatriz PINTOS LÓPEZ, José Antonio MANZANERA DE LA VEGA, Luisa MARTÍN CALVARRO, Carlos JIMÉNEZ, Aranzazu GÓMEZ-GARAY
Elicitación de la producción de antioxidantes en embriones somáticos de alcornoque (Q. suber): síntesis verde de nanopartículas de plata 116
- S3-P49 Carlos RIBELLES ALFONSO, Begoña GARCÍA-SOGO, Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ, Alejandro ATARÉS HUERTA, Juan CAPEL SALINAS, Rafael LOZANO RUIZ, Vicente MORENO, Benito PINEDA CHAZA
La menor tasa de cuajado en el mutante dominante lfs-2448 parece estar relacionada con el proceso normal de polinización 117
- S3-P50 Mar RUIZ GALEA, Eva FRIERO MOLANO, Cristina CELESTINO MUR, Mariano TORIBIO IGLESIAS
Efecto del genotipo sobre la producción y composición nutritiva de suspensiones embriogénicas de Quercus ilex y Quercus suber 118

Sesión IV

- S4-P51 Nuria ALBURQUERQUE, Lydia FAIZE, Lorenzo BURGOS, Mohamed FAIZE
Uso de extractos de algas en el cultivo in vitro de frutales 121
- S4-P52 Emma SUÁREZ TOSTE, M^a Carmen ALFAYATE CASAÑAS
Adaptaciones de la epidermis foliar de dos cultivares del género Leucospermum (Proteaceae), desarrollados in vitro, a las condiciones ex vitro 122

S4-P53	Isabel IMBRODA SOLANO, Marta BARCELO MUÑOZ, Alfonso GAGO-CALDERON, Isabel M.G. PADILLA, <u>Araceli BARCELÓ MUÑOZ</u> <i>Efecto de la iluminación LED en la propagación in vitro de P. terebinthus L, Fragaria x ananassa Duch y Rosa sp.</i>	123
S4-P54	M ^a Teresa MARTÍNEZ, M ^a del Carmen SAN JOSÉ, M ^a José CERNADAS, <u>Elena CORREDOIRA</u> <i>Micropropagación de árboles adultos de encina, Quercus ilex, mediante embriogénesis somática</i>	124
S4-P55	<u>Mercedes DABAUZA MICÓ</u> , José Antonio SOTOMAYOR SÁNCHEZ, María José JORDÁN BUESO, Cristina MARTÍNEZ CONESA, Pascual ROMERO ESPINAR, María QUÍLEZ SIMÓN, Inmaculada GARCÍA ALEDO <i>Establecimiento in vitro de genotipos de salvia y de orégano seleccionados por su composición en aceites esenciales</i>	125
S4-P56	J.M.T FIGUEIREDO, LM.V LAVOURA, R.F.V. PINTO, N. FARINHA, J.C. GONÇALVES, <u>C. DEBIASI</u> <i>In vitro establishment for the micropropagation of sea asparagus (Salicornia spp.)</i>	126
S4-P57	<u>E. GARCÍA</u> , J. A. MARÍN, P. LORENTE, P. ANDREU, A. ARBELOA <i>Micropropagación de patrones de pistacho</i>	127
S4-P58	<u>Aranzazu GÓMEZ-GARAY</u> , Luisa MARTÍN, Yolanda PÉREZ, Juan Antonio LÓPEZ, Nieves VILLALOBOS, Beatriz PINTOS <i>Alteraciones en la fotosíntesis en plantas de Medicago arborea cultivadas in vitro en presencia de nanocerio</i>	128
S4-P59	M ^a Teresa MARTÍNEZ, Elena CORREDOIRA, M ^a José CERNADAS, M ^a del Carmen SAN JOSÉ <i>Micropropagación de árboles adultos de encina vía proliferación de yemas axilares</i>	129
S4-P60	<u>C.R. MENDOZA MORALES</u> , R. DOLCET-SANJUAN <i>BIO-IRTA® a new type of temporary immersion system (TIS) evaluated with Prunus spp and Pyrus spp rootstocks</i>	130
S4-P61	M ^a del Carmen SAN JOSÉ, M ^a Teresa MARTÍNEZ, M ^a José CERNADAS, Laura BOUZA, Elena CORREDOIRA <i>Conservación del roble eneano del Monte Pindo mediante micropropagación</i>	131
S4-P62	Alberto RODRIGUEZ ACEVEDO, Nieves VIDAL GÓNZALEZ, Purificación COVELO ABELEIRA, <u>Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ</u> <i>Micropropagación de Prunus lusitanica para su conservación ex situ</i>	132
S4-P63	<u>Hadaly SERRANO RUIZ</u> , Adrián GAITE, Lluís MARTÍN-CLOSAS, Ana María PELACHO <i>Evaluación de la ecotoxicidad de compuestos liberados por acolchados plásticos biodegradables utilizados en agricultura mediante el cultivo in vitro de plantas</i>	133

- S4-P64 Alexander MORENO HERRERA Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA,
Mónica COIG O'DONNELL, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ,
Nieves del Pilar VIDAL GONZÁLEZ
*Sistemas alternativos del cultivo in vitro para la multiplicación eficiente
de banano (Musa AAA) variedad Williams* 134
- S4-P65 Susana VILARIÑO RODRÍGUEZ, José Luis GARCÍA FERNÁNDEZ,
Manuel CANTOS BARRAGÁN
*Modificaciones del sistema de cultivo para optimizar el factor de
multiplicación y la calidad de plantas micropropagadas de Stevia
rebaudiana, Bertoni* 135

Conferencias
plenarias

Plenary
conferences

4D-high-resolution phenotyping of single cells and organs enables systems biology insights into cell differentiation

Klaus PALME⁽¹⁾

¹ *Center for Systems Biology, Faculty of Biology, University of Freiburg (Germany)*

E-mail of contact: klaus.palme@biologie.uni-freiburg.de

Understanding the cellular mechanisms that direct organ growth in response to internal and environmental cues is a major challenge for plant biology. Although numerous studies have provided insight into the regulatory networks that direct organ growth and shape, surprisingly little is known about how cells and organs develop in three-dimensional space. To understand the cellular mechanisms that direct organ growth of plants in response to internal and environmental cues, large-scale methods have been developed for a quantitative analysis of cells and organs in situ. An advanced fully robotized imaging pipeline allows us to accurately visualize how single cells reprogram and differentiate into tissues and organs. An intrinsic root coordinate system enables a direct quantitative comparison between root tips at single cell resolution. Even subtle changes in cell division patterns within the root apical meristem can be monitored.

PL2**Ultra-cold but alive – achievements, chances and problems of plant cryopreservation**

E. R. Joachim KELLER⁽¹⁾

¹ Genebank Department, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstrasse 3, D-06466 Seeland OT Gatersleben, Germany

E-mail of contact: keller@ipk-gatersleben.de

Cryopreservation is the safest method to store plant germplasm for long time periods. It is most important for vegetatively propagated material and species with recalcitrant seeds, but it is also used for short-living orthodox seeds and pollen. Despite the fact that there are well-established methods for some main crop species, the need is evident of further research on fundamental and applied physico-chemical, physiological and genetic aspects.

Cryopreservation has been established in IPK since 1997. The genebank focuses on shoot tip cryopreservation of three main crops, namely potato, garlic and mint, and storage of *Allium* pollen. Recently, the number of accessions in storage amounts to more than 1950. Methods were adopted and further developed for this material. Investigations were conducted on positive effects of cold pretreatments and the influence of stress factors in various steps of the cryo-procedures. Tissue water plays a major role in cooling and warming processes. This was investigated by Differential Scanning Calorimetry. Ice crystallization is a major obstacle for maintenance of intact cell structure. Cryo-microscopy visualized freezing-thawing and vitrification processes. It was usable for pollen and thin translucent tissue. Genetic questions concern genes involved in stress responses, recovery processes and genetic stability. Conclusions from well-established systems to new ones (related species or alternative target tissue) are not always easy. The ubiquitous presence of microorganisms (endophytes) in all tissue types induces the need to work on cryopreservation of more complex living systems. Finally, economical aspects are important for broader utilization of cryopreservation, which was investigated in a model case of garlic cryopreservation. As major research results can be attained only with collaboration, some examples are given. Concluding the matter, some general features of cryopreservation are summarized.

***In vitro* Plant Cell Culture: A Challenge for the future?**

Maria Salomé S. PAIS⁽¹⁾

¹ Academia das Ciências de Lisboa; *Biosystems and Integrative Sciences Institute (BioISI)*. R. da Academia das Ciências, 19, 1249-122, Lisboa, Portugal

E-mail of contact: msalomepais@acad-ciencias.pt; msalomepais@gmail.com

The concept of *in vitro* plant cell culture comes back to 1902 with Haberlandt, immediately followed by Kolte & Robins that successfully cultured roots and stem tips. Attempts allowed Went (1926) to discover the plant growth hormone (IAA), followed by Skoog & Miller (1955) showing that kinetin, they discovered, act as a cell division hormone and that organ formation depends on the balance auxin/cytokinin. Discover of how to isolate protoplasts by Cocking (1960), enabled Takebe *et al.* (1971) to regenerate, for the first time, entire plants from them. A mark in the future of plant cell culture and of its impact on crop improvement arrived in 1977 with Chilton *et al.* (1977) that successfully integrated Ti plasmid DNA from *Agrobacterium tumefaciens* in plants, this discovery being the base of plant biotechnology. The *in vitro* plant cell culture achievements found their application in agriculture, floriculture, forestry, biodiversity preservation as well as in cosmetic and pharmaceutical industry. But it was with Horsh *et al.* (1984) that tobacco was the first plant (transgenic) to be engineered with *A. tumefaciens* and the first GENETICALLY MODIFIED CROP (GMC) was produced in USA (1996). Genetic transformation technology relies on the technical aspects of plant tissue culture and molecular biology. From 1996 to 2012, the cultivation of GMCs spread across the world, with more than 17 million farmers across 28 nations planting GMCrops.

Theoretically it should be possible to have an horizon of solutions for improving crops, the quality of products and human welfare. In the world we are leaving with increased air pollution, global changes, increased ecological footprint, increased levels of phosphorous and nitrogen in soils, iodine deficiency and crops yield growth slowing down about 40% compared to the green revolution, malnutrition, obesity and chronic diseases, the challenge by 2050, includes food production, food security, ability to cope with harmful effects of global changes and corresponding effects. In a changing world, to provide sustainable long term solutions scientists must make use of all available resources and developments generated by Plant Cell Culture, OMICS, Plant Biotechnology, Synthetic Biology and Gene Editing.

Conferencias
invitadas

Invited
conferences

Regulation of organogenesis and tissue patterning during postembryonic development of Arabidopsis roots

Miguel-Ángel MORENO-RISUENO⁽¹⁾, Estefano BUSTILLO AVENDAÑO⁽¹⁾,
Juan PERIAÑEZ-RODRIGUEZ⁽¹⁾, Álvaro SÁNCHEZ-CORRIONERO⁽¹⁾,
Sergio IBÁÑEZ⁽²⁾, Jose Manuel PÉREZ-PÉREZ⁽²⁾, Juan C. DEL POZO⁽¹⁾

¹ Center for Plant Biotechnology and Genomics (UPM-INIA), Department of Biotechnology and Plant Biology, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

² Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain.

E-mail de contacto: miguelangel.moreno@upm.es

Plants develop continuously through the formation and growth of organs. Organogenesis after embryogenesis starts with the formation of organ founder cells, which have the developmental potential –pluripotency–of giving rise to all distinct tissues which make up an organ. Positioning and specification of root organ founder cells is dependent on oscillating gene expression, which is part of a developmental clock, the Lateral Root Clock. To gain further insight into morphogenetic regulators of oscillating gene expression and founder cell specification we have generated plants carrying specific cell identity markers and have performed a mutagenesis screen. In one of these mutants, which we named *potent*, many pericycle cells change their identity becoming organ founder cells, which results in overproduction of lateral roots. POTENT is degraded by auxin and interacts with oscillating transcription factors, functioning as a transcriptional repressor. Our results indicate that POTENT integrates auxin signaling into oscillating gene expression through a double repression mechanism to set the pace of organ founder cell positioning.

New organ formation also occurs as part of body regeneration mechanisms. Regeneration of new root organs from plant aerial cuttings can occur naturally without exogenous hormone supplementation. We have investigated the developmental changes occurring during rooting of leaves using *Arabidopsis thaliana* as a model. Our results show that cytokinin and auxin signaling leads to proliferation of vascular-associated tissues, primarily those expressing the J0121 marker, to form a mass of cells with rooting competence which we termed morphogenic microcallus. Morphogenic microcallus does not show all markers observed in exogenously hormone-induced callus and precedes specification of postembryonic root founder cells. We also found that de novo root initiation and patterning of adventitious roots requires stem cell regulators, as mutant combinations of these factors show abnormal vascular and ground tissue specification with reduced number of cell layers. Our work highlights key stages required for rooting leaves and identifies factors primarily involved in their regulation, providing a developmental framework for understanding de novo organ formation in plants.

INV2

Aproximación biotecnológica a la mejora de olivo para inducir resistencia a Verticilosis

Fernando PLIEGO-ALFARO⁽¹⁾

¹ Dpto. de Biología Vegetal, IHSM “La Mayora”, Universidad de Málaga, 29071, Málaga, España.

E-mail de contacto: ferpliego@uma.es

Nuestro grupo de trabajo está abordando la mejora genética del olivo por métodos biotecnológicos. Inicialmente, esta mejora se ha enfocado hacia el acortamiento del periodo juvenil, mediante transformación con el gen *MtFT*, para acelerar los cruzamientos (FAST TRACK BREEDING) e introducir, en olivo cultivado, genes de resistencia a Verticilosis presentes en olivo silvestre. Se han obtenido varias líneas transgénicas, dos de las cuáles mostraron floración *in vitro*, así como en condiciones de invernadero. Tras polinización manual, se han obtenido algunos frutos y en la actualidad se están germinando las semillas. En una aproximación paralela, se está evaluando el efecto de distintos genes en la resistencia a Verticilosis: a) gen *afp* de *Aspergillus niger*, cuya proteína muestra una potente actividad antifúngica frente a hongos filamentosos; b) gen *AtNPR1*, que juega un papel crucial en la respuesta de la planta a patógenos mediada por salicilato y c) gen *Ve1* de tomate, implicado en la resistencia al patotipo no defoliante de *Verticillium dahliae*. En la actualidad, se dispone de varias líneas transgénicas de las 3 construcciones y se están regenerando plantas para evaluar su comportamiento frente a este patógeno. Asimismo, se ha abordado la regeneración *in vitro* del genotipo de olivo silvestre Stop Vert, resistente a Verticilosis, mediante proliferación de yemas axilares y vía embriogénesis somática; se han obtenido plantas mediante ambas rutas y se está evaluando su estabilidad genética. Finalmente, y como última estrategia, se está investigando la tolerancia a concentraciones crecientes del filtrado crudo de *Verticillium dahliae* en líneas embriogénicas procedentes de semillas del cv. susceptible Picual y del cv. Frantoio, con tolerancia parcial a Verticilosis.

Financiado por:

Proyecto AGR-7992 (P11-Junta de Andalucía)

Transgénesis y nutrición nitrogenada en coníferas

María Teresa LLEBRÉS⁽¹⁾, María Belén PASCUAL⁽¹⁾,
Vanessa CASTRO-RODRÍGUEZ⁽¹⁾, Concepción ÁVILA⁽¹⁾, Francisco M. CÁNOVAS⁽¹⁾

¹ Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga.

E-mail de contacto: canovas@uma.es

Las especies forestales juegan un papel crucial en el equilibrio global de los ecosistemas. Las plantas de interés forestal tienen también gran importancia económica en la producción de madera, pulpa de papel, biocombustibles y una gran variedad de resinas y metabolitos secundarios.

Las actividades investigadoras de nuestro grupo están dirigidas a conocer cómo el uso eficiente de los nutrientes nitrogenados determina el desarrollo vascular y la acumulación de biomasa en árboles. La economía del nitrógeno (N) tiene especial relevancia en especies arbóreas que poseen ciclos de vida largos con periodos estacionales de crecimiento y desarrollo durante muchos años. Como modelo experimental utilizamos pino marítimo (*Pinus pinaster* L. Aiton), la conífera de mayor importancia económica y ecológica en el sur de Europa y también uno de los modelos más avanzados en estudios de genómica forestal. En colaboración con otros grupos, en el marco de los proyectos europeos Sustainpine y ProCoGen, hemos puesto en marcha una plataforma tecnológica para la realización de estudios funcionales de genes en coníferas vía embriogénesis somática. Se han generado líneas transgénicas (sobre-expresión y silenciamiento) para genes implicados en el metabolismo del N, entre los que se incluyen algunos relacionados con el metabolismo de aminoácidos. Actualmente estamos explorando las propiedades moleculares, regulación molecular y localización subcelular de las enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos esenciales para la economía del N de las coníferas. Se presentará y discutirá una visión general de este programa de investigación.

Financiado por:

BIO2015- 69285-R, BIO2012-0474 y Grupo de investigación PAIDI BIO-114.

INV4

Biofactorías celulares para la producción de metabolitos secundarios

María A. PEDREÑO⁽¹⁾, Begoña MIRAS-MORENO⁽¹⁾,
Pedro-Joaquín SÁNCHEZ-PUJANTE⁽¹⁾, Laura DI PATRIA⁽²⁾,
Ana-Belén SABATER-JARA⁽¹⁾, Lorena ALMAGRO⁽¹⁾

¹ Departamento Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, España.

² Facultad Departamental de Medicina y Cirugía, Università Campus Bio-Medico di Roma, Via Álvaro del Portillo, 21, 00128 Roma, Italia.

E-mail de contacto: mpedreno@um.es

La producción de compuestos bioactivos mediante la utilización de sistemas biotecnológicos constituye un área emergente y de gran potencial ya que representa una alternativa a los procesos clásicos de extracción. Una de estas alternativas biotecnológicas consiste en el empleo de cultivos celulares vegetales. Tras más de diez años de investigaciones, muchos de los retos ligados al cultivo de células vegetales en biorreactores, han sido alcanzados. Sin embargo, el gran problema que plantean es el bajo nivel de producción alcanzado por unidad de biomasa (en el rango de 1-100mg/L) que, en ocasiones, es inferior al nivel de acumulación de estos metabolitos en los tejidos especializados de la planta. Este bajo nivel de producción depende factores inherentes de la línea celular y de la optimización del medio y de las condiciones de cultivo. Además, existen estrategias que permiten incrementar los niveles de producción de un metabolito en particular, rentabilizando su proceso de producción a gran escala. Entre ellas destacan la *elicitación* y la ingeniería metabólica. Partiendo de nuestra experiencia previa con suspensiones celulares de vid para producir *trans*-resveratrol, los principales escollos para la utilización de este cultivo celular como biofactoría han sido superados ya que el metabolito se produce a alto nivel (>2000 mg/L) bajo unas condiciones específicas de *elicitación* (Pedreño *et al*, 2003, 2009) reproducibles y controladas. Además, el metabolito se secreta y se acumula en el medio de cultivo resultando fácil el proceso de recuperación. Utilizando esta tecnología hemos sido capaces de mejorar la producción de metabolitos utilizando ciclodextrinas, solas o combinadas con otros compuestos inductores que resultan muy eficaces para estimular la producción de alcaloides, sesquiterpenos, carotenoides, fitoesteroles y tocoferoles en cultivos celulares de diferentes especies de plantas.

Por otra parte, conociendo las rutas de biosíntesis de estos compuestos bioactivos y mediante el uso de aproximaciones genómicas y transcriptómicas se han diseñado procedimientos de transformación para sobre-expresar genes que codifican enzimas claves de la biosíntesis de estos compuestos bioactivos.

Referencias:

PEDREÑO *et al*. 2003, WO2003062406A1. PEDREÑO *et al*. 2009, WO2009106662A1.

Financiado por:

Este trabajo de investigación ha sido financiado por el “Programa de Ayudas a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia, Fundación Séneca, Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia” (Proyecto 19876/GERM/15) y por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto BIO2014-51861-R).

Agricultura, contaminación ambiental por plásticos, ¿cultivo in vitro?

Ana M. PELACHO⁽¹⁾, Hadaly SERRANO-RUÍZ⁽¹⁾, Lluís MARTÍN-CLOSAS⁽¹⁾

¹ Departamento Hortofruticultura, Botánica y Jardinería, ETS de Ingeniería Agraria, Universidad de Lleida, Avda Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

E-mail de contacto: pelacho@hbj.udl.cat

El término plástico engloba una gran familia de productos de base polimérica diversa aditivados con cantidades menores de otros compuestos que otorgan propiedades únicas y diversas y los adaptan a su uso final específico. En agricultura se empezaron a utilizar como sustitutivos del vidrio en invernaderos, y poco después masivamente en túneles y sobre todo como acolchados, así como en infinidad de otras aplicaciones. Para muchos cultivos hortícolas, en ambientes con restricciones climáticas de cultivo, y más aún en agricultura ecológica, son insustituibles por los beneficios que proporcionan, a lo que contribuyen su bajo coste y su durabilidad. Sin embargo, estas características se han convertido también en el principal problema: al finalizar los cultivos, los acolchados plásticos fragmentados y mezclados con el suelo y restos de material vegetal son difíciles de recoger, perduran y se acumulan dispersos en el campo durante muchos años, contaminando el medio ambiente.

Conscientes de esta situación, desde hace unos años se desarrollan plásticos biodegradables con el objetivo de que sus fragmentos puedan ser incorporados al suelo agrícola tras recoger los cultivos para los que se utilizan; una buena alternativa para evitar la contaminación por polietileno que sin embargo plantea interrogantes. ¿Se degradan totalmente los plásticos en el suelo? ¿Se degradan también los aditivos y los plastificantes? ¿Cómo se produce la biodegradación? ¿Qué moléculas intermedias se liberan? ¿Afecta la composición de los plásticos, por su degradación, al equilibrio de la flora bacteriana del suelo? ¿Y a los cultivos que se instalan sobre un suelo en el que se están degradando los acolchados? En tanto en cuanto la cantidad de estos materiales en el suelo es pequeña se viene dando respuesta satisfactoria a la mayoría de estas cuestiones y no se espera que produzcan efectos indeseables. Sin embargo, conforme va incrementándose su uso también puede aumentar su acumulación, haciendo necesario identificar y considerar efectos y umbrales.

En línea con ello, la industria dispone de normas para asegurar la idoneidad de los materiales, incluyendo los acolchados plásticos biodegradables, y que determinan aspectos asociados a la posible toxicidad de los mismos sobre distintos tipos de organismos. En el caso de las plantas estas normas se limitan habitualmente a evaluar el efecto de los materiales fabricados sobre la germinación en placa Petri y las primeras etapas del desarrollo en macetas en invernadero, resultando muy cuestionable que estos ensayos permitan identificar el efecto de los compuestos liberados por la degradación de los plásticos a lo largo del ciclo agrícola: la germinación es un proceso independiente del desarrollo posterior de la planta y buena parte de los cultivos hortícolas se instalan como plántulas. El cultivo *in vitro* se ha revelado como una tecnología muy flexible, cuyas condiciones permiten superar estas limitaciones e identificar efectos de los compuestos liberados por los plásticos biodegradables, tanto individualmente como en un pool de composición múltiple e indefinida resultante de la degradación parcial del material, sobre el desarrollo de especies que habitualmente se cultivan en acolchado. Presentaremos los resultados más recientes realizados con varios acolchados biodegradables, así como otros indicadores del impacto que pueden tener estos materiales plásticos de uso agrícola.

INV6

Retos actuales en micropropagación

Juan SEGURA⁽¹⁾

¹ ISIC/ERI BIOTECMED, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia (Spain).

E-mail de contacto: juan.segura@uv.es

Es indudable que la micropropagación continua siendo la aplicación más importante e inmediata de la tecnología del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Sin embargo, y pese a los éxitos conseguidos, ninguna de las cuatro etapas en que se acostumbra a dividir la propagación *in vitro* de las plantas está exenta de problemas; en algunos casos, estos problemas limitan drásticamente el uso generalizado de esta tecnología. Pese a los conocimientos adquiridos, en los últimos años, utilizando especies modelo, la falta de información sobre los mecanismos moleculares implicados en las respuestas morfogénicas de las especies con mayor interés (agrícola, forestal, aromático-medicinal u ornamental), unido a la variabilidad entre especies y genotipos, hace que las aproximaciones experimentales utilizadas para resolver estos problemas continúen siendo, en la mayoría de los casos, empíricas. Aunque, por el momento, esta aproximación metodológica sigue siendo necesaria, abordaré la posible solución de algunos de los problemas (recalcitrancia, por ejemplo) a partir de los conocimientos actuales sobre la señalización de las hormonas implicadas en el proceso. Así mismo, discutiré tanto el papel de los nuevos abordajes experimentales (diseño de material mediante impresoras 3D, cultivos fotoautótrofos y Biorreactores) como el del microbioma vegetal en el proceso de micropropagación.

Comunicaciones
orales

Oral
communications

Auxin biosynthesis and transport are required for stress-induced microspore embryogenesis whereas the gametophytic pathway progresses with decreasing auxin in rapeseed and barley

Yolanda PÉREZ-PÉREZ⁽¹⁾, María-Teresa SOLÍS⁽¹⁾, Ahmed A. EL-TANTAWY⁽¹⁾,
Marta PITARCH⁽²⁾, Aurelio GÓMEZ-CADENAS⁽²⁾, María C. RISUEÑO⁽¹⁾,
Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

¹ Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

² Dep. CC Agrarias y del Medio Natural, Univ. Jaume I, Castellón, Spain.

E-mail of contact: testillano@cib.csic.es

During another development *in vivo*, microspores develop and follow the gametophytic pathway to produce pollen grains. *In vitro*, isolated microspores can be reprogrammed by stress, and they become totipotent cells, follow the embryogenesis program, and produce doubled-haploid embryos and plants. Our knowledge on the involvement of the phytohormone auxin in these two microspore pathways is very limited.

In the present study we analyzed the dynamics of the synthesis, transport and cellular accumulations of auxin during these two microspore developmental pathways, gametophytic and embryogenic, in *Brassica napus* and *Hordeum vulgare*. We analyzed auxin concentration and cellular accumulation, expression of *TAA1* auxin biosynthesis gene and *PINI-like* efflux carrier gene, as well as the effects in microspore embryogenesis of inhibitors of auxin biosynthesis (Kynurenin), transport (N-1-naphthylphthalamic acid, NPA) and action (α -(p-Chlorophenoxy) isobutyric acid, PCIB), in both species.

During the gametophytic development *in vivo*, endogenous auxin levels, *TAA1* and *PINI-like* expression were high at early stages, in microspore tetrads and tapetum, while they progressively decreased during gametogenesis in both pollen and tapetum cells. In contrast, after stress-induced microspore reprogramming to embryogenesis, *TAA1* gene was up-regulated, auxin concentration increased and accumulated in embryo cells from the first embryogenic divisions. Kynurenin treatments decreased microspore embryogenesis efficiency, indicating that *de novo* auxin biosynthesis was required in this pathway. *PINI-like* gene expression was also induced with microspore embryogenesis, while NPA and PCIB impaired embryogenesis initiation and development. These results indicated that auxin biosynthesis, polar transport and action were required for microspore embryo initiation and progression, while auxin progressively diminishes during gametophytic development, in the two species, the dicot rapeseed and the monocot barley.

Funding:

Work supported by project (AGL2014-52028-R) funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

S1-O2**Establecimiento de cultivos celulares de fanerógamas marinas**

Marina CARRASCO ACOSTA⁽¹⁾, Robaina R.R., Pilar GARCÍA-JIMÉNEZ⁽¹⁾

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas GC, Islas Canarias, España.

E-mail de contacto: pilar.garcia@ulpgc.es

La franja del litoral ocupada por las praderas de fanerógamas marinas coincide con las zonas de mayor presión antrópica, por lo que, a pesar de tener una importante función ecológica, están sometidas a numerosos impactos ambientales que provocan la regresión de las mismas. Los trabajos de cultivo *in vitro*, que tienen como fin la restauración de las praderas, tienen como objetivo la propagación clonal de explantos y el cultivo en condiciones asépticas de plántulas germinadas *in vitro*, los cuales dependen de una pradera donante. En los últimos años, la aproximación que se ha realizado es a través de cultivos celulares con la inducción de embriogénesis, que minimiza considerablemente la perturbación en dichas praderas dado que usa poca cantidad de material de partida. Con este objetivo, en el presente estudio se han establecido cultivos celulares axénicos de las especies de fanerógamas marinas *Posidonia oceanica* y *Cymodocea nodosa*. Los cultivos de células libres, para ambas especies, se obtuvieron mediante plasmólisis y digestión enzimática de los explantos. Dichos cultivos se establecieron en medio base MS suplementado con hormonas (10^{-4} M de la auxina 2,4-D y la citoquinina BAP). Las células se desarrollaron y dieron lugar microembriones en cultivos con diferentes reguladores de crecimiento (2,4-D, NAA, entre otros), reductores como el glutatión y sucesivas aclimataciones a la salinidad. Se presenta como dato más destacado que a las 9 semanas en cultivo, las células derivaron en estructuras multicelulares.

Con la experiencia adquirida se establecerán las bases del cultivo *in vitro* a partir de tejido embrionario, para poder obtener, en un futuro, material vegetal con el que llevar a cabo los programas de restauración y trasplante sin recurrir a las praderas naturales.

Análisis genético de granos de polen de Lima Mexicana cultivados *in vitro* con marcadores SSR (Simple SequenceRepeat) y SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Miguel F. GARAVELLO⁽¹⁾, Pablo ALEZA GIL⁽¹⁾

¹ Departamento de Citricultura y Producción Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias - IVIA Km. 10, CV-315, 7, 46113 Moncada, Valencia, Spain.

E-mail de contacto: aleza@ivia.es

El estudio de la estructura genética de los granos de polen de genotipos diploides y euploides de cítricos es de gran interés para los programas de mejora genética de híbridos triploides obtenidos mediante hibridación sexual. A partir de hibridaciones sexuales entre parentales diploides se pueden obtener híbridos triploides como consecuencia de la formación de gametos no reducidos (gametos 2n).

En este trabajo se pretende extraer el ADN de los granos de polen individualizados de Lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swing) cultivados *in vitro* y posterior amplificación del genoma completo para realizar análisis genéticos de cada grano de polen con múltiples marcadores SSR y SNP con el objetivo de identificar la presencia de granos de polen originados mediante gametos 2n y el mecanismo implicado en la formación de los mismos. Para ello, se sembraron granos de polen *in vitro* y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se clasificaron los granos de polen en función de su tamaño, y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf de 200 µL en los que previamente se depositaron 0,5 µL de una solución de SDS al 0,01%. A continuación, los tubos se sometieron a cinco ciclos de 5 minutos cada uno de enfriamiento a -25°C y calentamiento a 50°C. Luego se incorporó a cada tubo una solución tampón compuesta por proteinasa K y se incubaron una hora a 54°C y 10 minutos a 95°C. Finalmente, se amplificó el genoma de cada grano de polen mediante el REPLI-g Single Cell Kit (QiagenInc., Valencia, CA, USA) lo que nos permitió realizar análisis genéticos de un solo grano de polen con varios marcadores.

Los resultados obtenidos nos han permitido identificar la presencia de granos de polen originados a partir de gametos 2n y actualmente se están analizando con más marcadores para determinar el mecanismo implicado en su formación.

S2-04

Estimación de la eficacia de tratamientos elicitores para la inducción de tolerancia a estrés biótico en *Quercus ilex* L.

Marian MORCILLO⁽¹⁾, Lorena PONCE⁽¹⁾, María CANO⁽¹⁾, Leonardo ORLANDO⁽¹⁾, Álex ALBORCH⁽¹⁾, Eva CAÑIZARES⁽¹⁾, Juan Bautista PERIS⁽²⁾, Juan SEGURA⁽¹⁾, Mariano TORIBIO⁽³⁾, Isabel ARRILLAGA⁽¹⁾

¹ ISIC/ERI BIOTECMED, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés S/N, 46100 Burjassot, Valencia, España.

² Departamento de Botánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés S/N, 46100 Burjassot, Valencia, España.

³ Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Finca El Encín, Apdo. 127. 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España.

E-mail de contacto: angeles.morcillo@uv.es

En los últimos años los encinares (*Quercus ilex* L.) de la Península Ibérica están sufriendo un decaimiento general, conocido como “la seca”, provocado tanto por factores abióticos como bióticos; entre estos últimos destaca la infección por el oomiceto *Phytophthora* ssp.

El objetivo de nuestro estudio fue la inducción de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* mediante la aplicación de diferentes concentraciones de elicitores y extractos del oomiceto en embriones somáticos de *Quercus ilex* L. La evaluación de la posible tolerancia al patógeno se realizó en las líneas embriogénicas y/o en plantas obtenidas.

Las líneas embriogénicas Ha13 y E00 de encina se trataron, durante 3 días, con extractos estériles del oomiceto (OCF) o con elicitores químicos (metil jasmonato, MeJA; benzotiadiazol, BTH; ácido *para*-aminobenzoico, PABA; ácido salicílico, AS y ácido 3-aminobutanoico, BABA) a diferentes concentraciones. Transcurridos 7, 15 y 30 días, se evaluó el daño producido en las membranas celulares tras la elicitación, determinando la concentración de malondialdehído (MDA). El crecimiento y desarrollo de las líneas embriogénicas se determinó a los 60 días tras la elicitación. Posteriormente se realizaron ensayos de tolerancia en la línea embriogénica Ha13; para ello, dicha línea se co-cultivó con micelio durante 3 horas en medio líquido (20%) y durante 3 días en medio sólido. La evaluación del estrés oxidativo se realizó cuantificando los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y superóxido dismutasa (SOD). La posible tolerancia al patógeno se determinó en base al radio del crecimiento del micelio frente a líneas embriogénicas elicitadas y controles.

De los resultados obtenidos se destaca que concentraciones ≤ 25 μ M de MeJA son un buen agente elicitor ya que no afectan al crecimiento y desarrollo de la línea embriogénica; por otra parte, el contacto posterior de este material con el micelio incrementa la producción de H₂O₂. Además, en los ensayos de cocultivo la elicitación con MeJA o 50% de OCF indujo cierta tolerancia al oomiceto.

Financiado por:

Proyecto cofinanciado por el MINECO, UE (AGL2013-47400-C4-4-R y AGL2016-76143-C4-1-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052) y contrato predoctoral M.M (BES-02014-69171).

Genome editing of the octoploid *Fragaria* × *ananassa* using the CRISPR/Cas9 system

Carmen MARTÍN-PIZARRO⁽¹⁾, David POSÉ⁽¹⁾

¹ Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Universidad de Málaga-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ed. I+D, 3ª planta, Campus Teatinos s/n, 29010, Málaga, Spain.

E-mail de contacto: dpose@uma.es

Due to its octoploid nature, gene functional analyses in the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) are commonly carried out via gene silencing using self-complementary “hairpin” double-stranded RNA (RNAi) constructs. However, this system is not always as efficient as expected. First, an efficient silencing of the target gene is not always achieved, and second, its effect might not be stable after several clonal propagations of the transgenic lines. Recently, genome editing is becoming an important biotechnological tool for gene functional analysis and crop improvement, in particular since the development of the CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-CRISPR associated protein 9) system.

To investigate the functionality of the CRISPR/Cas9 in strawberry, we designed two sgRNAs directed against two regions of the floral homeotic gene *APETALA3* (*AP3*) in order to induce a deletion of around 200 nt. A vector containing both sgRNAs and Cas9 was used to transform leaf disks of *F.* × *ananassa* cv. Camarosa. Several independent stable transgenic lines displayed defects in stamen and fruit development, partially phenocopying that of the Arabidopsis *ap3* mutants. Molecular analysis of the targeted *AP3* locus indicated differences in gene editing among different transgenic lines and suggests mutations in all the possible *AP3* alleles. Phenotypic analyses indicate that impaired fruit development might be caused by the lack of proper development of the anthers due to the CRISPR/Cas9 induced mutation in *AP3*.

In summary, we show that the CRISPR/Cas9 system is a functional tool to perform genome editing in the octoploid *F.* × *ananassa*. We propose this system as an alternative to the traditional RNAi strategy to stably mutagenize a particular gene of interest for functional analyses in this species.

S3-O6

Transformation of *Quercus suber* somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein

Vanesa CANO⁽¹⁾, Elena CORREDOIRA⁽¹⁾, Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, José Luis COUSELO^(2,4), Antonio BALLESTER⁽¹⁾, Elena VARAS⁽⁴⁾, Mariano TORIBIO⁽³⁾, M^a del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾

¹ IIAG-CSIC, Avda Vigo s/n, Apartado 122, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña, Spain.

² Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Universidad de Vigo, Campus Universitario, s/n, 36310 Vigo, Pontevedra, Spain.

³ IMIDRA, Finca “El Encín”, Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

⁴ EFA, Subida a la Robleda, s/n, 36153 Pontevedra, Spain.

E-mail of contact: vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es

Cork oak is a widely distributed tree species in the Mediterranean ecosystem. The species is economically important as it provides cork, a renewable product that is widely used in the wine industry. In the last few decades, *Quercus* populations have been increasingly affected by the pathogen *Phytophthora cinnamomi*, one of the main causes of the syndrome denominated oak decline.

As genes directly related to resistance have not yet been isolated, genetic transformation techniques are used to overexpress pathogenesis-related (PR) proteins to produce individuals that are tolerant to oak decline. PR proteins comprise a group of diverse proteins that are accumulated in response to pathogen attack, abiotic stress and systemic acquired resistance. In European chestnut, a 23-kD thaumatin-like protein (*CsTLL1*), belonging to the PR5 family, displays *in vitro* antifungal properties (García-Casado et al. 2000). The objective was to produce cork oak somatic embryos (SEs) that overexpress the chestnut thaumatin-like protein (*CsTLL1*).

Small clumps of 2-3 SEs at globular and/or torpedo stages, derived from three different cork oak embryogenic lines (ALM6, ALM80 and TGR3), were used as target explants. SEs were co-cultured for 5 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harbouring the pK7WG2D-*CsTLL1* binary vector. SEs were then cultured on selective medium containing kanamycin (125 mg/l) and carbenicillin (300 mg/l). After 14 weeks on the selective medium, transformation efficiency was determined on the basis of the fluorescence of surviving explants. Transformation efficiency was clearly genotype dependent, as TGR3 yielded higher transformation rates (17%) than ALM80 (4.5%) and ALM6 (2%). The presence of transgenes was verified by PCR, and expression of the *CsTLL1* gene was confirmed by qPCR. Maturation and germination of transformed somatic embryos yielded transgenic plants. No phenotypic differences were found relative to control plants, suggesting a lack of any cytotoxic effects of the green fluorescent protein (GFP) used as a marker for gene expression.

References:

García-Casado et al. (2000) *Physiol Plant* 110:172-180.

Acknowledgements:

Special thanks to Dr. I. Allona for providing the *CsTLL1* gene.

Funding:

This work was supported by MINECO (AGL2013-47400-C4-3-R, AGL2016-76143-C4-4-R).

Efecto del aporte de sacarosa sobre el crecimiento y el estado fisiológico de brotes de especies leñosas cultivadas *in vitro*

Diego GAGO MESEJO⁽¹⁾, Anxela ALDREY VILLAR⁽²⁾,
Beatriz CUENCA VALERA⁽³⁾, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ⁽²⁾,
Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA⁽¹⁾, Nieves VIDAL GONZÁLEZ⁽²⁾

¹ Departamento de Biología Animal, Biol. Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña, España.

² Departamento de Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda de Vigo s/n. 15780 Santiago de Compostela, España.

³ TRAGSA. Vivero de Maceda. Ctra. Maceda-Valdrey km 2. 32700 Maceda, Ourense, España.

E-mail de contacto: diego.mesejo@udc.es

En el cultivo *in vitro* convencional, de carácter fotomixotrófico, los explantos crecen en un medio rico en sacarosa, normalmente con agar como soporte, y se comportan como parcialmente heterótrofos. En cambio, en el cultivo *in vitro* en condiciones fotoautotróficas se elimina el azúcar exógeno, se aumenta la intensidad lumínica y se aporta aire enriquecido con CO₂, con el objetivo de estimular la función fotosintética de los explantos y de que las plantas resultantes se aclimaten con mayor facilidad a las condiciones *ex vitro*.

El objetivo de este trabajo es la evaluación de las respuestas morfológicas y fisiológicas de especies leñosas a la disminución o eliminación de azúcar exógeno del medio de cultivo durante la fase de multiplicación *in vitro*.

Para ello se seleccionaron brotes de tres especies de familias distintas (*Salix viminalis*, familia *Salicaceae*, *Castanea sativa* x *C. crenata*, familia *Fagaceae*, y *Prunus domestica*, familia *Rosaceae*).

Los brotes se cultivaron tanto en jarras con medio semisólido como en biorreactores de inmersión temporal (RITA[®] y plantform[™]) con medio líquido. Para estudiar el efecto de las condiciones fotomixotróficas y fotoautotróficas se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa. Además, en el caso del cultivo en biorreactores, se estudió el efecto de aportar aire enriquecido con CO₂.

En la evaluación de resultados se tuvieron en cuenta tanto características físicas (número y longitud de los brotes, capacidad de multiplicación, tamaño de las hojas, peso fresco y seco...), como bioquímicas, cuantificando los pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b y carotenoides) y algunas enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono y metabolismo de los radicales libres en las plantas.

S4-O8

Cultivo *in vitro* low cost: maximizando la productividad

Verónica CODESIDO SAMPEDRO⁽¹⁾, Salvatore CASANO⁽¹⁾, Stefan MEYER⁽¹⁾

¹ Departamento de hibridación y cultivo. Phytoplant Research S.L. Rabanales 21 - Parque Científico Tecnológico de Córdoba. Calle Astrónoma Cecilia Payne. Edificio Centauro módulo B-1. 14014 Córdoba, España.

E-mail de contacto: v.codesido@phytoplant.es

El cultivo *in vitro* de plantas permite obtener una mayor tasa de reproducción que la clásica propagación mediante esquejes, obteniendo un mayor número de plantas y reduciendo el volumen que ocupan estas en las salas de cultivo, además de facilitar su transporte y exportación debido a sus óptimas condiciones de esterilidad. Uno de los mayores factores limitantes en las empresas para llevar a cabo multiplicación a través de cultivo *in vitro* es el elevado coste que supone no sólo la infraestructura necesaria para llevarlo a cabo sino también el de los reactivos necesarios para ello.

La empresa Phytoplant Research, especializada en el estudio y mejora genética de plantas medicinales, ha desarrollado una tecnología que minimiza los gastos sin comprometer la viabilidad del proceso. Se ha estudiado el éxito de propagación de seis variedades de *Cannabis sativa* L. bajo diferentes condiciones de cultivo, comparando el medio más utilizado Murashige & Skoog (MS) con nuevos medios de cultivo, en presencia de diferentes cantidades de sacarosa, hormonas, vitaminas y presencia/ausencia de agar. Se han utilizado dos tipos de explantos: meristemos apicales y segmentos nodales de 1 cm de longitud. Se ha medido la supervivencia, la longitud del tallo, número de hojas y capacidad de enraizamiento.

Los resultados obtenidos demuestran que es posible realizar cultivo *in vitro* en un solo paso (crecimiento de la parte aérea y enraizamiento simultáneamente) sin necesidad de utilizar sacarosa, agar y/o vitaminas con mejores tasas de éxito que utilizando el medio MS+vitaminas.

Comunicaciones
poster

Poster
communications

Sesión I

**Totipotencia,
organogénesis y
embriogénesis**

Session I

**Totipotency,
organogenesis and
embryogenesis**

Activation of autophagy and cystein proteases related to cell death during microspore embryogenesis induction in *Hordeum vulgare*

Ivett BÁRÁNY⁽¹⁾, María-Teresa SOLÍS⁽¹⁾, Eduardo BERENGUER⁽¹⁾, Yolanda PÉREZ-PÉREZ⁽¹⁾, Estrella SANTAMARÍA⁽²⁾, Isabel DÍAZ⁽²⁾, María C. RISUEÑO⁽¹⁾, Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

¹ Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

² Center of Plant Biotechnology and Genomics, CBGP, UPM-INIA; Montegancedo, Spain

E-mail of contact: testillano@cib.csic.es

Autophagy is a degradation pathway that recycles cell materials upon stress conditions or during specific developmental processes. Together with a survival role, autophagy can also play critical roles as cell death initiator and/or executioner. Papain-like C1A Cys-proteases or cathepsins are the most abundant enzymes with proteolytic activity in plants, with a prominent role in plant senescence and PCD events.

The microspore, at the responsive developmental stage of vacuolated microspore, can be reprogrammed *in vitro* by stress treatments, becoming a totipotent cell and producing doubled-haploid embryos and plants, very useful in plant breeding, *via* microspore embryogenesis. The efficiency of the process is limited by the occurrence of cell death after the inductive stress.

In this study we have analyzed the activation and possible involvement of cathepsins and autophagy in cell death occurrence during stress-induced microspore embryogenesis of *Hordeum vulgare* (barley). In isolated microspore cultures, application of a cold stress treatment induced microspore embryogenesis, and also produced high levels of cell death and ROS production. Enzymatic activity assays revealed, after the inductive stress, increased activities of several cystein proteases like cathepsins L, B, H and caspase 3-like proteases, as well as up-regulation of several autophagy (*Atgs*) and cathepsin genes. Concomitantly, autophagosomes, revealed by MDCV, also increased. Treatments with ROS scavengers, and with inhibitors of autophagy, caspase-3-like and cathepsin proteases reduced cell death levels and increased embryogenesis induction rate in microspore cultures. Taken together, the results indicate that autophagy is activated in stress-treated microspores suggesting autophagy plays a role in cell death at early stages of stress-induced microspore embryogenesis.

Funding:

Work supported by project (AGL2014-52028-R) funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

S1-P2**The inhibitor of histone H3K9 methylation, BIX-01294, promotes stress-induced microspore totipotency and enhances *in vitro* embryogenesis initiation**

Eduardo BERENGUER⁽¹⁾, Ivett BÁRÁNY⁽¹⁾, María-Teresa SOLÍS⁽¹⁾,
Yolanda PÉREZ-PÉREZ⁽¹⁾, María C. RISUEÑO⁽¹⁾, Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

¹ Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

E-mail of contact: testillano@cib.csic.es

Plant cells are characterized by their high plasticity and capacity to become totipotent and pluripotent cells that can initiate embryogenesis and organogenesis in response to external stimuli. Stress-induced microspore embryogenesis is a process of cell reprogramming, totipotency acquisition and embryogenesis initiation, used in plant breeding for rapid production of doubled-haploids, but their regulating mechanisms are still largely unknown. Increasing evidence has revealed epigenetic reprogramming during microspore embryogenesis, through DNA methylation, but less is known about the involvement of histone modifications.

In this study, we have analyzed the dynamics and possible role of histone H3K9 methylation, a major repressive modification, as well as the effects on microspore embryogenesis initiation of BIX-01294, an inhibitor of histone methylation, tested for the first time in plants, in *Brassica napus* and *Hordeum vulgare*.

Results revealed that microspore reprogramming and initiation of embryogenesis involved low H3K9 methylation. With the progression of embryogenesis, methylation of H3K9 increased, correlating with gene expression profiles of the histone methyl transferase *BnHKTM SUVR4-like* and the histone demethylase *BnLSD1-like* (writer and eraser enzymes of H3K9me2). At early stages, BIX-01294 promoted cell reprogramming, totipotency and embryogenesis induction, while diminished bulk H3K9 methylation, decreased DNA methylation and reduced heterochromatin masses. Findings open new possibilities to enhance microspore embryogenesis efficiency in recalcitrant species through pharmacological modulation of histone methylation by using BIX-01294.

References:

Berenguer E, Bárány I, Solís MT, Pérez-Pérez Y, Risueño MC, Testillano PS (2017) Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes microspore totipotency and enhances embryogenesis induction. *Frontiers Plant Sci. In press*

Funding:

Work supported by project (AGL2014-52028-R) funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

Efecto de la reducción de hormonas en el medio de cultivo de microsporas de berenjena

Carolina CAMACHO FERNÁNDEZ⁽¹⁾, Alba RIVAS I SENDRA⁽¹⁾,
Rosa PORCEL ROLDÁN⁽¹⁾, Jose María SEGUÍ SIMARRO⁽¹⁾

¹ Grupo de Biología Celular - Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain.

E-mail de contacto: carol.camacho@upv.es

Los reguladores de crecimiento juegan un papel fundamental en las diversas formas de cultivo *in vitro*, incluyendo el cultivo de microsporas para la obtención de embriones haploides o dobles haploides a partir de los precursores del polen maduro. Sin embargo, el cultivo de microsporas en especies consideradas como modelo para este proceso no requiere de fitohormonas exógenas, mientras que las especies recalcitrantes aún necesitan este aporte en mayor o menor medida. Las microsporas de berenjena se han cultivado desde el inicio en presencia de auxinas (ácido naftalenacético) y citoquininas (6-benzilamino-purina). Con este medio de cultivo se obtienen numerosos callos, pero la embriogénesis que se consigue inducir se detiene en la transición de embrión globular a corazón.

Estudios anteriores en nuestro grupo han demostrado que la disminución global de la concentración de fitohormonas no solo no disminuye la eficiencia sino que la aumenta (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014), lo cual parece indicar que se ha estado trabajando en unas concentraciones demasiado elevadas para lo que estas estructuras necesitan. En este trabajo se disminuyen los reguladores del crecimiento a distintos tiempos, con el objetivo de eliminar señales externas en el momento de la transición embrión globular a corazón para evitar que se induzca una desdiferenciación de las células que forman la estructura. Partiendo de la base de que a través del balance entre citoquininas y auxinas se puede dirigir la regeneración hacia callos, raíces o yemas, estudiar el balance auxina/citoquinina endógeno y el efecto de su alteración puede llevarnos a encontrar la combinación más favorable para la embriogénesis de microsporas.

Referencias:

Corral-Martínez, P. y Seguí-Simarro, J.M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica* 195, 369-382.

S1-P4

Modifications of pectin esterification and AGPs distribution patterns suggest the remodeling of cell wall during somatic embryogenesis initiation and progression in *Quercus suber*

Yolanda PÉREZ-PÉREZ⁽¹⁾, Elena CARNEROS, Ivett BÁRÁNY⁽¹⁾, Beatriz PINTOS⁽²⁾, Aránzazu GÓMEZ-GARAY⁽²⁾, María C. RISUEÑO⁽¹⁾, Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

¹ Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

² Dept. Plant Biology I, Plant Physiology, Fac. Biology, Complutense University of Madrid, UCM, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

E-mail of contact: testillano@cib.csic.es

Modifications in cell wall components and pectin residues have been reported as being crucial for initiating cell responses in relation to cell fate and development. Recent reports have indicated that changes in cell wall mechanics controlled by the esterification/de-esterification status of pectins, mediated by pectin methyl esterases (PME) and pectin methyl esterase inhibitors (PMEI) underlie organogenesis initiation, early embryo growth and embryogenesis progression. Arabinogalactan proteins (AGPs) are highly glycosylated hydroxyproline-rich proteins that are present in cell walls, plasma membranes and extracellular secretions and play a key role in several plant developmental processes.

In this study, we have investigated, in *Quercus suber*, if the induction of somatic embryogenesis and embryo differentiation involve changes in pectin esterification and AGP levels and distribution, which would suggest the cell wall remodeling during the process. Immuno-dot-blot assays, immunofluorescence and confocal analysis were performed at specific developmental stages of SE, by using a battery of monoclonal antibodies to specific epitopes of AGPs and pectin residues, high- and low-methylesterified (LM6, LM2, LM19, LM20, JIM7, JIM5).

The results allowed the in situ identification of the distribution patterns of AGPs and pectin esterification/de-esterification during somatic embryogenesis initiation and progression in *Quercus suber*. Early embryo cells and embryogenic cell masses showed high levels of esterified pectins and AGPs. At advanced stages of embryo differentiation, in heart, torpedo and cotyledonary embryos, the differentiating cells, like epidermis, exhibited walls rich in de-esterified pectins. These findings may indicate the cell wall remodeling, associated with cell proliferation and differentiation, during this *in vitro* embryogenesis process in a woody species, in which information on cellular processes underlying SE is still scarce.

References:

Solis MT, Berenguer E, Risueño MC, Testillano PS [2016]. BnPME is progressively induced after microspore reprogramming to embryogenesis, correlating with pectin de-esterification and cell differentiation in *Brassica napus*. BMC Plant Biology 16, 176.

Funding:

Work supported by project (AGL2014-52028-R) funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

El estrés térmico favorece el proceso embriogénico en *Pinus* spp

Ander CASTANDER⁽¹⁾, Itziar Aurora MONTALBÁN⁽¹⁾, Paloma MONCALEÁN⁽¹⁾

¹ Dpto. de Producción Vegetal, NEIKER-TECNALIA, Campus Agroalimentario de Arkaute apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz, España.

E-mail de contacto: pmoncalean@neiker.eus

La embriogénesis somática, además de ser una herramienta con un gran potencial para la producción de planta élite, resulta un sistema experimental de gran valor para el estudio de diversos procesos fisiológicos. Sin embargo, uno de los factores que limita su utilización es que encontramos especies y/o genotipos recalcitrantes. A este respecto, se ha demostrado que diferentes tipos de estrés físico-químico promueven tanto la iniciación de tejido embriogénico como la formación de embriones somáticos (Feher et al. 2003). En estudios previos mostramos que ligeras modificaciones sobre la temperatura y la concentración de agar durante la etapa de iniciación, generaban diferencias significativas tanto en esa etapa como en las de proliferación y maduración en *Pinus radiata* (García-Mendiguren et al. 2016) y *Pinus halepensis* (Pereira et al. 2016). Por otro lado, los cambios en las condiciones ambientales durante las primeras etapas del proceso embriogénico generan cambios epigenéticos (Yakovlev et al. 2016) que pueden resultar en plantas somáticas con distinta capacidad de adaptación a condiciones de estrés; a este respecto, experimentos recientes en nuestro laboratorio han mostrado diferencias en la tolerancia al estrés hídrico en plantas somáticas de *P. radiata* generadas bajo diferentes condiciones de disponibilidad de agua durante la etapa de iniciación (Montalbán et al. 2015). Con el objetivo de profundizar en el efecto de las temperaturas extremas en el proceso embriogénico, y de corroborar la hipótesis de que podemos modular la tolerancia al estrés hídrico, se aplicaron los siguientes tratamientos durante la iniciación de tejido embriogénico: 30°C, 40°C y 50 °C durante tiempos decrecientes. Los resultados obtenidos corroboran las hipótesis planteadas.

Referencias:

- García-Mendiguren et al. 2016. *Trees-Struct Funct* 30:949-958.
Feher et al. 2003. *Plant Cell Tiss Org* 74:385-402.
Montalbán et al. 2015. *In* Park Y.S., Bonga J.M. (Eds.).
<http://www.iufro.org/science/divisions/division-2/20000/20900/20902/publications/>
Pereira et al. 2016. *J. For. Res* 21:143-150.
Yakovlev et al. 2016. *Planta* 243:1237-1249.

S1-P6**Inducción de androgénesis en *Cannabis sativa* L.**

Alberto GALÁN ÁVILA⁽¹⁾, Jose María SEGUÍ SIMARRO⁽¹⁾

¹ Grupo de Biología Celular - Instituto Universitario para la Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camí de Vera, s/n, 46022 Valencia, Spain.

E-mail de contacto: algaav@upvnet.upv.es

Algunas técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* permiten acelerar el proceso de obtención de líneas puras mediante la producción de plantas dobles haploides, reduciendo considerablemente el tiempo y los recursos empleados tradicionalmente. Una de estas técnicas es la embriogénesis de microsporas, por la cual la microspora se desvía de su ruta gametofítica original y se reprograma hacia un desarrollo embriogénico. A pesar del creciente interés económico generado por la especie *Cannabis sativa* L. debido a su utilidad industrial y farmacológica, no se ha conseguido desarrollar hasta la fecha un protocolo de inducción androgénica con el que generar individuos dobles haploides que puedan emplearse en programas de mejora para la obtención de híbridos comerciales. En nuestro laboratorio, hemos conseguido inducir por primera vez la embriogénesis de microsporas en esta especie. Para ello, tal y como se ha estudiado en otras especies recalcitrantes a la androgénesis, es necesario, en primer lugar, aplicar un tratamiento de estrés sobre las flores. En nuestro caso, la aplicación de frío sobre las flores estaminadas de cannabis promueve el desarrollo esporofítico de las microsporas. Además, aplicar el frío sobre las yemas en lugar de sobre las microsporas directamente, mejora significativamente la viabilidad de las mismas. Tras el pretratamiento de inducción sobre las flores y el establecimiento del cultivo de microsporas, éstas pueden seguir diferentes rutas de desarrollo. Además de la muerte, una de estas rutas es su desarrollo natural o gametofítico. Otras microsporas/granos de polen, pueden sufrir un proceso de callogénesis derivado de la microspora o del grano de polen. Por último, las microsporas/granos de polen también pueden desviarse hacia una ruta de desarrollo embriogénico. Aunque la frecuencia es todavía muy baja, esta es la primera vez que se consigue inducir el cambio de programa de desarrollo en esta especie, extremadamente recalcitrante a la inducción de androgénesis.

Inducción de embriogénesis secundaria en embrión somático inmaduro y maduro de *Pinus pinea* L.

Nuria GONZÁLEZ-CABRERO⁽¹⁾, Mar RUIZ-GALEA⁽¹⁾, Mariano TORIBIO⁽¹⁾,
Cristina CELESTINO⁽¹⁾

¹ IMIDRA, Research Institute of Madrid for Food, Agriculture and Rural Development, Finca “El Encín”, Apdo. 127, 28800 Alcalá de Henares, Spain.

E-mail de contacto: nuriagc15@gmail.com

La embriogénesis somática en coníferas es un proceso por el cual se desarrollan estructuras bipolares similares a los embriones cigóticos en las primeras etapas del desarrollo. Este proceso de regeneración comienza con la formación de masas de embriones-suspensores que extruyen a través del micropilo del megagametofito y se multiplican por poliembrionía de partición de forma continua. Un fenómeno generalmente observado en pinos, es la pérdida de capacidad para producir embriones somáticos maduros después de que la línea embriogénica ha sido subcultivada durante varios meses. Esta pérdida de potencial de maduración se ha asociado con cambios en la morfología de los embriones somáticos iniciales y en la composición/organización celular del cultivo. La inducción de embriogénesis secundaria (ES) en embrión somático maduro podría ser un sistema para reestablecer o aumentar el potencial embriogénico en aquellas líneas que la han perdido con el tiempo en cultivo.

Se trata de determinar las condiciones necesarias para la inducción de ES en embriones somáticos de *P. pinea*, aislados en distintos estados del desarrollo; y la posible reactivación de la capacidad para producir embriones con morfología normal en líneas embriogénicas cultivadas durante varios años. Se han evaluado diferentes medios de cultivo, añadiendo distintos PGRs (2,4-D, BA, Picloram, Brasinólido, CPPU) y suplementos de vitaminas (biotina, ácido fólico, tiamina, nicotínico, piridoxina) para promover la iniciación. Los embriones cotiledonares no fueron susceptibles a la inducción. En embriones precotiledonares, las masas embrionarias procedentes del suspensor crecieron más pero menos diferenciadas que las procedentes de la cabeza embrionaria. Se inició SE por gemación directa sobre el meristemo apical cuando el embrión inicial se cultivó en medio con CPPU. El tejido embriogénico generado en la cabeza embrionaria se multiplicó dando masas de embrión-suspensor con el potencial embriogénico similar a las procedentes de los cultivos envejecidos.

S1-P8

Inducción de embriogénesis somática y maduración *in vitro* de ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes)

Alejandro IBARRA LÓPEZ⁽¹⁾, Héctor LOZOYA SALDAÑA⁽³⁾,
Emilio OLIVARES SÁENZ⁽²⁾, José E. TREVIÑO RAMÍREZ⁽²⁾,
Rigoberto E. VÁZQUEZ ALVARADO⁽²⁾, M.^a del Carmen OJEDA ZACARÍAS⁽¹⁾

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Unidad Marín, Universidad Autónoma de Nuevo León, Carr. Zuazua-Marín km. 17.5, 66700, Marín, N. L., México.

² Facultad de Agronomía, Campus Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Francisco Villa s/n, Col. Ex Hacienda "El Canadá", 66050, Gral. Escobedo, N. L., México.

³ Academia de Fisiología Vegetal, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco km. 38.5, 56230, Chapingo, Edo. de México, México.

E-mail de contacto: maria.ojedazc@uanl.edu.mx

La regeneración de plantas por embriogénesis somática, es la vía más adecuada para la micropropagación clonal de especies forestales. El ébano (*Ebenopsis ebano* [Berland.] Barneby & J.W. Grimes), es una especie nativa del sureste de Texas y noreste de México, de la cual su madera se utiliza para la fabricación de muebles; su propagación se realiza por semilla, pero requiere de escarificación. Actualmente, no existe referencia de su empleo en embriogénesis *in vitro*, condición que la hace una especie atractiva para su regeneración. El objetivo de esta investigación fue inducir la embriogénesis somática en ébano, a partir de semillas inmaduras en diferentes concentraciones de auxina, tipo de medio y condiciones de incubación; y posterior maduración de embriones somáticos. Fue utilizado medio MS adicionado con 2,4-D (0.0-6.79 μM más 2.32 μM de kinetina y 10% de agua de coco [AC]), además de un tratamiento con 10% AC. Los tratamientos de inducción fueron semisólidos y líquidos e incubados en fotoperiodo y oscuridad. Los medios líquidos se colocaron en un agitador orbital a 80 rpm. En estas condiciones, los tratamientos se evaluaron ocho semanas, contabilizando el porcentaje de callo embriogénico en los explantes. De acuerdo a los resultados, se demostró que los explantes tuvieron mayor inducción de embriogénesis en los tratamientos con 2.26 y 4.53 μM de 2,4-D, en medio semisólido y oscuridad. La formación de masas embriogénicas comenzó en el embrión cigótico inmaduro y continuo hasta los cotiledones. Posteriormente, las masas embriogénicas se colocaron en los tratamientos de maduración, utilizando medio MS semisólido, suplementado con sacarosa (1-4%), ABA (1.89-7.57 μM) o PEG 400 (3.75-7.5%), registrando el número de embriones en diferentes fases, después de ocho semanas. En esta etapa, sólo se presentó diferencia significativa en las fases corazón y torpedo, destacando los tratamientos con 7.5% PEG y 2% de sacarosa, respectivamente.

Inhibidores de la giberelina afectan positivamente al enraizamiento adventicio de *Pistacia vera* L.

Juan A. MARÍN⁽¹⁾, E. GARCÍA⁽¹⁾, P. ANDREU⁽¹⁾, P. LORENTE⁽¹⁾, A. ARBELOA⁽¹⁾

¹ Departamento de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza, Spain.

E-mail de contacto: jmarin@eead.csic.es

El paclobutrazol (PBZ) es un triazol que inhibe la síntesis de la giberelina bloqueando el citocromo P450, que a su vez está involucrado en diferentes reacciones de la biosíntesis de distintos reguladores de crecimiento (GA, ABA y citoquininas). Este efecto inhibitor de la síntesis de GA parece ser responsable del efecto promotor del enraizamiento que mostramos aquí. Se sabe que las giberelinas reducen y limitan el desarrollo de los primordios de raíz en las fases iniciales.

En este trabajo queremos profundizar en este efecto promotor del enraizamiento en una especie recalcitrante al enraizamiento *in vitro* como *Pistacia vera*.

El material vegetal utilizado fue la selección de pistacho AD15 que ha sido introducido *in vitro* y multiplicado adecuadamente anteriormente. Brotes de una longitud igual o superior a los 20 mm a los que se les quitaban las hojas basales se colocaron en medios de enraizamiento con IBA a los que se añadió PBZ a diferentes concentraciones. El mismo medio sin PBZ sirvió de control.

Los resultados preliminares muestran que el aumento del porcentaje de enraizamiento de la selección AD15 (*P. vera*) al añadir PBZ al medio de enraizamiento fue muy elevado, pasando de un escaso 6.7% al 83.3%. Además el enraizamiento fue sincrónico y de igual manera se pasó de una raíz por brote a numerosas raíces que rodeaban la base del brote.

Agradecimientos:

A R. López por su ayuda técnica.

Financiado por:

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).

S1-P10**Regeneración de plantas, vía embriogénesis somática, a partir de material adulto de olivo silvestre**

Isabel NARVÁEZ⁽¹⁾, Carmen MARTÍN⁽²⁾, Jose Ángel MERCADO⁽¹⁾,
Rafael JIMENEZ-DÍAZ⁽³⁾, Fernando PLIEGO-ALFARO⁽¹⁾

¹ Dpto. de Biología Vegetal, IHSM “La Mayora”, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España.

² Dpto. de Biotecnología-Biología Vegetal, ETS Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, España.

³ Dpto. de Agronomía, (ETSIAM), UCO/IAS (CSIC), Avda. Menéndez Pidal, s/n, 14004 Córdoba, España.

E-mail de contacto: narvaez@uma.es

La embriogénesis somática es una herramienta poderosa para la clonación de genotipos de interés. En algunas especies como el olivo, esta técnica se ve limitada por las dificultades que presenta la regeneración a partir de material adulto. En este trabajo, se ha inducido embriogénesis somática a partir de material adulto de *Olea europaea* var. *sylvestris* siguiendo el protocolo desarrollado por Mazri et al. (Scient. Hort. 159: 88-95, 2013) para el cultivar de olivo Dahbia. Se emplearon 4 genotipos con distinto nivel de resistencia al patógeno fúngico *Verticillium dahliae*: AC18, StopVert and Outvert (genotipos resistentes) y AC15 (genotipo susceptible) (Jiménez-Díaz, IAS-CSIC, Córdoba, comunicación personal). Inicialmente, los explantos se cultivaron en oscuridad en medio líquido de inducción conteniendo la formulación mineral MS con los macroelementos a la mitad, y un suplemento de 30 μ M TDZ-0.5 μ M NAA durante 4 días, a 80 rpm; posteriormente, fueron transferidos al mismo medio sin reguladores del crecimiento. A las 8 semanas, el callo que proliferó se cultivó en medio de expresión ECO suplementado con 0.25 μ M IBA, 0.5 μ M 2iP y 0.44 μ M BA, durante varios subcultivos. Sólo los explantos de yema apical del genotipo Stopvert formaron callo embriogénico con una frecuencia del 5%. Tras la multiplicación de este callo, una parte del mismo se transfirió a medio de maduración ECO con membranas de acetato de celulosa para la maduración de embriones. Los embriones maduros mostraron un porcentaje de germinación del 35%, lo que ha permitido la recuperación de plantas. La estabilidad genética del material obtenido se analizó mediante marcadores microsatélites. Se compararon plantas regeneradas a partir de embriones somáticos con el callo embriogénico del que procedían, plantas iniciadas a partir de yemas laterales y mantenidas *in vitro* mediante proliferación de axilares y la planta donante.

Financiado por:

Proyecto AGR-7992 (P11-Junta de Andalucía).

Propagación *in vitro* de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivar “Merlot”

M.^a del Carmen OJEDA ZACARÍAS⁽¹⁾, Jaime M. CAVAZOS GALINDO⁽¹⁾,
José A. SANTOS HALISCAK⁽¹⁾, Virgilio MOJICA MARIN⁽²⁾,
Gilberto RODRÍGUEZ PÉREZ⁽³⁾

¹ Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Unidad Marín, Universidad Autónoma de Nuevo León, Carr. Zuazua-Marín km. 17.5, 66700, Marín, N. L., México.

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Veterinaria s/n, Circuito Universitario, Col. Valle del Sur, 34120, Durango, México.

³ Instituto Tecnológico de Roque, Carr. Celaya-Juventino Rosas km. 8, 38110, Celaya, Guanajuato, México.

E-mail de contacto: maria.ojedazc@uanl.edu.mx

La micropropagación vegetal es una técnica aplicada con éxito en varios países del mundo, y ha sido utilizada extensivamente para la multiplicación de numerosas especies, logrando desplazar sistemas de propagación tradicional de numerosas especies de importancia económica. La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo de importancia económica a nivel mundial, esto resulta de gran interés para cuidar la calidad genética de los árboles *elite*. Por lo que, el objetivo de esta investigación fue inducir la organogénesis directa en yemas axilares de vid (*Vitis vinifera* L.) del cultivar Merlot. El establecimiento aséptico se inició depositando el material vegetal en una solución de Cloralex[®] al 30% (v/v) durante 15 min, seguido de tres enjuagues con agua esterilizada. Posteriormente, los materiales se colocaron en una solución antioxidante, durante la siembra. La inducción de brotes se inició a partir de yemas axilares en medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de BAP, e incubados en condiciones controladas de fotoperiodo e intensidad lumínica (16 h luz, 8 h oscuridad; 24-27 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y temperatura. Después de 8 semanas se evaluó el número y longitud de brotes. El número de brotes fue de 1.88 cm en promedio, mientras que para la longitud de brotes fue de 2.45 cm. La multiplicación de brotes se realizó en el mismo medio de cultivo MS al 50% de concentración. Las variables evaluadas fueron: número y longitud de brotes, los cuales fueron de 6.37 brotes y 2.72 cm de longitud de brotes después de 10 semanas de la transferencia a este medio. El enraizamiento se evaluó en esta misma etapa y las variables evaluadas fueron: número y longitud de raíces, obteniendo promedios de 4.06 raíces y en longitud de raíces con 3.34 cm. Los resultados obtenidos muestran evidencias para iniciar un protocolo de micropropagación del cultivar estudiado.

S1-P12**La recalcitrancia del género *Capsicum*: el efecto de las auxinas sobre la morfología en el desarrollo de los embriones somáticos de *Capsicum* spp.**

Jacobo PÉREZ-PASTRANA⁽¹⁾, Susana AVILÉS-VIÑAS⁽¹⁾,
Adriana CANTO FLICK⁽¹⁾, Dulce I.G. ÁLVAREZ-LÓPEZ⁽¹⁾,
Ignacio ISLAS-FLORES⁽¹⁾, Nancy SANTANA BUZZY⁽¹⁾

¹ Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), Calle 43 No. 130 x 32 y 34, Chuburná de Hidalgo; CP 97205, Mérida, Yucatán, México.

E-mail de contacto: jacoboperezpastrana@gmail.com

El género *Capsicum* es reconocido como severamente recalcitrante a la regeneración de plantas *in vitro*. La recalcitrancia es un fenómeno que limita a muchas especies vegetales para la regeneración *in vitro* y puede ocurrir en cualquiera de las etapas del proceso. Esta incapacidad es la causa de que las herramientas biotecnológicas no puedan ser aprovechadas en la mejora y la propagación de numerosos cultivos de interés. En *Capsicum* ha sido ampliamente documentada la fallida formación del meristemo apical (SAM) durante el proceso de morfogénesis. Actualmente numerosos autores han obtenido embriones somáticos, directa o indirectamente, utilizando diversos tipos de explantes en diferentes especies de *Capsicum*. Sin embargo, el escenario con respecto a la regeneración de plantas *in vitro* aún es insatisfactorio por la gran cantidad de embriones deformados; a pesar de lo antes mencionado, se ha logrado superar dos factores importantes en el proceso que son el alto índice de embriones somáticos formados por explante y la reproducibilidad del protocolo. El principal inductor auxínico para inducir a la SE es el 2,4-D. Dada la dependencia del protocolo de *Capsicum* por el 2,4-D en el medio de cultivo durante todo el desarrollo de los embriones somáticos, nuestro interés es conocer si las deformaciones están relacionadas con la presencia de esta auxina en el medio de cultivo y si la sustitución por otras auxinas pudiera revertir este efecto sobre la morfología de los embriones somáticos de *Capsicum chinense* y *Capsicum annuum*.

Changes in global DNA methylation during induction of leaf somatic embryogenesis and long-term multiplication of embryogenic cultures of tamarillo

Matilde SANCHES^(1, 2), Eduardo BERENGUER⁽¹⁾, Sandra CORREIA⁽²⁾,
María C. RISUEÑO⁽¹⁾, Jorge CANHOTO⁽²⁾, Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

¹ Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Center, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

² Dep. Life Sciences, Univ.Coimbra and Centre for Functional Ecology. Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

E-mails of contact: testillano@cib.csic.es, jorgecan@ci.uc.pt

Somatic embryogenesis (SE) is a powerful biotechnological tool, with practical applications in agriculture and forestry, such as crop improvement and large-scale production. Moreover, SE has great utility for research of plant development, since it provides a reliable *in vitro* system in which embryogenesis can be studied. However, woody species are frequently recalcitrant to SE, impairing scientific advances and their potential application in agriculture and forestry programmes. SE has been successfully induced in some tree species, *Solanum betaceum* Cav. (Sendt.), the tamarillo tree of the solanaceous family, is among those cases.

At cellular level, the balance between stability and plasticity is accomplished through temporal and spatial control of gene expression, chromatin organization and adequate response to external stimuli, which might induce cell fate changes. Epigenetic mechanisms are hallmarks of the regulation of development and acquisition or loss of competence both *in vivo* and *in vitro* plant systems.

In the present study we analyzed the variations in DNA methylation, one of the most relevant epigenetic marks, in indirect SE *in vitro* system of tamarillo. Both quantification of global DNA methylation levels and immunofluorescence of 5-methyl-deoxy-cytosine (5mdC) were performed in different cell lines and throughout the first stages of somatic embryo development. The results revealed that long-term embryogenic lines exhibited higher multiplication capacity and a loss of embryogenic competence, associated with accumulation of DNA methylation, in comparison with lines subcultured for short time. Non-embryogenic cell masses, even when recently induced showed high methylation levels.

After the induction of the process by stress in auxin-containing medium, tamarillo leaf cells dedifferentiated and showed a global decrease on DNA methylation. After a multiplication period, removal of auxin from the medium lead to the initiation of embryo formation from the embryogenic masses originated. An initial DNA hypomethylation was detected upon auxin removal, especially in groups of cells of the embryogenic masses that showed a typical meristematic-like organization. In contrast, embryo differentiation was accompanied by a progressive increase of DNA methylation levels. These findings suggest that DNA hypomethylation might be essential for triggering cell dedifferentiation and embryogenesis initiation, whereas further embryo differentiation requires hypermethylation, in tamarillo.

Funding:

MC was recipient of a ERASMUS+ fellowship for a 9-mont-stay in CIB-CSIC. Work partially supported by project (AGL2014-52028-R) funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

S1-P15**Post embryonic organogenesis of lateral roots of *Arabidopsis thaliana* involves stereotypic changes in cell fate associated to formative divisions of pluripotent founder cells or their developmental time**

Álvaro SÁNCHEZ-CORRIONERO⁽¹⁾, Rossangela SOZZANI⁽²⁾,
Miguel-Ángel MORENO-RISUEÑO⁽¹⁾

¹ Center for Plant Biotechnology and Genomics (UPM-INIA), Department of Biotechnology and Plant Biology, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

² Department of Plant and Microbial Biology, College of Agriculture and Natural Sciences, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA.

E-mail of contact: alvaro.scorrionero@upm.es

Totipotency and pluripotency acquisition is at the basis of plant regeneration and part of the postembryonic developmental programs allowing plants to continuously form new organs and tissues along their life. Lateral root (LR) formation can be used as a model for investigating adult organogenesis. LR formation begins with reprogramming of a low number of pericycle cells which are specified as LR Founder Cells (LRFCs), and are pluripotent. LRFCs initiate organogenesis through an asymmetric division which uses nuclear migration to generate small and large daughter cells. Daughter cells continue their development to form a regulated but non-stereotypic pattern, characterized by a regular switch on the division plane orientation. The mechanism(s) regulating tissue organization and cell fate specification during LR organogenesis is not well understood.

We have identified and generated specific fluorescent markers to investigate cell fate transitions during the initial stages of LR organogenesis. In addition, we have performed time course experiments with these markers lines. We have identified markers specifically expressed in LRFCs and their daughters, which associate with LRFC specification and precede or preclude peaks in auxin signaling. We have also identified markers associated to changes in the orientation plane division indicating that these divisions are asymmetric although they form a non-stereotypic pattern. We have also found that expression of other is related with the timing of development and not with formative divisions or changes in their orientation plane.

To decipher the programs regulating first stages of LR organogenesis and cell fate specification we have performed Fluorescent Activated Cell Sorting coupled to mRNA sequencing. We are currently following a bioinformatics analysis to define transitions between developmental and investigating how different cell fates can be specified from a single pluripotent cell (i.e. the LRFCs).

Dinámica del calcio durante inducción de embriogénesis en microsporas de *Brassica napus*

Alba RIVAS I SENDRA⁽¹⁾, Jose María SEGUÍ-SIMARRO⁽¹⁾

¹ Grupo de Biología Celular - Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, Valencia.

E-mail de contacto: seguisim@btc.upv.es

El calcio tiene un claro y bien conocido papel como molécula de señalización en muchos y muy diferentes procesos, incluyendo la respuesta al estrés y la activación del programa embriogénico, entre otros. Sin embargo, no hay ninguna evidencia directa sobre su papel en la inducción de embriogénesis en microsporas, un proceso experimental que precisamente combina un cambio de programa de desarrollo hacia la embriogénesis, y la aplicación simultánea de diferentes factores de estrés. En este trabajo utilizó FluoForte, un colorante fluorescente específico de calcio, para evaluar, mediante microscopía confocal, los cambios en los niveles y la distribución subcelular de calcio en microsporas y granos de polen de *B. napus* y berenjena, todavía en la antera, antes de ser inducidos, así como durante la inducción de embriogénesis y las primeras etapas de desarrollo del embrión androgénico.

Durante el desarrollo en la antera, se observó un pico claro de Ca^{2+} citosólico en microsporas vacuoladas de *B. napus* y granos de polen jóvenes, justo las etapas más adecuadas para inducir la embriogénesis. Sin embargo, los niveles observados en berenjena fueron notablemente más bajos. Justo después de la inducción, los niveles de Ca^{2+} aumentaron específicamente en microsporas embriogénicas de *B. napus* a niveles drásticamente más altos que durante el desarrollo en la antera. El aumento se observó en el citosol, pero predominantemente en las vacuolas. Las formas no embriogénicas tales como las estructuras de tipo callo y polen presentaron patrones notablemente diferentes. Después del tratamiento inductivo basado en choque térmico, los niveles de Ca^{2+} disminuyeron progresivamente en todos los casos. Estos resultados revelan una dinámica del calcio única en microsporas de *B. napus* antes de la inducción, así como en células reprogramadas hacia la embriogénesis, estableciendo un vínculo entre los cambios en el nivel y distribución subcelular del Ca^{2+} , y la inducción de embriogénesis.

Referencias:

Rivas-Sendra A, Calabuig-Serna A, Seguí-Simarro JM (2017) Dynamics of Calcium during *In vitro* Microspore Embryogenesis and *In vivo* Microspore Development in *Brassica napus* and *Solanum melongena*. *Frontiers in Plant Science* 8:1177. doi:10.3389/fpls.2017.01177.

S1-P17**Identificación y caracterización de genes implicados en la acetilación de histonas durante la inducción de la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo panadero**

M^a Pilar VALLES BRAU⁽¹⁾, Luís M^a VILLAR MARTIN⁽¹⁾,
Ana M.^a CASTILLO ALONSO⁽¹⁾

¹ Departamento de Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Avda Montañana 1005, 50059 Zaragoza, España.

E-mail de contacto: valles@eead.csic.es

Uno de los mecanismos epigenéticos que actúa sobre la regulación de la expresión génica es la acetilación post-traducciona de histonas. Estas modificaciones modulan la estructura de la cromatina actuando sobre su grado de condensación y determinando la activación o el silenciamiento de una región genómica. Recientemente, en *Brassica napus*, se han asociado los niveles de acetilación de las histonas con la capacidad de reprogramación celular durante la embriogénesis de la microspora, y así mismo se ha determinado que la aplicación de un inhibidor de deacetilasas de histonas aumenta el porcentaje de microsporas que cambian el patrón de desarrollo de polen a desarrollo embriogénico. En este estudio se ha caracterizado la expresión génica de genes implicados en la acetilación de histonas durante el tratamiento de estrés por manitol en cebada, mediante un estudio de transcriptómica. Se ha identificado un conjunto de 13 deacetilasas de histonas y 17 histona acetiltransferasas con expresión diferencial en las primeras fases de la embriogénesis de la microspora, observándose distintos patrones de expresión. Mediante estudios de homología de secuencia con los genes de deacetilasas de histonas que se habían seleccionado en cebada, se pudieron identificar 7 genes en trigo panadero. Los estudios de expresión de estos genes en el cultivar de alta de respuesta androgénica Pavon y el cultivar Caramba de media-baja respuesta, demostraron que durante el tratamiento de estrés por manitol se producía una disminución en la expresión de 6 genes de deacetilasas de histonas, aunque con distinta intensidad y perfil de expresión. Los resultados obtenidos revelan que la estrategia de aplicación de inhibidores de deacetilasas de histonas durante el tratamiento de estrés en la embriogénesis de la microspora en trigo panadero podría ser también efectiva para aumentar la producción de doblehaploides.

Sesión II

**Conservación,
estabilidad y
mejora**

Session II

**Conservation,
stability and
breeding**

A useful tool of breeding in durum wheat: production of doubled haploid lines by microspores culture

Olfa AYED SLAMA⁽¹⁾, Hajer SLIM AMARA⁽²⁾

¹ Department of Agronomy and Plant Biotechnology, Laboratory of Genetics and Cereal Breeding National Agronomic Institute of Tunisia, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Mahrajène, Tunis, Tunisia.

² Department of Agronomy and Plant Biotechnology, Laboratory of Genetics and Cereal Breeding, National Agronomic Institute of Tunisia, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082 Mahrajène, Tunis, Tunisia.

E-mail of contact: olfa.slama@planet.tn/olfayed@yahoo.fr

The production of double haploids through androgenesis is used by breeders to produce homozygous lines in one generation. Isolated microspore culture is a relatively recent method to obtain doubled haploid lines in cereals. However, durum wheat is a recalcitrant species to this technique with low rate of regeneration and a high rate of albino plants. Isolated microspores culture requires the ability to divert microspores from their normal gametophytic development into sporophytic differentiation by a pretreatment which improve green haploid regeneration. In this context, we tested the efficiency of four different pretreatments: 0.3M mannitol for 7 days at 4°C; PEG₄₀₀₀ 1% for 10 days at 4°C; cold pretreatment for 5 weeks and control without pretreatment. The cold treatment for 5 weeks (4°C) is the most efficient pretreatment and was used to test the androgenetic ability by microspore culture method of three Tunisian durum wheat cultivars: Jeneh Khotifa, Razzek, and Khiar. The cultivar “Khlar” showed a good regeneration of green plants with green/albina ratio ≈ 2 (43 green plants and only 20 albina). These results encourage researchers to use the isolated microspores technique in breeding program of durum wheat as it reduces time and cost of the production of perfect homozygous breeding lines obtained in one generation as opposed to the conventional breeding program requiring several cycles of self-pollination.

PS2-19

Conservación *in vitro* de clones de pistacho en condiciones de crecimiento ralentizado

P. LORENTE⁽¹⁾, J.A. MARÍN⁽¹⁾, P. ANDREU⁽¹⁾, E. GARCÍA⁽¹⁾, A. ARBELOA⁽¹⁾

¹ Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avda. Montañana, 1005. 50059 Zaragoza.

E-mail de contacto: arbeloa@eead.csic.es

El desarrollo de protocolos de cultivo *in vitro* para especies del género *Pistacia* ha permitido implantar otras estrategias de propagación y conservación de germoplasma de estas especies. Entre estas estrategias la conservación a medio plazo en condiciones de crecimiento ralentizado permite disminuir los intervalos entre subcultivos de manera que facilite tanto la conservación como la disponibilidad de material en el laboratorio.

Para la conservación y recuperación de distintos clones de pistacho se ha utilizado el protocolo de conservación a baja temperatura y en condiciones de crecimiento ralentizado puesto a punto para una amplia variedad de especies frutales (Arbeloa et al., 2017).

10 clones de pistacho de 4 especies diferentes (*P. vera*, *P. atlantica*, *P. terebinthus* y *P. atlantica x davidiana*) se testaron para su conservación. Los cultivos se mantienen en nevera a 3-4° de temperatura en oscuridad en dos medios de cultivo diferentes, basados en la disminución de sales minerales o contenido en azúcares, durante 7 meses. En este periodo se controló el estado de las plantas cada 4 semanas. La recuperación se realiza en el medio de cultivo de multiplicación, adecuado para cada clon y se evalúa el porcentaje de clones recuperados, así como el tiempo necesario para su recuperación posterior.

La adecuación de este protocolo para el pistacho nos permitirá conservar el material durante largos periodos de tiempo sin necesidad de subcultivo.

Palabras clave: Pistacho, baja temperatura, limitación de nutrientes, oscuridad.

Referencias:

A. Arbeloa, J.A. Marín, P. Andreu, E. García y P. Lorente. 2017. *In vitro* conservation of fruit trees by slow growth storage. Acta Horticulturae, 1155: 101-106.

Agradecimientos:

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Grupo de Excelencia A43 (Gobierno de Aragón).

Efecto de la temperatura y la disponibilidad de agua en la respuesta embriogénica de *Pinus pinaster* Aiton

María CANO⁽¹⁾, Ester SALES⁽²⁾, Álex ALBORCH⁽¹⁾, Marian MORCILLO⁽¹⁾,
Leonardo ORLANDO⁽¹⁾, Isabel MENDOZA-POUDEREUX⁽¹⁾,
Eva CAÑIZARES⁽¹⁾, Francisco DIAZ⁽¹⁾, Juan SEGURA⁽¹⁾, Isabel ARRILLAGA⁽¹⁾

¹ ISIC/ERI BIOTECMED, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés S/N, 46100 Burjassot, Valencia, España.

² Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N, 22071 Huesca, España.

E-mail de contacto: maria.cano@uv.es

La embriogénesis somática es una de las herramientas biotecnológicas más poderosas para la propagación clonal de coníferas. Se ha demostrado que los factores ambientales imperantes durante el desarrollo de los embriones pueden modificar el comportamiento de las plantas obtenidas ante posteriores situaciones de estrés. En este trabajo se han generado plantas de pino marítimo aplicando diversas condiciones de estrés durante las fases de la embriogénesis con el objetivo de mejorar su resiliencia.

Se utilizaron megagametofitos aislados de conos obtenidos por polinización abierta y recogidos a mediados de julio de tres genotipos de *Pinus pinaster* Aiton. Para determinar el efecto de la disponibilidad de agua durante las fases de inducción y proliferación, el medio mLV se suplementó con 3 o 6 g/L Gelrite®. Para estudiar el efecto de la temperatura, los megagametofitos se cultivaron en medio mLV con 3 g/L de Gelrite® y se incubaron a 18, 23 y 28°C en las fases de inducción, proliferación y maduración, siguiendo un diseño factorial completo. Las plantas regeneradas fueron aclimatadas y transferidas al invernadero.

La disminución de la disponibilidad de agua durante las fases de inducción y proliferación incrementó significativamente la respuesta embriogénica y el número de plantas obtenidas (167 vs 32 para 6 y 3 g/L Gelrite®, respectivamente). La temperatura de 18°C inhibió la inducción embriogénica, no observándose diferencias en esta fase ni en la de proliferación entre los cultivos establecidos a 23 y 28°C. No obstante, las líneas inducidas a 28°C produjeron más embriones maduros que las de 23°C. Sin embargo, se confirmó que la temperatura óptima de maduración de los embriones es 23°C.

En la actualidad se están evaluando las respuestas fenotípicas y fisiológicas de las plantas en distintas condiciones de estrés térmico e hídrico.

Financiado por:

Se agradece la financiación del MINECO, la UE (AGL2013-47400-C4-4-R y AGL2016-76143-C4-1-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052) y la Universidad de Valencia (Contrato predoctoral a María Cano, subprograma "Atracció de Talent"). También a TRAGSA (Maceda, Ourense) y la Dirección General de Desarrollo Rural y Política Forestal (MAPAMA) por la recogida del material vegetal.

PS2-21

Evaluation of *Arundo donax* tolerance to Cr, Cd, Ni or Pb in an *in vitro* culture assay

Judith CANO-RUIZ⁽¹⁾, Mari Cruz AMORÓS⁽¹⁾, Mar RUIZ-GALEA⁽¹⁾,
Juan ALONSO⁽¹⁾, M. Carmen LOBO⁽¹⁾, Pedro Vicente MAURI⁽¹⁾

¹ Dpto. Investigación Agroambiental. IMIDRA. Finca “El Encin” A-2, km 38,200. Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

E-mail de contacto: judith.cano@madrid.org

The problem of metal pollution is becoming increasingly serious due to its harmful effects on human health and ecosystem, being necessary remediation strategies to recover polluted soils. In this sense, the use of metal tolerant non-food crops could be used to exploit these sites.

The objective of the study is to evaluate the tolerance of an energy crop, *Arundo donax* to cadmium (Cd), chromium (Cr) nickel (Ni) or lead (Pb) for its potential application in the phytoremediation of polluted soils.

In vitro plants were cultured on semisolid medium MS, optimized for *Arundo donax*, using different metal concentrations, Pb: 1mM, Ni: 0.1 and 0.2 mM; Cr: 0.025mM and 0.05mM and Cd: 1mM. The jars were set in a growing chamber at 25 °C and 16 h of photoperiod during 30 days. The survivals of plants, fresh and dry weight were evaluated as well as the concentration of the metals in aerial part and roots.

The preliminary results showed a significant toxic effect in *Arundo* plants due to the cadmium concentration assayed. In general the higher metal accumulation was observed in roots except in the Cr treatments where no differences were observed between metal concentration in aerial part and roots. In this treatment, a higher dose does not increase metal concentration in plant. In Ni treatments, the concentration in aerial plant and roots was depended on the dose applied. These results show that *Arundo donax* could be a good candidate to be use in phytoremediation of Ni and Pb polluted sites, but further studies are needed to establish the range of tolerance for each metal.

Funding:

Proyects FP-16 RESIDUA and FP16 –ENER (IMIDRA). To the agroenergy research group GA-UPM for the plant material.

Reducción de los costes en el proceso de rescate *in vitro* de embriones inmaduros de *Prunus* spp.

María CASANOVAS⁽¹⁾, Elisabet CLAVERIA⁽²⁾, Sandra FRANQUESA⁽¹⁾,
Carlos R. MENDOZA⁽¹⁾, Cristian FONTICH⁽¹⁾, Celia CANTÍN⁽¹⁾,
Simó ALEGRE⁽¹⁾, Ramón DOLCET-SANJUAN⁽¹⁾

¹ Laboratori Cutliu *in vitro*, IRTA-Fruitcentre, PCiTAL, Lleida, Spain.

² IRTA-Torre Marimón, Caldes de Montbui, Spain.

E-mail de contacto: maria.casanovas@irta.cat

En este estudio se ha mejorado el método de rescate de embriones inmaduros de *Prunus* spp. *in vitro*. Durante dos campañas consecutivas, en los meses de verano de 2014 y 2015, se ha ensayado un nuevo método para el rescate de embriones utilizando un solo medio durante todo el proceso hasta su aclimatación en invernadero. Este medio estaba compuesto por las sales y vitaminas de Woody Plant Medium (WPM), sacarosa, agar y vermiculita. Los embriones (con un tamaño ≥ 5 mm) fueron desinfectados, se les retiró la cubierta y fueron introducidos en tubos con medio. Se dejaron de 2 a 6 meses a 4 C y en oscuridad; después se introdujeron en la cámara de cultivo a 14 C y con un fotoperiodo 16/8h durante 30 días y posteriormente se fijó la temperatura a 24 C, todo ello sin cambiar de medio.

En el control tras la etapa de estratificación, de 4296 embriones introducidos, un 72.6% de los embriones no contaminados habían germinado. En este medio, los embriones ya enraizaron en las cámaras de cultivo y debido a la adición de vermiculita, formaron gran número de raíces secundarias lo que aseguró su buena aclimatación posterior. En la preparación del medio se añadió una tira de papel por debajo del medio para facilitar la extracción de la planta del tubo sin causar daño a sus raíces.

Por tanto, éste es un método muy útil para cuando se tiene una cantidad muy grande de embriones para rescatar, llevándose a cabo la introducción, estratificación, germinación y desarrollo de la planta en un mismo medio de cultivo, minimizando así el volumen de trabajo y los gastos en personal, material de vidrio y medios de cultivo, y permitiendo mantener el material vegetal el tiempo necesario hasta la época adecuada para su aclimatación. La adición de medio líquido, si es necesario, permite mantener las plantas *in vitro* hasta 4 o 6 meses en el mismo recipiente.

S2-P23

Embriogénesis de la microspora de trigo espelta de origen español, centroeuropeo y líneas de trigo panadero x trigo espelta

Ana M^a. CASTILLO ALONSO⁽¹⁾, Sandra ALLUÉ DURANGO⁽¹⁾,
Asún COSTAR CASTÁN⁽¹⁾, Fanny ALVARO SÁNCHEZ⁽²⁾,
M^a Pilar VALLÉS BRAÚ⁽¹⁾

¹ Departamento Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei (CSIC), Avda Montañana 1005, 50.059 Zaragoza, España.

² Area de Cultivos Extensivos, IRTA-Agrónomos, Avda Alcalde Rovira i Roure 191, 25198 Lleida, España.

E-mail de contacto: amcast@eead.csic.es

El trigo espelta se caracteriza por tener un mayor contenido en proteína y una mayor adaptabilidad a condiciones de agricultura sostenible que el trigo panadero. Por eso, es una fuente de variabilidad genética muy valiosa para los programas de mejora de trigo panadero. Además, el trigo espelta de origen español, que constituye un grupo genético diferenciado del centroeuropeo, tiene una harina de excelente calidad para repostería y panificación. El poder disponer de protocolos de obtención de DH de espelta tiene gran interés para los programas de mejora tanto de espelta como de trigo panadero. Sin embargo, existen muy pocos trabajos de producción de DH de espelta. En este estudio se ha evaluado, por primera vez, la respuesta a la embriogénesis de la microspora de 5 accesiones de trigo espelta de origen español, 2 cultivares centroeuropeos y 3 líneas F5 de cruzamientos de trigo panadero x trigo espelta, utilizando el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio para trigo panadero. Se obtuvieron plantas verdes de todos los materiales con la excepción de una línea F5. En general, la mayoría de los materiales presentaron bajos porcentajes de regeneración de plantas y altos porcentajes de albinismo. Se encontraron diferencias significativas para el número de embriones, plantas verdes y plantas albinas entre los diferentes materiales. Las líneas de espelta españolas y 2 de los cruzamientos F5 produjeron mayor número de embriones y plantas verdes que los cultivares centroeuropeos. Estos resultados indican que los materiales de origen español pueden tener una mejor respuesta a la embriogénesis de la microspora que los materiales centroeuropeos.

Ultraestructura celular durante el proceso de criopreservación mediante vitrificación

M. Elena GONZÁLEZ BENITO⁽¹⁾, Carolina KREMER⁽¹⁾, Iván GONZÁLEZ⁽¹⁾,
Carmen MARTÍN⁽¹⁾

¹ Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S.I. Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Avda. Complutense 3, 28040 Madrid, España.

E-mail de contacto: me.gonzalezbenito@upm.es

La criopreservación ofrece una serie de ventajas sobre otros métodos para la conservación a largo plazo del germoplasma de especies de propagación vegetativa. Se han desarrollado diversos procedimientos para una criopreservación exitosa de ápices obtenidos a partir de plantas cultivadas *in vitro*. Varios de esos procedimientos se basan en la utilización de soluciones con una alta concentración de sustancias crioprotectoras (etilenglicol, glicerol, dimetilsulfóxido ...) que entran en estado vítreo al ser enfriadas rápidamente (soluciones para la vitrificación). Son diversos los estudios que han comprobado la vitrificación de dichas soluciones y los tejidos tratados, pero escasos los que estudian los efectos de las soluciones en la ultraestructura celular.

Ápices de *Mentha x piperita* procedentes de plantas cultivadas *in vitro* fueron sometidos al proceso de criopreservación mediante vitrificación-*droplet*. En diversos pasos del procedimiento (control *in vitro*, tras el tratamiento con la solución de carga y tras someter las muestras a la solución de vitrificación PVS2) se retiraron muestras que fueron fijadas y posteriormente observadas mediante microscopía electrónica de transmisión. El resto de los ápices siguieron el protocolo completo con la inclusión del material en nitrógeno líquido y posterior recuperación en medio MS+ 0.5 mg/L 2iP + 0.1 mg/L NAA. Después de seis días de cultivo, se pudo distinguir entre ápices que habían sobrevivido la criopreservación y aquellos que no, recogiendo muestras de ambos tipos para su análisis mediante microscopía electrónica. De acuerdo a las imágenes obtenidas, según avanzaba el proceso de crioprotección se observó una mayor plasmólisis, reducción del volumen vacuolar, mayor densidad del citoplasma y efectos en la estructura mitocondrial. Las células de los ápices que habían sobrevivido la criopreservación no mostraban plasmólisis, pero sí todavía un denso citoplasma. Mediante este procedimiento de criopreservación se obtuvo un 75 % de recuperación de ápices después de la criopreservación.

El análisis de la ultraestructura celular permite distinguir diferencias entre los ápices viables y no viables.

S2-P25**Estabilidad genética y capacidad de regeneración en callos de maíz conservados *in vitro***

Carmen MARTÍN⁽¹⁾, Fatiha BRADAI⁽²⁾, Juan Bautista MARTÍNEZ-LABORDE⁽¹⁾

¹ Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Avda. Complutense, 3. 28040 Madrid, España.

² Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA), 2 rue les frères Ouadek, 16200 Alger, Argelia.

E-mail de contacto: mariacarmen.martin@upm.es

Callos de la línea homocigótica de maíz W64Ao2 se mantuvieron en cultivo *in vitro* durante 30 años en medio MS suplementado con 2 mg/l de 2,4-D. Transfiriéndolos a un medio sin auxinas, Torné *et al.* (1984) consiguieron regenerar plántulas vía organogénesis.

Este material resulta especialmente valioso ya que no es frecuente encontrar cultivos mantenidos en condiciones *in vitro* durante tanto tiempo. Por ese motivo, y tras 30 años de cultivo, se plantea el análisis de la estabilidad y capacidad regenerativa actual de dichos callos.

Para ello se transfirieron a un medio sin auxinas y se observó la formación de estructuras alargadas que sin embargo no resultaron en el desarrollo de plántulas. Se examinaron dichas estructuras, así como los callos a partir de los cuales se habían formado, mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión, comprobando en la mayoría de los casos que esas estructuras eran posiblemente raíces en formación, pero no yemas.

Para el estudio de la estabilidad genética se han llevado a cabo análisis con marcadores moleculares (SSR y RAPDs) comparando los patrones obtenidos en los callos con los de las plántulas obtenidas por germinación de las semillas de la misma línea.

Agradecimientos:

Al Dr. JM Torné por donar el material de partida para este trabajo.

Bibliografía:

Torné JM, Santos MA, Blanco JL (1984) Plant Sci. Letters, 33:317-325.

Assessment of molecular genetic stability during the cryopreservation process of *Pinus pinaster* Aiton embryogenic calli

Isabel MENDOZA-POUDEREUX⁽¹⁾, María CANO⁽¹⁾, María Teresa SOLÍS⁽²⁾,
Francisco ESTEVE⁽¹⁾, Juan SEGURA⁽¹⁾, Pilar S.TESTILLANO⁽²⁾,
Isabel ARRILLAGA⁽¹⁾

¹ ISIC/ERI BiotecMed; Dept Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, C/Vicente Andrés Estellés s/n, Bujassot, 46100 Valencia, España.

² Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, C/ Ramiro de Maeztu 9, Madrid, España.

E-mail de contacto: isabel.mendoza@uv.es

Pinus pinaster Aiton is a coniferous species native to the Southern Europe with a high economic and recreational value. *Somatic embryogenesis* technology may assist in the clonal production of desired lines and safekeeping of rare and valuable germplasm via cryopreservation. However, maintaining the genetic integrity in long-term tissue cultured and cryopreserved plants is important for the correct conservation of plant genetic resources. As an index of epigenetic stability, we determined the DNA-methylation status of *Pinus pinaster* embryogenic calli during and after the cryopreservation process. Global DNA methylation levels were quantified at selected stages of the process by an ELISA-based colorimetric method that estimates 5mC proportion in genomic DNA extracts, following the protocol for plant samples previously described (Testillano et al. 2013, *Physiol Plant*).

Six different *Pinus pinaster* embryogenic lines were used in the analysis. Samples measured for their 5-mdC content were taken both before and after the cryopreservation procedure and along the process at different time points: 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 hours and after recovery from LN. Oxidative stress was estimated at time 0 and after 48 hours. The oxidative stress due to cryopreservation was determined by ROS detection with DHE (dihydroethidium). By using a confocal microscope, this procedure detects superoxide radicals being produced by living cells. A ROS inhibitor (MnCl₂) is being used to downplay background signals.

Preliminary data show that although global DNA methylation remains at similar levels before and after the cryopreservation process, there are significant variations during the process, where embryogenic calli are placed in liquid culture with increasing osmotic pressure every 24 hours, hitting the 5-mdC DNA top levels at 48 hours. The possible correlation between changes in DNA methylation and ROS production will be discussed. Further research is needed in order to learn if the specific genes methylated remain the same prior and after the process.

S2-P27

Red CYTED: Biotecnología para fortalecer programas de mejora de especies de interés socioeconómico

Paloma MONCALEÁN GUILLÉN⁽¹⁾

¹ Dpto. de Producción Vegetal, NEIKER-TECNALIA, Campus Agroalimentario de Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz, España.

E-mail of contact: pmoncalean@neiker.eus

El Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) ha aprobado la financiación de la red BIOALI “Biotecnología para fortalecer programas de mejora de especies de interés socioeconómico”. La red que agrupa 12 grupos de investigación, 3 empresas del sector agroalimentario y un total de 79 investigadores engloba a profesionales interesados en el desarrollo y la aplicación de herramientas cuantitativas, fisiológicas y moleculares para el fitomejoramiento de especies de interés alimenticio. El objetivo general de la red BIOALI (www.bioali.es) será el de contribuir, con la generación e intercambio de conocimiento entre los miembros y su entorno, a la mejora sostenible de la productividad y el valor nutricional de especies alimentarias del género *Musa* spp. y *Theobroma cacao*. Esta mejora se llevará a cabo a través de la exploración de sus genomas, la fortificación de sus productos, el desarrollo de métodos de diagnóstico precoz de sus principales patógenos, mediante técnicas de fenotipado, fisiológicas y metabólicas y la obtención de indicadores de resistencia a los principales estreses bióticos y abióticos derivados del cambio climático. Todo esto, a través de la investigación, la capacitación, el intercambio de información entre grupos multidisciplinarios expertos en diferentes campos, la educación y la sensibilización social, acciones que se llevarán a cabo satisfaciendo las necesidades de las generaciones presentes, sin poner en peligro las de las generaciones futuras. Las especies que se estudiarán dentro de la red proporcionan frutos de elevada importancia nutricional, social y económica para los países iberoamericanos.

Agradecimientos:

A CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) por la financiación de la red temática P116RT0038 (2017-2020).

Regeneración de planta somática a partir de líneas embriogénicas conservadas a -80°C durante más de un año

Itziar Aurora MONTALBÁN⁽¹⁾, Paloma MONCALEÁN⁽¹⁾

¹ Dpto. de Producción Vegetal, NEIKER-TECNALIA, Campus Agroalimentario de Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz, España.

E-mail de contacto: pmoncalean@neiker.eus

La embriogénesis somática permite la generación de un gran número de líneas celulares que pueden usarse para la producción de plantas a escala comercial o como material de experimentación. Sin embargo, la competencia embriogénica, es decir, la habilidad para producir embriones a partir del tejido embriogénico, disminuye con el tiempo que transcurre entre la generación de las masas y la etapa de maduración. Para hacer frente a este problema, las líneas embriogénicas se suelen crioconservar, tradicionalmente a baja temperatura en nitrógeno líquido. Pese a que la crioconservación reduce los costos asociados al mantenimiento de cultivos embriogénicos, la inversión inicial y el mantenimiento pueden resultar extremadamente caros.

En este trabajo se estudió la posibilidad de desarrollar sistemas de almacenamiento de líneas embriogénicas de *Pinus radiata* a -80 °C durante más de un año. Para ello, se evaluaron no sólo las tasas de regeneración de las líneas celulares, sino también las tasas de maduración y germinación de las mismas, comparándolas con los resultados obtenidos previamente a su congelación. Como resultado, presentamos un protocolo que permite la regeneración de las líneas celulares en tasas superiores al 75%. Asimismo, las tasas de maduración y germinación fueron superiores al 80%, asegurándose una producción considerable de embriones somáticos (hasta 1651 embriones somáticos por gramo de tejido embriogénico). El protocolo presentado constituye una buena alternativa a los sistemas tradicionales, reduce considerablemente el coste económico del proceso y garantizando el éxito del proceso de conservación.

S2-P29**Saneamiento y conservación de ajo mediante técnicas de cultivo *in vitro***Leonardo VELASCO⁽¹⁾, Araceli BARCELÓ⁽²⁾, Isabel M.G. PADILLA⁽²⁾¹ Laboratorio de Fitopatología, IFAPA Centro de Málaga, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga.² Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Biotecnología, IFAPA Centro de Málaga, Cortijo de la Cruz, 29140-Málaga.E-mail de contacto: isabelm.gonzalez.padilla@juntadeandalucia.es

El cultivo del ajo tiene un especial interés socio-económico a nivel nacional y en Andalucía en particular. Sin embargo, el sistema habitual de propagación vegetativa del ajo conlleva la infección de las plantas por virus y su difusión, provocando graves pérdidas de producción, sin que exista en el sector una producción propia de bulbos libres de virus. El cultivo *in vitro* permitiría el saneamiento mediante cultivo de meristemos y la obtención de plantas de ajo libres de virus, su micropropagación y la conservación *in vitro* del material saneado. En este sentido, hemos puesto a punto un protocolo de saneamiento y micropropagación de la variedad “Morado de Cuenca” para la empresa 9989 SAT Peregrin (Pulpí, Almería). Igualmente, se ha abordado el saneamiento y conservación del Banco de Germoplasma de Ajo del CNRF (INIA) mantenido en el Centro de Investigación Agroforestal de Albadalejito (CIAF), Cuenca, el cual se encuentra afectado por virosis, de forma que en cada campaña se pierden gran cantidad de entradas. Se ha estudiado la presencia de los virus OYDV, LYSV, GCLV y SCV mediante DAS-ELISA y RT-qPCR en las entradas de Banco constatándose que el 98% de ellas están infectadas por al menos uno de los virus mencionados, siendo frecuente la infección múltiple (>70%). En este trabajo se han introducido *in vitro* 194 entradas del Banco, de las cuales, 40 se encuentran ya libres de virus. Asimismo, se ha desarrollado un protocolo de conservación en frío de las entradas de ajos establecidas *in vitro*. Para ello, se frigoconservaron brotes de distintas entradas durante 9 y 12 meses con distintos fotoperiodos. Tras tres subcultivos, la supervivencia era superior en todas las entradas conservadas durante 9 meses. Por otra parte, se ha observado una respuesta genotipo dependiente a los tratamientos de frigoconservación, obteniéndose un 100% de supervivencia a la salida del frío, tanto a los 9 como a los 12 meses, que disminuía o no a lo largo de los subcultivos sucesivos dependiendo del genotipo. Así, algunas entradas mantenían el 100% de supervivencia tras tres subcultivos mientras que otras solo alcanzaron el 13% en el tratamiento de 12 meses.

Agradecimientos:

A Amalia Cabeza Duarte, técnico de laboratorio contratada INIA, por la realización de la parte experimental, y a D. Juan Morata Gómez, de la empresa 9989 SAT Peregrin.

Financiado por:

Este trabajo ha sido financiado con fondos INIA-FEDER (proyecto RTA2012-00002-C02-01) y a través de una asistencia técnica IFAPA- 9989 SAT Peregrin.

Evaluación del efecto del filtrado crudo del hongo *Rosellinia necatrix* en el crecimiento de brotes y cultivos embriogénicos de olivo

Elena PALOMO-RÍOS⁽¹⁾, Almudena PELÁEZ⁽¹⁾, Sergio CEREZO⁽¹⁾,
Titouh KHAYREDDINE⁽¹⁾, Carlos LÓPEZ-HERRERA⁽²⁾,
José Ángel MERCADO⁽¹⁾, Fernando PLIEGO-ALFARO⁽¹⁾

¹ Dpto. Biología Vegetal, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, IHSM-UMA-CSIC. Campus de Teatinos, 29071 Málaga, España.

² IAS, C.S.I.C, Finca Alameda del Obispo, Córdoba. España.

E-mail de contacto: elepalrio@uma.es

Rosellinia necatrix es un patógeno muy extendido en plantaciones de aguacate del sur de la Península Ibérica, afectando también, ocasionalmente, a plantaciones de olivo. Nuestro grupo está abordando la obtención de variantes somaclonales de olivo y aguacate, que muestren mayor tolerancia a este patógeno. En este trabajo se presentan los resultados en olivo, tras la exposición de cultivos embriogénicos a dosis crecientes de filtrado crudo del hongo. Se utilizó callo embriogénico, obtenido a partir de radícula, cultivado en medio líquido ECO (Pérez-Barranco et al. 2009 PCTOC 97: 243-251) durante 3 semanas en agitación, y posteriormente filtrado (malla de 2 mm) para separar la fracción fina. Esta fracción fue cultivada durante otras 3 semanas en medio ECO líquido conteniendo un 20, 40, 60 u 80% de filtrado crudo de *Rosellinia necatrix*, tras su esterilización en frío. Finalmente, el callo embriogénico fue cultivado en placa en medio ECO sólido para su recuperación. El filtrado del hongo al 20% no afectó al crecimiento del callo embriogénico; sin embargo, a partir del 40% el crecimiento fue inhibido, salvo en algunas placas, donde se observó proliferación de callo tras 2 meses en medio de cultivo sin filtrado. Se han obtenido varias líneas que han sobrevivido tras la exposición al 40, 60 y 80% de filtrado del hongo. Estas líneas están siendo cultivadas de nuevo en presencia de la misma concentración de filtrado del hongo para evaluar su comportamiento. Posteriormente, se abordará la recuperación de plantas. Paralelamente, brotes de olivo regenerados a partir de la línea embriogénica P1 han sido cultivados en medio de multiplicación (Vidoy-Mercado et al. 2012, Acta Hort. 949: 27-30) suplementado con filtrado crudo del hongo (60%), durante varios subcultivos, para evaluar el efecto del filtrado en el crecimiento de los brotes.

Financiado por:

Proyecto AGR-7992 (P11-Junta de Andalucía)

S2-P31**Estrés oxidativo durante la crioconservación de ejes embrionarios de tres especies con diferente tolerancia a la deshidratación: *Phaseolus vulgaris* (ortodoxa), *Arachis hypogaea* (subortodoxa) y *Theobroma cacao* (recalcitrante)**

César PÉREZ^(1,2), Alberto ROURA⁽²⁾, César TAPIA⁽²⁾ y Marcelo TACÁN⁽²⁾

¹ Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, España.

² Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Panamericana sur km 1, Quito, Ecuador.

E-mail de contacto: cesar.perez@upm.es

La crioconservación no es aplicable a un importante número de especies de importancia económica y/o ecológica, probablemente, porque no sobreviven al estrés oxidativo ocasionado por los tratamientos crioprotectores, principalmente la deshidratación.

Como material de estudio, se utilizaron ejes embrionarios de una especie ortodoxa (*Phaseolus vulgaris*), una sub-ortodoxa (*Arachis hypogaea*) y otra altamente recalcitrante (*Theobroma cacao*. En esta especie también se utilizaron embriones somáticos) sometidos a diferentes tratamientos crioprotectores (deshidratación con gel de sílice, en estufa y mediante gota vitrificación) antes de su inmersión en nitrógeno líquido. Tras la crioconservación, se evaluaron factores morfofisiológicos de la germinación, la producción de especies reactivas de oxígeno (O_2^- y H_2O_2), la pérdida de electrolitos y la activación de mecanismos fisiológicos de reducción del estrés oxidativo, como los niveles de ascorbato, GSH y GSSG, de prolina, glutamato y otros catorce aminoácidos.

Se detectó que, en los ejes embrionarios de la especie ortodoxa, los elevados contenidos de prolina son constitutivos y no se desencadena como respuesta al estrés. Por el contrario, en la especie sub-ortodoxa se producen incrementos muy significativos como respuesta a la desecación. Otros aminoácidos, como el glutamato y la asparagina, varían en función de la situación de estrés y del grado de tolerancia y podrían utilizarse como indicadores.

La ruta detoxificadora ascorbato-glutatión jugó un papel relevante tanto durante los tratamientos crioprotectores como durante la descongelación. Esto se evidenció por la baja relación GSH/GSSG en todos los casos estudiados lo cual indicaría una activa eliminación de H_2O_2 (hecho que fue comprobado mediante análisis directo). El radical superóxido se detectó en zonas concretas de las radículas, pero no afectó de forma significativa la supervivencia de los embriones.

En cacao, los procesos oxidativos fueron extremos en todos los casos y tipos de explantos, incluidos los controles, al igual que la pérdida masiva de electrolitos.

Mutantes de patrones de cítricos tolerantes a la salinidad. Evaluación *in vitro* de los cambios en el crecimiento producidos por la sal

Fernando CÓRDOBA⁽¹⁾, Antonio J. LÓPEZ-PÉREZ⁽¹⁾, N. NAVARRO-GARCÍA⁽¹⁾,
José M. GAMBÍN⁽¹⁾, Olaya PÉREZ-TORNERO⁽¹⁾

¹ Equipo de Citricultura, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). C/Mayor s/n 30150 La Alberca, Murcia, España.

E-mail de contacto: olalla.perez@carm.es

La salinidad es uno de los mayores estreses medioambientales que afectan a la producción de plantas de cítricos. El uso combinado de mutagénesis y cultivo de tejidos puede facilitar la selección de líneas de cítricos tolerantes a la salinidad. En el presente estudio se evaluó el efecto del medio salino sobre explantos de líneas mutantes de patrones de cítricos tolerantes a salinidad, obtenidas por irradiación de semillas de *Citrus macrophylla* y selección *in vitro*. Explantos de clones mutantes (MM1A, MM3A, MM1B, MM3B, MM4B y MM5B), junto con explantos de 'Macrophylla' (control), fueron cultivados *in vitro* en medio de proliferación con diferentes concentraciones de NaCl dependiendo del mutante: 0 y 60 mM de NaCl (MM1B, MM3B, MM4B y MM5B); 0 y 80 mM de NaCl (MM1A y MM3A); 0, 60 y 80 mM de NaCl (explantos control de 'Macrophylla'). Se observó un mejor crecimiento de los explantos de los mutantes con respecto a los explantos del control en el medio salino. La productividad de MM1B fue similar en 0 y 60 mM de NaCl. En MM3B y MM4B la productividad en el medio con sal fue solamente un 9% inferior a la del medio con 0 mM de NaCl, sin embargo en MM5B la disminución de la productividad en el medio salino con respecto al medio sin sal fue del 17%, similar al control en estas condiciones. En MM1A y MM3A la productividad disminuyó solo un 10% en el medio salino (80 mM de NaCl) con respecto al medio sin sal, sin embargo en el control esta disminución fue del 27%. El número de hojas dañadas y caídas de los explantos en el medio salino fue inferior al de los explantos del control en MM1B, MM4B y MM5B, pero no se observaron diferencias significativas con el control en MM3B, MM1A o MM3A. Actualmente se está analizando la tolerancia a la salinidad de estos mutantes en condiciones *ex vitro*.

S2-P33**Efecto de la crioconservación y de un precultivo con alta concentración de sacarosa sobre la embriogénesis somática de olivo**Fatiha BRADAÏ⁽¹⁾, Carolina SÁNCHEZ-ROMERO⁽¹⁾¹ Dpto. Biología Vegetal, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, España.

E-mail de contacto: c.sanchez@uma.es

La crioconservación se considera la única técnica que permite la conservación a largo plazo de germoplasma vegetal. Los cultivos embriogénicos constituyen un material de gran interés biotecnológico, ya que permiten la aplicación de herramientas tales como la transformación genética, la variación somaclonal o la selección *in vitro*. Embriones somáticos de olivo han sido crioconservados con éxito, obteniéndose los mejores resultados después un precultivo con alta concentración de sacarosa. En estas condiciones, el 100% de los cultivos fueron recuperados seis semanas después de la descongelación. Sin embargo, el tratamiento con altas concentraciones de sacarosa puede tener efectos adversos sobre la morfogénesis, disminuyendo el potencial regenerativo de los cultivos. En el presente estudio se analizó el efecto de la inclusión de un tratamiento con sacarosa, previo a la crioconservación, sobre el proceso de embriogénesis somática. Para ello, se comparó el comportamiento de cultivos control, no crioconservados, con cultivos procedentes de embriones somáticos crioconservados, con o sin tratamiento previo con sacarosa. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto pequeños cambios en la composición estructural de los cultivos durante la fase de proliferación, así como un aumento de la producción de embriones en estadios avanzados de desarrollo durante la fase de maduración. Aunque no se apreciaron diferencias en las tasas de germinación, valores de potencial de regeneración significativamente más elevados fueron obtenidos a partir de los cultivos crioconservados después de un precultivo con sacarosa. Las plantas obtenidas presentaron un aspecto similar y no mostraron diferencias en ninguno de los parámetros evaluados durante las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

Crecimiento de plantas de alcornoque regeneradas a partir de árboles selectos mediante embriogénesis somática

Cristina CELESTINO MUR⁽¹⁾, Bárbara FERNÁNDEZ GUIJARRO^(1,2),
Inmaculada HERNÁNDEZ SÁNCHEZ⁽¹⁾, Marta BALLESTEROS GUTIÉRREZ⁽²⁾,
Mar RUIZ GALEA⁽¹⁾, Luis CARDO MAYA⁽²⁾, Mariano TORIBIO IGLESIAS⁽¹⁾

¹ Departamento de Investigación Agroambiental, IMIDRA, Finca El Encín, Apdo. 127, Alcalá de Henares, Madrid, España.

² I.E.S. Centro de Capacitación Agraria, Villaviciosa de Odón, Madrid, España.

E-mail de contacto: mariano.toribio@madrid.org

La clonación es una potente herramienta de mejora genética, ya que permite la captura de todo el potencial genético de los individuos seleccionados y genera poblaciones uniformes. La biotecnología de regeneración de plantas mediante embriogénesis somática (ES) está permitiendo implementar la silvicultura multivarietal en muchas especies forestales de interés económico. Para alcornoque (*Quercus suber* L.) hemos desarrollado un protocolo de regeneración de árboles adultos vía ES que permite clonar cualquier genotipo. En 2003 establecimos una parcela de ensayo con un diseño de 15 tratamientos en 5 bloques completos aleatorizados. Se generaron plantas de tres tipos de progenie a partir de 5 alcornoques seleccionados por productividad y calidad de corcho: plantas de embriones somáticos generados a partir de hojas de dichos árboles, plantas de embriones somáticos inducidos en hojas de plantas procedentes de bellotas de los mismos árboles, y plantas de bellotas de cada uno de dichos árboles. En 2015 se realizó un clareo, dejando una planta por unidad experimental. En abril de 2017 se midieron los diámetros de los tocones de las 84 plantas objeto del clareo (tamaño desde el inicio) y el diámetro a la altura de 80 cm del suelo de las 64 plantas que quedan en la plantación. Este último dato se comparó con el de 2013 para determinar el crecimiento de 4 años. Para ambos parámetros no hubo diferencias significativas entre bloques. Las plantas procedentes de bellotas mostraron un tamaño significativamente superior al de las plantas procedentes de embriones somáticos. Este dato refleja el crecimiento inicial más vigoroso de las plantas de origen cigótico. Con respecto al crecimiento durante los últimos cuatro años, no hubo diferencias significativas entre las plantas con orígenes cigótico y somático, ni entre las generadas a partir de hojas de árboles adultos con respecto a las inducidas en hoja de planta joven. Por tanto, para este carácter, la ES causa rejuvenecimiento y las plantas producidas tienen un comportamiento semejante al de las procedentes de bellotas.

Financiado por:

Proyecto AGL2000-0297-C3-1 y fondos propios IMIDRA. Agradecemos a los profesores y alumnos del IES Escuela de Capacitación Agraria de Villaviciosa de Odón la conservación de la parcela de ensayo y la toma de datos.

S2-P35

Estudio de la respuesta de cítricos cultivados *in vitro* a diferentes estreses abióticos

Vicente VIVES-PERIS⁽¹⁾, Rosa M. PÉREZ-CLEMENTE⁽¹⁾,
Aurelio GÓMEZ-CADENAS⁽¹⁾

¹ Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales, Universitat Jaume I, Campus Riu Sec, Avda. Sosys Baynat s/n, 12071 Castellón de la Plana, Castellón, España.

E-mail de contacto: vvives@uji.es

El cambio climático conlleva una exacerbación de las condiciones de sequía y temperaturas extremas que tendrán un impacto muy negativo en los cultivos.

En este trabajo se estudió el efecto de diferentes estreses abióticos (salino, osmótico y elevadas temperaturas) sobre plantas de citrange Carrizo, portainjertos de cítricos ampliamente utilizado en citricultura. Para analizar la respuesta de las plantas, se determinó el contenido foliar y radical de prolina, malondialdehído (MDA) así como la concentración de diferentes fitohormonas (ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA)).

Los ensayos se llevaron a cabo en plantas cultivadas *in vitro*, lo que permitió estudiar cada condición adversa de forma independiente. La fisiología de las plantas se vio alterada de forma diferente según el estrés aplicado. La salinidad indujo un aumento del contenido de prolina únicamente en parte aérea y SA en raíces, mientras que el contenido de ABA y JA aumentó en ambos órganos. El estrés osmótico indujo un incremento del contenido en prolina y ABA y una reducción de la concentración de SA y JA. La concentración de MDA aumentó en brotes y descendió en raíces. El calor aumentó los niveles prolina en brotes y SA en ambos tejidos. En raíces descendieron los contenidos de prolina, MDA y ABA. La concentración de JA descendió en ambos tejidos.

Estos resultados concuerdan con estudios en campo, por lo que el cultivo *in vitro* supone una alternativa viable a los estudios *ex vitro*, que requieren mayores superficies de terreno y no permiten el control de las condiciones ambientales. Esta herramienta permite el estudio de estreses abióticos aplicados individualmente o de forma conjunta, pudiéndose emplear para la selección de genotipos cítricos resistentes a los estreses estudiados.

Financiado por:

MINECO (AGL2016-76574-R) y UJI (B2016-23). V.V.-P ha sido financiado por un contrato predoctoral de la UJI (PREDOC/2013/31).

New effective cryopreservation approach for grey poplar *in vitro* cultures

Eva ŽIŽKOVÁ⁽¹⁾, Pavlína MÁCHOVÁ⁽¹⁾, Jiří ZÁMEČNÍK⁽²⁾, Miloš FALTUS⁽²⁾

¹ Department of Biology and Breeding of Forest Tree species, Forest and Game Management Research Institute, Strnady 136, Jíloviště 252 02, Czech Republic.

² Division of Crop Genetics and Breeding, Crop Research Institute, Drnovská 507/73, Prague 161 06, Czech Republic.

E-mail of contact: zizkova@vulhm.cz

Populus x canescence (grey poplar) belongs among fast-growing woody plant species. For its unique phenotype traits observed in floodplain forest in the South Moravia region of the Czech Republic and a relatively rapid growth in *in vitro* as well, approximately 4-6 weeks of micropropagated plants were used to test the most effective culture conditions for a long-term conservation under ultra-low temperature. Firstly, excised apical and nodal segments were followed in their growth to determine suitable plant material for cryopreservation. Apical segments exhibited more steady developmental progress opposite to unbalanced growth of nodal segments therefore modified vitrification protocol (80% PVS₃ cryoprotectant) was applied into the apical segments of 2 mm length.

Secondly, three Variants (A – C) differing in plant's pretreatment conditions (A – no cold hardening and no addition of sucrose, B – cold hardening but no addition of sucrose, and C – cold hardening and application of 0.7 M sucrose) were treated accordingly to vitrification protocol (isolated shoot tips precultivation for 24 h on MS medium containing 0.3 M sucrose, application of loading solution containing 2 M glycerol and 0.4 M sucrose for 30 min and dehydration with 80% PVS₃ for 240 min). Two weeks after PVS-dehydration a strong reduction of vitality in treated segments was determined in Variant A in comparison to Variant C (27% and 96% respectively) while the vitality of segments in Variant B reached 77 %. These trends corresponding with the regeneration of segments and thus suggest that cold hardening and sucrose has additive as well as positive effects on grey poplar explant tolerance to cryoprotective solution treatments.

In summary, we found that pre-treatment conditions substantially affect cryopreservation of valued grey poplar germplasm.

Funding:

This work was supported by the project of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic – Resolution RO0117 (6779/2017-MZE-14151.) and project no. QJ1630301.

Sesión III

**Transformación y
biofactorias**

Session III

**Transformation and
Biofactories**

Identificación de mutantes de tomate afectados en diferentes etapas de la organogénesis adventicia

Jorge SÁNCHEZ LÓPEZ⁽¹⁾, Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ⁽¹⁾, Begoña GARCÍA-SOGO⁽¹⁾, Benito PINEDA CHAZA⁽¹⁾, Carlos RIBELLES ALFONSO⁽¹⁾, Fernando YUSTE-LISBONA⁽²⁾, Trinidad ANGOSTO TRILLO⁽²⁾, Rafael LOZANO RUIZ⁽²⁾, Vicente MORENO FERRERO⁽¹⁾, Alejandro ATARÉS HUERTA⁽¹⁾

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia, España.

² Dpto. de Biol. Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, Carretera de Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, España.

E-mail de contacto: aatares@ibmcp.upv.es

La organogénesis adventicia *in vitro* es un proceso clave cuando en la micropropagación o la mejora vegetal. Se han desarrollado protocolos que permiten la regeneración en muchas especies cultivadas, pero siguen habiendo genotipos recalcitrantes o con baja respuesta. La identificación de los genes clave que controlan la organogénesis adventicia no solo tendría interés básico sino que también abriría nuevas perspectivas en programas de mejora. Nosotros estamos abordando la disección genética de la organogénesis adventicia mediante la identificación de mutantes de pérdida de función o con alteraciones en la respuesta. Tras el escrutinio de 762 líneas T-DNA de tomate, hemos identificado cinco mutantes recesivos afectados en diversas etapas de la respuesta organogénica: formación de callo desorganizado (*tomato defective in callus proliferation; tdc-1*), diferenciación de yemas adventicias (*tomato defective in bud differentiation; tdb-1, -2 y -3*) y desarrollo o elongación de brotes adventicios (*tomato defective in shoot development; tds-1*).

La alteración del gen en el mutante *tdc-1* impide la proliferación de callo desorganizado en condiciones permisivas para los explantes WT. Pese a ello, el desarrollo vegetativo del mutante era indistinguible del WT.

En el mutante *tdb-3* se observa formación de callo desorganizado pero no hay diferenciación de yemas adventicias. En este mutante hay alteraciones en las concentraciones endógenas de algunas hormonas vegetales. Además, la planta mutante exhibía diversas alteraciones en el desarrollo vegetativo y reproductivo.

En el mutante *tds-1* se observó formación de callo desorganizado y diferenciación de yemas adventicias, pero éstas no eran capaces de dar brotes con un desarrollo normal. Los análisis histológicos indicaron alteraciones en la estructura de los meristemos surgidos *de novo*. Sorprendentemente, el desarrollo mutante *in vivo* era indistinguible del WT, lo que sugiere que el gen *TDS-1* juega un papel específico en el desarrollo de brotes adventicios *in vitro*.

Financiado por:

Los autores agradecen al MINECO la concesión de los proyectos AGL2015-64991-C3-3 y AGL2015-64991-C3-1 que han sido cofinanciados con fondos FEDER. Jorge Sánchez y Marybel Jáquez agradecen a CONACYT y la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca.

S3-P38

Obtención de plantas de fresa transformadas con una doble construcción glucanasa-quitinasa y evaluación de su tolerancia a patógenos fúngicos

Marta BARCELÓ-MUÑOZ⁽¹⁾, Ana MORENO⁽¹⁾, Clara PLIEGO⁽¹⁾,
Fares BELLAMECHE⁽⁴⁾, Elena PALOMO-RÍOS⁽⁴⁾, Miguel GÓMEZ-LIM⁽³⁾,
David RUANO-ROSA⁽³⁾, Carlos LÓPEZ-HERRERA⁽³⁾,
José Ángel MERCADO⁽⁴⁾, Fernando PLIEGO-ALFARO⁽⁴⁾.

¹ Centro de Churriana, I.F.A.P.A, Cortijo de la Cruz s/n, 29140 Churriana, Málaga. España.

² IAS, C.S.I.C, Finca Alameda del Obispo, Córdoba. España.

³ Cinvestav, Libramiento Norte Carretera Irapuato León Kilómetro 9.6, 36821 Irapuato, Guanajuato, México.

⁴ Dpto. Biología Vegetal, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea “La Mayora”, IHSM-UMA-CSIC. Campus de Teatinos, 29071 Málaga, España.

E-mail de contacto: ferpliego@uma.es

Rosellinia necatrix es un hongo patógeno que afecta a las plantaciones de aguacate en el sur de la Península Ibérica. Nuestro grupo está evaluando la utilidad de genes de origen diverso para inducir tolerancia a este patógeno; sin embargo, dada la dificultad que presenta obtener plantas transgénicas de aguacate, actualmente estamos utilizando la fresa, también huésped de *R. necatrix*, como especie modelo para evaluar la utilidad de estos genes antifúngicos. En este trabajo se transformaron discos de hoja de fresa, cv. Camarosa, con el plásmido pBAGG, que contiene en su T-ADN el gen neomicina fosfotransferasa II (*nptII*) como marcador selectivo y genes de glucanasa y quitinasa de *Nicotiana tabacum* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Para la transformación genética se siguió el protocolo de Barceló-Muñoz *et al.* (PCTOC 54:29-36, 1998) utilizando la cepa de *A. tumefaciens* AGL1. Se obtuvieron 12 líneas transgénicas GQ independientes. Tras su aclimatación, se evaluó la tolerancia a *R. necatrix* en plantas de 6 meses de edad (12 plantas por línea). La mayoría de las líneas mostraron mejor comportamiento frente al patógeno que el control no transformado; en particular, 4 líneas presentaron claramente una menor incidencia de la enfermedad, con un índice de severidad entre 2-3, mientras que el control alcanzaba un valor de 4,5 (índice de severidad de 1, planta sana, a 5, planta muerta). En la actualidad se está llevando a cabo la caracterización molecular y agronómica de las 4 líneas GQ seleccionadas, así como su comportamiento frente a otros patógenos fúngicos.

Financiado por:

Proyecto Plan Nacional AGL2014-52518-C2-1-R.

In vitro* conditions to induce organogenesis and also promote lignan production in *Linum album

Liliana LALALEO⁽¹⁾, Pilar TESTILLANO⁽²⁾, María-Carmen RISUEÑO⁽²⁾,
Rosa M. CUSIDO⁽¹⁾, Javier PALAZON⁽¹⁾, Ruben ALCAZAR⁽¹⁾,
Mercedes BONFILL⁽¹⁾

¹ Plant Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain.

² Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Centre (CIB), C.S.I.C., Ramiro de Maeztu, 9. 28040 Madrid, Spain.

E-mail of contact: mbonfill@ub.edu

The anticancer compound podophyllotoxin and related compounds are lignans produced in different *Linum album in vitro* cultures. However, their biosynthesis takes place in higher or lower levels depending mainly on the differentiation degree of the *L. album* material cultured with this purpose. In general, cell cultures of this species do not form the same lignans as root or other culture systems.

With the aim of increasing the knowledge about the relationship between the conditions that permit the formation and growth of organogenic cell masses and their capacity to form the lignans of interest, *L. album* biomass obtained from plantlets was then cultured in dark or light conditions, with or without the addition of plant growth regulators. In each conditions the levels of podophyllotoxyn, metoxypodophyllotoxyn and other related lignans was determined. The organogenic capacity of the cell bio-masses, grown in the different conditions studied, was directly observed, as well as using both light and scanning electronic microscope.

The results showed that the main lignan obtained in the cell masses studied was methoxypodophyllotoxin. At the same time, the organogenic capacity of the cell bio-masses was directly related with the production of this lignan and in lower extend with the production of podophyllotoxin.

S3-P40

Transformation of *Quercus ilex* somatic embryos with a gene encoding a thaumatin-like protein

Vanesa CANO⁽¹⁾, Elena CORREDOIRA⁽¹⁾, Laura BOUZA⁽¹⁾, Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, Antonio BALLESTER⁽¹⁾, Mariano TORIBIO⁽²⁾, M^a del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾

¹ IIAG-CSIC, Avda. Vigo s/n, Apartado 122, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña, España.

² IMIDRA, Finca “El Encin”, Apartado 127, 28800 Alcalá de Henares, Madrid, España.

E-mail de contacto: arualazuob@gmail.com

Holm oak is the dominant tree species in Mediterranean forests, especially in the special type of agroforestry meadowland system called dehesa (in Spanish) or montado (in Portuguese). In recent years populations of these trees have been severely affected by the fungal pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Genes for resistance have not yet been isolated and overexpression is not possible. However, genetic transformation techniques can be used to produce tolerant plants by introducing genes expressing pathogenesis related proteins (PR), which are encoded by the plant genome and induced under biotic or abiotic stress. The objective was to produce holm oak somatic embryos (SEs) that overexpress the chestnut thaumatin-like protein (CsTL1), a PR protein.

In the first experiment, 2-3 proembryogenic masses (PEMs) were isolated from the Q8 embryogenic line and precultured for one day, one week or two weeks on SH medium (Schenk and Hildebrand, 1972) without plant growth regulators. In a second experiment, PEMs isolated from three embryogenic lines (Q8, E00 and E2) were precultured for one week. In all cases, explants were pre-cultured and then co-cultured for 5 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harbouring the pK7WG2D-CsTL1 binary vector. Explants were then cultured on selective medium consisting of SH medium containing kanamycin (100 mg/l) and carbenicillin (300 mg/l). After 14 weeks on selective medium, transformation efficiency was determined on the basis of the fluorescence of surviving explants. Genetic transformation was only achieved when PEMs were precultured for one or two weeks. The best results (2%) were obtained with explants precultured for one week. Genotype also affected the efficiency of transformation, which was only achieved in 2 of the 3 embryogenic lines evaluated. A total of 12 transformed lines were obtained, all of which were maintained by secondary embryogenesis. Plants were successfully produced from transformed SEs stored for 2 months at 4°C. Molecular analysis was performed to determine the presence of the CsTL1 gene.

References:

Schenk and Hildebrand (1972) Can J Bot 50:199-204.

Special thanks to Dr. I. Allona for providing the CsTL1 gene.>

Funding:

This work was supported by MINECO (AGL2013-47400-C4-3-R, AGL2016-76143-C4-4-R, BES-2014-070572).

Preliminary results on rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on sharka resistance in non-transgenic fruit trees

Nuria ALBURQUERQUE⁽¹⁾, Pedro DÍAZ-VIVANCOS⁽¹⁾, Lydia FAIZE⁽¹⁾,
José Antonio HERNÁNDEZ⁽¹⁾, Lorenzo BURGOS ORTIZ⁽¹⁾

¹ Grupo de Biotecnología de Frutales, Departamento de Mejora, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30.100 Murcia, España.

E-mail de contacto: burgos@cebas.csic.es

Genetic engineering is a breeding technique that allows the introduction of genes or genomic sequences, not available within the species gene pool, to induce desired characteristics in plants. Although these technologies are undoubtedly useful, unfortunately, transgenic products are being rejected in Europe and other parts of the world due to the negative publicity given to them. Therefore, few or none new transgenic plants are being commercialized in Europe.

Sharka, caused by plum pox virus, is probably one of the most devastating diseases affecting stone fruit trees. In an attempt to introduce resistance to this disease we produced transgenic plum trees with a construct designed to silence virus genes inducing a “pathogen-derived resistance” by interfering RNA. We demonstrated that some of these lines were highly resistant to the virus.

Commercialization of these plants would be much easier if they could be used as rootstocks so that they will never flower and therefore transgene dispersion through pollen would not be possible.

In order to test if the small-interfering-RNAs-mediated resistance found in these plants is transmitted to other *Prunus* grafted onto them, we designed an experiment where four of these lines were grafted with wild apricots heavily infected by sharka. The highly resistant St5⁻¹ and St5⁻⁹ lines, the intermediate resistant St5⁻⁶ line (the virus was found during initial evaluation but disappeared later), and the susceptible St5⁻⁷ line were bud-grafted with infected apricot.

After artificial winter in cold chamber and sprouting of buds in the greenhouse plants were evaluated for virus presence by ELISA and confirmed by RT-PCR. Virus was transmitted to all susceptible St5⁻⁷ rootstocks grafted with infected buds and, obviously, was also found in all graftings. In the intermediate St5⁻⁶ line the virus was transmitted to half of the grafted rootstock plants and was found in all graftings. Finally, both resistant lines St5⁻¹ and St5⁻⁹ behaved similarly. The virus was never transmitted to the rootstock plants and was not found in half of the scions sprouted from heavily infected apricot buds. Although results are promising (especially considering the high viral inoculum density in this experimental approach) more plants need to be grafted in order to have more consistent results and also graftings will be examined after subsequent artificial winters to see if the silencing mechanism works on the long term, eliminating viral particles from the apricot grafted onto resistant plums rootstocks.

S3-P42

Efficient isolation and purification of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) leaf mesophyll cells and protoplasts

Sandra CORREIA^(1,2), Diana AUGUSTO⁽¹⁾, Inês RIBEIRO⁽³⁾, Jorge CANHOTO^(1,2)

¹ Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

² Centre for Functional Ecology, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

³ Escola Superior Agrária de Coimbra, Bencanta, 3045-601 Coimbra, Portugal.

E-mail of contact: jorgecan@ci.uc.pt

The isolation and culture of plant cells and plant protoplasts are important biotechnological tools for morphogenic studies due to their characteristics of being unique single cell systems. We have been working in the development of protocols for the isolation, purification and culture of mesophyll cells and protoplasts of several genotypes of *in vitro* established tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) plants. Thus, leaves from *in vitro* growing shoots maintained through axillary shoot proliferation were used for protoplast and whole cell isolation. Mechanically isolation of tamarillo mesophyll cells was unsuccessful, contrary to what was indicated in the literature for other systems such as *Zinnia elegans*. An enzymatic treatment of the explants with a pectinase prior to isolation (0.5% w/v macerozyme R-10) was necessary to obtain a good yield of viable cells for culture (2.932×10^5 cells.g⁻¹ FW). For the isolation of protoplasts, three main variables were evaluated: cellulase/macerozyme combinations, leaf mesophyll explant incubation time and temperature and purification method. The highest protoplast yield ($20.410 \pm 2.933 \times 10^5$ protoplasts.g⁻¹ FW) and viability (over $89.91 \pm 6.38\%$) was obtained by digesting leaf mesophyll explants in 2% (w/v) cellulase “Onozuka” R-10 and 0.5% w/v macerozyme R-10, dissolved in 0.4 M sucrose – K3 solution, overnight at 27 °C and purifying the isolated protoplasts by centrifugation and stabilization in an interphase band. The development of such protocols represents an important step to increase the biotechnological potential of tamarillo since they can be applied not only in plant regeneration and *in vitro* cloning but also for somatic hybridization and genetic transformation purposes and molecular biology analysis. Divisions of the isolated cells and protoplasts could be achieved but optimization of the culture protocols is necessary to increase the rate of cell proliferation.

K and P supply modifies root amino acid exudation by sunflower *in vitro*. Effect on chemotactic behavior of PAHs degrading microorganisms

Manuel CANTOS BARRAGÁN⁽¹⁾, José Luis GARCÍA FERNÁNDEZ⁽¹⁾,
Leticia FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ⁽¹⁾, José Julio ORTEGA CALVO⁽¹⁾

¹ IRNAS (CSIC). Avda. Reina Mercedes nº 10. 41080 Sevilla, España.

E-mail of contact: cantos@irnase.csic.es

Root exudation is one of the main mechanisms involved in bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Exudates stimulate the proliferation of soil microorganisms active in the degradation of these organic compounds.

Sunflower (*Helianthus annuus*) is considered a feasible species for PAHs elimination from polluted soils because its seeds germinate easily and develop deep and profuse radical system in these contaminated soils. Sunflower root exudates obtained *in vitro* have been shown to exert a positive effect on PAHs elimination. Readily degradable compounds found in root exudates such as amino acids have been postulated to be part of a fast pool of carbon which is rapidly utilized and cycled by the microbial cells. Beside this, it is known that reduction of phosphorous and potassium in the medium enhances amino acids production by roots.

In this work, sunflower root exudates have been obtained *in vitro* by germinating seeds in MM medium with 25 and 50% reductions of K and P (as KH_2PO_4). Amino acid profile of the exudates was determined thereafter by HPLC.

Our results show that the lowest KH_2PO_4 concentration (25%) resulted in higher number (12) and concentration (6.29 mgL^{-1}) of amino acids in the exudates, particularly histidine and arginine. Moreover, the highest amino acid content found in this exudate with 25% of monopotassium phosphate produced a higher chemotactic index in *Pseudomonas putida* G7, bacteria able to degrade naphthalene.

In consequence, the reduction of monopotassium phosphate concentration to a quarter in the medium can enhance biological activity of PAHs degrading microorganisms in soil thus leading to a more effective bioremediation of contaminated soils.

S3-P44

Producción heteróloga de resveratrol en cultivos celulares de *Silybum marianum* transformados genéticamente con estilbeno sintasa de *Vitis vinifera* y el factor de transcripción MYB12 de *Arabidopsis thaliana*

Purificación CORCHETE⁽¹⁾, Isabel MATEOS-WHITE⁽¹⁾, Diego HIDALGO⁽²⁾,
Javier PALAZON⁽²⁾

¹ Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

² Laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

E-mail de contacto: corchpu@usal.es

La creciente demanda de *t*-resveratrol para uso industrial ha abierto la búsqueda de nuevos recursos para su obtención. Una de las alternativas es la producción heteróloga en cultivos celulares vegetales, ya que, aparte de la ventaja que aporta su rápido crecimiento a bajo coste, sólo requiere la inserción de uno o dos genes de la ruta metabólica debido a la presencia de precursores metabólicos comunes.

Para comprobar la viabilidad de esta opción, se han utilizado cultivos de *Silybum marianum* transformados con el gen estilbeno sintasa procedente de *Vitis vinifera*. *S. marianum* es la fuente del flavonolignano silimarina y en la planta, al igual que en otras asteráceas, la ruta de estilbenoides no está operativa.

La expresión heteróloga de VvSTS3 permitió la detección de resveratrol en el medio de cultivo aunque en cantidades limitadas y, sólo la elicitación con jasmonato de metilo y ciclodextrinas permitió optimizar la producción a niveles de mg por litro.

La inserción del factor de transcripción AtMYB12, al actuar como modificador holístico de la vía de fenilpropanoides, incrementó la producción de resveratrol en cultivos que expresaban de forma heteróloga el gen VvSTS3, sin necesidad de estimular la ruta metabólica con elicitores. La productividad se optimizó con la inclusión de polivinilpirrolidona soluble, adsorbente de compuestos fenólicos que no posee actividad elicitora, alcanzándose cantidades de resveratrol próximas a las obtenidas con ciclodextrinas. La expresión de AtMYB12 también aumentó la biosíntesis global de compuestos fenólicos, incluidos la de ácidos cafeoil quínicos, flavonoides y monolignoles. Este incremento se vio reflejado en la actividad antioxidante de extractos de biomasa, que aumentó en más del 100% en relación a la de cultivos portadores de sólo el gen VvSTS3.

Los resultados obtenidos permiten extender las aplicaciones de los cultivos celulares vegetales a la producción simultánea de metabolitos biológicamente valiosos, tanto nativos como no constitutivos.

Caracterización de un mutante insercional de tomate afectado en el desarrollo del meristemo apical

Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ⁽¹⁾, Jorge SÁNCHEZ LÓPEZ⁽¹⁾,
Benito PINEDA CHAZA⁽¹⁾, Begoña GARCÍA-SOGO⁽¹⁾,
Carlos RIBELLES ALFONSO⁽¹⁾, Fernando YUSTE-LISBONA⁽²⁾,
Alba RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ⁽²⁾, Rafael LOZANO RUIZ⁽²⁾,
Vicente MORENO FERRERO⁽¹⁾, Alejandro ATARÉS HUERTA⁽¹⁾

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia, España.

² Dpto. de Biol. Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, Carretera de Sacramento s/n., La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, España.

E-mail de contacto: mary_ja_gu@hotmail.com

Se ha identificado un mutante de tomate afectado en el desarrollo del SAM (*shoot apical meristem*) a partir del escrutinio de una colección de líneas T-DNA. El desarrollo inicial de la plántula mutante era similar al del WT, ya que la raíz embrionaria crecía normalmente, los cotiledones se expandían y el hipocótilo alcanzaba su tamaño habitual. Sin embargo, tras la formación de un par de hojas, el meristemo apical detenía su crecimiento y no seguía desarrollando nuevas hojas. Tras un mes de cultivo las diferencias eran más evidentes, incluso cuando la actividad meristemática se reanudaba y se volvían a formar nuevas hojas. El fenotipo se ha observado tanto *in vitro* como *in vivo*. En ambos casos, además de las alteraciones descritas, se ha observado un cambio en la morfología y el tamaño de las hojas.

El análisis genético de esta línea indicó que el fenotipo se debe a una mutación recesiva. Además, mediante el análisis de segregación de plantas sensibles y resistentes a la kanamicina se pudo determinar que esta línea portaba dos insertos de T-DNA con el gen *nptII* funcional. Al combinar los datos del fenotipo con los de resistencia a kanamicina se comprobó que existía cosegregación entre uno de los dos insertos de T-DNA y el fenotipo mutante. Gracias al empleo de una trampa de intensificadores para obtener las líneas T-DNA se podría inferir el patrón de expresión del gen mutado analizando la expresión del gen delator *uidA*. Además, tras el análisis por Anchor-PCR de las regiones que flanquean al T-DNA, se ha podido determinar que el gen alterado es un factor de transcripción de la familia WRKY. Actualmente se está llevando a cabo el análisis funcional mediante el estudio de las correspondientes líneas de anulación de función y de sobreexpresión.

Financiado por:

Los autores agradecen al MINECO la concesión de los proyectos AGL2015-64991-C3-3 y AGL2015-64991-C3-1 que han sido cofinanciados con fondos FEDER. Jorge Sánchez y Marybel Jáquez agradecen a CONACYT y la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca.

S3-P46

Biotransformation assays using callus and shoot cultures of *Arbutus unedo* L.

Lucie DE SOUSA⁽¹⁾, João MARTINS^(1,2), María Teresa BATISTA⁽³⁾,
Jorge CANHOTO^(1,2)

¹ Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

² Association UC InProPlant, University of Coimbra, Calçada Martim de Freitas, 3000-456 Coimbra, Portugal.

³ Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Azinhaga de Santa Comba, 3000-548, Coimbra, Portugal.

E-mail de contacto: jorgecan@ci.uc.pt

Arbutus unedo L. (Strawberry tree) is a shrub or a small tree belonging the Ericaceae family, common around the Mediterranean basin. This species is well known since ancient times due to its vast utilities, not only from a pharmaceutical perspective, but also as an interesting ecological and ornamental plant. Fruits can be eaten fresh or used used in the confection of jams but most of the production is for the preparation of a strong brandy known as medronheira. In the last years the interest of farmers on this species has increased as an alternative to more traditional forest species, such as *Pinus pinaster* which being affected by pest diseases. The present work emerges from the purpose to explore new areas of interest concerning the strawberry tree. Thus the potential of *A. unedo* to produce arbutin, a skin-lightening agent, was analysed, as well the ability of callus and shoot cultures to transform hydroquinone into arbutin. Callus were induced from leaves of shoots growing on a medium containing different combinations of auxins and cytokinins. Shoot cultures were established from adult trees through the culture of nodal segments on liquid De Fossard medium (125 rpm) containing 2.0 mg/l benzyladenin. Best callus induction rates and callus growth were obtained when 1.0 mg/l 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 1.0 mg/l thidiazuron were used. For biotransformation assays two concentrations of hydroquinone (50 or 200 mg/l) for 1 to 7 days. The analyses by high performance liquid chromatography with photodiode array (HPLC-PDA) confirmed the presence of arbutin for strawberry tree plants grown on its natural environment as well as for plants cultivated *in vitro*, with or without the addition of hydroquinone. Best results for hydroquinone conversion to arbutin were obtained when shoot cultures were exposed to 200 mg/l of hydroquinone for 24h. The results show that biotransformation in shoot cultures could be a useful alternative for arbutin production.

Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la obtención de plantas transgénicas de melón

Begoña GARCÍA-SOGO⁽¹⁾, Carlos RIBELLES ALFONSO⁽¹⁾,
Victoria ALBALAT PERAITA⁽¹⁾, Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ⁽¹⁾,
Alejandro ATARÉS HUERTA⁽¹⁾, Vicente MORENO FERRERO⁽¹⁾,
Benito PINEDA CHAZA⁽¹⁾

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia, España.

E-mail de contacto: vmoreno@ibmcp.upv.es

La mutagénesis insercional se ha convertido en una herramienta genómica esencial a la hora de identificar genes que controlan caracteres relevantes a nivel agronómico. Alternativamente, el sistema CRISPR/Cas9 ha abierto el camino para evaluar el efecto de ciertos cambios en la secuencia de un gen. Nosotros estamos interesados en utilizar ambas aproximaciones en melón. Nuestros métodos de transformación previos permitieron la transferencia de algunos genes que potencialmente podían conferir caracteres relevantes. No obstante, la eficacia de tales métodos era insuficiente para abordar estas nuevas aproximaciones. En efecto, la variación de eventos asociados al sistema CRISPR aconseja emplear un método transformación eficaz y para abordar un programa de mutagénesis insercional no basta con obtener decenas de plantas transgénicas, sino que hay que generar cientos o miles de líneas T-DNA. Por este motivo, hemos intentado avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogénicos de diversos cultivares melón. En concreto, hemos evaluado el efecto del estadio ontogénico de la plántula, el tipo de explante, la combinación de reguladores de crecimiento y el soporte de cultivo sobre la organogénesis adventicia en melón. Los resultados indicaron que algunos de estos factores llegan a tener una influencia determinante no sólo sobre la cantidad sino, lo que es tanto o más importante, la calidad de la respuesta morfogénica. De esta manera, hemos desarrollado un método que permite una tasa de transformación (número de eventos independientes con respecto al número de explantes) que llega que al 51,1 % en un cultivar de melón tipo ‘Cantaloup Charentais’. El trabajo realizado ha permitido poner a punto un sistema de alto rendimiento que resulta adecuado para abordar un programa de mutagénesis insercional o para la edición de genes mediante CRISPR/Cas9.

Financiado por:

Los autores agradecen al MINECO la concesión del proyecto AGL2015-64991-C3-3 que ha sido cofinanciado con fondos FEDER. Marybel Jáquez agradece a CONACYT y la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca.

S3-P48

Elicitación de la producción de antioxidantes en embriones somáticos de alcornoque (*Q. suber*): síntesis verde de nanopartículas de plata

Beatriz PINTOS LÓPEZ⁽¹⁾, José Antonio MANZANERA DE LA VEGA⁽²⁾,
Luisa MARTÍN CALVARRO⁽¹⁾, Carlos JIMÉNEZ⁽¹⁾, Aranzazu GÓMEZ-GARAY⁽¹⁾

¹ Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Novais, 12, 28040 Madrid.

² Departamento, Centro, Universidad Politécnica de Madrid.

E-mail de contacto: bpintos@ucm.es

Embriones somáticos de alcornoque (*Q. suber*) fueron sometidos a diferentes tratamientos de estrés abiótico (estrés térmico, luz ultravioleta, etc.) con la finalidad de elicitar la producción de metabolitos secundarios con capacidad antioxidante en los cultivos. El extracto de los embriones contiene altas cantidades de compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides, y muestran una elevada actividad antioxidante. Los tratamientos de estrés incrementaron la capacidad antioxidante de los embriones somáticos de alcornoque obtenidos *in vitro*. Ninguno de los tratamientos aplicados incrementó significativamente, respecto al control, la cantidad de fenoles totales. Sin embargo, si se incrementó la cantidad de flavonoides totales.

Los resultados de este estudio mostraron la posibilidad de obtener cantidades importantes de metabolitos secundarios con elevada capacidad antioxidante que se utilizaron para llevar a cabo la síntesis verde de nanopartículas de plata, a partir de extractos de embriones somáticos de *Q. suber*. Estas nanopartículas se sintetizaron a partir de la reducción de nitrato de plata utilizando el extracto acuoso de embriones somáticos de alcornoque como agente reductor y nitrato de plata como sal precursora. Las nanopartículas de plata obtenidas fueron posteriormente caracterizadas mediante diferentes técnicas.

La menor tasa de cuajado en el mutante dominante *lfs-2448* parece estar relacionada con el proceso normal de polinización

Carlos RIBELLES ALFONSO⁽¹⁾, Begoña GARCÍA-SOGO⁽¹⁾,
Marybel JÁQUEZ GUTIÉRREZ⁽¹⁾, Alejandro ATARÉS HUERTA⁽¹⁾,
Juan CAPEL SALINAS⁽²⁾, Rafael LOZANO RUIZ⁽²⁾, Vicente MORENO⁽¹⁾,
Benito PINEDA CHAZA⁽¹⁾

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, UPV-CSIC, Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia, España.

² Dpto. de Biología Vegetal y Ecología, Escuela Politécnica Superior, Carretera de Sacramento s/n, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, España.

E-mail de contacto: carrial1@etsmre.upv.es

El cuajado de un fruto con capacidad para convertirse en un órgano maduro que alberga y protege la semilla tiene lugar desde el momento en el que la flor alcanza el estadio de anthesis. Este proceso, dependiente de la polinización, está regulado en gran medida por señales hormonales, especialmente auxinas y giberelinas. Así, tras la polinización, se produce una regulación positiva de los genes de respuesta a estas dos hormonas. Pese a que la tasa de cuajado es un factor determinante en la producción de un cultivar de tomate, es muy poco lo que se sabe sobre los genes responsables de este carácter. El análisis de mutantes con alteraciones en la tasa de cuajado podría ser la estrategia ideal para este propósito. En esta comunicación presentamos la caracterización de un nuevo mutante dominante de tomate (*lfs-2448*; *lower fruit setting*) con alteraciones en la tasa de cuajado. Acorde con lo esperado, observamos que la mitad de la progenie resultante del cruce entre el mutante y el WT exhibía menor tasa de cuajado. Lo más interesante fue que en todas las plantas mutantes se detectó un inserto de T-DNA. Una caracterización más detallada del desarrollo reproductivo reveló que en torno al 50% del polen de las plantas mutantes era inviable y que los frutos contenían menor cantidad de semilla. El análisis de segregación en progenies de plantas mutantes puso de manifiesto la ausencia de descendientes con el inserto de T-DNA en homocigosis. Los resultados sugieren que el fenotipo mutante está ocasionado por un T-DNA que promueve la letalidad del gameto masculino, afectando al proceso normal de polinización y al cuajado de fruto.

Financiado por:

Los autores agradecen al MINECO la concesión de los proyectos AGL2015-64991-C3-3 y AGL2015-64991-C3-1 que han sido cofinanciados con fondos FEDER. Marybel Jáquez agradece a CONACYT y la Universidad Autónoma de Sinaloa la concesión de una beca.

S3-P50

Efecto del genotipo sobre la producción y composición nutritiva de suspensiones embriónicas de *Quercus ilex* y *Quercus suber*

Mar RUIZ GALEA⁽¹⁾, Eva FRIERO MOLANO⁽¹⁾, Cristina CELESTINO MUR⁽¹⁾,
Mariano TORIBIO IGLESIAS⁽¹⁾

¹ Departamento de Investigación Agroambiental. I.M.I.D.R.A. Finca "El Encín". Apdo. postal 127. 28800. Alcalá de Henares, Madrid, España.

E-mail de contacto: mdelmar.ruiz@madrid.org

La encina y el alcornoque tienen un gran interés económico para la producción de bellota. Esta producción muestra gran variabilidad entre individuos, zonas y años, pero el cambio climático y las enfermedades hacen prever que la producción sea insuficiente para satisfacer la demanda futura.

Los protocolos de embriogénesis somática están actualmente desarrollados en ambas especies. Incluyen procesos de multiplicación recurrente de embriones somáticos, que garantizan altas tasas de proliferación, susceptibles de automatizar y escalar. En el género *Quercus*, el embrión es el constituyente casi exclusivo de la bellota por lo que podría usarse en alimentación animal o para obtener sustancias de interés ya descritas en bellota.

Debido a la alta variabilidad natural, un primer paso es evaluar el efecto del genotipo sobre la producción y composición nutritiva del material embriónico. Se establecieron cultivos de 5 encinas y de 5 alcornoques en erlenmeyers de 200ml con 50ml de medio SH. Se cultivaron en agitación a 110rpm y 23°C, con fotoperiodo de 16 horas y en oscuridad, realizándose 10 repeticiones por genotipo y tratamiento. Se midió semanalmente el peso fresco (PF) de cada envase. Tras 28 días de cultivo, se analizó el contenido en materia seca (MS), proteína, grasa, fibra (FND, FAD y lignina) y cenizas, en las suspensiones producidas y en embriones diferenciados a partir de éstas.

Se detectaron diferencias significativas de producción (PF) entre especies y genotipos. El cultivo en luz o en oscuridad no influyó en el crecimiento. A partir de una densidad inicial de $3\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ se obtuvieron tasas de crecimiento entre 10 y 50 en el alcornoque y entre 13 y 28 en la encina.

De los parámetros analizados sólo el contenido en proteínas resultó significativamente superior en la encina (30%MS) que en el alcornoque (20%MS) y en las suspensiones (36%MS) respecto a los embriones (27%MS).

Sesión IV

**Micropropagación
y avances
tecnológicos**

Session IV

**Micropropagation
and technological
advances**

Uso de extractos de algas en el cultivo *in vitro* de frutales

Nuria ALBURQUERQUE⁽¹⁾, Lydia FAIZE⁽¹⁾, Lorenzo BURGOS⁽¹⁾,
Mohamed FAIZE⁽²⁾

¹ Grupo de Biotecnología de Frutales, Departamento de Mejora, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo, 30.100 Murcia, España.

² Laboratory of Plant Biotechnology and Ecosystem Valorisation, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkli, El Jadida, Morocco.

E-mail de contacto: nalbur@cebas.csic.es

En este trabajo se examinó el efecto del extracto de algas (EA) de *Fucus spiralis* (Fs), *Cystoseira myriophylloides* (Cm) y *Laminaria digitata* (Ld) en el cultivo *in vitro* de distintas especies. En *Nicotiana benthamiana* la combinación de 25% de EA de Cm con 25% de medio MS aumentó la regeneración adventicia de brotes a partir de discos foliares en un 620%, en comparación con el medio de regeneración convencional. De forma similar, la utilización de EA de Cm 25% y Ld 25% con 25% de medio MS aumentó la regeneración en aproximadamente un 500%. Sin embargo, al incrementar la concentración de EA hasta el 50%, sólo Cm mejoró significativamente la tasa de regeneración respecto al control sin EA.

También se estudió el efecto de los EA en la micropropagación *in vitro* de *N. benthamiana*, vid, ciruelo y albaricoquero, evaluando la longitud de los brotes, el número de hojas y los entrenudos. La utilización de los EA de Fs y Cm a concentraciones bajas (2,5% y 12,5%) permitió obtener la misma eficacia en la micropropagación de brotes de *N. benthamiana* que cuando se utiliza medio MS. Sin embargo, para la micropropagación de plantas leñosas como vid, ciruelo y albaricoquero, fue necesaria una combinación de 50% de EA de Cm o Fs con 50% de sus medios de micropropagación convencionales para obtener los mismos resultados. La utilización de estas combinaciones de Cm o Fs también mejoró el porcentaje de enraizamiento en los brotes de tabaco y vid y se ha correlacionado con sus mayores concentraciones de ácido indolacético en comparación con el extracto de Ld. Estos resultados, junto con los datos de análisis de minerales, sugiere que los EA de Fs y Cm contienen nutrientes y reguladores de crecimiento necesarios para permitir su uso como medio para el cultivo de plantas *in vitro*.

S4-P52

Adaptaciones de la epidermis foliar de dos cultivares del género *Leucospermum* (Proteaceae), desarrollados *in vitro*, a las condiciones *ex vitro*

Emma SUÁREZ TOSTE⁽¹⁾, M^a Carmen ALFAYATE CASAÑAS⁽²⁾

¹ Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. 38071 Sección de Farmacia, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.

² Dpto. Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. 38206 Sección de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.

E-mail de contacto: malfayat@ull.es

Las plantas desarrolladas *in vitro* presentan modificaciones anatómicas y fisiológicas que hacen difícil su supervivencia tras la transferencia directa a condiciones *ex vitro*. Para ello es necesario un período de aclimatación durante el cual, las plantas trasplantadas a un sustrato adecuado, deben acomodarse a las condiciones ambientales *ex vitro*. Este proceso suele iniciarse en cámaras de crecimiento o invernaderos en los cuales se pueden realizar modificaciones graduales del ambiente que permiten la adaptación paulatina de los tejidos vegetales. Estos cambios son especialmente importantes en la epidermis, ya que esta constituye la primera barrera de protección de las plantas frente a las condiciones externas.

Este trabajo se centra en el estudio de los primeros cambios anatómicos y fitodermológicos foliares de dos cultivares del género *Leucospermum* (*L. cordifolium* ‘Flame Spike’ y *L.* ‘Tango’) multiplicadas *in vitro* después de su transferencia a condiciones *ex vitro*.

Se seleccionaron plántulas de ambos cultivares desarrolladas y enraizadas *in vitro*. Cuando las raíces alcanzaron el tamaño adecuado, las plantas fueron trasplantadas a una mezcla de arena de río:perlita:turba (3:2:1) e incubadas en una cámara de crecimiento en la que se fueron variando las condiciones de luminosidad y humedad relativa. Para el estudio estructural, ultraestructural y fitodermológico se seleccionaron hojas de plantas procedentes de cultivo *in vitro* y de la fase de aclimatación, y se prepararon para su observación al microscopio óptico, electrónico de transmisión y electrónico de barrido.

El empleo de una mezcla de sustratos con un alto grado de aireación, la reducción de la humedad relativa y el incremento de la irradiancia en el interior de la cámara de crecimiento provocaron una serie de modificaciones en las hojas a nivel de: grosor de la cutícula, índice estomático, tamaño de las células de guarda y poros estomáticos, índice de tricomas y cantidad de depósitos de fenoles.

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

Isabel IMBRODA SOLANO⁽¹⁾, Marta BARCELO MUÑOZ⁽¹⁾,
Alfonso GAGO-CALDERON⁽²⁾, Isabel MG PADILLA⁽¹⁾,
Araceli BARCELÓ MUÑOZ⁽¹⁾

¹ Laboratorio Cultivo de Tejidos y Biotecnología, IFAPA Centro de Málaga, Cortijo de la Cruz, 29140 Málaga, España.

² Dpto. Expresión Gráfica, Diseño y Proyectos Universidad de Málaga, Málaga, España.

E-mail de contacto: araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

El crecimiento y desarrollo de las plantas requiere de la luz para los procesos de fotosíntesis, fotomorfogénesis y fototropismo. En cultivo *in vitro*, sin embargo, el efecto más importante es el ejercido sobre la morfogénesis, salvo que se trabaje en condiciones fotoautotróficas.

Hasta hace poco tiempo, los sistemas de iluminación utilizados en cultivo *in vitro* eran, casi universalmente, fluorescentes, con suplemento o no de luces incandescentes como fuente de rojo lejano. Actualmente, los emisores LED permiten generar transmisores de luz con longitudes de onda muy específicas y alta capacidad de regulación y control, convirtiéndolos en una herramienta muy importante para los estudios de morfogénesis.

En trabajos previos evaluamos el efecto de la iluminación fluorescente GroLux frente a sistemas LEDES (blanca / blanca más roja) sobre la micropropagación de terebinto, fresa y rosal, Los resultados mostraron mayor tamaño y número de brotes y contenido en clorofilas en las plantas iluminadas con luces LEDES, con respuesta diferencial entre especies (Imbroda et al, 2015).

En trabajos publicados, se han analizado estas fuentes de luz por sus colores de manera genérica o, al menos, sin seleccionar diferentes frecuencias específicas características, dentro de una misma gama de color. Para obtener resultados más precisos en este sentido, generamos un sistema, con 9 celdas independientes, en el que se ha colocado una selección de emisores que varía desde luces monocromáticas hasta un sistema RGB donde cada frecuencia de emisión puede regularse independientemente, con el objetivo de evaluar si cultivos de diferentes especies reaccionan igual ante una misma frecuencia de iluminación o si sus umbrales de activación difieren con respecto a diferentes tramos de longitud de onda de la fuente de luz artificial utilizada, y analizar el efecto de estas pequeñas variaciones de la frecuencia de emisión (20 – 30 nm) en diferentes especies.

Financiado por:

Este trabajo ha sido financiado con fondos INIA-FEDER (proyecto RTA2014-00056-C02-01).

S4-P54**Micropropagación de árboles adultos de encina, *Quercus ilex*, mediante embriogénesis somática**

M^a Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, M^a del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾, M^a José CERNADAS⁽¹⁾,
Elena CORREDOIRA⁽¹⁾

¹ Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal, Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC), Avd. de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña, España.

E-mail de contacto: elenac@iiag.csic.es

Se ha definido un procedimiento eficiente para la inducción de embriones somáticos (ES) a partir de material adulto de dos encinas centenarias, Q3 y Q10. Los explantos para la inducción fueron ápices y hojas aislados de brotes de 6 semanas micropropagados vía axilares. Los explantos se cultivaron en medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 500 mgL⁻¹ de hidrolizado de caseína (HC) y diferentes concentraciones (0, 1, 2, 4 mgL⁻¹) de ácido indol-3-acético o ácido α -naftalenacético (ANA), en combinación con 0,5 mgL⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BA). La inducción fue posible en los dos genotipos y en los dos tipos de explantos, aunque la frecuencia de inducción varió con el genotipo, el tipo de explanto, y el tipo/concentración de auxina. Los ápices respondieron mejor que las hojas en los dos genotipos, independientemente de la auxina utilizada. Los mejores resultados se obtuvieron con ápices del clon Q3 (11%) en medio con ANA 4 mgL⁻¹ + BA 0,5 mgL⁻¹. Este medio también fue el mejor para inducir ES en hojas pero con menor frecuencia (1-3%).

Las líneas embriogénicas establecidas a partir de los ES aislados de los explantos iniciales son mantenidas mediante embriogénesis repetitiva en medio Schenk y Hildebrand (1972) sin reguladores, utilizando como explanto inicial masas proembriogénicas (PEMs). Las tasas de proliferación son significativamente más bajas cuando se utilizan ES en estado torpedo o cotiledonar temprano como explanto inicial, y también disminuyen significativamente al añadir glutamina o HC en una concentración de 500 mgL⁻¹.

Para la obtención de plantas, ES cotiledonares, aislados de cultivos de 6 semanas en proliferación, fueron estratificados en frío (4°C) durante dos meses, y después cultivados en medio de germinación Gresshoff y Doy (1972) adicionado con BA 0,1 mgL⁻¹ y 20 μ M de tiosulfato de plata, obteniéndose frecuencias de conversión entre 21-65 % en función del genotipo.

Agradecimientos:

Se agradece al Dr. M. Toribio el suministro del material vegetal utilizado en este trabajo. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (España) mediante los proyectos AGL2013-47400-C4-3-R y AGL2016-76143-C4-4-R.

Referencias:

Gresshoff and Doy (1972) 107:161-170.
Murashige and Skoog (1962) *Physiol Plant* 15:473-497.
Schenk and Hildebrand (1972) *Can J Bot* 50:199-204.

Establecimiento *in vitro* de genotipos de salvia y de orégano seleccionados por su composición en aceites esenciales

Mercedes DABAUZA MICÓ⁽¹⁾, José Antonio SOTOMAYOR SÁNCHEZ⁽¹⁾,
María José JORDÁN BUESO⁽¹⁾, Cristina MARTÍNEZ CONESA⁽¹⁾,
Pascual ROMERO ESPINAR⁽¹⁾, María QUÍLEZ SIMÓN⁽¹⁾, Inmaculada GARCÍA ALEDO⁽¹⁾

¹ Departamento de Recursos Naturales, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), C/Mayor s/n, 30150 La Alberca, Murcia, España.

E-mail de contacto: mercedes.dabauza@carm.es

Las plantas aromático-medicinales presentan compuestos con actividades saludables (antimicrobianas, antioxidantes y gastroprotectoras) y son una alternativa real al empleo de antibióticos en ganadería. La adaptación al cultivo de estas especies, obteniendo variedades estables en cuanto a la producción de componentes bioactivos, es una alternativa eficaz tanto para agricultores (mejora de sus plantaciones) como para ganaderos (reducción de antibióticos), ya que ambos podrían hacer sus producciones más competitivas y seguras. En este sentido, la selección y multiplicación vegetativa de plantas silvestres para establecer cultivares comerciales con alto rendimiento y homogéneos (estandarizados), tanto en aceite esencial, como en extractos polifenólicos y otros metabolitos secundarios, es un objetivo prioritario de nuestro grupo.

En esta comunicación presentamos los resultados preliminares del establecimiento *in vitro* de plantas de dos especies seleccionadas por su composición en aceites esenciales: orégano (*Origanum vulgare*) y salvia (*Salvia lavandulifolia* Vahl), recogidas en Moratalla (Murcia). Se ensayaron tres tiempos de desinfección (10, 20 y 30 minutos) en una solución de lejía comercial (4g de cloro activo/L). Los explantos se sembraron en medio de establecimiento y se incubaron durante 4 semanas a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con un fotoperiodo 16/8 y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $45 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (tubos de luz blanca PHILIPS Master TL-D 36W/865 D8).

La desinfección durante 30 minutos dio lugar a un mayor porcentaje de explantos no contaminados. Se ha observado una clara diferencia de respuesta entre las plantas empleadas como fuente de explantos. En orégano, el 100% de las yemas brotaron y elongaron y hasta un 97% fueron capaces de enraizar; sin embargo, se observó hiperhidratación y necrosis apical hasta en un 60% y un 40% respectivamente, en función de la planta fuente de explantos. En salvia, de las 7 plantas recolectadas, se obtuvo entre un 4% y un 71% de brotación, hasta un 42% de elongación y no se observó enraizamiento en ninguno de los explantos. Se están realizando ensayos de micropropagación en medios de cultivo con distinta composición en sales minerales.

Financiado por:

Proyecto 14-20-12 cofinanciado en un 80% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

S4-P56***In vitro* establishment for the micropropagation of sea asparagus (*Salicornia* spp.)**J.M.T FIGUEIREDO⁽¹⁾, L.M.V LAVOURA⁽¹⁾, R.F.V. PINTO⁽¹⁾, N. FARINHA⁽²⁾,
J.C. GONÇALVES⁽²⁾, C. DEBIASI⁽²⁾¹ Universidade da Beira Interior (UBI), Covilhã, Portugal.² Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBPBI), Castelo Branco, Portugal.

E-mail of contact: claytondebiasi@gmail.com

Sea asparagus (*Salicornia* spp.) is a halophyte species that are awakening the population interest because is rich in vitamins A and C, iron, iode, sodium and magnesium, presenting antioxidative and antinfamatory proprieties, replacing the salt on alimentation. The aim of this study was to develop an efficient methodology for the *in vitro* establishment of sea asparagus. Shoot tips and nodes, collected from adult plants, were submitted to different aseptic treatments, combining 30 seconds of immersion in ethanol solution 70%, 10 minutes of immersion in Mancozebe solution (1g/L^{-1}), with 10 or 15 minutes of immersion in NaClO solution (1, 2 or 3%) or 2 or 3 minutes of immersion in HgCl_2 solution (0,1 or 0,5%), finalizing with 5 rinses with sterile water, before cultivate on different culture media, variating the MS and DMS media supplemented with different combination of 6-Benzylaminopurine (0, 2 and 3mg/L^{-1}), 1-Naphthaleneacetic acid (0 and 1mg/L^{-1}), Zeatin (0 and $0,5\text{mg/L}^{-1}$) and with NaCl (0, 15 and 30g/L^{-1}). For *in vitro* establishment of sea asparagus, the use of 3 minutes of immersion in HgCl_2 solution to 0,3% resulted in 80% of viable explants, without contamination and, the DMS medium supplemented with BA (2mg/L^{-1}) and NAA (1mg/L^{-1}) induced the production of a higher number of lateral shoots (4.3), while the MS medium, without growth regulators and without NaCl supplementation, induced the production of explants with greater length (2.8 cm).

Micropropagación de patrones de pistacho

E. GARCÍA⁽¹⁾, J. A. MARÍN⁽¹⁾, P. LORENTE⁽¹⁾, P. ANDREU⁽¹⁾, A. ARBELOA⁽¹⁾

¹ Estación Experimental de Aula Dei-CSIC. Avenida Montañana 1005. 50059 Zaragoza, España.

E-mail de contacto: egarcia@eead.csic.es

La demanda de plantones de pistacho, superior a la oferta del mercado, causa un freno a la expansión de este cultivo en España. La propagación del pistacho se realiza tradicionalmente mediante el injerto de plantas de diversas especies de *Pistacia*, utilizadas como patrones y provenientes de semilla. La aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* a estas especies de *Pistacia* permitiría la propagación clonal y masiva de estos patrones, así como la obtención de plantas durante todo el año incrementando de esta forma la oferta de planta de pistacho en el mercado.

En la Estación Experimental de Aula Dei se están desarrollando con éxito técnicas de micropropagación de distintos patrones de pistachero: UCB1 (*Pistacia atlantica* x *P. integerrima*) (2 clones), *P. atlantica* (3 clones) y *P. integerrima* (1 clon) de distintos orígenes.

El establecimiento de material se ha realizado tanto a partir de árboles creciendo en campo como de semillas y en esta fase tanto el control de las contaminaciones como principalmente de los exudados, mediante el uso de antioxidantes, ha resultado definitiva para la obtención de material creciendo *in vitro*.

Una vez se establecieron brotes de las tres especies estudiadas, se procedió a la multiplicación de los explantos. Cuatro medios fueron evaluados tanto con respecto a la tasa de multiplicación como a la presencia de brotes necrosados, uno de los factores críticos en la micropropagación de pistacho. Con los medios estudiados, se han logrado tasas de multiplicación variables entre 0,5 y 3 mostrando diferencias no solo entre medios de cultivo sino también entre clones. La presencia de brotes necrosados, un factor a tener en cuenta, fue muy variable dependiendo de los medios de cultivo y el clon, reduciendo en algunos casos la incidencia a un 5% de los brotes.

El enraizamiento *in vitro* ha alcanzado niveles cercanos al 100% una vez desarrollado el medio adecuado y posteriormente se ha procedido a la aclimatación y endurecimiento de la planta tras su trasplante a un sustrato adecuado bajo condiciones ambientales controladas.

Mediante el desarrollo de protocolos adaptados para los distintos clones se ha conseguido una propagación masiva de distintos patrones de *Pistacia*.

Financiado por:

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).

S4-P58**Alteraciones en la fotosíntesis en plantas de *Medicago arborea* cultivadas *in vitro* en presencia de nanocerio**

Aranzazu GÓMEZ-GARAY⁽¹⁾, Luisa MARTÍN⁽¹⁾, Yolanda PÉREZ⁽¹⁾,
Juan Antonio LÓPEZ⁽²⁾, Nieves VILLALOBOS⁽³⁾, Beatriz PINTOS⁽¹⁾

¹ Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Novais 12, 28040 Madrid, España.

² Proteómica, CNIC, C/ Melchor Fernández Almagro, 3, 28029 Madrid, España.

³ Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, C/ Donantes de Sangre s/n, 37007 Salamanca, España.

E-mail de contacto: magom02@bio.ucm.es

Semillas de *M. arborea* fueron germinadas *in vitro* en presencia de nanocerio y de óxido de cerio en tamaño convencional. Las plántulas se cultivaron durante cuatro semanas en cámara de cultivo a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad y una irradiancia de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mediante luz fluorescente. Se valoraron en las mismas caracteres morfológicos (longitud de tallo y de raíz, número de hojas trifoliadas y biomasa fresca y seca), se realizó además un análisis proteómico mediante cromatografía nanolíquida; la valoración de la actividad fotosintética se estimó mediante SPAD y la fluorescencia de la clorofila y se cuantificaron los pigmentos fotosintéticos (clorofilas a y b, clorofila total, antocianinas y carotenoides). Se realizó además un estudio de estrés oxidativo mediante la detección *in vivo* y cuantificación de ROS y la actividad de enzimas detoxificadoras de ROS (SOD, CAT y GPOX). Las diferencias a nivel morfológico fueron muy escasas, salvo por un incremento en la longitud de las raíces producido por el óxido de cerio que resultó independiente del tamaño de las partículas. Los niveles de pigmentos fotosintéticos se vieron incrementados por la presencia de cerio en el medio de cultivo. Las plantas tratadas con nanocerio mostraron una reducción en la máxima eficiencia fotosintética del Fotosistema II lo que es un signo indicativo de estrés. La valoración de ROS y de los enzimas detoxificadores mostraron el posible papel mimético del nanocerio empleado con el enzima catalasa.

Micropropagación de árboles adultos de encina vía proliferación de yemas axilares

M^a Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, Elena CORREDOIRA⁽¹⁾, M^a José CERNADAS⁽¹⁾,
M^a del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾

¹ Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal, Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia (IIAG-CSIC), Avd. de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, La Coruña, España.

E-mail de contacto: temar@iiag.csic.es

En este trabajo se presenta un procedimiento para el establecimiento y mantenimiento *in vitro* de material adulto de encina mediante la proliferación de yemas axilares. Segmentos de ramas (25-30 cm) de la copa de encinas de 30-100 años fueron forzados a brotar en condiciones controladas, y los nuevos brotes fueron utilizados como fuente de explantos para iniciar cultivos. Un paso crítico del proceso fue la esterilización; el establecimiento *in vitro* sólo fue posible cuando se aplicaron concentraciones/tiempos bajos de hipoclorito sódico (0,3% de cloro libre 2-3 min). La estabilización de cultivos se logró en 6 de los 8 genotipos evaluados, aunque con marcadas diferencias genotípicas.

La proliferación de los brotes se obtuvo mediante el cultivo de segmentos nodales y apicales (0,5-1 cm) en posición vertical en jarras con 500 ml de medio en un ciclo de cultivo de 6 semanas con transferencias cada dos semanas a medio fresco, como sigue: 0,1 mg L⁻¹ de benciladenina (BA) las 2 primeras semanas, 0,05 mg L⁻¹ BA las 2 semanas siguientes, y 0,01 mg L⁻¹ BA más zeatina 0,1 mg L⁻¹ las últimas 2 semanas. El medio mineral, la concentración de sacarosa y el agar utilizado afectaron a la proliferación de los brotes. Los mejores resultados se obtuvieron con el medio WPM (Lloyd y McCown 1980) suplementado con 8 g L⁻¹ agar Sigma y 30 g L⁻¹ de sacarosa. La adición de tiosulfato de plata 20 µM al medio mejoró la proliferación al reducir la necrosis y senescencia de hojas y ápices en los brotes.

El enraizamiento de los brotes fue posible pero en porcentajes bajos. Los mejores resultados se obtuvieron en medio Murashige y Skoog (1962) con los macronutrientes a la mitad suplementado con 3 ó 5 mg L⁻¹ ácido indol-3-butírico y 0,1 mg L⁻¹ ácido naftalenacético durante 15 días y transferencia posterior a medio sin reguladores.

Agradecimientos:

Se agradece al Dr. M. Toribio el suministro del material vegetal utilizado en este trabajo. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (España) mediante los proyectos AGL2013-47400-C4-3-R y AGL2016-76143-C4-4-R.

Referencias:

Lloyd y McCown (1980) Comb Proc Int Plant Prop Soc 30: 421-427.
Murashige and Skoog (1962) Physiol Plant 15:473-497.

S4-P60**A new type of temporary immersion system (TIS) evaluated with *Prunus spp* and *Pyrus spp* rootstocks**

C.R. MENDOZA MORALES⁽¹⁾, R. DOLCET-SANJUAN⁽¹⁾

¹ Plant *in Vitro* Culture Laboratory, Fruticulture Program, IRTA, Fruitcentre, PCiTAL, Parc de Gardeny, 25003 Lleida, Spain.

Laboratorio de Cultivo *in vitro*, IRTA Fruitcentre, Lleida, España.

E-mail of contact: ramon.dolcet@irta.cat

Micropropagation has been revealed to be an efficient propagation method for production of large quantities of true to type and disease free plants. Traditional methods of micropropagation on solid and semisolid media are limited in commercial production due to high labor cost. Bioreactor production in liquid medium has therefore been studied and tested in recent years, but there are still no appropriate types of bioreactor until now applied to commercial fruit tree rootstock propagation. A new type of bioreactor, based on the temporary immersion system (TIS) principle, is being developed by the Plant *in Vitro* Culture Laboratory, Fruticulture Program, IRTA, Fruitcentre, Lleida, Spain. This is a mid-sized unit (1 to 4L) reactor that so far operates on the same principles as other existing temporary immersion systems do.

The aim of this study was to evaluate this new bioreactor for micropropagation in comparison with the micropropagation on semisolid medium, using a commercial *Prunus spp* rootstocks (ROOTPAC-20®) and a new hybrid *Pyrus spp* rootstock (Py170), which is in the last phase of selection, and determining the shoot fresh weights, multiplication rate, shoot length, and shoot hyperhydricity.

The results show that this newly developed bioreactor is suitable for mass production of target plants species with survival rate and plant quality similar to those from semisolid medium. The multiplication rate was either similar or better than that from semisolid medium. Depending on the rootstock, between 400 and more than 600 shoots could be obtained per bioreactor, whereas in agar containing medium, over 100 shoots per flask were obtained. The average shoots length was higher in the bioreactor than in the semisolid medium. In addition, while shoots produced had the same quality in both systems, the time needed was shortened two weeks when cultures were done in the bioreactor. Shoot hyperhydricity was controlled and eliminated when immersion time and frequency were corrected for each rootstock. Overall, the analysis of the culture systems results show that the bioreactor is stable and reliable and with greater productivity.

Conservación del roble enano del Monte Pindo mediante micropropagación

M^a del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾, M^a Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, M^a José CERNADAS⁽¹⁾,
Laura BOUZA⁽¹⁾, Elena CORREDOIRA⁽¹⁾

¹ Grupo de Biotecnología y Mejora Forestal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda. de Vigo s/n, 15705 Santiago de Compostela, España.

E-mail de contacto: sanjose@iiag.csic.es

El roble enano del Monte Pindo está considerado como un endemismo ibero-occidental tingitano, cuyas únicas tres poblaciones se encuentran en el norte de Marruecos, sur de Portugal y oeste de Andalucía y noroeste de Galicia. Su escasa presencia y el deterioro de sus hábitats ha hecho que se encuentre incluida en los Catálogos de Especies Amenazadas de Extremadura y Galicia y en la Lista Roja de Andalucía. En este trabajo se ha desarrollado un protocolo para la conservación de genotipos adultos de esta especie aplicando técnicas de micropropagación. Se recogieron ramas de árboles de entre 30-40 años que se forzaron a brotar en condiciones controladas. Los brotes, una vez esterilizados, se utilizaron como la fuente de los explantos para el establecimiento *in vitro*. En la fase de multiplicación se ensayó el efecto de diversos medios minerales: Gresshoff y Doy (1972), Murashige y Skoog (1962) con los nitratos reducidos a la mitad y Lloyd y McCown (WPM, 1980), suplementados con 0,1 mg/l de benciladenina. Los mejores resultados se obtuvieron al utilizar los explantos nodales y el medio mineral de Lloyd y McCown. El cultivo horizontal de los brotes provocó el desarrollo de brotes con aspecto suculento que no fueron aptos para el mantenimiento *in vitro* de los cultivos.

Brotes de entre 1,5-2 cm fueron enraizados utilizando el medio WPM con los macronutrientes reducidos a la mitad suplementado con 0,1 mg/l de ácido indol butírico. Los brotes permanecieron en este medio durante 7 días, siendo posteriormente transferidos a un medio fresco de igual composición pero sin auxina. Las raíces fueron visibles a partir de los 15-20 días y los porcentajes de enraizamiento fueron superiores al 75%. Las plantas enraizadas fueron transferidas a tiestos con una mezcla de suelo de jardín y perlita (2:1) para su aclimatación en condiciones controladas, consiguiendo porcentajes de supervivencia superiores al 70%.

Referencias:

- Gresshoff y Doy (1972) *Planta* 107: 161-170.
Lloyd y McCown (1980) *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 30: 421-427.
Murashige y Skoog (1962) *Physiol Plant* 15: 473-497.

S4-P62

Micropropagación de *Prunus lusitanica* para su conservación *ex situ*

Alberto RODRIGUEZ ACEVEDO⁽¹⁾, Nieves VIDAL GÓNZALEZ⁽¹⁾,
Purificación COVELO ABELEIRA⁽¹⁾, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ⁽¹⁾

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

E-mail de contacto: conchi@iiag.csic.es

Prunus lusitánica, conocida también como loro o azarera, es una especie arbórea reminiscente de la laurisilva del terciario-cuaternario, de gran interés ecológico que se encuentra en poblaciones dispersas y fragmentadas. En la lista Roja de la Flora vascular española está clasificada como Vulnerable, siendo recomendable la utilización de herramientas biotecnológicas para su conservación *ex situ*.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar protocolos para el establecimiento y multiplicación *in vitro* de material juvenil y adulto de esta especie con vistas a su conservación y propagación, evaluando el efecto del medio de cultivo y reguladores de crecimiento.

Como material de partida para el establecimiento *in vitro* se utilizaron los brotes de nuevo crecimiento recogidos en primera procedentes de dos plantas de invernadero de 3 años de edad y de un ejemplar adulto de aproximadamente 30 años. Se estudió el efecto de diferentes formulaciones de sales minerales (MS, WPM, DKW) y como reguladores de crecimiento se utilizaron BA (benzilaminopurina) y mT (metatopolina) en combinación con AIB (ácido indol butírico).

Se establecieron *in vitro* diferentes líneas de cultivos procedentes de cada uno de los tres genotipos. La reactividad *in vitro* en la etapa de establecimiento dependió de la edad y estado fisiológico del material inicial, siendo menos reactivo el material más adulto. En la etapa de proliferación se observaron diferencias genotípicas en cuanto a los requerimientos nutritivos. Los genotipos juveniles respondieron mejor al medio MS, con buenas tasas de enraizamiento espontáneo, mientras el medio DKW proporcionó mejores resultados en las líneas adultas. El subcultivo de los brotes en medio WPM durante un mes incrementó el número medio de brotes y una posterior transferencia al medio DKW resultó en una mayor longitud de los mismos. Los brotes enraizados se aclimataron fácilmente a las condiciones *ex vitro*.

Evaluación de la ecotoxicidad de compuestos liberados por acolchados plásticos biodegradables utilizados en agricultura mediante el cultivo *in vitro* de plantas

Hadaly SERRANO RUIZ⁽¹⁾, Adrián GAITE⁽¹⁾, Lluís MARTÍN-CLOSAS⁽¹⁾,
Ana María PELACHO⁽¹⁾

¹ Departamento de Hortofruticultura, Botánica y Jardinería, Campus ETSEA, Universidad de Lleida, Avda. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España.

E-mail de contacto: hadaly.serrano@hbj.udl.cat

La utilización agrícola de acolchados biodegradables de plástico ha surgido como alternativa en sustitución de los de polietileno. Al biodegradarse directamente en el suelo agrícola evitan la acumulación de residuos plásticos, que de otra forma permanecerían en él muchos años. Sin embargo, durante su degradación liberan al suelo pequeñas cantidades de diversos compuestos químicos que pueden interactuar con los sucesivos cultivos, lo que hace necesario evaluar preventivamente el efecto de estos productos. Hasta la fecha, apenas se ha estudiado el impacto de los productos de la degradación de estos acolchados en plantas. Los estudios en campo son complejos y difícilmente estandarizables, y requerirían del acumulo de grandes cantidades de materiales. Por otro lado, algunas Normas UNE o guías internacionales proponen ensayos de germinación, o de germinación y primeras etapas del desarrollo, en placas Petri o en macetas, ambos de limitado alcance. Este trabajo responde a la necesidad de una evaluación de mayor recorrido. En ensayos preliminares anteriormente realizados con extractos de algunos acolchados biodegradables, el cultivo *in vitro*, que permite el control de los factores que afectan al desarrollo de la planta y permite visualizar la morfología radical para un número elevado de plantas y en poco espacio, ha mostrado su capacidad para poner de manifiesto efectos no identificados previamente. Por ello, este trabajo evalúa los efectos de acolchados biodegradables (8 plásticos -BP1 a BP8-) mediante el cultivo *in vitro* de semillas de lechuga y tomate en medio MS al que se incorporan extractos con los compuestos liberados por la incubación de los materiales.

La germinación de ambas especies no se vio afectada en ningún caso, pero sí el desarrollo de ambas, que se monitorizó visualmente y al mes de crecimiento se cuantificó determinando la biomasa de la parte aérea y raíces, el contenido en clorofila y la prolina en hojas como marcador de estrés. Cuando el medio de cultivo se preparó mediante filtrado de los extractos plásticos, la mayoría de ellos redujeron el desarrollo de las plántulas de tomate, apareciendo coloración rojiza en los tallos. También se apreció visualmente una reducción del desarrollo de las plántulas de lechuga, aunque su peso sólo disminuyó significativamente con el material BP4. El autoclavado de los extractos, estudiado en lechuga, no eliminó su efecto, sino que por el contrario lo incrementó para varios de ellos. Los niveles de prolina aumentaron significativamente en los tratamientos con menor crecimiento, especialmente con BP4 donde la concentración se incrementó hasta 4 veces respecto al control, lo que sugiere una situación de estrés. La reducción del peso de los explantos se vio acompañada de la reducción del número de raíces o de una acusada transformación de su morfología. Los resultados sugieren que en el proceso de degradación de los acolchados biodegradables se liberan sustancias con capacidad de interferir en el desarrollo de las plantas, aunque no en su germinación.

S4-P64

Sistemas alternativos del cultivo *in vitro* para la multiplicación eficiente de banano (*Musa AAA*) variedad Williams

Alexander MORENO HERRERA⁽¹⁾ Ángeles BERNAL PITA DA VEIGA⁽²⁾,
Mónica COIG O'DONNELL⁽³⁾, Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ⁽⁴⁾,
Nieves del Pilar VIDAL GONZÁLEZ⁽⁴⁾

¹ Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Universidad Técnica de Machala. Avda. Panamericana km 5, Machala, El Oro, Ecuador.

² Departamento de Biología Animal, Biol. Vegetal y Ecología, Universidade da Coruña, A Zapateira s/n 15071, A Coruña, España.

³ CULTESA. Ctra. de Guayonje, 68, Apdo. de Correos 73, 38350 Tacoronte, Santa Cruz de Tenerife, España.

⁴ Departamento de Fisiología Vegetal, Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia, CSIC. Avda. de Vigo s/n. Apdo 122. 15780 Santiago de Compostela, España.

E-mail de contacto: nieves@iiag.csic.es

El objetivo de este estudio es el desarrollo de métodos alternativos de micropropagación para su aplicación a brotes de banano var. Williams. El cultivo de banano en Ecuador está siendo amenazado por la edad de las plantaciones y enfermedades como la *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, por lo que para mantener la producción en campo se necesita disponer de gran cantidad de semilla sana y de calidad. Para ello, se utiliza el cultivo *in vitro* convencional, así como sistemas alternativos que reduzcan gastos e incrementen el coeficiente de multiplicación y la calidad de las vitroplantas.

En este trabajo se presentan los resultados de a) la instalación *in vitro* de genotipos de banano Williams de la zona del Oro (Ecuador) mediante el sistema convencional y su propagación en biorreactores, y b) experimentos preliminares de cultivo en medio líquido con material vegetal de banano Williams previamente establecido *in vitro* por la empresa CULTESA (España).

Como biorreactores se utilizaron los sistemas comerciales de inmersión temporal RITA[®] y plantform[™] a los que se añadieron 150 y 500 ml (respectivamente) de medio Murashige y Skoog con 2 mg/l de benciladenina y 0,65 mg/l de ácido indol acético. Como material de partida se utilizaron brotes provenientes de micropropagación convencional en fase de multiplicación, que se decapitaron y se dispusieron en medio semisólido en frascos de cristal (con 50 ml de medio) y en medio líquido en bioreactores programados para inmersiones de un minuto cada cuatro y ocho horas. El medio semisólido se gelificó con Vitroagar (7 g/l). En todos los casos el pH se ajustó a 5,8 antes del autoclavado a 120 °C durante 20 minutos. Las condiciones de cultivo fueron 25 ± 1,0 °C, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y con lámparas blancas fluorescentes (50-60 μmol m⁻² s⁻¹).

Modificaciones del sistema de cultivo para optimizar el factor de multiplicación y la calidad de plantas micropropagadas de *Stevia rebaudiana*, Bertoni

Susana VILARIÑO RODRÍGUEZ⁽¹⁾, José Luis GARCÍA FERNÁNDEZ⁽²⁾,
Manuel CANTOS BARRAGÁN⁽²⁾

¹ Vitrosur Lab SLU. Algodonera del Sur. Calle Desarrollo 2, Los Palacios. 41720. Sevilla, España.

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS). CSIC. Avda. Reina Mercedes nº 10. 41012. Sevilla, España.

E-mail de contacto: svilarino@algosur.com

Entre los compuestos con elevada capacidad edulcorante pero sin riesgos para la salud procedentes de vegetales, destaca el extracto obtenido de plantas de *Stevia rebaudiana* Bert.. La reproducción sexual de esta especie, caracterizada por una alta heterogeneidad de las poblaciones resultantes de sus semillas y la baja eficiencia de la germinación de éstas, hace que se prefiera la propagación asexual para obtener un elevado número de plantas homogéneas genéticamente. El uso de esquejes requiere tallos con un determinado porte y numerosas labores y tiempo para la obtención de plantas. En consecuencia, la micropropagación viene siendo el sistema adecuado para alcanzar un número suficiente de plantas en un período corto de tiempo.

Para optimizar la micropropagación de yemas axilares y apicales de dos variedades (S6 y S9) de *Stevia rebaudiana*, Bert., se ensayan tres medios nutritivos distintos (MS, MSM y G) bajo dos sistemas de cultivo: el tradicional (medio sólido) y el Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Tras 25 días de cultivo se observa un mayor desarrollo en longitud de las plantas de la variedad S6, y un mayor número de ramificaciones laterales y yemas en las de S9. Para las plantas de ambas variedades, la mayor longitud y peso fresco se dan en el medio sólido, por el contrario se obtienen más ramificaciones laterales en las condiciones SIT. Los niveles de pigmentos son similares en ambas variedades, aunque las plantas desarrolladas en medio sólido tienen mayores niveles de clorofila a y carotenoides. Las concentraciones de malondialdehído (MDA) son similares en todos los medios, ya sean sólidos o SIT, aunque con un nivel más elevado en las plantas de la variedad S6. No obstante, estos niveles indican ausencia de daño en las membranas celulares de los tejidos de las plantas obtenidas. El balance nutricional en todos los casos es correcto.

Índice
de autores

Authors
index

Índice de autores

A

- ALBALAT PERAITA, Victoria: 115
ALBORCH, Álex: 56, 85
ALBURQUERQUE, Nuria: 109, 121
ALCAZAR, Ruben: 107
ALDREY VILLAR, Anxela: 59
ALEGRE, Simó: 87
ALEZA GIL, Pablo: 55
ALFAYATE CASAÑAS, M^a Carmen: 122
ALLUÉ DURANGO, Sandra: 88
ALMAGRO, Lorena: 48
ALONSO, Juan: 86
ÁLVAREZ-LÓPEZ, Dulce I.G.: 76
ALVARO SÁNCHEZ, Fanny: 88
AMORÓS, Mari Cruz: 86
ANDREU, P.: 73, 84, 127
ANGOSTO TRILLO, Trinidad: 105
ARBELOA, A.: 73, 84, 127
ARRILLAGA, Isabel: 56, 85, 91
ATARÉS HUERTA, Alejandro: 105, 113, 115, 117
AUGUSTO, Diana: 110
ÁVILA, Concepción: 47
AVILÉS-VIÑAS, Susana: 76
AYED SLAMA, Olfa: 83

B

- BALLESTER, Antonio: 58, 108
BALLESTEROS GUTIÉRREZ, Marta: 99

BÁRÁNY, Ivett: 65, 66, 68
BARCELÓ MUÑOZ, Araceli: 94, 123
BARCELO MUÑOZ, Marta: 106, 123
BATISTA, María Teresa: 114
BELLAMECHE, Fares: 106
BERENGUER, Eduardo: 65, 66, 77
BERNAL PITA DA VEIGA, Ángeles: 59, 134
BONFILL, Mercedes: 107
BOUZA, Laura: 108, 131
BRADAI, Fatiha: 90, 98
BURGOS ORTIZ, Lorenzo: 109, 121
BUSTILLO AVENDAÑO, Estefano: 45

C

CAMACHO FERNÁNDEZ, Carolina: 67
CANHOTO, Jorge: 77, 110, 114
CANO, María: 56, 84, 91
CANO, Vanesa: 58, 108
CANO-RUIZ, Judith: 86
CÁNOVAS, Francisco M.: 48
CANTÍN, Celia: 87
CANTO FLICK, Adriana: 76
CANTOS BARRAGÁN, Manuel: 111, 135
CAÑIZARES, Eva: 56, 85
CAPEL SALINAS, Juan: 117
CARDO MAYA, Luis: 99
CARNEROS, Elena: 68
CARRASCO ACOSTA, Marina: 54
CASANO, Salvatore: 60
CASANOVAS, María: 87
CASTANDER, Ander: 69
CASTILLO ALONSO, Ana M.^a: 80, 88
CASTRO-RODRÍGUEZ, Vanessa: 47
CAVAZOS GALINDO, Jaime M.: 75
CELESTINO MUR, Cristina: 71, 99, 118
CEREZO, Sergio: 95

CERNADAS, M^a José: 124, 129, 131
CLAVERIA, Elisabet: 87
CODESIDO SAMPEDRO, Verónica: 60
COIG O'DONNELL, Mónica: 134
CORCHETE, Purificación: 112
CÓRDOBA, Fernando: 97
CORREDOIRA, Elena: 58, 108, 124, 129, 131
CORREIA, Sandra: 77, 110
COSTAR CASTÁN, Asún: 88
COUSELO, José Luis: 58
COVELO ABELEIRA, Purificación: 132
CUENCA VALERA, Beatriz: 59
CUSIDO, Rosa M.: 107

D

DABAUZA MICÓ, Mercedes: 125
DE SOUSA, Lucie: 114
DEBIASI, C.: 126
DEL POZO, Juan C.: 45
DI PATRIA, Laura: 48
DÍAZ, Francisco: 85
DÍAZ, Isabel: 65
DÍAZ-VIVANCOS, Pedro: 109
DOLCET-SANJUAN, Ramón: 87, 130

E

EL-TANTAWY, Ahmed A.: 53
ESTEVE, Francisco: 91

F

FAIZE, Lydia: 109, 121
FAIZE, Mohamed: 121
FALTUS, Miloš: 101
FARINHA, N.: 126
FERNÁNDEZ GUIJARRO, Bárbara: 99
FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Leticia: 111

FIGUEIREDO, J.M.T.: 126
FONTICH, Cristian: 87
FRANQUESA, Sandra: 87
FRIERO MOLANO, Eva: 118

G

GAGO MESEJO, Diego: 59
GAGO-CALDERON, Alfonso: 123
GAITE, Adrián: 133,
GALÁN ÁVILA Alberto: 70
GAMBÍN, José M.: 97
GARAVELLO, Miguel F.: 55
GARCÍA ALEDO, Inmaculada: 125
GARCÍA, E.: 73, 84, 127
GARCÍA FERNÁNDEZ, José Luis: 111, 135
GARCÍA-JIMÉNEZ, Pilar: 54
GARCÍA-SOGO, Begoña: 105, 113, 115, 117
GÓMEZ-CADENAS, Aurelio: 53, 100
GÓMEZ-GARAY, Aranzazu: 68, 116, 128
GOMEZ-LIM, Miguel: 106
GONÇALVES, J.C.: 126
GONZÁLEZ BENITO, M. Elena: 89
GONZÁLEZ, Iván: 89
GONZÁLEZ-CABRERO, Nuria: 71

H

HERNÁNDEZ, José Antonio: 109
HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Inmaculada: 99
HIDALGO, Diego: 112

I

IBÁÑEZ, Sergio: 45
IBARRA LÓPEZ, Alejandro: 72
IMBRODA SOLANO, Isabel: 123
ISLAS-FLORES, Ignacio: 76

J

JÁQUEZ GUTIÉRREZ, Marybel: 105, 113, 115, 117
JIMÉNEZ, Carlos: 116
JIMENEZ-DÍAZ, Rafael: 74
JORDÁN BUESO, María José: 125

K

KELLER E. R., Joachim: 40
KHAYREDDINE, Titouh: 95
KREMER, Carolina: 89

L

LALALEO, Liliana: 107
LAVOURA, LM.V.: 126
LLEBRÉS, María Teresa: 47
LOBO, M. Carmen: 86
LÓPEZ, Juan Antonio: 128
LÓPEZ-HERRERA, Carlos: 95, 106
LÓPEZ-PÉREZ, Antonio J.: 97
LORENTE, P.: 73, 84, 127
LOZANO RUIZ, Rafael: 105, 113, 117
LOZOYA SALDAÑA, Héctor: 72

M

MÁCHOVÁ, Pavlína: 101
MANZANERA DE LA VEGA, José Antonio: 116
MARÍN, Juan A.: 73, 84, 127
MARTÍN CALVARRO, Luisa: 116
MARTÍN, Carmen: 74, 89, 90
MARTÍN, Luisa: 128
MARTÍN-CLOSAS, Lluís: 49, 133
MARTÍNEZ CONESA, Cristina: 125
MARTÍNEZ, M.^a Teresa: 58, 108, 124, 129, 131
MARTÍNEZ-LABORDE, Juan Bautista: 90
MARTIN-PIZARRO, Carmen: 57
MARTINS, João: 114

MATEOS-WHITE, Isabel: 112
MAURI, Pedro Vicente: 86
MENDOZA MORALES, Carlos R.: 87, 130
MENDOZA-POUDEREUX, Isabel: 85, 91
MERCADO, José Ángel: 74, 95, 106
MEYER, Stefan: 60
MIRAS-MORENO, Begoña: 48
MOJICA MARIN, Virgilio: 75
MONCALEÁN GUILLEN, Paloma: 69, 92, 93
MONTALBÁN, Itziar Aurora: 69, 93
MORCILLO, Marian: 56, 85
MORENO, Ana: 106
MORENO FERRERO, Vicente: 105, 113, 115
MORENO HERRERA, Alexander: 134
MORENO, Vicente: 117
MORENO-RISUENO, Miguel-Ángel: 45, 78

N

NARVÁEZ, Isabel: 74
NAVARRO-GARCÍA, N.: 97

O

OJEDA ZACARÍAS, M.^a del Carmen: 72, 75
OLIVARES SÁENZ, Emilio: 72
ORLANDO, Leonardo: 56, 85
ORTEGA CALVO, José Julio: 111

P

PADILLA, Isabel M.G.: 94, 123
PALAZON, Javier: 107, 112
PALME, Klaus: 39
PALOMO-RÍOS, Elena: 95, 106
PASCUAL, María Belén: 47
PEDREÑO, María A: 48
PELACHO, Ana María: 49, 133

PELÁEZ, Almudena: 95
PÉREZ, César: 96
PÉREZ, Yolanda: 128
PÉREZ-CLEMENTE, Rosa M.: 100
PÉREZ-PASTRANA, Jacobo: 76
PÉREZ-PÉREZ, Jose Manuel: 45
PÉREZ-PÉREZ, Yolanda: 53, 65, 66, 68
PÉREZ-TORNERO, Olaya: 97
PERIAÑEZ-RODRIGUEZ, Juan: 45
PERIS, Juan Bautista: 56
PINEDA CHAZA, Benito: 105, 113, 115, 117
PINTO, R.F.V.: 126
PINTOS LÓPEZ, Beatriz: 68, 116, 128
PITARCH, Marta: 53
PLIEGO, Clara: 106
PLIEGO-ALFARO, Fernando: 46, 74, 95, 106
PONCE, Lorena: 56
PORCEL ROLDÁN, Rosa: 67
POSÉ PADILLA, David: 57

Q

QUÍLEZ SIMÓN, María: 125

R

R.R., Robaina: 54
RIBEIRO, Inês: 110
RIBELLES ALFONSO, Carlos: 105, 113, 115, 117
RISUEÑO, María-Carmen: 53, 65, 66, 68, 77, 107
RIVAS I SENDRA, Alba: 67, 79
RODRIGUEZ ACEVEDO, Alberto: 132
RODRÍGUEZ PÉREZ, Gilberto: 75
RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, Alba: 113
ROMERO ESPINAR, Pascual: 125
ROURA, Alberto: 96
RUANO-ROSA, David: 106
RUIZ GALEA, Mar: 71, 86, 99, 118

S

- S. PAIS, Maria Salomé: 41
SABATER-JARA, Ana-Belén: 48
SALES, Ester: 85
SAN JOSÉ, M^a del Carmen: 58, 108, 124, 129, 131
SANCHES, Matilde: 77
SÁNCHEZ FERNÁNDEZ, Conchi: 59, 132, 134
SÁNCHEZ LÓPEZ, Jorge: 105, 113
SÁNCHEZ-CORRIONERO, Álvaro: 45, 78
SÁNCHEZ-PUJANTE, Pedro-Joaquín: 48
SÁNCHEZ-ROMERO, Carolina: 98
SANTAMARÍA, Estrella: 65
SANTANA BUZZY, Nancy: 76
SANTOS HALISCAK, José A.: 75
SEGUÍ SIMARRO, Jose María: 67, 70, 79
SEGURA, Juan: 50, 56, 85, 91
SERRANO RUIZ, Hadaly: 49, 133
SLIM AMARA, Hajer: 86
SOLÍS, María Teresa: 53, 65, 66, 91
SOTOMAYOR SÁNCHEZ, José Antonio: 125
SOZZANI, Rossangela: 78
SUÁREZ TOSTE, Emma: 122

T

- TACÁN, Marcelo: 96
TAPIA, César: 96
TESTILLANO, Pilar S.: 53, 65, 66, 68, 77, 91, 107
TORIBIO IGLESIAS, Mariano: 99, 118
TORIBIO, Mariano: 56, 58, 71, 108
TREVÍÑO RAMÍREZ, José E.: 72

V

- VALLES BRAU, M^a Pilar: 80, 88
VARAS, Elena: 58
VÁZQUEZ ALVARADO, Rigoberto E.: 72
VELASCO, Leonardo: 94

VIDAL GONZÁLEZ, Nieves del Pilar: 59, 132, 134

VILARIÑO RODRÍGUEZ, Susana: 135

VILLALOBOS, Nieves: 128

VILLAR MARTIN, Luis M^a: 80

VIVES-PERIS, Vicente: 100

Y

YUSTE-LISBONA, Fernando: 105, 113

Z

ZÁMEČNÍK, Jiří: 101

ŽIŽKOVÁ, Eva: 101

Lista
de participantes

Participants
list

Lista de participantes

A

ARBELOA MATUTE, Arancha arbeloa@eead.csic.es
ARRILLAGA MATEOS, Isabel isabel.arrillaga@uv.es
ATARÉS HUERTA, Alejandro aatares@ibmcp.upv.es
AYED SLAMA, Olfa olfayed@yahoo.fr

B

BÁRÁNY, Ivett yvett@cib.csic.es
BARCELÓ MUÑOZ, Marta marta.barcelo@juntadeandalucia.es
BERENGUER PEINADO, Eduardo eduardoberenguer@cib.csic.es
BONFILL BALDRICH, Mercedes mbonfill@ub.edu
BOUZA MORCILLO, Laura María laura.bouza@iiag.csic.es
BURGOS ORTIZ, Lorenzo burgos@cebas.csic.es

C

CALADO SANCHES, Matilde mat.ltcs@gmail.com
CAMACHO FERNÁNDEZ, Carolina carol.camacho@upv.es
CANHOTO, Jorge jorgecan@uc.pt
CANO GARCÍA, María maria.cano@uv.es
CANO LÁZARO, Vanesa vanesa.cano.lazaro@iiag.csic.es
CANO SHAW, Celia celia.cano.shaw@madrid.org
CANO-RUIZ, Judith judithcanoruiz@gmail.com
CÁNOVAS, Francisco M. canovas@uma.es
CANTOS BARRAGÁN, Manuel cantos@irnase.csic.es
CAÑIZARES RAMOS, Eva ecara2@alumni.uv.es
CARBAJAL CRUZ, Nimbe Nayeli naye_nc25@hotmail.com
CARNEROS, Elena ecarneros@cib.csic.es
CARRASCO ACOSTA, Marina marina.carrasco101@alu.ulpgc.es
CASANOVAS CASTRO, María maria.casanovas@irta.cat
CASTANDER OLARIETA, Ander acastander@neiker.eus
CASTILLO ALONSO, Ana María amcast@eead.csic.es

CELESTINO MUR, Cristina
CODESIDO SAMPEDRO, Verónica
COIG O'DONNELL, Mónica
CORCHETE, Purificación
CORREDOIRA CASTRO, Elena
CRUZ BACALLADO, Martíá Teresa
CUENCA VALERO, Beatriz

cristina.celestino@madrid.org
v.codesido@phytoplant.es
compras@cultesa.com
corchpu@usal.es
elenac@iiag.csic.es
direccion@cultesa.com
bcuenca@tragsa.es

D

DA SILVA MARTINS, João Filipe
DABAUZA MICÓ, Mercedes
DEBIASI, Clayton
DÍAZ RIQUELME, José

joao.martins@uc.pt
mercedes.dabauza@carm.es
claytondebiasi@gmail.com
diaz@provedo.com

E

ESTEVE DÍAZ, Francisco

festeve.diaz@gmail.com

F

FRAGA ARES, Marga
FRIERO MOLANO, Eva María

info@cultigar.es
eva.friero@madrid.org

G

GAGO MESEJO, Diego
GALÁN AVILA, Alberto
GARAVELLO, Miguel Fernando
GARCÍA ALCÁZAR, Manuel
GARCÍA FERNÁNDEZ, José Luis
GARCÍA FERRIZ, José Lorenzo
GARCÍA MARTÍN, María Elena
GÓMEZ GARAY, Aranzazu
GONZÁLEZ BENITO, M^a Elena
GONZÁLEZ CABRERO, Nuria
GONZÁLEZ PADILLA, Isabel María

diego.mesejo@udc.es
albertogalanavila@gmail.com
mgaravello79@gmail.com
manuelgarcia@cristalplant.es
jlgarcia@irnase.csic.es
lgarcia@cotevisa.com
egarcia@eead.csic.es
magom02@bio.ucm.es
me.gonzalezbenito@upm.es
nuriagc15@gmail.com
isabelm.gonzalez.padilla@juntadeandalucia.es

H

HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Inmaculada
HINE GÓMEZ, Ana Lizeth

inmaher.sanchez@madrid.org
ana@hine.co.cr

I

IBARRA HUESA, Manuel
IBARRA LÓPEZ, Alejandro

mibarra@meristec.es
aibarra_lopez@outlook.com

PÉREZ CLEMENTE, Rosa María
PÉREZ PASTRANA, Jacobo
PÉREZ PÉREZ, Yolanda
PÉREZ RUIZ, César
PÉREZ TORNERO, Olaya
PINTOS LÓPEZ, Beatriz
PLIEGO ALFARO, Fernando
POSÉ PADILLA, David

rosa.perez@uji.es
jacoboperezpastrana@gmail.com
yperez@cib.csic.es
cesar.perez@upm.es
olalla.perez@carm.es
bpintos@ucm.es
ferpliego@uma.es
dpose@uma.es

R

RIBELLES ALFONSO, Carlos
RISUEÑO ALMEIDA, María del Carmen
RODRÍGUEZ ALCARAZ, Ana Belén
ROJAS VARGAS, Alejandra
RUIZ DE GAUNA GUTIÉRREZ, Gonzaga
RUIZ GALEA, María del Mar

carrial1@etsmre.upv.es
risueno@cib.csic.es
a.rodriiguez@dummenorange.com
alejandra.rojas.vargas@una.cr
gruizgauna@invegen.org
mdelmar.ruiz@madrid.org

S

S. TESTILLANO, Pilar
SAN JOSÉ CAPILLA, María del Carmen
SÁNCHEZ CORRIONERO, Álvaro
SANCHEZ FERNÁNDEZ, Conchi
SÁNCHEZ-ROMERO, Carolina
SANTON, Nathalie
SEGUÍ SIMARRO, Jose María
SEGURA GARCÍA DEL RÍO, Juan
SERRANO RUIZ, Hadaly
SLIM AMARA, Hajer
SOLER CALVO, Nuria

testillano@cib.csic.es
sanjose@iiag.csic.es
alvaro.scorrionero@upm.es
conchi@iiag.csic.es
c.sanchez@uma.es
nathalie.santon@vilmorin.com
seguisim@btc.upv.es
juan.segura@uv.es
hadaly.serrano@hbj.udl.cat
amarahajer@yahoo.fr
nuria.soler@granadacoating.com

T

TINEO GARCÍA, Lorena
TORIBIO IGLESIAS, Mariano

lorena.tineo@itson.edu.mx
mariano.toribio@madrid.org

V

VALLES BRAU, María Pilar
VIDAL GONZÁLEZ, Nieves del Pilar
VILARIÑO RODRÍGUEZ, Susana
VIVES-PERIS, Vicente

valles@eead.csic.es
nieves@iiag.csic.es
svilarino@algor.com
vvives@uji.es

Z

ZIZKOVA, Eva

zizkova@vulhm.cz

ORGANISED BY:



CAMPUS
DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL



SPONSORS:



CAMPUS
DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

