

**“Retos del cultivo de tejidos vegetales
en la era de la bioeconomía”**

11-13 de septiembre de 2019
Palacio de Congresos Villasuso
Vitoria-Gasteiz (Álava)



SECIVTV2019

“Retos del cultivo de tejidos vegetales en la era de la bioeconomía”

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

Vitoria-Gasteiz

11-13 de Septiembre 2019

September 11-13, 2019

Organiza | Organized by
NEIKER-Tecnalia (Instituto Vasco de I+D Agrario)

ISBN: 978-84-09-13383-3

Dep. LEGAL: BI-1285-2019

Índice General

6	Presentación
7	Comités
11	Programa científico
21	Conferencias plenarias
27	Conferencias invitadas
39	Comunicaciones póster
107	Índice de autores



Presentación

La Sociedad Española de Cultivo In vitro de Tejidos Vegetales (SECIVTV) os invita a participar en su XIII Reunión que va a tener lugar en Vitoria-Gasteiz, entre los días 11 y 13 de septiembre de 2019, organizada por NEIKER-TECNALIA. Bajo el lema "Retos del cultivo de tejidos vegetales en la era de la bioeconomía", la reunión va a tratar los temas más actuales en la investigación del cultivo in vitro de plantas, mediante conferencias magistrales, ponencias invitadas y sesiones orales. El congreso va a reunir expertos en diferentes áreas relacionadas con nuestro ámbito de trabajo tales como, el Cultivo in vitro en la era de las -ómicas, la mejora genética y epigenética, la organogénesis y embriogénesis somática y la conservación de recursos genéticos. Además, hemos pensado en una sesión denominada "del laboratorio a la empresa" donde hablaremos de algunas estrategias para el escalado de los procedimientos desarrollados en los laboratorios de investigación. En el nombre de la SECIVTV, el comité organizador os da la bienvenida a Vitoria y os anima a que participéis activamente de todas las sesiones contribuyendo a crear un cálido ambiente de ciencia para el progreso.

Isabel Arrillaga
Presidenta de la SECIVTV



COMITÉ ORGANIZADOR Y CIENTÍFICO

ORGANIZING
AND SCIENTIFIC
COMMITTEE

Comité organizador

Organizing committee

Paloma Moncaleán (NEIKER-Tecnalia)
Itziar A. Montalbán (NEIKER-Tecnalia)
Ander Castander (NEIKER-Tecnalia)
Maiara Marqués (NEIKER-Tecnalia)
Iranzu Telletxea (NEIKER-Tecnalia)

Comité científico
Scientific committee

Isabel Arrillaga (Universidad de Valencia)
Lorenzo Burgos (CEBAS-CSIC)
Mariano Toribio (IMIDRA)
Fernando Pliego (Universidad de Málaga)
Juan Marín (EEAD)
Jesús Jorrín (Universidad de Córdoba)
Pilar Testillano (CIB-CSIC)
Elena Corredoira (IIAG-CSIC)



PROGRAMA

PROGRAMME



Programa Científico

Miércoles, 11/09/2019

08:00 - 09:00 Registro y entrega de documentación.

09:00 - 10:00 **Conferencia Inaugural**
 "Edición de genes mediante transformación de explantes y transfección de protoplastos con CRISPR/Cas".
 Vicente Moreno (IBMCP-CSIC, Valencia).

10:00 - 10:30 **Inauguración congreso.**

10:30 - 12:45 **Sesion I: Cultivo in vitro en la era de las -ómicas**

Moderador: Lorenzo Burgos

10:30 - 11:15 "Investigación molecular en el área del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales: un reto para cualquier época".
 Jesús Jorrín (Universidad de Córdoba).

11:15 - 12:00 Café y Pósters.

12:00 - 12:30 «Proteomic and transcriptomic profiling of embryogenic competence acquisition in tamarillo somatic embryogenesis».
 Sandra Correia (Universidade Coimbra).

12:30 - 13:30 **Discusión Póster Sesión Temática I**

Moderadores: Lorenzo Burgos / Benito Pineda

Stage and tissue-specific expression analysis of two miRNAs and their targets during *Solanum betaceum* Cav. (tamarillo) somatic embryogenesis.
 Miguel Rito, Sandra Correia, Jorge Canhoto.

Functional validation of candidate miRNAs in the regulation of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) regeneration processes.
 Daniela Cordeiro, Sandra Correia, Jorge Canhoto.

Poligalacturonasa FaPG1 y CRISPR/Cas9: Editando la firmeza del fruto de fresa.
 Gloria López-Casado, Estrella Salcedo, Pablo Ric-Varas, Antonio J. Matas, José A. Mercado.

Transformación de olivo con el gen AtNPR1 para inducir tolerancia a patógenos fúngicos.
 Isabel Narváez, Clara Pliego, Elena Palomo-Ríos, Louis Fresta, Rafael Jiménez-Díaz, Jose Luis Trapero-Casas, Carlos López-Herrera, Juan M. Arjona-López, Jose Angel Mercado, Fernando Pliego-Alfaro.

Genetic transformation of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.)
 Somatic embryos with a gene encoding a Gnk2 protein.
 María Teresa Martínez, Susana Serrazina, Rita Lourenço Costa, Francisco Javier Vieitez, María del Carmen San José, Elena Corredoira.

Miércoles, 11/09/2019

Estudio de las variaciones en el perfil hormonal, proteómico y fenólico en embriones somáticos de encina (*Quercus ilex* L) elicitados y sometidos a estrés biótico.

Marian Morcillo, Rosa Sánchez-Lucas, Álex Alborch, Kamilla Carvalho, Ana Patricia Martínez, Alberto Guillén, Ester Sales, Jesús V. Jorrín-Novó, Juan Segura, Isabel Arrillaga.

El estrés térmico determina la organización celular y el perfil metabólico durante la iniciación de la embriogénesis somática en *Pinus radiata*.

Ander Castander-Olarieta, Itziar Aurora Montalbán, Eliana de Medeiros Oliveira, Emilia Dell'aversana, Luisa D'amelia, Petronia Carillo, Neusa Steiner, Hugo Pacheco de Freitas Frata, Miguel Pedro Guerra, Tomás Goicoa, María Dolores Ugarte, Catia Pereira, Paloma Moncaleán.

13:30 - 15:00 Comida.

15:00 - 17:30 **Sesión II: Mejora genética y epigenética**

Moderadora: Olaya Pérez-Tornero

15:00 - 15:30 «Las líneas dobles haploides en la mejora genética».

José María Seguí (Universidad Politécnica de Valencia).

15:30 - 16:00 «Epigenetic memory affects bud phenology in *Picea abies*»

Elena Carneros (CIB-CSIC).

16:00 - 16:30 «Inducción de la embriogénesis de la microspora en trigo mediante modificaciones epigenéticas». Pilar Vallés (EEAD).

16:30 - 17:00 "Approach to apomixis by culturing the fern gametophyte".

Helena Fernández (Universidad de Oviedo).

17:00 - 17:30 «Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming and totipotency to improve microspore embryogenesis in crop and forest species».

Pilar Testillano (CSIC).

17:30 - 18:15 Pausa Café y Pósters.

Miércoles, 11/09/2019

18:15 - 19:30

Discusión Póster Sesión Temática II

Moderadores: J. María Seguí / Pilar Testillano

Incremento de tolerancia a salinidad en patrones de cítricos mediante mutación por rayos gamma.

Margarita Pérez-Jiménez, Fernando Córdoba, Antonio José López-Pérez, Montserrat Moreno, Carmen Maxi Rodríguez, Olaya Pérez-Tornero.

Caracterización fenotípica, celular y genética de un mutante de tomate con desarrollo helicoidal.

Marybel Jazquez, Alejandro Atarés, Benito Pineda, Carlos Ribelles, Begoña García-Sogo, Carmen Capel, Fernando J. Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno.

Genetically engineered resistance to sharka disease in apricot.

Nuria Alburquerque, Lydia Faize, Vicenza Ilardi, Lorenzo Burgos.

Cell culture initiation from isolated tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) protoplasts.

Joana Puga, Sandra Correia, Jorge Canhoto.

Obtención de plantas compuestas de olivo mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes*.

Elena Palomo-Ríos, Isabel Narváez, Marina Yébenes, Naima Gouffi, Adela Zumaquero, Clara Pliego, Jose Angel Mercado, Fernando Pliego-Alfaro.

Identificación de modificadores epigenéticos que actúan como inductores de la embriogénesis de la microspora en trigo.

Isabel Valero Rubira, Ana M. Castillo Alonso, M. Pilar Vallés Brau.

High temperatures during maturation produce different somatic embryo morphologies and yields in *Pinus* spp.

Antonia Maiara Marques Do Nascimento, Paloma Moncaleán, Ander Castander Olarieta, Itziar Aurora Montalbán.

La mutación Arlequín confiere cambios en la arquitectura radicular y mayor tolerancia a estrés.

Carlos Ribelles Alfonso, Begoña García-Sogo, Alejandro Atarés Huerta, Fernando J. Yuste-Lisbona, Laura Castañeda Cruz, Carmen Capel Salinas, Rafael Lozano Ruiz, Vicente Moreno Ferrero, Benito Pineda Chaza.

Embriogénesis somática, priming y termotolerancia en pino marítimo.

Ester Sales, Amparo Perez, Álex Alborch, Juan Segura, Isabel Arrillaga.

Effects of environmental stress in *Pinus halepensis* somatic embryogenesis.

Cátia Pereira, Itziar A. Montalbán, Tomás Goicoa, María Dolores Ugarte, Sandra Correia, Jorge Canhoto, Paloma Moncaleán.

19:30

Pintxos y Potes en el Palacio Villasuso / Plaza del Matxete.

Jueves, 12/09/2019

09:00 - 09:45 **Conferencia Magistral**
«Opportunities and challenges of tissue culture in forest trees with a focus on conifers».
Jean François Trontin (FCBA)

09:45 - 12:35 **Sesión III: Organogénesis y Somatic Embriogénesis: bases fisiológicas**

Moderadora: Conchi Sánchez

09:45 - 10:15 "Embriogénesis somática de alcornoque (*Quercus suber* L) en medio líquido"
("Cork oak *Quercus suber* Embryogenic Liquid Cultures").
Maria del Mar Ruiz Galea. (I.M.I.D.R.A.)

10:15 - 13:15 **Discusión Póster Sesión temática III**

Moderadores: Araceli Barceló / Conchi Sánchez / José A. Mercado

Micropropagación de *Sedum sediforme* y *S. album*, una estrategia rápida y eficiente para multiplicación a gran escala de estas especies.

Begoña García-Sogo, Carlos Ribelles Alfonso, Gökhan Gökmen, Benito Pineda Chaza, Salvador Soler Aleixandre, Vicente Moreno Ferrero.

Efecto de la concentración de auxina y de la presencia de derivados de las difenilureas en el enraizamiento adventicio de brotes castaño y roble.

Jesús M Vielba Villegas, Nieves Vidal González, Ada Ricci, Ricardo Castro Camba, Purificación Covelo Abeleira, M. Carmen San-Jose Capilla, Conchi Sánchez Fernández.

Pulsos con 2,4-D estimulan la organogénesis en *Prunus spp.*

Elisabeth Carmona-Martín y César Petri.

Estudio preliminar de la influencia de las poliaminas sobre la regeneración adventicia de explantos de limonero.

Virginia Celdrán-Sánchez, Nuria Navarro-García, Fernando Córdoba, Antonio López-Pérez, Yolanda Jiménez, Margarita Pérez-Jiménez, Olaya Pérez-Tornero.

Effect of the invasive *Caulerpa cylindracea* and *Asparagopsis taxiformis* seaweeds extracts on the in vitro plant regeneration and crop protection.

Nuria Albuquerque, Lydia Faize, Mohamed Faize, Maria Dolores Nortes, Jaime Bernardeau, Juan Manuel Ruiz-Fernández, Lorenzo Burgos.

Estudio de la osmolalidad interna y del medio en el cultivo *in vitro* de microsporas.

Antonio Calabuig-Serna, José María Seguí-Simarro.

Influencia del tipo de iluminación LED en la micropropagación del patrón de pistacho UCB1.

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

Efecto de la iluminación LED sobre la fase de multiplicación *in vitro*.

Marta Barceló Muñoz, Alfonso Gago-Calderón, Araceli Barceló Muñoz.

Morphological and physiological evaluation of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) somatic embryogenesis-derived plants.

Mariana Correia, Sandra Correia, Jorge Canhoto.

Jueves, 12/09/2019

Developing scale-up systems for the *in vitro* multiplication of tamarillo using temporary immersion bioreactors.

Ana Puga, Sandra Correia, João Martins, Clayton Debiassi, Jorge Canhoto.

Changes in pectin methylesterification and AGPs indicate remodeling of cell wall during somatic embryogenesis of *Quercus suber*.

Elena Carneros, Yolanda Pérez-Pérez, Eduardo Berenguer, María-Teresa Solís, Ivett Bárány, Beatriz Pintos, Aránzazu Gómez-Garay, María C. Risueño, Pilar S. Testillano.

Evaluation, micropropagation and selection of tamarillo plants (*Solanum betaceum* Cav.)

Tércia Lopes, Sandra Correia, Daniel Martín, Paula Marques, Jorge Canhoto.

11:15 - 11:45

Pausa Café y Pósters.

Establecimiento *in vitro* de material seleccionado de Teca (*Tectona grandis* Linn) procedente de Plantaciones Forestales del Pacífico Sur de Costa Rica

Alejandra Rojas Vargas, Ana Hine Gómez, Maricruz Torres Mendoza, Lucía Jiménez Corrales.

Efecto de la sacarosa sobre el crecimiento, estrés y contenido en azúcares en brotes de *Castanea sativa* x *C. crenata* cultivados en sistemas de inmersión temporal y continua.

Diego Gago Mesejo, Conchi Sánchez Fernández, Anxela Aldrey Villar, Beatriz Cuenca Valera, M^a Ángeles Bernal Pita da Veiga, Nieves Vidal González.

Proembryogenic masses from anther culture show cellular markers of early zygotic embryos in *Cucumis sativus*

Sara Bagheri, Ivett Bárány, Eduardo Berenguer, Mahmoud Lotfi, Mehran E. Shariatpanahi, Pilar S. Testillano.

El Sistema de Inmersión Temporal aplicado al cultivo *in vitro* del patrón de pistacho UCB1.

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

La inhibición de histona desacetilasas provoca un aumento de la competencia embriogénica en microsporas de colza.

Patricia Corral-Martínez, Ricardo Mir, José M. Seguí-Simarro.

Embriogénesis de microsporas: estudiando la relación de la respuesta al estrés y el destino celular.

Patricia Corral-Martínez, Carolina Camacho-Fernández, Ignacio Lorente-Castro, Kim Boutilier, José M. Seguí-Simarro.

In vitro morphogenesis in cultured explants of *Pinus halepensis* adult trees.

Jéssica Tavares, Cátia Pereira, Itziar A. Montalbán, Sandra Correia, Paloma Moncaleán, Jorge Canhoto.

Introducción *in vitro* de diferentes genotipos utilizados como portainjertos en cultivos comerciales de aguacate (*Persea americana* Mill.).

Lina María Arbelaez Galvis, Diana María Cano Martínez, Aura Ines Urrea Trujillo.

Microinjerto de *Morus nigra* sobre *Morus alba*.

Juan Luis Fernández-Lorenzo, Alba Noelia Prado Vázquez, Nuria Ferreiro Domínguez, Rosa Mosquera Losada, Pilar González Hernández, Antonio Rigueiro Rodríguez, Rosa Romero Franco, J. Javier Santiago Freijanes.

Jueves, 12/09/2019

Mejora genética de cítricos asistida con marcadores moleculares.

Pablo Aleza, Andrés García-Lor, María Hernández, José Cuenca, Luis Navarro.

12:00 - 13:00

Sesión IV: Metabolismo Secundario

Moderadora: Isabel Arrillaga

«Producción biotecnológica de fármacos y biofármacos en cultivos de células y órganos vegetales».

Javier Palazón (UB).

«Efecto del estrés lumínico sobre el crecimiento y el metabolismo secundario, en cultivos celulares vegetales».

Luisa Rojas (Grupo de Biotransformación Universidad de Antioquia).

13:30 - 14:00

Discusión Póster Sesión temática IV

Moderadores: Isabel Arrillaga / Javier Palazón

Optimización de la callogénesis en *Stevia rebaudiana* (Bert.) para establecimiento de cultivos celulares.

Susana Vilariño Rodríguez, José Luis García Fernández, Manuel Cantos Barragán.

Production of *Silymarin flavonolignans* in metabolically engineered plant cell suspension cultures of *Silybum marianum*.

Purificación Corchete, Antonio Ibarlucea, David Villar, Lorena Almagro, Javier Palazón.

Biomass and cannabinoids content increases by using flowering *Cannabis sativa* L. proceeding from *in vitro* vs. *in vivo* plantlets.

Verónica Codesido Sampedro, Carlos Ferreiro Vera.

Botanical, chemical and genetic characterization of a 235-year old historical herbarium sample of *Cannabis sativa* L. cultivated in Alava. Proposed efforts for the *in vitro* generation of live tissue from achenes.

Guillermo Moreno, Javier Gamboa, Tomás E. Díaz, Paloma Moncaleán.

Estrategia biotecnológica para incrementar la producción de oxi-resveratrol mediante cultivo *in vitro* de morera.

Isabel Nicolás Sánchez, Laura di Patria, Pedro Joaquín Sánchez Pujante, M^a Ángeles Pedreño, Ana Belén Sabater Jara.

Análisis del perfil génico y su relación con la producción de compuestos terpénicos en cultivos celulares de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom sometidos a elicitación.

María Borja-Martínez, María J. Marín-Marín, María A Pedreño, Ana B. Sabater-Jara.

Eventos de señalización temprana en suspensiones celulares de brócoli elicidadas con coronatina.

Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Karla Daniela Pavón Ramón, Sarai Belchí Navarro, Lorena Almagro, Ana Belén Sabater-Jara, María Borja Martínez, M^a Ángeles Pedreño.

Jueves, 12/09/2019

14:00 - 15:30 Comida.

15:45 - 17:45 **Sesión V: Conservación de recursos**

Moderadoras: Elena Corredoira / Itziar Montalbán

15:45 - 16:15 «Conservación de germoplasma de especies leñosas mediante técnicas biotecnológicas». Elena Corredoira (IIAG-CSIC).

16:15 - 16:45 Conservación de recursos genéticos forestales a bajo coste: utopía o realidad?. Itziar Montalbán (NEIKER).

16:45 - 16:55 **Discusión Póster Sesión temática V**

Análisis fenotípico de plantas regeneradas a partir de embriones somáticos crioconservados. José Manuel Cereto Blanco, Carolina Sánchez Romero.

Manejo y conservación del polen de teca (*Tectona grandis* L). Ana Hine Gómez, Alejandra Rojas Vargas, Olman Murillo Gamboa

16:55 - 17:30 Café.

17:30 - 18:00 Asamblea Ordinaria.

18:00 - 18:30 Asamblea extraordinaria.

19:00 Visita guiada del casco histórico de la ciudad de Vitoria-Gasteiz.

21:00 Cena Congreso. Restaurante EL PORTALÓN.

Viernes, 13/09/2019

09:00 - 09:45 **Conferencia Magistral:** "El cultivo *in vitro* de plantas: algo más que micropropagación".
Juan Marín (EEAD).

09:45 - 12:10 **Sesión VI: Del laboratorio a la empresa**

Moderador: Alejandro Atarés

09:45 - 10:30 «Plant tissue culture to support Nestlé's Nescafé and Cocoa Plants».
Jean-Paul Ducos (Nestlé).

10:30 - 10:50 «Herramientas de inteligencia artificial y de diseño experimental aplicadas al cultivo *in vitro*: nuevas tecnologías para viejos problemas».
Pedro Pablo Gallego (Universidad de Vigo).

11:00 - 11:45 Café y Pósters.

11:45 - 12:30 **Discusión Pósters Sesión temática VI**

Moderadores: Alejandro Atarés / Beatriz Cuenca

Adaptación de un protocolo de micropropagación adquirido al sistema productivo en un laboratorio comercial en un clon de granado (*Punica Granatum*).

Inés Mataix Valero, Josefa Fernández Fernández, Elena García Martín, María Pilar Lorente Alonso, Arancha Arbeloa Matute.

Introducción de plantas carnívoras en cultivo *in vitro*.

Alberto Coronado, Marybel Jáquez, Vicente Moreno, Alejandro Atarés.

Estratificación en frío: Un método simple de mejorar la conversión de embriones somáticos de *Pinus taeda* a plantas.

Yenny Lineros, Sandra Marín, Ximena Muñoz

¿Puede el CTV apoyar las bioeconomías regionales? Casos exitosos en Argentina.

Sandra Sharry, Patricia Boeri, Sebastián Galarco.

Transferencia del laboratorio al vivero comercial: propagación masiva del patrón de pistachero UCB-1.

José Díaz-Riquelme, Elena García, Pilar Lorente, Juan A. Marín, Arancha Arbeloa

Improving a culture medium for Bryophyllum spp: role of micronutrients.

Samuel L. Novoa, Pascual Pérez-García, Pedro P. Gallego, M. Esther Barreal

Design of culture medium for the rooting of a recalcitrant chestnut clone.

Aida López-Díaz, Alejandro Pérez-Martínez, Laura Iglesias-Bernabé, Margarita Fraga, M. Esther Barreal, Pedro P. Gallego.

Tissue culture of ornamental native species from Argentina as a market innovation.

Maite Romero Alves, Tatiana Cinquetti, Mariano Velázquez, Sebastián Galarco, Diego Ramilo, Sandra Sharry.

12:30

Clausura.



CONFERENCIAS PLENARIAS

PLENARY CONFERENCES



Edición de genes mediante transformación de explantes y transfección de protoplastos con CRISPR/Cas

Vicente Moreno Ferrero

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

Email de contacto: asun.lopez@topcongress.es

El sistema inmune CRISPR consta básicamente de dos elementos: los loci genómicos CRISPR y sus nucleasas asociadas (Cas). En 2005, el Dr. Mojica y sus colaboradores encontraron unas secuencias muy extrañas en el genoma de una arquea que medra en las salinas de Santa Pola. Poco después se descubrió que estas secuencias forman parte de un sistema de defensa de las bacterias y arqueas contra la invasión de material genético de virus. En 2012, se publicó la primera edición genómica con CRISPR/Cas. En tan solo seis años este sistema ha conducido a un salto cualitativo en la biotecnología vegetal. Esta técnica se utiliza habitualmente para generar mutaciones en secuencias codificadoras, pero se puede emplear también para modificar secuencias reguladoras que son las que han tenido un mayor papel en la evolución, domesticación y mejora. En particular, el uso de vectores con varios RNAs permite generar múltiples variantes alélicas para el promotor de un gen, lo que tiene una gran relevancia a nivel básico y aplicado. Además, la disponibilidad de métodos de regeneración de plantas a partir de protoplastos permite abordar la edición genómica mediante transfección, lo que conduce a la modificación genética deseada sin integración del vector.

Investigación molecular en el área del cultivo in vitro de tejidos vegetales: un reto para cualquier época

Jesús V. Jorrín Novo

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba,
UCO-CeiA3

Email de contacto: bf1jonoj@uco.es

Los avances en el campo de la biología molecular, en especial las aproximaciones -ómicas y su integración con otras más clásicas, hacen posible que las técnicas de cultivo in vitro de tejidos y células vegetales se apoyen en el conocimiento y la predicción más que en el empirismo. Esta la idea que pretendo desarrollar durante la reunión, ilustrándola con trabajos en los que se ha utilizado una aproximación de proteómica con diferentes sistemas vegetales, incluyendo suspensiones celulares de alfalfa y embriones somáticos de palmera datilera y encina. Se discutirán las ventajas y limitaciones de la aproximación proteómica y la necesidad de integración con datos fenotípicos, de fisiología y otras aproximaciones -ómicas, en la dirección de la biología de sistemas.

Opportunities and challenges of tissue culture in forest trees with a focus on conifers

Jean-François TRONTIN

FCBA Technological Institute, Biotech & Advanced Forestry department, 71,
Route d'Arcachon – Pierroton, F-33610 Cestas, France.

Contact email: jean-francois.trontin@fcba.fr

Forests and forest-wood sector are considered as key players towards de-carbonation of the economy worldwide and mitigation of climate change. It is the dynamic forest management for wood production that would likely contribute to reduce (carbon sequestration) or prevent greenhouse gas emission (material and energy substitution) while increasing the flexibility to adapt forests to climate change. Intensively managed plantation forests are expected to play a major role, especially faster-growing and more successful conifers for reforestation. This will require however significant capacity to produce high-quality seedlings at reduced cost.

Reproduction strategies of selected varieties based on vegetative propagation may therefore become more essential in the near future to continuously improve upon wood biomass production. Micropropagation technologies are promising for scaling-up the production of many forest tree species, especially conifers. However, forest biotechnologists are facing recurrent problems for decades, i.e. low genotype capture and yield during the process and poor plant quality compared to reference seedlings. The presentation will highlight some ongoing tissue culture strategies and challenges to make biotech forest a reality in the bioeconomy era.

El cultivo in vitro de plantas: algo más que micropropagación

Juan A. MARÍN

Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza

Email de contacto: jmarin@eead.csic.es

El cultivo in vitro es una técnica tremendamente versátil y flexible y que requiere un equipamiento relativamente modesto y accesible. En el conjunto de grupos de investigación, sirve como herramienta para muy diferentes fines. Indudablemente, la micropropagación o propagación masiva, es la aplicación más importante, no solo comercialmente, sino como una herramienta de apoyo para las demás aplicaciones. Pero en esta exposición nos extenderemos en tres temas: Organogénesis, Selección Precoz y Transferencia de Conocimiento.

Organogénesis. La formación de nuevos órganos, como brotes y raíces, hace posible la micropropagación y la regeneración de plantas a partir de células y tejidos selectos, aquí mostraremos cómo suceden a un nivel morfológico. La regeneración de yemas adventicias a partir de tejidos de hojas, que dará lugar a nuevos brotes, es un modelo que se ha utilizado muy frecuentemente en cultivo in vitro. Las hojas, forman un callo desorganizado que se desarrolla y da lugar a la formación del ápice meristemático. Partiendo del callo como un tejido muy esponjoso se pasa a una compactación de las células y posteriormente a la formación de una capa a modo de cutícula que cubre estas células. Finalmente, las divisiones celulares en la epidermis y en las capas celulares inmediatamente inferiores da lugar a una estructura de ápice meristemático. Este patrón de regeneración indirecta es aplicable a las especies frutales. Sin embargo, plantas modelo, como la violeta africana (*Saintpaulia ionantha* J.C. Wendl), permiten la regeneración directa de brotes a partir de los tejidos foliares. En el caso de las raíces adventicias formadas en la base de las microestaquillas, su origen es interno. El cambium origina células meristemáticas que se organizan en ápices radicales y después como nuevas raíces. **Selección precoz.** El cultivo in vitro permite utilizar como material experimental modelos de organización más simplificados que la planta entera. En nuestro caso, hemos utilizado las raíces aisladas como modelo experimental y hemos reproducido in vitro la respuesta que el árbol frutal tiene en campo, reduciendo el tiempo de respuesta a un estrés abiótico: la salinidad. Además, los cultivos más sensibles acumularon más granos de almidón en sus células que los más tolerantes. Por otra parte, la prolina exudada era más concentrada a medida que aumentaba la concentración de sal y los cultivos más tolerantes exudaban más prolina que los más sensibles. Y estas concentraciones estuvieron muy relacionadas con el contenido interno de prolina en las raíces.

Transferencia de Conocimiento. Hay que destacar como claves 1) la comunicación con la empresa, 2) establecer cual es el "éxito tecnológico" de la transferencia, 3) la diversidad de las empresas y 4) la dificultad para fijar el valor de la transferencia, ya que no hay referencias normalizadas. La participación creciente de las empresas como parte activa en proyectos de investigación o de innovación nos fuerza a quienes trabajamos en "Ciencia Orientada" a adaptarnos a esta realidad.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056- C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A12_17R).

Plant tissue culture to support Nestlé's Nescafé and Cocoa

BRETON David, GUILLOU Caroline, FILLODEAU Audrey, DUCOS Jean-Paul

Nestlé Research–Plant Science Research Unit. 101 Avenue Gustave Eiffel, Notre Dame D'Oé,
BP 49716, 37097 Tours Cedex 2, FRANCE.

Contact email: Jean-paul.ducos@rdto.nestle.com

Abstract – Coffee and cocoa are threatened by many factors such as aging trees and increasing exposure to biotic and abiotic stresses. In 2010, Nestlé launched two major sustainability initiatives to tackle this situation: the Nescafé and the Cacao plans. One of the objectives was the distribution to farmers of selected varieties. To support these projects, Nestlé-PSRU developed an expertise in in vitro mass propagation for the both species. The process, based on somatic embryogenesis, was scaled-up up in liquid medium cultures. We will describe in details this propagation method applied to the both species, as well as its state-of-the-art and limits.



CONFERENCIAS INVITADAS

INVITED
CONFERENCES

Proteomic and transcriptomic profiling of embryogenic competence acquisition in tamarillo somatic embryogenesis

Sandra CORREIA, Jorge CANHOTO

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

Email de contacto: sandraimc@ci.uc.pt

Plant somatic embryogenesis (SE) is a developmental pathway in which a somatic cell acquires totipotency and evolves into an embryo. Our group has developed effective protocols for SE in the solanaceous tree tamarillo (*Solanum betaceum*). Tamarillo SE induction is achieved through a two-step process, by exposing leaf segments or mature zygotic embryos to MS media with an auxin and high concentrations of sucrose and by transferring the induced embryogenic cells (EC) to auxin-free medium to allow somatic embryos development. Tamarillo's SE is also an efficient system for molecular analyses and experimental embryology approaches. Based on this system, comparative proteomic and transcriptomic profiles were obtained for tamarillo's EC and non-EC cells. The results obtained reveal a better ability of EC to regulate the effects of stress conditions through an increased expression of heat-shock and energy metabolism-related proteins. The differential expression of several transcription factors and specific families of miRNAs in EC and NEC also reveals a strong epigenetic regulation of cell commitment to embryogenic competence. These results allow the formulation and test of various novel fundamental hypotheses regarding the induction of SE.

Las líneas dobles haploides en la mejora genética

Jose María SEGUÍ SIMARRO

COMAV - Universitat Politècnica de València, Edificio 8E - Acceso I. c./ Ingeniero Fausto Elio, s/n,
46011 Valencia. SPAIN.

Email de contacto: seguisim@btc.upv.es

Las líneas dobles haploides (DHs) son líneas de individuos 100% homocigotos provenientes de la duplicación de un genoma haploide. Esta característica les hace ser muy útiles como herramientas para acelerar el proceso de obtención de semilla híbrida, y también para facilitar otra serie de procesos también relacionados con la mejora. Existen diversas aproximaciones biotecnológicas, tanto in vivo como in vitro, para obtener DHs en distintas especies a partir de sus gametos masculinos o femeninos, o de sus precursores, pero por desgracia todavía son muchas en las que no es posible obtenerlas. Por este motivo, diversos grupos de investigación se dedican a su estudio y al desarrollo de metodologías para obtenerlas utilizando diversos abordajes celulares, moleculares y genéticos.

La aproximación más utilizada en la actualidad para obtener DHs consiste en tratar de inducir que las microsporas (precursores del gameto masculino) se desarrollen como un embrión haploide, y después duplicar su genoma para convertir el embrión en DH. Entender exactamente qué le sucede a la microspora para acabar convirtiéndose en un embrión es la clave para poder hacer este proceso posible en aquellas especies donde aún no lo es, y para hacer el proceso más eficiente en aquellas donde, siendo posible, el rendimiento es aún bajo. En los últimos años se han realizado una serie de estudios que han permitido avanzar en la comprensión de este cambio en el programa de desarrollo de la microspora. Por ejemplo, la relación entre la inducción de embriogénesis y la alteración de los niveles de calcio intracelular, que induce la generación de paredes celulares anormales, con una composición alterada de calosa y celulosa, lo cual a su vez tiene un efecto clave en la viabilidad de las microsporas cultivadas in vitro, y en su posterior desarrollo como embriones.

Epigenetic memory affects bud phenology in *Picea abies*

Elena CARNEROS⁽¹⁾⁽²⁾, Marcos VIEJO⁽²⁾, Nina NAGY⁽²⁾, Kaia SLÅGEDAL⁽³⁾, Torstein TENGS⁽²⁾⁽³⁾, Hugh CROSS⁽²⁾, Igor YAKOVLEV⁽²⁾, Jorunn E. OLSEN⁽³⁾, Carl Gunnar FOSSDAL⁽²⁾

⁽¹⁾ Biological Research Centre (CIB), Spanish Research Council (CSIC), Madrid, Spain.

⁽²⁾ Norwegian Institute of Bioeconomy Research (NIBIO), Ås, Norway.

⁽³⁾ Department of Plant Sciences, Norwegian University of Life Sciences (NMBU), Ås, Norway.

Contact Email: ecarneros@cib.csic.es

In northern regions *Picea abies* is subjected to strong seasonal environmental changes that require a precise synchronization of the annual growth-dormancy cycle in order to grow and survive. Some crucial phenological traits associated to the latitude such as bud burst timing are influenced by the temperature sum during zygotic embryogenesis forming a long-lasting epigenetic memory phenomenon. Similarly, during somatic embryogenesis at different epitype inducing temperatures (EpI) lay down an epigenetic memory generating warm (WE) and cold epitypes (CE). The resulting plants behave much like latitudinal ecotypes, differing in the timing of spring bud burst and bud set in the autumn.

Despite the increasing evidence of an epigenetic impact on bud phenology in different plant species, little is known about the induction and persistence of the epigenetic memory from a molecular perspective. To elucidate the mechanisms involved, 16-year old clonal WE and CE individuals growing in a field in Ås, Norway (69°N latitude) were studied using several approaches: (a) a phenological study of the bud burst timing, (b) gene expression analysis by qRT-PCR of genes associated with bud phenology and with the epigenetic machinery in buds and last year's needles harvested before and during bud burst, and from isolate defined cells types of buds collected in early spring before bud burst and (d) RNAseq transcriptomic analysis in buds harvested in early spring before bud burst.

The timing of phenology showed differential time of bud swelling and bud burst in the epitypes with the CE being advanced compared to WE. The two epitypes exhibited different expression pattern of the candidate genes selected in buds and last year's needles but also cell type specific differences. The transcriptome differences also reflected the phenological observations at gene expression level. CE individuals are enriched in the up-regulation of cell cycle controlling genes, translational activity and epigenetic players. The results demonstrate that the epigenetic memory of temperature during embryogenesis affects the transcriptome and bud phenology and confirm the long-lasting persistence of the epigenetic memory in *Picea abies*.

Acknowledgements:

This work was financially supported by the EU FP7 Project ProCoGen, the NFR-FRIMEDBIO grant 240766/F20 and the EpiClimate Project. Elena Carneros was supported by a grant from Iceland, Liechtenstein and Norway through the EEA Financial Mechanism, operated by Universidad Complutense de Madrid.

Inducción de la embriogénesis de la microspora en trigo mediante modificaciones epigenéticas

María Pilar VALLES BRAU, Isabel VALERO RUBIRA, Sandra ALLUE DURANGO, Asunción COSTAR CASTAN, Ana María CASTILLO ALONSO

Departamento de Genética y Producción Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (EEAD-CSIC), Av Montañana 1005, 50059 Zaragoza.

Email de contacto: valles@eead.csic.es

En los últimos años se han descrito nuevas estrategias de inducción de la embriogénesis de microsporas basadas en la aplicación de compuestos que modifican la estructura de la cromatina, actuando, por ejemplo, sobre el grado de acetilación de histonas(1, 2, 3). En nuestro grupo hemos estudiado el efecto inductor de un inhibidor de histonas deacetilasas (*Trichostatina A*, TSA) en la embriogénesis de las microsporas de trigo panadero.

Para identificar el tratamiento más eficiente, se han aplicado diferentes concentraciones de la TSA en combinación con dos tratamientos de estrés inductores de la embriogénesis de la microspora (manitol y frío), en dos momentos distintos de aplicación: junto con el tratamiento de estrés convencional; después del tratamiento de estrés. También se ha ensayado la TSA como tratamiento único de inducción. Se ha analizado el efecto del tratamiento con TSA en los parámetros que caracterizan las distintas fases de la embriogénesis de la microspora hasta la producción de plantas verdes DH. El análisis se ha realizado en dos genotipos de distinta respuesta a la embriogénesis de la microspora.

El efecto de la TSA dependió del genotipo utilizado, de la dosis aplicada, y su combinación o no con un tratamiento de estrés. Con la aplicación de la TSA durante un tratamiento de inanición y alta presión osmótica con manitol se obtuvieron los valores más altos de embriones. En estas condiciones, la aplicación de la TSA fue más eficiente en el cultivar de baja respuesta que en el cultivar de alta respuesta. Nuestro interés se centra en estudiar los mecanismos por los cuales la TSA induce la embriogénesis de la microspora.

1- Li H., Soriano M., Cordewener J., Muiño J.M., Riksen T., Fukuoka H., Angenent G.C., Boutilier K. (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell*, Vol. 26: 195–209.

2- Jiang F., Ryabova D., Diedhiou J., Hucl P., Randhawa H., Marillia E-F., Foroud N.A., Eudes F., Kathiria P., (2017) Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Reports* 1-6.

3- Pandey, P., Daghma D.S., Houben A., Kumlehn J., Melzer M., Rutten T. (2017) Dynamics of post-translationally modified histones during barley pollen embryogenesis in the presence or absence of the epi-drug trichostatin A. *Plant Reproduction* 30:95-105.

Approaching to apomixis by in vitro culture of fern gametophytes

Helena FERNÁNDEZ, Alejandro RIVERA and M^a Jesús CAÑAL

Dept. BOS, Area of Plant Physiology, Oviedo University, Catedrático Rodrigo Uría, s/n 330071.

Email de contacto: fernandezelena@uniovi.es

The gametophyte of ferns is a cellular monolayer structure, whose more important function is to form the gametes, responsible of sexual fusion that will lead to sporophyte generation. During the last decades, there has been a great effort all around the world, to decipher the molecular clues behind apomixis or asexual seed formation, which could have important repercussions in crop production. In ferns, apomixis is more frequent than in other major plant groups, and it includes two events: apogamy (the formation of sporophytes from somatic cells of the gametophyte), and agamospermy or diplospory (the production of unreduced –diplo- spores. The gametophyte in ferns is an autonomous organism that is well suited for *in vitro* cultures, sample collection, and observation under a microscope, being a useful experimental system to cope with either basic and practical developmental processes.

Dryopteris affinis (Lowe) Fraser-Jenkins ssp. *affinis* is a diploid fern with an apomictic life cycle; when cultured in vitro, apogamy in this species is evident as gametophyte develops a brown meristematic area near the apical indentation that evolves into a new sporophyte. Sexual reproduction is not possible due to the lack of archegonia or female sexual organs. Apogamy in ferns can be seen as an opportunity to investigate on embryogenesis, one of the more powerful tools in plant biotechnology. How somatic cells, either of sporophytic or gametophytic origin become and develop as embryogenic is still poorly understood. Omics technologies based on comprehensive biochemical and molecular characterizations of an organism, tissue or cell type, and next-generation omics approaches, facilitate the analyses of non-model organisms owing to the rapid production of large amounts of *de novo* systems biology data, making them attractive options for studying plant development and evolution.

Targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming and totipotency to improve microspore embryogenesis in crop and forest species

Pilar S. TESTILLANO

Pollen Biotechnology of Crop Plants Group, Biological Research Centre, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, Spain

Email de contacto: testillano@cib.csic.es

Stress-induced microspore embryogenesis is a powerful *in vitro* system in which microspores are reprogrammed towards embryogenesis, producing doubled-haploid (DH) plants, which are biotechnological tools, very useful in plant breeding as a source of new genetic variability, fixed in homozygous plants in only one generation. This system is widely used by plant biotechnology companies, although low efficiency of the process still limits its application in many agroforestry species. Our recent investigations in horticultural, cereal and forest tree species have characterized a number of determinant factors involved in the regulation of microspore embryogenesis. Upon the inductive stress, autophagy and specific proteases are activated and involved in cell death at early stages, being crucial players in the response to stress. After induction, cell reprogramming and totipotency acquisition are mainly regulated by hormonal and epigenetic mechanisms. On one hand, endogenous auxin biosynthesis, transport and action are required for microspore embryogenesis. Initial embryogenesis stages involve genome-wide epigenetic changes including DNA hypomethylation, H3K9 demethylation, and H3/H4 acetylation. Pharmacological treatments with small molecule modulators of autophagy, proteases and epigenetic marks are able to reduce cell death and enhance embryogenesis initiation, opening up new intervention pathways for biotech strategies to improve *in vitro* DH production for breeding programs, via microspore embryogenesis.

Testillano PS (2019) Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress induced cell reprogramming for crop improvement. *J.Exp.Bot.* Doi: 10.1093/jxb/ery464.

Pérez-Pérez Y, Bárány I, Berenguer E, Carneros E, Risueño MC, Testillano PS (2019) Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Sign. Behav.* 14:2, e1559577.

Bárány I, Berenguer E, Solís MT, Pérez-Pérez Y, et al. Testillano PS (2018) Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during microspore embryogenesis in barley. *J. Exp. Bot.* 69, 1387-1402.

Berenguer E, Bárány I, Solís MT, Pérez-Pérez Y, Risueño MC, Testillano PS (2017) Inhibition of histone H3K9 methylation by BIX-01294 promotes stress-induced microspore totipotency and enhances embryogenesis initiation. *Front. Plant Sci.* 8, 1161.

Work supported by projects AGL2014-52028-R and AGL2017-82447-R funded by AEI of MCIU and ERDF/FEDER, and TRANSAUTOPHAGY Cost Action CA15138.

Embriogénesis somática de alcornoque (*Quercus suber* L.) en medio líquido (Cork oak *Quercus suber* embryogenic liquid cultures)

María del Mar RUIZ-GALEA, Inmaculada HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Eva FRIERO MOLANO
y Mariano TORIBIO IGLESIAS

Departamento Agroambiental, Instituto Madrileño de Investigación (IMIDRA),
Consejería de Medioambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid,
Autovía A-2 km 38. Alcalá de Henares. 28800 Madrid.

Email de contacto: mdelmar.ruiz@madrid.org

El alcornoque (*Quercus suber* L.) es un árbol de la familia de las Fagáceas de gran interés económico por su producción de corcho y de bellotas.

El protocolo de embriogénesis somática desarrollado para esta especie a partir de hojas (Toribio et al. 2005) permite clonar ejemplares adultos, en los que se observan los caracteres de interés, estableciéndose líneas embriogénicas de casi cualquier genotipo. Sin embargo, para la propagación a gran escala, es necesaria su adaptación al cultivo en medio líquido.

A partir de las líneas embriogénicas proliferando en medio semisólido sin reguladores de crecimiento, se ha llegado al establecimiento y mantenimiento de los cultivos en el mismo medio sin gelificante (Jiménez et al. 2013). Inoculando agregados embriogénicos de unos 3mm de diámetro a baja densidad (43mg/L) es posible mantener estos cultivos durante años sin pérdida de la capacidad embriogénica. Un aumento de la densidad del inóculo (150mg/L) favorece la proliferación pero reduce la capacidad embriogénica con el tiempo.

En estos cultivos en medio líquido se identificaron tres vías de diferenciación de embriones somáticos (Alegre et al. 2011), dos de ellas similares a las observadas en medio semisólido a partir de embriones en recurrencia. El control de estas dos vías ha permitido obtener una cantidad máxima de 30 embriones aislados por embrión. En la tercera vía se producían embriones a partir de células y agregados celulares. Se ha conseguido establecer y mantener suspensiones de estos agregados sin usar reguladores de crecimiento (Ruiz-Galea et al, 2018). Cultivando la fracción de 40-800µm de diámetro en alta densidad (8g/L) se obtienen suspensiones de embriones globulares. Distribuyendo este material sobre un filtro en el mismo medio con agar y carbón activo, se producen alrededor de 500 embriones inmaduros por gramo, mejorándose la producción media de 25 embriones por gramo conseguido al cultivar en medio semisólido.

Producción biotecnológica de fármacos y biofármacos en cultivos de células y órganos vegetales

Javier Palazón, Abbas Khojasteh, Rosa M. Cusido

Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente. Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona. Av. Joan XXIII 27-31. 08028 Barcelona, España.

Email de contacto: javierpalazon@ub.edu

El impacto de la biotecnología vegetal actualmente es considerable debido a su enorme avance de las últimas décadas. Responsables de este progreso son la implementación de herramientas clave como, los cultivos in vitro y las técnicas de ingeniería genética. Una consecuencia de ello, ha sido el desarrollo de las biofactorías vegetales, plataformas biotecnológicas basadas en cultivos de células y órganos, utilizadas para la producción de fármacos y biofármacos. En este contexto, la ingeniería metabólica ha demostrado ser una estrategia efectiva para incrementar la producción de estas biofactorías y lograr su mayor implementación a nivel industrial, ya que permite modificar el genoma vegetal y diseñar nuevas líneas celulares con capacidades metabólicas mejoradas.

Muchos metabolitos secundarios vegetales tienen propiedades farma-, nutra- o cosmeceúticas. Este metabolismo involucra miles de enzimas, algunas específicas que generan un producto a partir de un sustrato, o bien pueden generar múltiples productos a partir del mismo sustrato, resultando en nuevas aplicaciones de las biofactorías vegetales, en las que la maquinaria metabólica natural puede aprovecharse para la bioconversión de fitofármacos o la producción de nuevos compuestos bioactivos. Además, la ingeniería metabólica permite la expresión heteróloga de genes en los cultivos in vitro, que equipados con nuevas capacidades metabólicas pueden convertir sustratos específicos en otros compuestos bioactivos e incluso transferir una ruta de metabólica total o parcialmente de una especie vegetal a un cultivo in vitro de otra especie.

Por otro lado, las biofactorías vegetales también se han implementado en el mercado biofarmacéutico, ya que los cultivos de células vegetales ofrecen varias ventajas para la producción de biofármacos frente a los cultivos transgénicos de bacterias, levaduras o células de mamíferos, como son, rápido crecimiento celular en medios de bajo coste y químicamente bien definidos, seguridad, pues están libres de componentes derivados de mamíferos y toxinas bacterianas, y como sistemas eucariotas, consiguen el ensamblaje correcto de proteínas multiméricas.

Efecto del estrés lumínico sobre el crecimiento y el metabolismo secundario, en cultivos celulares vegetales

Luisa F. ROJAS⁽¹⁾, Adriana Gallego⁽²⁾, Lucía ATEHORTÚA⁽²⁾.

⁽¹⁾ Grupo de Biotransformación, Universidad de Antioquia, Calle 70 No 52-21, Medellín-Colombia.

⁽²⁾ Grupo de Biotecnología, Universidad de Antioquia, Calle 70 No 52-21, Medellín-Colombia.

Email de contacto: lfernanda.rojas@udea.edu.co

La luz es un factor que afecta el crecimiento y la producción de metabolitos en las plantas; diferentes investigaciones, han demostrado el efecto estimulante que ésta posee sobre la producción de antioxidantes en cultivos celulares. En la actualidad, con las tecnologías de secuenciación de nueva generación, se cuenta con mayor información acerca de las rutas metabólicas y sus mecanismos de regulación; así mismo del papel que juegan las especies reactivas del oxígeno (EROs), como intermediarios asociados al estrés oxidativo. En este trabajo, se desarrolló un análisis de componentes principales, para correlacionar el efecto de la radiación visible y UV, sobre indicadores como el crecimiento, metabolismo y el estrés oxidativo generado. Se propuso la producción de polifenoles (CPT) como metabolitos de defensa (sistema no enzimático) y el sistema antioxidante enzimático constitutivo de la célula. Se encontró que las células irradiadas con UV a una intensidad de $125 \times 10^{-3} \text{ Wm}^{-2}$, mostraron un caso típico de estrés oxidativo, caracterizado por una alta producción de EROs, que no fue mitigado por ninguno de los sistemas antioxidantes, conduciendo a una pérdida en la viabilidad y a una baja productividad volumétrica. Cuando la intensidad se duplicó, las células incrementaron su producción de EROs, pero fueron capaces de mantener activo su sistema antioxidante no enzimático, para continuar con su proceso de multiplicación celular. Por otro lado, la luz blanca a una intensidad de 15 Wm^{-2} , mostró bajo contenido de EROs y un nivel intermedio de CPT, aunque se observó mayor actividad de la enzima SOD. En este caso, se evidenció que bajo esta longitud de onda, ambos sistemas de defensa son capaces de contrarrestar la cantidad de EROs producida, no siendo evidenciado un caso de estrés oxidativo. Este estudio, permitió proponer mecanismos de defensa de las células de *T. cacao*, frente a las diferentes condiciones de irradiación.

Conservación de germoplasma de especies leñosas mediante técnicas biotecnológicas

Elena CORREDOIRA

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

Contact email: Elena CORREDOIRA

Las herramientas biotecnológicas disponibles en la actualidad suponen una ayuda importante en la conservación de recursos fitogenéticos, especialmente en especies leñosas. Los métodos desarrollados son altamente eficaces para el mantenimiento a largo plazo del germoplasma de especies leñosas que deben ser propagadas vegetativamente, de especies que producen semillas recalcitrantes de difícil conservación por métodos clásicos o de material vegetal derivado de procesos biotecnológicos (transformación genética). Los bancos de germoplasma derivados de procesos biotecnológicos complementan los bancos convencionales de conservación como son los bancos de semillas, las colecciones de plantas conservadas in situ o las existentes en jardines botánicos.

En esta comunicación se describen los avances en la conservación de germoplasma mediante la aplicación de las herramientas biotecnológicas disponibles: el uso del cultivo in vitro de tejidos vegetales para su conservación en cámaras de cultivo y la crioconservación o el almacenamiento indefinido del material vegetal en nitrógeno líquido (-196°C). En el primer caso, el material vegetal (ápices caulinares, yemas axilares, yemas adventicias y embriones somáticos) se mantienen de forma rutinaria y, en muchos casos de forma indefinida, mediante subcultivos periódicos (sobre 4-6 semanas). No obstante, en muchos casos, es factible extender estos períodos de forma notable (6-12 meses o más) manteniendo los cultivos en condiciones de crecimiento reducido, especialmente mediante el almacenamiento a baja temperatura (3-8°C). Por otra parte, la crioconservación puede considerarse el método más seguro y eficaz para el almacenamiento a largo plazo de un gran número de especies leñosas. Se describen las diferentes técnicas disponibles: enfriamiento paulatino, desecación, encapsulación, encapsulación-deshidratación y vitrificación. Se hace especial énfasis en la selección del explanto más apropiado para la crioconservación: 1) explantos aislados in vivo (ejes embrionarios de semillas recalcitrantes o yemas axilares recogidas en campo) y 2) explantos aislados de material cultivado in vitro (ápices caulinares, yemas axilares, masas proembriónicas (PEMs), embriones somáticos y suspensiones embriónicas). Se hará una revisión crítica de los diferentes métodos propuestos.

Finalmente, se destaca la importancia de la crioconservación de líneas embriónicas en especies leñosas mientras se lleva a cabo su evaluación en campo (Multi-Varietal Forestry).

Conservación de recursos a bajo coste: ¿Utopía o realidad?

Itziar Aurora MONTALBÁN

Departamento de Ciencias Forestales, Neiker, Campus Agroalimentario de Arkaute,
Apdo. 46 Vitoria-Gasteiz.

Email de contacto: imontalban@neiker.eus

En los últimos años el desarrollo y optimización de las técnicas de propagación in vitro de especies forestales ha posibilitado la conservación a largo plazo de recursos genéticos élite. En este sentido, la embriogénesis somática en especies de coníferas es una herramienta biotecnológica de alto valor, pero el desarrollo comercial de esta tecnología adquiere mayor relevancia, si cabe, si se combina con la conservación de los recursos genéticos generados. El inconveniente de la crioconservación clásica es que la adquisición y mantenimiento de criotankes y el abastecimiento de los mismos con nitrógeno líquido es muy costoso; este hecho aumenta considerablemente el coste final de las plántulas somáticas o hace esta tecnología inaccesible para centros de investigación con limitados recursos económicos.

En este escenario, el desarrollo de métodos de almacenamiento alternativos que minimicen estos costes se presenta como una alternativa muy atractiva para la crioconservación. A lo largo de nuestra exposición, daremos un repaso a los estudios desarrollados en Neiker para la conservación de recursos genéticos vegetales a temperaturas por encima de la congelación (4°C), así como a los que llevamos a cabo en nuestro laboratorio a temperaturas ultrabajas (- 80°C). De este modo, ponemos de manifiesto que la conservación de recursos genéticos a bajo coste ya no es ciencia ficción.



COMUNICACIONES PÓSTER

POSTER
COMMUNICATIONS





SESIÓN I

Cultivo in vitro en la
era de las -ómicas

SESSION I

In vitro culture in the
era of the -omics

Stage and tissue-specific expression analysis of two miRNAs and their targets during *Solanum betaceum* Cav. (tamarillo) somatic embryogenesis

Miguel RITO, Sandra Correia, Jorge Canhoto

Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

Email: miguelrito@ua.pt

Somatic embryogenesis (SE) is a type of non-zygotic embryogenesis that has been used for plant cloning and analysis of embryo development. Embryogenic competence in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) is achieved when explants (either zygotic embryos or young leaves) are exposed to auxins (2,4-D or Picloram) and high sucrose concentrations (0.3 M) in the culture medium. On these conditions embryogenic (EC) or non-embryogenic (NEC) calluses are obtained from the same explant. By transferring EC to culture media without auxins and with lower sucrose concentrations (0.1 M), embryos develop and plantlets are obtained from them. The auxin pathway is essential in the regulation of SE. Genes like *TIR*, *AFB* or *GRFs* play a key role in auxin-mediated plant developmental processes. miRNAs are small, single-stranded RNAs known to function as post-transcriptional regulators of gene expression. Two of those miRNAs, mir393 and mir396, that play important roles in plant growth, development and maturation of the plant, were identified as differentially expressed in tamarillo's EC and NEC smallRNAseq libraries. Both are crucial in the auxin pathway, by regulating *TIR* and *AFB* expression (mir393), and the expression of *GRF*'s genes (mir396).

This study aims to analyse the expression of mir393 and mir396 and their target genes during tamarillo's SE, from zygotic embryos and leaf explants. Total RNA and smallRNAs were extracted from EC and NEC as well as from explants collected throughout the SE induction and embryo development processes. RNA samples were reverse transcribed into cDNA and the expression levels of the target genes and miRNAs quantified by qPCR.

Tissue-specific expression of miR393 and miR396, shows their up-regulation in non-embryogenic samples, suggesting their possible modulation on tamarillo SE. These results provide new insights into embryogenic competence acquisition by tamarillo tissues, as well as how that competence is maintained during callus subcultures and expressed during embryo development.

Acknowledgments: This work was supported by the project PTDC/BAA-AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".

Functional validation of candidate miRNAs in the regulation of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) regeneration processes

Daniela CORDEIRO, Sandra CORREIA, Jorge CANHOTO

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

Email: danielacordeiro@outlook.pt

Plant regeneration is the expression of somatic plant cell totipotency under *in vitro* conditions. The ability to induce this regeneration competence, either through somatic embryogenesis (SE) or organogenesis, has been widely used in plant biotechnology as an efficient tool for plant cloning and as a system for studying plant morphogenesis. Recently, the generation of genome-wide profiles of microRNAs (miRNAs) and their target genes has pointed out several of these molecules as key factors controlling many developmental processes. High-throughput sequencing (HTS) and differential expression analysis of the smallRNAs from cell lines with different embryogenic ability, indicated that specific miRNA-target regulatory nodes are involved in the acquisition and expression of embryogenic competence. In order to functionally validate the effects of miRNAs on tissue culture *in vitro*, a preliminary analysis of the levels of previously identified miRNAs was carried out by qPCR in tissues induced through effective protocols of SE and organogenesis in the fruit tree tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.). The quantification method used allows efficient, reliable, and specific measure of individual mature miRNAs expression. RNA extracted from the induced tissues is reverse-transcribed using a primer, specific for the miRNA under study, with a highly stable stem-loop structure that provides better specificity and sensitivity. The obtained RT product is amplified using a forward primer, also specific for the miRNA under study, and a universal reverse primer, by qPCR for quantification. Using this method, we are being able to analyse several miRNAs that are differentially expressed in tamarillo plants originated by different propagation methods. So far, the expression of miR393 and miR396 was tested using this method in *calli* with different regeneration abilities. miR393 is more expressed in non-embryogenic *calli* than in embryogenic ones, and miR396 has more equivalent expression levels in tissues with different embryogenic ability, validating the results obtained from the HTS.

Poligalacturonasa *FaPG1* y CRISPR/Cas9: Editando la firmeza del fruto de fresa

Gloria LÓPEZ-CASADO, Estrella SALCEDO, Pablo RIC-VARAS,
Antonio J. MATAS, José A. MERCADO

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA- CSIC),
Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071 Málaga

Email de contacto: mercado@uma.es

El uso de la técnica CRISPR/Cas9 para la edición de genomas vegetales ha sido ampliamente estudiado y referido en los últimos años. En trabajos recientes, se ha empleado esta técnica para mejorar la vida postcosecha y características organolépticas de frutos modelo como el tomate; sin embargo, los trabajos de edición génica en otros frutos como la fresa son muy escasos. Los cambios en las características y/o composición de las paredes celulares durante la maduración son el principal factor que contribuye a la pérdida de la firmeza del fruto. Estos cambios están promovidos por la inducción de genes que codifican enzimas modificadoras de los polímeros de la pared celular. En el caso de la fresa, trabajos anteriores demostraron que el silenciamiento de genes de poligalacturonasa alarga la vida postcosecha del fruto. En este trabajo se ha evaluado el efecto de la edición del gen de poligalacturonasa *FaPG1* mediante el sistema CRISPR/Cas9 en fresa, con el fin último de desarrollar plantas editadas no transgénicas con una vida postcosecha más larga. Para ello, se diseñaron cebadores para amplificar el RNA guía específico para este gen utilizando la aplicación <http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/> y el genoma de *F. vesca* v4.0 como referencia. Se transformaron discos de hoja del cv. Chandler mediante *A. tumefaciens* portando el vector binario pDe-CAS9 que contiene la secuencia codificante de Cas9 y el gen bar para selección en fosfotricina. Se obtuvieron un total de 40 líneas transgénicas independientes. En el 50% de las plantas analizadas, se comprobó la edición del gen diana mediante el ensayo de la endonucleasa T7. Los productos de amplificación para la zona editada están siendo secuenciados mediante la plataforma Illumina para determinar los patrones de edición que han tenido lugar. Estas líneas serán aclimatadas para su posterior cultivo y evaluación fenotípica en invernadero.

Proyecto AGL2017-86531-C2-1-R

Transformación de olivo con el gen *AtNPR1* para inducir tolerancia a patógenos fúngicos

Isabel NARVÁEZ⁽¹⁾, Clara PLIEGO⁽²⁾, Elena PALOMO-RÍOS⁽¹⁾, Louis FRESTA⁽¹⁾, Rafael JIMÉNEZ-DÍAZ^{(3) (4)}, Jose Luis TRAPERO-CASAS⁽⁴⁾, Carlos LÓPEZ-HERRERA⁽⁴⁾, Juan M. ARJONA-LÓPEZ⁽⁴⁾, Jose Angel MERCADO⁽¹⁾, Fernando PLIEGO-ALFARO⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

⁽²⁾ Departamento de Genómica y Biotecnología, Fruticultura Subtropical y Mediterránea (IFAPA) Unidad Asociada de I+D+i al CSIC, 29140 Málaga, Spain

⁽³⁾ Departamento de Agronomía, College of Agriculture and Forestry (ETSIAM), Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario ceiA3, Edificio C-4 Celestino Mutis, Campus Rabanales, Ctra. de Madrid, Km 396, 14071 Córdoba, Spain

⁽⁴⁾ Instituto de Agricultura Sostenible (IAS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida Menéndez Pidal s/n, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, ceiA3, 14004 Córdoba, Spain

Email de contacto: narvaez@uma.es

El gen *NPR1* codifica un componente esencial de la respuesta SAR mediada por ácido salicílico (AS). Tras la infección por el patógeno, la acumulación de AS libera los monómeros *NPR1* en el citoplasma, los cuales son translocados al núcleo activando la expresión de genes relacionados con la patogénesis (PR). La sobreexpresión del gen *NPR1* de *Arabidopsis thaliana* ha incrementado la resistencia a hongos, bacterias y virus, en distintas especies. El objetivo de esta investigación fue sobreexpresar este gen en olivo con objeto de evaluar su efecto en la tolerancia a dos hongos de suelo, el hemibiotrofo *Verticillium dahliae* (Vd), una de las mayores amenazas del cultivo y el necrotrofo *Rosellinia necatrix*, un patógeno emergente en nuevas plantaciones. Se obtuvieron 3 líneas transgénicas, a partir de una línea embriogénica derivada de semilla del cv. Picual. Las líneas mostraron diferencias en el nivel de expresión del transgen en hoja, aunque estas diferencias no afectaron a los niveles de actividad endoquitinasa basal, similar a la de plantas control. La respuesta a Vd varió con el patotipo; así, todas las plantas murieron 50 días tras su inoculación con la cepa defoliante (D) V-138. Por otra parte, la respuesta a patotipos no defoliantes (ND) también fue variable, en función de la raza; tras la inoculación con la cepa V1242 (ND, raza 2), los síntomas aparecieron transcurridos 44-55 días, siendo la línea *NPR1*-780, con mayor expresión del transgen, la que mostró menor índice de severidad de la enfermedad. Esta línea también mostró un comportamiento superior al control tras la inoculación con la cepa V1558 (ND, raza 1), aunque las diferencias no fueron tan acusadas. En la respuesta a *R. necatrix*, las líneas transgénicas mostraron un ligero retraso en el desarrollo de la enfermedad con valores AUDPC entre 7-15% inferiores al control.

Proyectos: Plan Nacional AGL2014-52518-C2-1-R; AGL2017-83368-C2-1-R y Junta de Andalucía P11-AGR7992.

Genetic transformation of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) somatic embryos with a gene encoding a Gnk2 protein

María Teresa MARTÍNEZ⁽¹⁾, Susana SERRAZINA⁽²⁾, Rita LOURENÇO COSTA⁽³⁾, Francisco Javier VIEITEZ⁽¹⁾, María del Carmen SAN JOSÉ⁽¹⁾, Elena CORREDOIRA⁽¹⁾

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

⁽²⁾ Plant Functional Genomics Group (BioISI), Campus da Facultade de Ciências da Universidade de Lisboa, Campo Grande, 1749-016, Lisboa, Portugal.

⁽³⁾ Centro de Estudos Florestais, Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Tapada da Ajuda, Lisboa, Portugal.

European chestnut is a tree species with a wide distribution and important economical and ecological role in Europe. This species is seriously threatened by diseases and pests namely: ink disease/ root rot, caused by *Phytophthora* spp, blight disease, caused by the fungus *Cryphonectria parasitica*, and more recently gall wasp caused by *Dryocosmus kuriphilus*. Genetic transformation with antifungal genes could be an alternative to conventional breeding efforts. Recently Serrazina et al. (2015) compared the root transcriptomes of *C. sativa* (susceptible species) and *C. crenata* (resistant species) after *P. cinnamomi* infection and they have identified candidate genes associated with the plant defenses differentially expressed after infection. One of these candidate genes is Ginkbilobin2 gene (Gnk2) which was found in seeds of the gymnosperm Ginkgo biloba and it is known to possess antifungal properties. The aim of the present study was to produce European chestnut somatic embryos that overexpress the Cast_Gnk2-like gene.

The Cast_Gnk2-like gene was cloned into pK7WG2D under the CaMV35S promoter using the Gateway cloning system (Invitrogen, USA). The resulting plasmid was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. This plasmid also contains neomycin phosphotransferase II (nptII) gene as the selectable marker gene for kanamycin resistance and the green fluorescent protein gene (gfp) as reporter marker gene. For transformation, explants consisted of small clumps of 2 or 3 somatic embryos in globular or early-torpedo stage which were isolated from two chestnut embryogenic lines. Explants were co-cultured for 5 days with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105pK7WG2D-GIN. The transformation efficiency (TE) was determined based on the fluorescence of surviving explants and was clearly genotype- dependent. The TE was 14.2% in CI-9 line whereas in the CI-3 line was 2.5%. A total of 12 independent transformed lines were obtained and the presence Gnk2 gene in genomic DNA was determined by PCR.

Serrazina, S., Santos, C., Machado, H., Pesquita, C., Vicentini, R., Pais, M.S., Sebastiana, M., Costa, R. (2015). Castanea root transcriptome in response to Phytophthora cinnamomi challenge. Tree Genet. Genomes 11, 6. doi: 10.1007/s11295-014-0829-7.

This report was partially funded by MINECO (Spain) through the project AGL2016-76143-C4- 4-R.

Estudio de las variaciones en el perfil hormonal, proteómico y fenólico en embriones somáticos de encina (*Quercus ilex* L.) elicitados y sometidos a estrés biótico

Marian MORCILLO⁽¹⁾, Rosa SÁNCHEZ-LUCAS⁽²⁾, Álex ALBORCH⁽¹⁾, Kamilla CARVALHO⁽²⁾, Ana Patricia MARTÍNEZ⁽²⁾, Alberto GUILLÉN⁽¹⁾, Ester SALES⁽³⁾, Jesús V. JORRÍN-NOVO⁽²⁾, Juan SEGURA⁽¹⁾, Isabel ARRILLAGA⁽¹⁾

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

⁽²⁾Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario, CeIA3, 14071 Córdoba, España.

⁽³⁾Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Área de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Zaragoza, Ctra Cuarte s/n, 22071 Huesca, España.

angeles.morcillo@uv.es

La encina (*Quercus ilex* L.) es una de las especies más afectadas por el decaimiento conocido como "la seca" producido, entre otros factores, por el oomiceto *Phytophthora* spp. Con este estudio se pretende probar si la aplicación de elicitores a embriones somáticos (SEs) de encina produce una memoria epigenética, que a su vez induce una mayor tolerancia de esta especie al patógeno.

La línea embriogénica E00 se elicitó durante 3 días con 0 y 50 μ M de metil jasmonato (MeJA) y los embriones se transfirieron a medio de proliferación (Martínez *et al.* 2015, Plant Cell Tiss Organ Cult DOI 10.1007/s11240-015-0722-6). Después de 5 días las muestras se sumergieron durante 3 horas en medio ESM líquido (Elicitin Secretion Medium, Horta *et al.* 2008, PMPP 73:48–57) que contenía un 20% de extracto activo de *Phytophthora cinnamomi* (cepa 1630) y se volvieron a depositar en medio de proliferación durante 24 horas, tras las cuales, se liofilizaron para llevar a cabo los análisis.

Para estudiar las posibles modificaciones inducidas por la aplicación del elicitador metil jasmonato se ha evaluado la variación en el contenido hormonal (ABA; salicilato y jasmonato) y en los perfiles proteómico y fenólico de la línea E00 elicitada o no y enfrentada al oomiceto.

Los resultados obtenidos indican alteraciones en los niveles hormonales, fundamentalmente de ácido jasmónico en las líneas elicitadas y enfrentadas al oomiceto, expresión diferencial de 24 proteínas, 7 de ellas relacionadas con respuesta a estrés biótico y variaciones en algunos compuestos fenólicos.

Estos resultados sugieren que la elicitación con MeJA activa los mecanismos de defensa ante la infección por *Phytophthora* spp.

Agradecimientos. Dra. Paloma Abad del Instituto Agroforestal del Mediterráneo (UPV, Valencia) por facilitar la cepa de *P. cinnamomi*. Dr. Mariano Toribio del Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Agroalimentario (IMIDRA) por la cesión de la línea embriogénica E00. Este trabajo está financiado por el MINECO, la UE (AGL2016-76143-C4-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052) y por un contrato predoctoral a M.M.

El estrés térmico determina la organización celular y el perfil metabólico durante la iniciación de la embriogénesis somática en *Pinus radiata*

Ander Castander Olarieta⁽¹⁾, Itziar Aurora Montalbán⁽¹⁾, Eliana de Medeiros Oliveira⁽²⁾,
Emilia Dell'Aversana⁽³⁾, Luisa D'Amelia⁽³⁾, Petronia Carillo⁽³⁾, Neusa Steiner⁽⁴⁾,
Hugo Pacheco de Freitas Fraga⁽⁵⁾, Miguel Pedro Guerra⁽⁶⁾, Tomás Goicoa⁽⁷⁾,
María Dolores Ugarte⁽⁷⁾, Cátia Pereira⁽⁸⁾, Paloma Moncaleán⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centro de Arkaute, Neiker-Tecnalia, Vitoria-Gasteiz, Spain

⁽²⁾ Central Laboratory of Electron Microscopy, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁽³⁾ Department of Environmental, Biological and Pharmaceutical Sciences and Technologies, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Naples, Italy

⁽⁴⁾ Department of Botany, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁽⁵⁾ Department of Botany, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

⁽⁶⁾ Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

⁽⁷⁾ Department of Statistics, Computer Science and Mathematics, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain

⁽⁸⁾ Department of Life Sciences, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Email de contacto: pmoncalean@neiker.eus

El cambio climático está condicionando la supervivencia y el rendimiento de plantaciones y recursos forestales. Por consiguiente, la capacidad de las plantas para hacer frente a dichas variaciones será un factor determinante en los próximos años. En este sentido, parece que los cambios epigenéticos inducidos pueden ayudarnos a modular la capacidad adaptativa de las plantas, y además, se ha demostrado que ciertos metabolitos, tales como azúcares solubles y aminoácidos, toman parte activa en procesos de respuesta a estrés abiótico y plasticidad fenotípica. Por ese motivo, en este trabajo hemos investigado el efecto que la temperatura y la disponibilidad de agua durante la iniciación de la embriogénesis somática de *Pinus radiata* puede tener durante las diferentes etapas del proceso, además de evaluar si dicho efecto puede determinar el perfil metabólico y la organización morfológica y ultraestructural de las masas embriogénicas generadas. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de iniciación aplicando temperaturas elevadas durante diferentes periodos de incubación (1. Experimento: 23°C, 12 semanas (control); 30°C, 4 semanas; 40°C, 4 días; 50°C, 5 minutos/ 2. Experimento: 23°C, 12 semanas (control), 40°C, 4 horas; 50°C, 30 minutos; 60°C, 5 minutos). Los resultados indicaron que temperaturas moderadas durante largos periodos de tiempo tienen un efecto negativo sobre la iniciación y proliferación debido a un incremento de células suspensoras procedentes de eventos de muerte celular programada. Además de un aumento general en productividad, los embriones procedentes de incubaciones bajo temperaturas extremas durante periodos cortos de tiempo resultaron tener mayor vigor y mejores características morfológicas. Finalmente, entre las diferencias observadas en el perfil metabólico, cabe destacar la acumulación de aminoácidos como la tirosina y la isoleucina, o la acumulación de compuestos fenólicos, metabolitos involucrados en respuestas de reajuste osmótico, antioxidante y en la síntesis de metabolitos secundarios.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado por MINECO (Gobierno de España) (AGL2016-76143-C4-3R), BIOALI-CYTED (P117RT0522) y DECO (Gobierno Vasco, "Ayudas de formación a jóvenes investigadores y tecnólogos").



SESIÓN II

Mejora genética y
epigenética

SESSION II

Genetic and epigenetic
improvement

Incremento de tolerancia a salinidad en patrones de cítricos mediante mutación por rayos gamma

Margarita PÉREZ-JIMÉNEZ, Fernando CÓRDOBA, Antonio José LÓPEZ-PÉREZ, Montserrat MORENO, Carmen Maxi RODRÍGUEZ, Olaya PÉREZ-TORNERO

Departamento de Biotecnología, Genómica y Mejora Vegetal, Equipo de Mejora Genética de Cítricos, IMIDA, C/Mayor s/n La Alberca, 30509, Murcia.

Email de contacto: margarita.perez3@carm.es

Aumentar la tolerancia a la salinidad en cítricos es uno de los principales objetivos de cualquier programa de mejora de patrones. Sin embargo, debido a que este es un proceso en el que intervienen múltiples mecanismos, la mejora clásica se encuentra limitada, tomando mayor protagonismo técnicas alternativas como la mutagénesis por rayos gamma. Así, tres mutantes obtenidos por rayos gamma (MM3B, MM4B, MM5B) de *Citrus macrophylla* que habían sido seleccionados previamente in vitro por su capacidad para hacer frente al estrés salino, se cultivaron in vitro junto con explantos de *Citrus macrophylla*, como control, a una concentración de NaCl de 60 mM. Después de 8 semanas de cultivo, se tomaron datos sobre la tasa de proliferación y el número de hojas dañadas para evaluar los efectos producidos por la salinidad en el medio de cultivo. Además, se cuantificó el contenido en prolina, Na⁺, Cl⁻ y NO₃⁻. En las condiciones salinas analizadas, todos los mutantes mostraron un mejor comportamiento que *Citrus macrophylla*, con mayores tasas de multiplicación. MM5B mostró menos daño en hoja y un mayor contenido en prolina en condiciones de estrés salino que el resto de mutantes y *Citrus macrophylla*, mientras que no se encontraron diferencias, para esta variable, en el resto de mutantes entre condiciones control y de salinidad. Además, aunque se detectó una acumulación similar de los iones Na⁺ y Cl⁻, la concentración de NO₃⁻ fue mayor en plantas mutantes que en *Citrus macrophylla*, en condiciones salinas, lo que les confirió una ventaja adicional contra el estrés salino. Así, aunque el global de los mutantes tuvieron mejor comportamiento en condiciones de salinidad que los explantos de *Citrus macrophylla*, el mutante MM5B fue con certeza el que produjo mejores resultados siendo un gran candidato para estudiar los mecanismos que confieren tolerancia a salinidad en cítricos.

Caracterización fenotípica, celular y genética de un mutante de tomate con desarrollo helicoidal

Marybel Jáquez⁽¹⁾, Alejandro Atarés⁽¹⁾, Benito Pineda⁽¹⁾, Carlos Ribelles⁽¹⁾, Begoña García-Sogo⁽¹⁾, Carmen Capel⁽²⁾, Fernando J. Yuste-Lisbona⁽²⁾, Rafael Lozano⁽²⁾, Vicente Moreno⁽¹⁾

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

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

Email de contacto: mary_ja_gu@hotmail.com

El mutante recesivo 1425-MM exhibe un desarrollo helicoidal de sus órganos, motivo por el cual lo denominamos corkscrew (crs). En plántulas cultivadas in vitro el rasgo se manifiesta por una débil curvatura en los cotiledones y primeras hojas y un marcado crecimiento helicoidal del hipocótilo. En las hojas adultas la lámina foliar se curva y el desarrollo helicoidal es aún más evidente en el raquis, así como en el tallo de las plantas crs cultivadas in vivo. Sorprendentemente, el crecimiento helicoidal se manifiesta también en los verticilos de la flor. Los sépalos y pétalos se curvan ligeramente a lo largo de su superficie, excepto en su parte terminal que se curva totalmente hacia la cara abaxial. El cono estaminal parece normal en su parte basal pero tiene un marcado desarrollo helicoidal en su extremo distal.

Los análisis de citometría de flujo no revelaron diferencias en el patrón de mixoploidía en diferentes zonas del tallo de crs con respecto al WT, lo que sugiere que el fenotipo no se debe a diferencias en la progresión mitótica. Subsiguientemente, estimamos el tamaño celular en cortes longitudinales y transversales del tallo. Las células del cortex de crs tenían una anchura ligeramente menor y una similar longitud. En cambio, las células de la médula eran mucho más estrechas y dos veces más largas, lo que provoca ondulaciones en las líneas de células que generan el fenotipo helicoidal. Así pues, en contraste con los mutantes spiral1 y spiral2 de Arabidopsis, en los que el crecimiento helicoidal está asociado a un menor crecimiento anisotrópico, en el mutante crs de tomate el fenotipo parece deberse al mecanismo opuesto, es decir, a un incremento en la anisotropía celular. Actualmente estamos abordando la identificación del gen responsable de este fenotipo peculiar mediante mapeo por secuenciación.

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 la concesión de una beca.

Genetically engineered resistance to sharka disease in apricot

Nuria ALBURQUERQUE⁽¹⁾, Lydia FAIZE⁽¹⁾, Vicenza ILARDI⁽²⁾, Lorenzo BURGOS⁽¹⁾

⁽¹⁾Departamento de Mejora Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus Universitario de Espinardo Nº 25, 30100 Murcia

⁽²⁾Consigli per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria – Centro di ricerca difesa e certificazione (CREA-DC). Via C. G. Bertero, 22 00156, Rome, Italy.

Contact email: nalbur@cebas.csic.es

Sharka disease is caused by the Potyvirus Plum pox virus (PPV) and induces severe damage in apricot (*Prunus armeniaca* L.), that seriously affects yield. One of the main objectives of apricot breeders is to obtain plants resistant to sharka disease. The aim of this work is to produce apricot plants resistant to PPV by genetic transformation using a vector designed for silencing virus genome, which has been successfully used in tobacco and plum. Hypocotyls sections from mature apricot seeds ('Canino' cv.) were infected with the EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens* harbouring the binary vector h-UTR/P1 (Di Nicola-Negri et al., 2005), following a procedure previously described (Wang et al., 2011). The vector produces self-complementary RNA that includes the no-translatable 5' region and part of the P1 gene (nt 1-733) of PPV-M ISPaVe44. Three apricot transgenic lines were generated and the presence of the transgenes was tested by PCR. The lines has been in vitro propagated and evaluated by in vitro micrografting using as rootstock shoots of peach GF305 infected with PPV (García-Almodovar et al., 2015). After 42 weeks from the micrografting the virus was not detected in most of the evaluated shoots of the three lines, whereas all non-transformed shoots controls showed the presence of the virus when evaluated by RT-PCR. Plants of all lines were rooted and acclimatized for their inoculation with PPV under greenhouse conditions following previously published methodology (Rubio et al., 2013). Inoculated plants were subjected to vernalization in a cool chamber for two months and then transferred to the greenhouse for four months to resume the cycle of growth. After two cycles of vernalization and growth lack of symptoms and negative DASI-Elisa results were observed in infected plants of one line. However, positive and negative results in the analyzed plants of the others lines were obtained. More vernalization cycles are required to properly evaluate sharka resistance in apricot plants.

References

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

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

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

Acknowledgements: This work was supported by the INIA project RTA2017-00011-C03-02. genetic engineering. *Sci. Hortic. -Amsterdam* 128, 457-464.

Cell culture initiation from isolated tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) protoplasts

Joana Puga, Sandra Correia, Jorge Canhoto

Centre for Functional Ecology (CFE), Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

joanaritanespuga@gmail.com

Solanum betaceum (Cav.), commonly known as tamarillo or tree tomato, is a Solanaceae that produces edible fruits with economic interest. The low genetic variability observed in natural populations of this species, due to natural inbreeding, imposes limitations to breeding programs, which can be overcome through the combination of classical and biotechnological approaches. Protoplasts have a large potential for plant breeding since they can be used for genetic transformation, somatic hybridization and single cell regeneration. Few data are available over the isolation, culture and regeneration from protoplasts of tamarillo. Previous work carried out in our lab allowed the isolation of protoplasts but without further division. Now we present the first results showing cell division in cultured protoplasts of tamarillo from *in vitro* established shoots and embryogenic cell lines.

Protoplast isolation was achieved using a combination of 2% (w/v) cellulase "Onozuka" R-10 and 0.5% (w/v) macerozyme R-10 on isolation solution buffer (0.4M manitol, 20mM MES-KOH, 20 mM KCl, 0.1% BSA e 10mM CaCl₂), overnight at 27°C, in the dark with agitation. Following digestion of the cell wall protoplasts were purified under centrifugation at 100g for 5min. Protoplasts settled in an interphase band being removed to fresh medium of the same composition of the isolation solution but without the enzymes. Average yields, evaluated by direct counting in a hemocytometer, gave a number of $6.608 \pm 5,821 \times 10^5$ protoplasts g⁻¹FW. Viability assays, using Calcofluor White as well as blue Evans staining, showed that viable cells reached values of $50.51 \pm 28.12\%$.

Isolated protoplasts were cultured in several conditions to test variables such as basal media, culture media additives, plant growth regulators and agarose embedding versus liquid culture. B5 basal medium, supplemented with 0.1mg/L 2,4-D, 1.0mg/L NAA and 1.0mg/L BAP, showed the best results, with cell wall formation and cell divisions being observed after 7days of culture.

Acknowledgments: This work was supported by the project PTDC/BAA- AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".

Obtención de plantas compuestas de olivo mediante transformación con *Agrobacterium rhizogenes*

Elena PALOMO-RÍOS⁽¹⁾, Isabel NARVÁEZ⁽¹⁾, Marina YÉBENES⁽¹⁾, Naima GOUFFI; Adela ZUMAQUERO⁽²⁾, Clara PLIEGO⁽²⁾, Jose Angel MERCADO⁽¹⁾, Fernando PLIEGO-ALFARO⁽¹⁾

⁽¹⁾ Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, Spain

⁽²⁾ Departamento de Genómica y Biotecnología, Fruticultura Subtropical y Mediterránea (IFAPA) Unidad Asociada de I+D+i al CSIC, 29140 Málaga, Spain

Email de contacto: epalomorios@uma.es

La transformación con *Agrobacterium rhizogenes* ha sido utilizada como herramienta para estudios de genómica funcional en raíces (Collier et al. 2005 Plant Journal 43:449-457; Baranski et al. 2006 Plant Cell Reports 25:190-197). La obtención de plantas compuestas de olivo (sistema radicular transgénico y parte aérea no transgénica), mediante esta técnica, sería de gran ayuda para estudiar la interacción de esta especie con los patógenos de suelo *Verticillium dahliae* y *Rosellinia necatrix*. En este trabajo, se presentan las primeras aproximaciones para la transformación de brotes micro-propagados de olivo mediante *A. rhizogenes*. Se han utilizado 2 genotipos procedentes de semilla del cv. Picual, uno con baja capacidad de enraizamiento, P1, y otro, con alta capacidad, P138, y dos cepas de *A. rhizogenes*: A4, que contiene el plásmido silvestre Ri, y K599, con el plásmido binario pKGWFS7.0-35SP, que incluye el gen marcador gfp. En el caso del genotipo P1, en la fase de co-cultivo con la bacteria, se añadieron al medio 3 mg/l AIB, para facilitar la formación de raíces.

En el genotipo P138, se obtuvo un 100% de enraizamiento tanto en el tratamiento control como en el de brotes infectados con la cepa A4; sin embargo, aquéllos inoculados con la cepa K599 sólo alcanzaron un 70% de enraizamiento. Asimismo, se observó que el 61% de las raíces obtenidas tras la infección con K599 mostraron fluorescencia verde bajo el microscopio confocal. En el genotipo P1, el 60% de las plantas control formaron raíces, frente al 10% de plantas infectadas con A4 y ninguna con la cepa K599. La naturaleza transgénica de las raíces obtenidas tras la infección con A4, en ambos genotipos, se evaluará mediante amplificación por PCR del gen RolB.

Proyectos: PLAN NACIONAL AGL2017-83368-C2-1-R y JUNTA DE ANDALUCÍA AVA201601.14 (20% Junta de Andalucía-80% FEDER).

Identificación de modificadores epigenéticos que actúan como inductores de la embriogénesis de la microspora en trigo

Isabel Valero Rubira, Ana M. Castillo Alonso, M. Pilar Vallés Brau

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

Email de contacto: valles@eead.csic.es

La embriogénesis de la microspora se basa en el cambio de patrón de desarrollo del polen inmaduro hacia una ruta embriogénica. La activación del nuevo programa de desarrollo se caracteriza por una reorganización de la cromatina y una alteración de la expresión génica. Las modificaciones post-traduccionales de histonas y la metilación del DNA son dos de los principales mecanismos de regulación epigenética implicados en la embriogénesis de la microspora [1].

Para inducir la embriogénesis de la microspora se usa normalmente un tratamiento de estrés. En estudios recientes se ha descrito que la aplicación de modificadores epigenéticos, como el inhibidor de las histona deacetilasas Tricostatina A (TSA), también tienen un efecto inductor y pueden aumentar la eficiencia del proceso en distintas especies vegetales, entre las que se encuentra el trigo [2].

En este estudio se ha realizado un cribado de modificadores epigenéticos para la identificación de inductores de la embriogénesis de la microspora con mayor potencial que la TSA. Se ha analizado el efecto de cuatro nuevos compuestos sobre el número de divisiones y estructuras pro-embriogénicas obtenidas a lo largo de los 10 primeros días de cultivo en dos cultivares de trigo de diferente respuesta androgénica.

En el cultivar de alta respuesta, tres de los compuestos indujeron un mayor número de estructuras pro-embriogénicas respecto al control, siendo uno de ellos superior a la TSA. Este compuesto fue el único que tuvo un efecto inductor en el cultivar de baja respuesta, obteniéndose valores más altos que los de la TSA. Los resultados obtenidos han permitido identificar un modificador epigenético con un efecto inductor de la embriogénesis de la microspora en trigo mayor que el de la TSA.

[1]: Testillano, P.S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, ery464.

[2]: Jiang, F., Ryabova, D., Diedhiou, J., Hucl, P., Randhawa, H., Marillia, E-F., Foroud, N.A., Eudes, F., Kathiria, P. (2017). Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Rep* 36:1701-1706.

High temperatures during maturation produce different somatic embryo morphologies and yields in *Pinus* spp.

Antonia Maiara Marques do NASCIMENTO, Paloma MONCALEÁN,
Ander CASTANDER OLARIETA, Itziar Aurora MONTALBÁN

NEIKER. Forestry Science Department. Centro de Arkaute. 01080 Vitoria-Gasteiz. Spain.

Email de contacto: maiara2011.marques@gmail.com

In the context of current climate change, the development of techniques to generate stress-tolerant plants is of vital importance. For this purpose, we have used somatic embryogenesis as a biotechnological tool to try to induce tolerance to abiotic stress. The conditions of cultivation at the maturation stage are crucial for the development of well-formed somatic embryos and plants. The objective of this study was to evaluate the influence of high temperatures at the maturation phase both for *P. radiata* and *P. halepensis*, on this phase and on the subsequent phases of the process. In order to accomplish this goal, six embryogenic lines for each species, were subjected to maturation at four different temperatures (23, 40, 50 and 60°C) during different incubation periods (6 weeks, 90, 30, 5 min, respectively). It was observed that embryos with normal and aberrant features were formed. With the increase of the temperatures, there was an increase in width and length of the embryos, in both species. The number of somatic embryos did also increase as the temperature increased. Therefore, further studies are being carried out to evaluate and quantify the influence of temperature on the production of metabolites and the genetic integrity of the embryos; also the effect of the temperatures during maturation stage in the following phases of the process and in the stress tolerance of the generated plants will be studied.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado por MINECO (Gobierno de España) (AGL2016-76143-C4-3R), BIOALI-CYTED (P117RT0522) y DECO (Gobierno Vasco, "Ayudas de formación a jóvenes investigadores y tecnólogos").

La mutación *Arlequín* confiere cambios en la arquitectura radicular y mayor tolerancia a estrés

Carlos Ribelles Alfonso⁽¹⁾, Begoña García-Sogo⁽¹⁾, Alejandro Atarés Huerta⁽¹⁾,
Fernando J. Yuste-Lisbona⁽²⁾, Laura Castañeda Cruz⁽²⁾, Carmen Capel Salinas⁽²⁾,
Rafael Lozano Ruiz⁽²⁾, 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

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

Email de contacto: bpineda@btc.upv.es

Arlequín (*Alq*) es un mutante insercional de tomate cuyos sépalos se convierten en órganos análogos a un fruto (Pineda et al, 2010). El cambio en el programa de desarrollo de los sépalos de *Alq* se debe a la expresión ectópica de un gen MADS-box (i.e. *ARLEQUÍN* (*ALQ*)/*TAGL1*) que desempeña un papel clave en el proceso de maduración (Giménez et al, 2010). A diferencia de lo que ocurre con otros genes implicados en el proceso de maduración (i.e. *RIN* o *CNR*), *ALQ* también actúa en el desarrollo temprano del carpelo, coincidiendo con el estadio de proliferación celular que tiene lugar en la etapa posterior a la antesis. En este contexto, Ribelles et al (remitido) han mostrado que la mutación *Alq* incrementa la tasa de cuajado de fruto como consecuencia de eventos de división celular en el pericarpio del ovario previos al proceso de polinización, lo que parece estar mediado principalmente por un notable incremento de los niveles de citoquinina.

Moreno-Risueno et al (2010) demostraron que los ortólogos de *ALQ* en *Arabidopsis* (i.e. *SHATTERPROOF1* (*SHP1*) y *SHP2*) participan en el desarrollo radicular, actuando junto con el gen *AUXIN RESPONSIVE FACTOR7* (*ARF7*) en una misma ruta para producir periódicamente regiones de pre-ramificación radicular. El trabajo que presentamos en esta comunicación está relacionado con la caracterización de la arquitectura radicular de *Alq* y la evaluación del mutante en condiciones de estrés osmótico. Los resultados indican que la mayor expresión del gen *ALQ* confiere cambios en la arquitectura de la raíz y que el mutante *Alq* es capaz de tolerar mejor las condiciones de estrés osmótico. Estos resultados sugieren que el mayor nivel endógeno de citoquininas y/o una arquitectura radicular más favorable podrían determinar un mejor comportamiento del mutante bajo ciertas condiciones de estrés abiótico.

Referencias

Pineda et al (2010). *Plant and Cell Physiology*, 51: 435-447. Moreno-Risueno et al (2010). *Science*, 329 (5997): 1306-1311.

Financiado con Ayuda a Primeros Proyectos de Investigación (PAID-06-18), Vicerrectorado de Investigación y Transferencia de la Universitat Politècnica de València (UPV), València, Spain.

Embriogénesis somática, priming y termotolerancia en pino marítimo

Ester Sales⁽²⁾, Amparo Pérez- Oliver⁽¹⁾, Álex Alborch⁽¹⁾, Juan Segura⁽¹⁾, Isabel Arrillaga⁽¹⁾

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

⁽²⁾Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Área de Producción Vegetal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Zaragoza, Ctra Cuarte s/n, 22071 Huesca, España.

Email de contacto: isabel.arrillaga@uv.es

Estudios recientes han demostrado que la aplicación de estímulos externos durante la fase de desarrollo de los embriones zigóticos y/o somáticos produce cambios epigenéticos que estimulan respuestas de adaptación de las plantas ante posteriores situaciones de estrés. El objetivo de este trabajo es producir plantas de pino marítimo (*Pinus pinaster* Aiton) mejor adaptadas a condiciones de estrés térmico aplicando choques térmicos durante la fase de inducción de la embriogénesis somática.

Se aislaron megagametofitos de semillas inmaduras de pino marítimo y se les aplicó un choque térmico inicial de 37 o 50°C (priming). Posteriormente, se cultivaron siguiendo el protocolo de embriogénesis somática desarrollado por nuestro grupo hasta la producción de plantas (Arrillaga et al. 2019).

En general el priming disminuyó la frecuencia de inducción embriogénica aunque se obtuvieron plantas de todos los tratamientos.

Las plantas derivadas de megagametofitos primados a 37 y 50°C presentaron una mayor expresión del gen *WRKY*, que codifica un factor de transcripción implicado en la activación de genes de respuesta al calor, en las plantas in vitro generadas tras la maduración. Dicha expresión se mantuvo en las plantas una vez transferidas al invernadero.

En un ensayo posterior, se aplicó un estrés prolongado de calor durante 12 días (45°C durante 3 horas al día) a plantas primadas y control tras dos años de su transferencia al invernadero. Se midieron en estas plantas varios parámetros relacionados con el ajuste osmótico, la fotosíntesis y la expresión de HSP70, proteína de respuesta a calor, antes de iniciar el experimento, al finalizar el estrés (T12) y 14 días después para ver la recuperación.

Los resultados obtenidos apuntan a que el priming en la fase de inducción de embriogénesis somática origina plantas mejor adaptadas a elevadas temperaturas.

Referencias

Arrillaga I, Morcillo M, Zanón I, Lario F, Segura J and Sales E (2019) Front Plant Sci 10:138. DOI: 10.3389/fpls.2019.00138.

Agradecimientos. Este trabajo está financiado por el MINECO, la UE (AGL2016-76143-C4-R), la Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2014/052).

Effects of environmental stress in *Pinus halepensis* somatic embryogenesis

Cátia PEREIRA⁽¹⁾⁽²⁾, Itziar A. MONTALBÁN⁽¹⁾, Tomás GOICOA⁽³⁾, María Dolores UGARTE⁽³⁾, Sandra CORREIA⁽²⁾, Jorge CANHOTO⁽²⁾, Paloma MONCALEÁN⁽¹⁾

⁽¹⁾ Neiker-Tecnalia. Centro de Arkaute. Apdo. 46. 01080 Vitoria-Gasteiz. Spain. pmoncalean@neiker.eus

⁽²⁾ Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, 3000-456 Coimbra. Portugal. jorgecan@uc.pt

⁽³⁾ Department of Statistics, Computer Science and Mathematics, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain

Somatic embryogenesis (SE) has been a worldwide used technology tool that offers the capacity to propagate a large number of plants with improved characteristics that can increase forest productivity.

Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.), native to the Mediterranean basin, is a drought-tolerant species with high plasticity to grow in a wide diversity of soils and susceptible to be used in large afforestations in a future scenario of climate change.

In order to establish and improve a regeneration protocol for *Pinus halepensis* and to assess the effect of different temperatures and water availabilities in the success along the process, two separate experiments with manipulation of environmental conditions were made.

In the first experiment different temperatures (18, 23 and 28 °C) and different agar concentrations (2, 3 and 4 g L⁻¹) were tested during the initiation stage of Aleppo pine SE. In the second, the changes in temperatures (18, 23 and 28 °C) and agar concentrations (3.5, 4.5 and 5.5 g L⁻¹) were tested during the proliferation stage.

It was found that environmental conditions during the initiation stage of *Pinus halepensis* SE influence the success of initiation and proliferation, with the induction of SE with lower water availability (4 g L⁻¹ of gellan gum) increasing the initiation rates (49 %). On the other hand, manipulation of environmental conditions during proliferation of embryonal masses caused an effect after several months in the production of somatic plants. The best results were obtained when the embryonal masses were cultured at the lowest temperature, since embryonal masses proliferated at 18°C showed a significantly higher ex vitro survival (69.5%) and water availability was lowered, once the highest germination rates were achieved with the concentration of 5.5 g L⁻¹ of gellan gum.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado por MINECO (Gobierno de España) (AGL2016-76143-C4-3R), BIOALI-CYTED (P117RT0522) y DECO (Gobierno Vasco, "Ayudas de formación a jóvenes investigadores y tecnólogos").



SESIÓN III

Organogénesis y Somatic
Embriogénesis: bases
fisiológicas

SESSION III

Organogenesis and Somatic
Embryogenesis:
physiological bases

Micropropagación de *Sedum sediforme* y *S. album*, una estrategia rápida y eficiente para multiplicación a gran escala de estas especies

Begoña García-Sogo⁽¹⁾, Carlos Ribelles Alfonso⁽¹⁾, Gökhan Gökmen⁽¹⁾, Benito Pineda Chaza⁽¹⁾, Salvador Soler Aleixandre⁽²⁾, Vicente Moreno Ferrero⁽¹⁾

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

⁽²⁾Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, UPV, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia

Email de contacto: carriall@etsmre.upv.es

Dos de los problemas del crecimiento urbano son la escasez de espacios verdes y el aumento de la temperatura, lo que conduce a una reducción de la calidad medioambiental de las ciudades. Para la mejora de estas condiciones, la incorporación de cubiertas vegetales en los edificios se ha convertido en una medida de sostenibilidad aplicada a la nueva construcción o rehabilitación de edificios, lo que proporciona ventajas económicas y ecológicas, y mejora el balance energético de los edificios. En este sentido, tanto en los países más cálidos como en los más fríos, las cubiertas vegetales protegen a los edificios acumulando calor en invierno o protegiéndolos de la radiación solar durante las estaciones más cálidas. Algunas especies del género *Sedum*, como por ejemplo *S. sediforme* y *S. album*, son especialmente interesantes para su implantación en una cubierta vegetal, ya que tienen un sistema radicular no agresivo y superficial, alta tolerancia a la sequía, pocos requerimientos nutricionales, elevada resistencia a plagas y enfermedades, y una capacidad especial para modificar su sistema metabólico durante periodos de sequía.

Con el fin de abrir una vía alternativa a los métodos de propagación tradicionales, en este estudio se ha abordado la micropropagación de dos ecotipos de *S. sediforme* y *S. album* oriundos de la Comunidad Valenciana, empleando como material de partida tanto brotes axilares como hojas de plantas establecidas *in vitro*. Describimos el efecto de los reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica y las condiciones más asequibles para abordar todas las fases del proceso de micropropagación de *S. sediforme* y *S. album*.

Efecto de la concentración de auxina y de la presencia de derivados de las difenilureas en el enraizamiento adventicio de brotes castaño y roble

Jesús M VIELBA VILLEGAS⁽¹⁾, Nieves VIDAL GONZÁLEZ⁽¹⁾, Ada RICCI⁽²⁾,
Ricardo CASTRO CAMBA⁽¹⁾, Purificación COVELO ABELEIRA⁽¹⁾,
M Carmen SAN-JOSE CAPILLA⁽¹⁾; Conchi SÁNCHEZ FERNÁNDEZ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda de Vigo s/n. 15780 Santiago de Compostela (España).

⁽²⁾ Dipartimento di Scienze Chimiche, della Vita e della Sostenibilità Ambientale. Unità di Biologia Evolutiva e Funzionale. Università di Parma. Parco Area delle Scienze 11/A (Italia).

Email de contacto: conchi@iiag.csic.es

El enraizamiento adventicio es un proceso complejo y de gran interés para la propagación vegetativa de árboles adultos seleccionados. La concentración de auxina y su modo de aplicación influyen en la formación del sistema radicular y en la calidad del brote enraizado.

En este estudio se evaluaron diferentes concentraciones de auxina y tiempos de aplicación en dos clones de castaño (P1 y P2) y uno de roble (Sainza), establecidos *in vitro* a partir de renuevos basales de árboles adultos. Además, se evaluó la actividad de dos compuestos derivados de urea (2,3-MDPU y 3,4-MDPU), que han demostrado tener efectos beneficiosos en el enraizamiento de otras especies (Brunoni et al. 2014; Ricci et al. 2016).

El ácido indol-butírico se aplicó: a) mediante inmersión basal de los brotes en disoluciones de concentración elevada de auxina (2450 y 4900 μM) durante 1 minuto, b) añadiendo la auxina al medio de cultivo durante 24 h (50, 75 y 125 μM) y c) añadiendo la hormona durante 5 días (25 μM) y en oscuridad. Además, se estudió la aplicación de MDPU durante las primeras 24 horas del tratamiento de auxina o durante todo el periodo de enraizamiento, así como durante 5 días en brotes tratados con auxina 25 μM .

En los brotes tratados con auxina durante 24 h los porcentajes de enraizamiento aumentaron con la concentración de auxina. La aplicación de MDPU no supuso diferencias significativas en las tasas de enraizamiento y número de raíces, pero mejoró el sistema radicular (reducción del callo basal y raíces aéreas, aumento de raíces laterales), redujo la necrosis apical y aumentó el número de brotes que reemprendieron el crecimiento. En general, 3,4-MDPU demostró tener un mayor efecto en la calidad del sistema radicular y del brote enraizado.

Ricci et al. (2016). PCTOC 126:411-427.

Brunoni et al. (2014) PCTOC 118: 111-124.

Pulsos con 2,4-D estimulan la organogénesis en *Prunus* spp.

Elisabeth CARMONA-MARTÍN y César PETRI

Departamento de Fruticultura Subtropical y Mediterránea, Instituto de Horticultura Subtropical y Mediterránea, UMA-CSIC, Avenida Dr. Wienberg, s/n.
29750 Algarrobo-Costa (Málaga - SPAIN).

Email de contacto: cesar.petri@csic.es

En este estudio se ha trabajado con dos tipos de explantos provenientes de semillas maduras (hipocótilos y cotiledones) de tres especies diferentes dentro del género *Prunus*: *P. domestica* (genotipo 'Stanley'), *P. cerasifera* (genotipos 'Adara', 'Ademir', 'Mirobolan B' y 'Mirobolan 29C') y *P. insititia* (genotipo 'Pixi').

Ambos tipos de explantos se cultivaron en medio de regeneración (SRM) descrito anteriormente en Petri et al. (2008). Se aplicaron dos tratamientos diferentes (1: los explantos se cultivaron directamente en SRM, o 2: Los explantos se cultivaron durante 3 días en SRM con la adición de 9,05 μ M ácido 2,4-diclorofenoxiacético y posteriormente en SRM) y se observó periódicamente la regeneración adventicia de yemas hasta 6 semanas después del inicio del experimento.

El análisis de los datos mostró que el tratamiento con ácido 2,4-diclorofenoxiacético aumentó el porcentaje de explantos regenerantes en los dos tipos de explantos para todos los genotipos estudiados. Cuando el explanto utilizado fueron secciones de hipocótilos el incremento fue estadísticamente significativo ($P = 0,05$) en todos los casos excepto para el genotipo 'Adara' y 'Ademir' ($P = 0,2$). En cotiledones el aumento en la frecuencia de organogénesis fue más acusado en todos los genotipos ($P < 0,05$). Incluso, en cotiledones de los genotipos de *Prunus cerasifera* 'Ademir' y 'Mirobolan B', el pulso con ácido 2,4-diclorofenoxiacético resultó crítico, y solamente se observó organogénesis cuando este se aplicó.

Estos resultados son de especial interés ya que muestran un factor clave para la estimulación de la organogénesis en especies recalcitrantes, como es el caso de *Prunus* spp.

Referencias:

Petri C, Webb K, Hily J-M, Dardick C y Scorza R (2008) High transformation efficiency in plum (*Prunus domestica* L.): A new tool for functional genomics studies in *Prunus* spp. *Molecular Breeding*, 22(4): 581-591

Estudio preliminar de la influencia de las poliaminas sobre la regeneración adventicia de explantos de limonero

Virginia CELDRÁN-SÁNCHEZ, Nuria NAVARRO-GARCÍA, Fernando CÓRDOBA, Antonio LÓPEZ-PÉREZ, Yolanda JIMÉNEZ, Margarita PÉREZ-JIMÉNEZ, Olaya PÉREZ-TORNERO

Equipo de Mejora Genética de Cítricos, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), Calle Mayor, s/n, 30150 La Alberca, Murcia.

Email de contacto: olalla.perez@carm.es

La regeneración de plantas in vitro se ve alterada en ocasiones por la producción de etileno en algunos genotipos. La síntesis de etileno está ligada metabólicamente a la de las poliaminas, ya que utilizan como precursor el intermediario S-adenosilmetionina (SAM). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las poliaminas sobre la regeneración adventicia en limonero. Para llevar a cabo este experimento, se utilizaron tres tipos de poliaminas, en cuatro concentraciones distintas: putrescina (0, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM), espermidina (0, 0,3 mM, 0,6 mM, 0,9 mM, 1,2 mM) y espermina (0, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM). El estudio se realizó con segmentos nodales de explantos de dos variedades de limonero: 'Fino 49' y 'Verna 51', a los cuales se les eliminó previamente las yemas pre-existentes. Como resultado, en 'Verna 51' se observó un efecto positivo de las concentraciones más bajas de poliaminas sobre el porcentaje y la tasa (n° yemas totales/ n° explantos) de regeneración. Los mejores resultados se obtuvieron con 0,3 mM de espermidina, aumentando el porcentaje de regeneración en un 47% y la tasa de regeneración en un 67%, con respecto al control. Sin embargo, en los explantos de 'Fino 49' se vio reducida la capacidad de regeneración en todos los tratamientos con poliaminas. Además, se observó que altas concentraciones de putrescina producían la muerte de los explantos de 'Verna 51', no ocurriendo lo mismo en 'Fino 49', indicando así una importante diferencia en la sensibilidad a esta poliamina según el genotipo. En vista de los resultados obtenidos, sería interesante evaluar el efecto de las poliaminas, en el medio de regeneración, sobre los niveles de etileno producidos por los explantos de limonero durante el proceso de organogénesis.

Effect of the invasive *Caulerpa cylindracea* and *Asparagopsis taxiformis* seaweeds extracts on the *in vitro* plant regeneration and crop protection

Nuria Alburquerque⁽¹⁾, Lydia Faize⁽¹⁾, Mohamed Faize⁽²⁾ Maria Dolores Nortes⁽¹⁾,
Jaime Bernardeau⁽³⁾, Juan Manuel Ruiz-Fernandez⁽³⁾, Lorenzo Burgos⁽¹⁾

⁽¹⁾ Group of Fruit Tree Biotechnology, Department of Plant Breeding, CEBAS-CSIC, PO Box 164, 30100 Murcia, Spain

⁽²⁾ Laboratory of Plant Biotechnology and Ecosystem Valorisation, Faculty of Sciences, University Chouaib Doukkali, El Jadida, Morocco

⁽³⁾ Seagrass Ecology Group, Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Murcia, Varadero 1, 30740 San Pedro del Pinatar, Murcia, Spain

Email de contacto: burgos@cebas.csic.es

Caulerpa cylindracea and *Asparagopsis taxiformis* are both invasive seaweeds representing a major threat to indigenous species and the native ecosystems of certain regions of the Mediterranean Sea.

This work examines the possibility of adding value to this abundant biomass in the fields of *in vitro* culture and plant protection.

Results showed that using a 10% aqueous extract from *C. cylindracea* and *A. taxiformis* to *in vitro* culture media enhanced the regeneration percentage of apricot hypocotyl slices, as well as the diameter of explants and the number of regenerating buds per explant.

The combination of each extract with an increasing concentration of conventional plant growth regulators further significantly enhanced most of these parameters.

In addition, the data showed that soaking seeds of *Nicotiana benthamiana* in a 1.5% solution of aqueous extracts of *C. cylindracea* resulted in seedlings with reduced disease severity, when inoculated with the plum pox virus.

These observations demonstrated that it would be possible to transform and perhaps manage the biomass of these invasive algae, which could pave the way to multiple valorizations.

Acknowledgements: MF was supported by the University Chouaib Doukkali, El Jadida (Morocco). The authors want to thank Dr. Alfonso Albacete for his technical assistance with the hormonal analysis. This work was partially supported by the project INIA RTA2017-00011-C03-02 (co-financed by FEDER funds).

Estudio de la osmolalidad interna y del medio en el cultivo *in vitro* de microsporas

Antonio CALABUIG-SERNA, José María SEGUÍ-SIMARRO

Grupo de Biología Celular - Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València. CPI, Edificio 8E – Acceso I, c./ Ingeniero Fausto Elio, s/n. 46011 València (Spain).

Email de contacto: ancaser3@upv.es

Existen diferentes factores que determinan la inducción de la androgénesis en el cultivo de microsporas aisladas. Entre estos factores, el contexto osmótico al que se ven sometidas las células en cultivo podría tener un papel importante. Sin embargo, este aspecto no ha sido todavía estudiado detalladamente. En este sentido, el objetivo del presente trabajo es estudiar la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en cultivos *in vitro* de microsporas. En primer lugar, hubo que poner a punto un método eficiente de homogeneización de las microsporas, evaluando y adaptando algunos de los utilizados previamente para otros materiales vegetales. Posteriormente, se usó este método para analizar la osmolalidad interna de las microsporas recién aisladas, así como la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en diferentes etapas del desarrollo de las microsporas en cultivo.

Comparando los distintos métodos de homogeneización se concluyó que los valores de osmolalidad de las microsporas recién aisladas dependen del método usado para la extracción del contenido intracelular. De entre los diferentes métodos probados, la aplicación de ciclos frío-calor fue lo más efectivo, ya que los valores medios de osmolalidad obtenidos fueron significativamente superiores y, por tanto, ofreció un mayor poder de discriminación entre muestras. En cuanto al estudio de la osmolalidad de las microsporas recién aisladas, se observó que no existen diferencias significativas entre microsporas en diferentes etapas del desarrollo gametofítico. Sin embargo, el cultivo *in vitro* sí afectó a su osmolaridad, de modo que las microsporas correspondientes a etapas de mayor respuesta embriogénica mantuvieron su osmolalidad interna de forma mucho más estable que los que responden menos, que acabaron igualando sus osmolalidades con la del medio de cultivo. Es decir, existe una clara relación entre el mantenimiento de la osmolalidad interna y la respuesta embriogénica.

Influencia del tipo de iluminación LED en la micropropagación del patrón de pistacho UCB1

Elena GARCÍA, Pilar LORENTE, Juan A. MARÍN, Arancha ARBELOA

Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza

Email de contacto: egarcia@eead.csic.es.es

La iluminación mediante LEDs permite ahorrar costes y estudiar la influencia de las características espectrales de la luz en el cultivo *in vitro* y en la micropropagación de plantas.

Hasta ahora, la iluminación a partir de tubos fluorescentes "cool-white" ha sido considerada estándar y, en nuestro caso, los resultados han sido satisfactorios. Para obtener protocolos de propagación masiva de brotes de gran calidad para el patrón de pistacho híbrido UCB1 (*Pistacia atlantica* x *P. integerrima*) es interesante el estudio del efecto de diferentes tipos de iluminación LEDs. En este trabajo se han comparado tres tipos de luz blanca: fría (>5000°K), neutra (3800- 4500°K) y cálida (2800-3500°K) ajustando su intensidad PAR a 35 micromol m⁻² s⁻¹. Como control se ha utilizado la iluminación con tubos fluorescentes "cool-white".

Los brotes de UCB1 se han cultivado en las condiciones estándar solidificando el medio empleado con Difco-Bacto agar al 0.7% y subcultivando cada 3 semanas. Se ha partido de 20 ápices de brotes iniciales (5 ápices/frasco y 4 frascos/tratamiento) y en cada subcultivo se ha mantenido todo el material obtenido eliminando los ápices necrosados. Al final del subcultivo 4 se han tomado los datos del número de brotes totales, número de brotes con ápices necrosados y número de brotes ≥ 25 mm destinados a estudios de enraizamiento.

Los resultados muestran que con la luz cálida la tasa de multiplicación ha sido inferior al control y con un elevado porcentaje de brotes con necrosis apical (>35%), mientras en los demás casos ha sido similar. El porcentaje de brotes sanos con luz fría ha sido cercano al 100%, mejorando al control. Sin embargo, el tipo de iluminación no afectó al enraizamiento *in vitro*.

La temperatura de color de los LEDs blancos ha influido claramente en la tasa de multiplicación y en la calidad de los brotes.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A12_17R).

Efecto de la iluminación LED sobre la fase de multiplicación *in vitro*

Marta BARCELÓ MUÑOZ⁽¹⁾, Alfonso GAGO-CALDERÓN⁽²⁾,
Araceli BARCELÓ MUÑOZ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Lab. Cultivo de Tejidos y Biotecnología. IFAPA Centro de Málaga, Cortijo de Cruz S/N 29140 Málaga, España

⁽²⁾ Dpto. Expresión Gráfica, Diseño y Proyectos, Universidad de Málaga, Escuela de Ingenierías Industriales, C/ Dr. Ortiz Ramos S/N, 29016 Málaga, España

Email de contacto: araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

La iluminación artificial, como complemento de la luz natural o como la única fuente controlada de un sistema, se ha utilizado en la horticultura para modificar el fotoperíodo de un cultivo y aumentar su productividad.

La adaptación cromática de la luz aplicada a este sector comenzó con el desarrollo de filtros foto-selectivos y de conversión de espectro. Hoy día, la principal opción tecnológica, debido a la eficiencia energética, la baja generación de calor y la alta capacidad de control y regulación, son los LED monocromáticos de alta potencia.

En la horticultura en general, y en el Cultivo de Tejidos *in vitro* en particular, estos dispositivos permiten un control más preciso del crecimiento y desarrollo de la planta, que el uso de luz blanca convencional, que cubre la mayor parte del espectro visible. Sin embargo, los resultados pueden mejorarse caracterizando adecuadamente la respuesta de cada especie a las diferentes frecuencias de radiación lumínica, estableciendo qué condiciones concretas de intensidad de luz y longitud de onda son las más adecuadas para cada proceso de crecimiento y desarrollo. El uso preciso de esta información nos podría permitir manipular la fotomorfogénesis y maximizar la productividad y la rentabilidad de una instalación, con reducción de los costes de energía, ya que toda la luz emitida estaría en el rango de espectro de mayor interés para la planta en cada momento.

Se ha estudiado el efecto de la iluminación LED sobre la multiplicación *in vitro* de terebinto, fresa y rosál. Utilizando lámparas con pequeños saltos de longitud de onda predominante en los dos segmentos del espectro visible más influyente en el desarrollo de plantas: el rojo (630 - 660 nm) y el azul (480 - 450 nm), los resultados obtenidos caracterizan a las especies, que muestran diferentes predilecciones de los espectros de luz.

Este trabajo ha sido financiado con fondos INIA-FEDER (proyecto RTA2016-00056-C02-01).

Morphological and physiological evaluation of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) somatic embryogenesis-derived plants

Mariana CORREIA, Sandra Correia, Jorge Canhoto

Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra

mjcorreia324@gmail.com

Somatic embryogenesis (SE) is an effective tool for cloning and large-scale propagation as shown for many species, including many trees. In the solanaceous tree tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) plant cloning through SE is based on a well-established protocol involving two steps. In the first one embryogenic *calli*, formed by proembryogenic masses of cytoplasmic-rich cells containing large nuclei can be induced from young leaf segments or zygotic embryos in an auxin-containing medium (2,4-D or Picloram) supplemented with high sucrose levels (0.3M). These *calli* can be kept in the same medium through 4-5week subcultures, maintaining their embryogenic potential. Following transfer to an auxin-free medium containing lower sucrose levels (0.1M), proembryogenic masses evolve into somatic embryos that germinate and produce plants. Main drawbacks of this system are the high frequency of abnormal embryos as well as arrested somatic embryo development. To optimize somatic embryo development and plant regeneration several experiments were carried out.

Different embryogenic lines derived from SE leaf induction with different times of culture (1 to 5 years) were treated with 20 μ M 5-azacitidine, 0.05 μ M trichostatin A for 2 days and washed with 0.2% (w/v) activated charcoal, before being transferred to auxin-free conversion media. Activated charcoal treatment presented a higher number of somatic embryos reaching 46 embryos per 100mg of *calli* in one line, but only the trichostatin A and the 5-azacitidine treatments allowed the efficient conversion of somatic embryos into plantlets with a germination rate of 54.5% and 26.3%, respectively. Scanning electron microscopy, histology and gene expression analysis were made to evaluate embryo quality. Successfully acclimatized plantlets from *calli* previously subjected to the different treatments were compared with plants from non-treated *calli* and with plants from zygotic origin. Preliminary results show that SE- derived plants have a similar development when compared to seed-derived plants.

Acknowledgments: This work was supported by the project PTDC/BAA-AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".

Developing scale-up systems for the *in vitro* multiplication of tamarillo using temporary immersion bioreactors

ANA PUGA⁽¹⁾, Sandra Correia⁽¹⁾, João Martins⁽¹⁾, Clayton Debiasi⁽²⁾, Jorge Canhoto⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, Portugal

⁽²⁾ Biotech Plant Lab of Beira Interior, CBPBI, Castelo Branco, Portugal

ananpuga@gmail.com

Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) is a subtropical solanaceous tree species with an increasing agronomical interest due to its high nutritious edible fruits. Several protocols for *in vitro* propagation of tamarillo have been developed at the Plant Biotechnology Laboratory of the University of Coimbra, and micropropagation through axillary shoot proliferation, organogenesis and somatic embryogenesis have been efficiently used in the establishment and multiplication of several genotypes. Nevertheless, a growing demand for tamarillo plants requires an optimization of the existing propagation methods and scaled-up systems that allow large scale cloning.

Bioreactors are used for clonal production of plants starting from cell cultures, tissues, seeds or plant organs, assuring optimal growth conditions. These systems facilitate routine work and improve environmental and aseptic culture conditions, thus allowing large production yields.

The objective of the present work was the optimization of tamarillo axillary shoot proliferation using temporary immersion bioreactors (SETISTM).

Axillary shoot proliferation in the bioreactors was tested on MS medium supplemented with 3 different BA concentrations (0.2, 0.5 and 1 mg/L). The immersion phase occurred for periods of 5 minutes every 3 hours, and elongation (≈ 5 cm) was observed in the 3 conditions tested. The plants were transferred from the bioreactor directly to the substrate (mixture of soil:perlite 2:1). *Ex vitro* rooting was faster and more effective for shoots obtained with 1 mg/L of BA, with 82 % survival rates during the acclimatization phase.

Even though more conditions are being tested (*e.g.* aeration periods, different PGRs), the results obtained so far confirm the effectiveness of this technology for a scaled-up production of tamarillo, offering greater speed in the production process and efficiency when compared to micropropagation in solidified media, in addition to a lower occurrence of hyperhydricity, caused by the permanent contact of the explant with the culture medium.

Acknowledgments: This work was supported by the project PTDC/BAA- AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".

Changes in pectin methylesterification and AGPs indicate remodeling of cell wall during somatic embryogenesis of *Quercus suber*

Elena CARNEROS⁽¹⁾, Yolanda PÉREZ-PÉREZ⁽¹⁾, Eduardo BERENGUER⁽¹⁾,
María-Teresa SOLÍS⁽¹⁾⁽²⁾, 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 Centre, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, 28040, Madrid, Spain

⁽²⁾Departament of Genetics, Microbiology and Physiology, Fac. Biology, UCM, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain

Email de contacto: testillano@cib.csic.es

Changes in cell wall mechanics controlled by methylesterification of pectins, mediated by pectin methyl esterases (PMEs) and pectin methyl esterase inhibitors (PMEIs) underlie organogenesis initiation and embryogenesis progression. Arabinogalactan proteins (AGPs) are highly glycosylated proteins located at the surface of plasma membranes, in cell walls, and in extracellular secretions, with key roles in a range of plant developmental processes.

In this study, we have investigated changes in pectin esterification and AGPs at specific developmental stages during somatic embryogenesis (SE) in *Quercus suber*. Expression analysis of PME, PMEI and AGP genes; PME activity assays; immuno dot blot assays; immunofluorescence and confocal analysis were performed at specific developmental stages, by using monoclonal antibodies to AGPs, high- and low-methylesterified pectins (LM20, JIM7, LM19, JIM5, LM6, LM2); and analysis of total AGPs levels using the β -glucosyl Yariv reagent which binds AGPs. Functional analyses with pharmacological treatments using PME and AGP inhibitors were also carried out.

The results showed that at early embryogenesis stages, cells of proembryogenic masses showed high levels of esterified pectins and expression of QsPME and QsPMEIs genes. At advanced stages, differentiating cells of developing embryos exhibited walls rich in de-esterified pectins, while QsPME gene expression and PME activity progressively increased. AGPs were detected in cell walls of proembryogenic masses and somatic embryos. QsLys-rich-AGP18, QsLys-rich-AGP17 and QsAGP16L1 gene expression increased with embryogenesis progression, as did the level of total AGPs. The distribution patterns of AGPs and pectin esterification/de-esterification during SE progression correlated with the expression patterns of the PME and AGP genes analyzed. Functional analyses with inhibitors of PME activity and AGPs respectively, impaired SE. Results indicate a key role for pectins and AGPs promoting the cell wall remodeling, that is required for SE progression, in cork oak, a woody species in which information on cellular processes underlying SE is still scarce. These findings open up new possibilities to improve in vitro embryo production in tree breeding.

References:

Pérez-Pérez Y, Carneros E, Berenguer E, Solís MT, Bárány I, Pintos B, Gómez-Garay A, Risueño MC, Testillano PS (2019) Pectin de-methylesterification and AGP increase promote cell wall remodeling and are required during somatic embryogenesis of *Quercus suber*. *Front. Plant. Sci.* 9: 1915

Funding:

Supported by projects AGL2014-52028-R and AGL2017-82447-R funded by MINECO and ERDF/FEDER.

Evaluation, micropropagation and selection of tamarillo plants (*Solanum betaceum* Cav.)

Tércia LOPES⁽¹⁾, Sandra Correia⁽¹⁾, Daniel Martín⁽²⁾, Paula Marques⁽²⁾, Jorge Canhoto⁽¹⁾

⁽¹⁾ Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra

⁽²⁾ Molecular Physical-Chemistry, R&D Unit, University of Coimbra

Email: tercia.lopes.95@gmail.com

Tamarillo is a small tree of the Solanaceae family, native to the Andean region of South America. Due to a growing demand for this fruit, the main purpose of this work was the evaluation, micropropagation and selection of tamarillo plants with potential to the Portuguese agro-food sector.

Fruit characterization was determined using different approaches such as morphological (hardness, biometric values), physical-chemical (acidity and soluble solid content) and chemical (ATR-FTIR and Raman spectroscopy data) parameters, collected from red and orange fruits. The results obtained showed the red fruits have higher hardness and soluble solid content in comparison with the orange ones that are poorer in acidity. Red fruit varieties are greater in fruit size and calibre, which make them more attractive for fresh consumption.

Plant propagation potential was also assessed for the same purposes. The registered parameters were shoot proliferation and rooting length and biomass; as well as survival rate after the hardening process, and physiology and genetic uniformity of successfully acclimatized plantlets. Based on multiplication rates it was possible to conclude that long-term established (>6 years) genotypes had significantly lower multiplication rates (33–75%) when compared to recently established genotypes (<1 year), with rates of 80 - 94%. *Ex vitro* rooting of the multiplied shoots was very effective (IBA 0,5mg/L –79.5% and without IBA–81.14%) although less effective, when compared to the *in vitro* rooting rates (92.58%). The length and number of the roots obtained *ex vitro* were higher and with higher biomasses (IBA–15 cm, 8 roots, 7.63% DW; without IBA–13 cm, 8 roots, 8.49% DW; *in vitro*–4 cm, 5 roots, 7.31% DW; respectively).

Based on the fruit quality parameters analysed and on the multiplication potentials assessed, several genotypes of red and orange fruit varieties will be selected and made available for tamarillo fruit producers in Portugal.

Acknowledgments: This work was supported by the project PTDC/BAA-AGR/32265/2017 "Tamarillo breeding: better plants for better products".

Establecimiento *in vitro* de material seleccionado de Teca (*Tectona grandis* L) procedente de Plantaciones Forestales del Pacífico Sur de Costa Rica

Alejandra Rojas Vargas⁽¹⁾, Ana Hine Gómez⁽²⁾, Maricruz Torres Mendoza⁽³⁾,
Lucía Jiménez Corrales⁽⁴⁾

⁽¹⁾⁽²⁾ Laboratorio de Biotecnología Forestal, Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

⁽³⁾⁽⁴⁾ Profesional Independiente, Consultor Forestal, San José, Costa Rica

Email de contacto: alejandra.rojas.vargas@una.cr

La teca (*Tectona grandis*) es una especie ampliamente utilizada en programas de reforestación con fines comerciales. Específicamente, en Centroamérica se estima que más de 4,35 millones de hectáreas se destinan al cultivo de esta especie. La madera de teca es apreciada a nivel mundial por su belleza, resistencia a patógenos y durabilidad. El cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado como una herramienta biotecnológica para complementar el mejoramiento de genotipos seleccionados. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de brotes epicórmicos de 19 genotipos seleccionados. Para el establecimiento se evaluaron tres metodologías de desinfección y se logró establecer brotes epicórmicos de 19 genotipos diferentes empleando cloruro de mercurio 0,25% con un tiempo de exposición de 10 minutos. El mejor medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* de los explantes fue el MS complementado con 3% de sacarosa, 0,016 g/l de agrimicin y benlate y 0,5 g/L de carbón activado solidificado con agar; en donde se obtuvo entre un 9%-94% de brotes epicórmicos establecidos a los 16 días de cultivo; resultado en dependencia al tipo de genotipo utilizado. Además, se evaluó el efecto de dos citocinas (BAP y zeatina) en la brotación de nudos de teca establecidos *in vitro* en medios de cultivo semisólido y líquido (Sistema de inmersión temporal). Específicamente, para el caso del clon49, se obtuvo en promedio 9 brotes por explante y en el mejor tratamiento de brotación fue en medio líquido (concentración de 4,4 M L⁻¹) de 6-BAP. Finalmente, para la inducción de raíces se evaluó el AIB en diferentes concentraciones y en base a los resultados se puede sugerir que no es necesario un regulador de crecimiento exógeno para inducir la formación de raíces. Los 19 genotipos se aclimataron en vivero con un 90% de sobrevivencia y se utilizaron como plantas madres para posterior multiplicación. Con esta metodología se logró establecer las vitroplantas en el vivero forestal La Ampola (INISEFOR-UNA), Costa Rica para su multiplicación vegetativa con fines de investigación y comercial.

Efecto de la sacarosa sobre el crecimiento, estrés y contenido en azúcares en brotes de *Castanea sativa* x *C. crenata* cultivados en sistemas de inmersión temporal y continua

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

⁽¹⁾ Departamento de Fisiología Vegetal. Instituto de Investigaciones Agrobiológicas de Galicia. CSIC. Avda de Vigo s/n. 15780 Santiago de Compostela.

⁽²⁾ Departamento de Biología Animal, Biol. Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus da Zapateira s/n 15071 A Coruña

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

Email de contacto: nieves@iiag.csic.es

El castaño europeo, *Castanea sativa*, es un árbol de gran importancia ecológica y económica en Europa cuyo cultivo está siendo amenazado por la expansión de diversas especies exóticas, tanto insectos como microorganismos. Dentro de estas amenazas destacan varias especies del género *Phytophthora*, causantes de la enfermedad de la tinta.

Durante el siglo pasado se han realizado hibridaciones de castaños europeos y asiáticos, obteniéndose individuos con distintos grados de resistencia a esta enfermedad. Estos híbridos interespecíficos deben ser propagados vegetativamente para mantener su resistencia. Al tratarse de un árbol recalcitrante a la propagación vegetativa convencional se han desarrollado métodos de micropropagación en medios con agar (Vieitez et al. 2007). Además, con el objetivo de reducir costes de producción y mejorar la aptitud de las plantas para la aclimatación, los brotes de castaño se han cultivado en medio líquido utilizando sistemas de inmersión temporal (Vidal et al. 2015) y continua (Cuenca et al. 2017). El siguiente paso ha consistido en reducir el aporte de sacarosa para conseguir el cultivo fotoautotrófico (Aldrey et al. 2018).

En el presente trabajo se estudia el efecto de la concentración de sacarosa añadida al medio de cultivo sobre diversos parámetros fisiológicos. Se han utilizado dos clones de castaño, ambos híbridos de castaño europeo y japonés, que se han cultivado en sistemas de inmersión temporal y continua en condiciones de alta intensidad lumínica y con aire enriquecido en CO₂. Al final de la fase de multiplicación se ha analizado su crecimiento, así como el contenido en compuestos fenólicos solubles totales, antioxidantes totales, azúcares totales y monosacáridos.

Aldrey et al. (2018) Acta Horti 1220:177-184.

Cuenca et al. (2017) PCTOC 131:307-320.

Vidal et al. (2015) PCTOC 123:229-243.

Vieitez et al. (2007) En: Jain SM, Häggman H (eds) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, pp 299–312.

Proembryogenic masses from anther culture show cellular markers of early zygotic embryos in *Cucumis sativus*

Sara BAGHERI⁽¹⁾⁽²⁾, Ivett BÁRÁNY⁽¹⁾, Eduardo BERENGUER⁽¹⁾, Mahmoud LOTFI⁽³⁾,
Mehran E. SHARIATPANAHI, Pilar S. TESTILLANO⁽¹⁾

⁽¹⁾ Pollen Biotechnology of Crop Plants Group, Biological Research Centre, CIB-CSIC, Madrid, Spain

⁽²⁾ College of Aburairhan, University of Tehran, Tehran, Iran.

⁽³⁾ Dep. Horticulture, Fac. Genetics and Breeding of Vegetables, Univ. Tehran, Pakdasht, Iran.

⁽⁴⁾ Dep. Tissue Cell Culture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran

Contact E-mail: testillano@cib.csic.es

Cucumber (*Cucumis sativus*) is an important vegetable crop that is commonly grown worldwide. Progress in in vitro protocols for breeding and propagation purposes in cucumber has been very slow due to its recalcitrance. Temperature treatments are considered as a common stress for induction of embryogenesis through in vitro anther culture in many plant species.

In this work, two cucumber Iranian varieties ('Tabriz' and 'Esfehani') were used for preliminary development of embryogenic anther cultures. In vitro cultures were performed in MS media supplemented with 2 µmol/L 2,4-D and 1 µmol/L BAP, using different temperature treatments (4°C for 9 days, 32°C for 9 days, and 25°C continuously), as potential inducers of embryogenesis. Cultures under 32°C and 25°C conditions showed development of rounded proliferating masses (PMs) from anthers, while no response was found in cultures treated at 4°C. To investigate the embryogenic features of these PMs, a comparative study with early zygotic embryos was performed, by using cellular, biochemical and immunocytochemical assays with specific antibodies to cellular markers, known to have differential expression in embryogenic systems (auxin, esterified pectins, 5mdC-methylated DNA).

Microscopical analyses revealed that PMs were formed by cells with typical features and organization of proembryogenic cells, e.g. small cell size, dense cytoplasm, rounded and large nucleus, and low vacuolation. Quantification of global DNA methylation showed lower methylation levels in PMs than anthers and differentiating tissues. Immunofluorescence assays followed by confocal analyses revealed that cells of PMs exhibited low signal of methylated DNA, high presence of endogenous auxin, and cell walls with highly esterified pectins, in contrast with other cells of anther. Parallel analyses performed in zygotic embryogenesis showed similar results in cells of early proembryo and globular embryo than in PM cells, they differentially exhibited high auxin concentration, DNA hypomethylation and highly esterified pectins, while non-embryo tissues of the developing seed did not.

Taken together, preliminary conditions for embryogenic induction in anther cultures have been developed in two Iranian varieties of cucumber, leading to production of proembryogenic masses that express early embryogenic markers, also present in zygotic embryogenesis.

Work supported by projects AGL2014-52028-R and AGL2017-82447-R funded by AEI of MCIU and ERDF/FEDER. SB is recipient of a grant of the University of Tehran for a sabbatical stay in the CIB.

El Sistema de Inmersión Temporal aplicado al cultivo in vitro del patrón de pistacho UCB1

Pilar LORENTE, Elena GARCÍA, Arancha ARBELOA, Juan A. MARÍN

Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza

Email de contacto: jmarin@eead.csic.es

Los Sistemas de Inmersión Temporal han mostrado grandes dificultades para su aplicación al cultivo in vitro de especies frutales. Sin embargo, las ventajas que ofrecen son muy notables. En el caso de las especies de pistacho, además, pueden contribuir a la disminución de la necrosis apical, que es muy frecuente. La aparición en el mercado de equipos de inmersión temporal asequibles y con posibilidad de ventilación de los cultivos puede disminuir la incidencia de la hiperhidricidad en estas especies.

En este trabajo se aplica el sistema Plantform® a la micropropagación del patrón híbrido de pistacho UCB1 (*Pistacia atlantica* x *P. integerrima*) para su propagación masiva.

Brotos cultivados en el medio habitual (medio1) y subcultivados cada 3 semanas, se han comparado en dos combinaciones de tratamientos: 2 inmersiones/día durante 6 minutos frente a 3 inmersiones/día 1 minuto. Además, los brotes utilizados podían ser colocados libremente o insertados verticalmente en un lecho de perlas de vidrio (5 mm de diámetro) para conservar su polaridad o, en algunos casos, con perlas de vidrio de 16 mm de diámetro. Una modificación del medio (medio2) se evaluó con 2 inmersiones/día.

Tras 3 subcultivos se han obtenido los resultados siguientes: 1) el medio de cultivo, optimizado en medio semisólido, no se ha comportado igual de eficaz en medio líquido y el número de brotes producidos decae, en general, desde el segundo subcultivo; 2) ha habido una baja incidencia de necrosis apical o de ápices parados en muchos tratamientos; 3) el porcentaje de brotes aptos para enraizar (≥ 20 mm) es muy superior al correspondiente en medio con agar; 4) el soporte de perlas de vidrio ha sido perjudicial; y 5) la adaptación de la composición del medio de cultivo a las condiciones de inmersión temporal (medio2) ha dado resultados muy favorables para la propagación masiva de UCB1.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A12_17R).

La inhibición de histona desacetilasas provoca un aumento de la competencia embriogénica en microsporas de colza

Patricia Corral-Martínez, Ricardo MIR, Jose M. Seguí-Simarro

COMAV - Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España

Email de contacto: rimimo@upv.es

La regeneración de plantas dobles haploides a partir de microsporas sometidas a estrés permite obtener líneas puras en una única generación *in vitro*, si bien este proceso es altamente dependiente del genotipo. Muchos aspectos celulares y moleculares de este proceso de inducción del desarrollo embriogénico en microsporas son aún desconocidos. La acetilación de histonas es un proceso importante para la inducción de embriogénesis de microsporas de colza (*B. napus*) ya que la aplicación del inhibidor de histona desacetilasas (HDACs) Tricostatina A (TSA), provoca un aumento de la respuesta embriogénica en colza. En este trabajo hemos tratado microsporas de colza de dos líneas distintas, DH4079 y DH12075, de alta y baja respuesta embriogénica respectivamente, con distintos tipos de inhibidores de HDACs, selectivos y no selectivos, y hemos analizado su respuesta embriogénica en términos de número de embriones producidos. En ambos genotipos observamos un aumento en la respuesta embriogénica de microsporas tratadas con inhibidores de HDACs. Dicho aumento es dependiente de la dosis aplicada y es más pronunciado en la línea de baja respuesta. La aplicación combinada de inhibidores de HDACs, entre los que se incluye el TSA, provoca un aumento frente al control en microsporas de la línea DH12075 tres veces superior al aumento observado en microsporas de la línea DH4079. Por otra parte, el efecto sobre la respuesta embriogénica del inhibidor no selectivo Parabinostat en microsporas de la línea DH4079 depende del estadio específico de desarrollo de las microsporas. En los distintos intervalos analizados de la línea DH12075 se observan incrementos de respuesta del orden de varias decenas respecto a la respuesta observada en el control. Estos resultados apuntan a un efecto general de la inhibición de la acetilación de histonas en la respuesta embriogénica de las microsporas, si bien este efecto es más pronunciado en la línea de baja respuesta.

Embriogénesis de microsporas: estudiando la relación de la respuesta al estrés y el destino celular

Patricia CORRAL-MARTÍNEZ⁽¹⁾, Carolina Camacho-Fernández⁽¹⁾, Ignacio Lorente-Castro⁽¹⁾, Kim Boutilier⁽²⁾, Jose M. Seguí-Simarro⁽¹⁾

⁽¹⁾ COMAV - Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España

⁽²⁾ Laboratory for Molecular Biology and 2Plant Development Systems, Wageningen University and Research, P.O. Box 16, 6700 AA Wageningen, Netherlands

Email de contacto: patcorma@upvnet.upv.es

El reino vegetal se caracteriza por un alto nivel de plasticidad del desarrollo, incluida la capacidad de las plantas para formar embriones en ausencia de fecundación, como en el caso de la inducción de embriogénesis haploide o doble haploide (DH) a partir de microsporas. Esta forma de totipotencia, y los DHs en concreto, constituyen una valiosa herramienta en mejora vegetal. Sin embargo, todavía hay muchos cultivos recalcitrantes a este proceso, como pimiento, berenjena o tomate, entre otros.

En colza, especie modelo para el estudio de este proceso, la embriogénesis se induce mediante estrés térmico, mientras que las especies recalcitrantes suelen requerir varios estreses físico/químicos combinados. En este trabajo examinamos el efecto combinado de algunos de estos estreses, tanto físicos como químicos, que juegan un papel importante en la inducción de embriogénesis de microsporas y su posterior desarrollo.

Estudiando el destino de las microsporas embriogénicas en colza mediante time-lapse imaging y microscopía óptica, confocal y electrónica, vimos que se inducen diferentes tipos de estructuras embriogénicas que acumulan lípidos y almidón de forma distinta, forman paredes celulares diferentes, y tienen diferentes destinos. Algo parecido sucede en especies recalcitrantes a la inducción de embriogénesis. Mediante citometría de flujo hemos podido cuantificar diferencias en la acumulación de lípidos y almidón dependiendo del tipo de estrés y de compuestos aplicados en el momento de la inducción. Nuestros datos sugieren que el estrés y/o la desregulación de la expresión génica dependiente de la inhibición de las histona-desacetilasas son factores importantes que limitan la capacidad de las microsporas para formar embriones viables, lo cual influiría en el grado de recalcitrancia observado en algunas especies.

***In vitro* morphogenesis in cultured explants of *Pinus halepensis* adult trees**

Jéssica TAVARES⁽¹⁾, Cátia PEREIRA⁽¹⁾⁽²⁾, Itziar A. MONTALBÁN⁽²⁾, Sandra CORREIA⁽¹⁾, Paloma MONCALEÁN⁽²⁾, Jorge CANHOTO⁽¹⁾

⁽¹⁾Centre for Functional Ecology, Department of Life Sciences, University of Coimbra, 3000-456 Coimbra. Portugal. jessicatavares96@gmail.com

⁽²⁾Neiker-Tecnalia. Centro de Arkaute. Apdo. 46. 01080 Vitoria-Gasteiz. Spain.

pmoncalean@neiker.eus

Somatic embryogenesis (SE) is a worldwide biotechnological tool that can be used for large-scale clonal propagation in which somatic embryos genetically identical are produced. In conifers as in other taxa recalcitrance of vegetative explants towards somatic embryogenesis increases as donor trees mature, becoming increasingly unresponsive to generate embryogenic calluses and/or somatic embryos.

To develop a SE system for tissue of adult trees and to be able to reproduce identically the genotype of the donor plant, shoot buds were used as explants to induce direct SE in *Pinus halepensis*. DCR media with different concentrations of phytosulfokine, storage temperatures and induction times were used. Only non-embryogenic callus were produced. At the same time, shoot bud organogenesis was used in order to reinvigorate the material before the induction of SE from axillary shoots.

Two types of young cones were also cultured on DCR medium containing 9 mM of 2,4-D and 2,7 mM of Kinetin. One group, with approximately 2 x 1,4 cm, was collected after one year of development and other, with approximately 1,2 x 0.7 cm, after 3 months. Scales from these cones were also used for histological analysis to determine the stage of megagametophyte development at the time of culture. The results showed that calluses could be obtained from these explants and that the older cones gave better results than the younger ones. Acetocarmine staining of these calluses showed no somatic embryo formation.

Non-embryogenic calluses were cultured on different conditions trying to revert its non-embryogenic condition. Experiments included auxin shocks with 100 mg L⁻¹ 2,4-D, 0,3 M sucrose and 0,15 M sucrose with 0,15 M mannitol, pH values of 4 and 10. Although some visible changes in the callus occurred, acetocarmine staining and microscope observation showed that in the tested conditions none of the samples acquired embryogenic properties.

Introducción *in vitro* de diferentes genotipos utilizados como portainjertos en cultivos comerciales de aguacate (*Persea americana* Mill.)

Lina María ARBELAEZ GALVIS, Diana María CANO MARTÍNEZ y
Aura Ines URREA TRUJILLO

Antioquia, Grupo de agrobiotecnología, Universidad de Antioquia. Dirección: calle 67
No.53-108.

Email de contacto: lmaria.arbelaez@udea.edu.co

En Colombia, los portainjertos empleados como material de siembra en los cultivos comerciales de aguacate, presentan alta variabilidad genética, lo que conlleva a una inestabilidad de las características morfoagronómicas de interés como la resistencia a patógenos, a condiciones ambientales, productividad, longevidad, entre otras. Con el fin de unificar el comportamiento y productividad de los huertos de aguacate, el presente trabajo tuvo como objetivo, establecer y propagar *in vitro* cinco morfotipos de portainjertos comerciales de aguacate (LF, LV, LR, LS y LA). Para ello se realizaron cinco eventos de introducción de 179 explantes apicales y segmentos nodales de plantas madre etioladas, las yemas fueron desinfectadas y sembradas en medio basal Murashige & Skoog (MS) y Woody Plant Medium (WPM) bajo condiciones de fotoperiodo (16 horas luz / 8 horas oscuridad) y temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los resultados encontrados a los 90 días de evaluación mostraron un 43% y 35,5% de yemas viables y en desarrollo en los medios de cultivo MS y WPM, respectivamente. Además, se obtuvo un 95% de desinfección y un bajo porcentaje de fenolización (9.3%). Finalmente, el método utilizado permitió el establecimiento *in vitro*, así como la multiplicación y enraizamiento de los diferentes genotipos de aguacate evaluados.

Microinjerto de *Morus nigra* sobre *Morus alba*

Juan Luis FERNÁNDEZ-LORENZO, Alba Noelia PRADO VÁZQUEZ, Nuria FERREIRO DOMÍNGUEZ, Rosa MOSQUERA LOSADA, Pilar GONZÁLEZ HERNÁNDEZ, Antonio RIGUEIRO RODRÍGUEZ, Rosa ROMERO FRANCO, J. Javier SANTIAGO FREIJANES

Departamento de producción Vexetal e Proxectos de Enxeñaría, EPSE de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, Benigno Ledo s/n, 27004 LUGO

Email de contacto: juanluis.fernandez@usc.es

Tres clones de *Morus alba* (Criolla, Tigrenda e Illa Verde) y un clon de *M. nigra* (Bande) seleccionados para uso forrajero fueron micropropagados in vitro y aclimatados. Las plantas obtenidas se utilizaron en ensayos en campo en parcelas distribuidas en tres zonas de Galicia. Los tres clones de *M. alba* presentaron tasas de multiplicación y porcentajes de enraizamiento in vitro significativamente superiores al clon de *M. nigra*. En campo, los clones de *M. alba* presentaron igualmente tasas de crecimiento superiores al clon de *M. nigra*.

En el presente trabajo, se realizaron experimentos de microinjerto del clon *M. nigra* sobre los clones de *M. alba* para determinar las tasas de prendimiento sobre los distintos clones y evaluar si el microinjerto mejora el comportamiento in vitro y en campo del clon de *M. nigra*. Segmentos nodales defoliados de 1,5 cm (1-2 yemas axilares) del clon de *M. nigra* fueron microinjertados sobre segmentos nodales de 2 cm, desyemados, sin raíces, de los clones de *M. alba*. A los dos meses del microinjerto, los primeros resultados muestran tasas de prendimiento entre el 83,3% y el 91,7% (100 % en el autoinjerto). Entre un 77,3% y un 85% de las yemas axilares de las púas han desarrollado un nuevo crecimiento (95,8% en el autoinjerto), y la tasa de enraizamiento espontáneo de los patrones fue de 27,3% (Criolla), 31,8% (Tigrenda), 35,0% (Illa Verde) y 0% (Bande –autoinjerto–), respectivamente. Tras el realisamiento de las púas, se evalúan las tasas de multiplicación y enraizamiento del material de *M. nigra* sometido a microinjerto con relación al control.

Evaluación de la capacidad de producción de líneas CRISPR/Cas9 doblehaploides del cultivar de trigo panadero Bobwhite

Ana María CASTILLO ALONSO⁽¹⁾, Asunción COSTAR CASTAN⁽¹⁾, María José GIMENEZ ALVEAR⁽²⁾, Francisco BARRO LOSADA⁽²⁾, María Pilar VALLES BRAU⁽¹⁾

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

⁽²⁾ Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IAS-CSIC), Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba.

Email de contacto: castillo@eead.csic.es

La obtención de plantas doblehaploides (DH) cobra una especial importancia cuando se usa en combinación con las técnicas de edición génica como CRISPR/Cas9 ya que nos permite obtener líneas homocigóticas en una sola generación. Bobwhite es el cultivar modelo utilizado para obtener plantas editadas de trigo panadero con bajo contenido en gluten (Sánchez-León y col 2018). La eficiencia de Bobwhite para la producción de plantas DH mediante cultivo de anteras es baja. En este estudio se ha aplicado el protocolo descrito por Castillo et al. (2015) para la obtención de plantas DH de 9 cruzamientos F1, en los que intervienen al menos una línea CRISPR/Cas9 de Bobwhite.

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que la capacidad de este cultivar para el cultivo de anteras es baja. Uno de los factores más limitantes es el bajo porcentaje de regeneración, debido a una mala calidad de los embriones. Además, los bajos porcentajes de duplicación cromosómica espontánea, con valores inferiores al 25% en la mitad de los cruzamientos, han hecho necesario la aplicación de colchicina para inducir la duplicación cromosómica. El albinismo no fue un factor limitante ya que en ninguno de los cruzamientos se obtuvieron más de un 25% de plantas albinas.

Se observó una gran variabilidad para la respuesta al cultivo de anteras entre todos los cruzamientos. El menor número de plantas verdes/100 anteras (1,38) se obtuvo a partir de un cruzamiento entre dos líneas de Bobwhite, siendo todas haploides. El cruzamiento de Bobwhite x Arthur Nick produjo el mayor número de plantas verdes/100 anteras (10) y un 50 % de autoduplicación. Sin embargo, en el cruzamiento de Bobwhite por el otro cultivar de interés agronómico, Anza, se obtuvieron valores similares al resto de los cruzamientos.

Castillo AM, Sánchez-Díaz RA, Vallés MP (2015) Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: Ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Front Plant Sci* 6, 402.

Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez, MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro, F (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 2018(16): 902–910.

Mejora genética de cítricos asistida con marcadores moleculares

Pablo ALEZA, Andrés GARCÍA-LOR, María HERNÁNDEZ, José CUENCA, Luis NAVARRO

Centro de Citricultura y Producción Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Ctra. Moncada-Náquera km 4,5, 46113 Moncada, Valencia.

Email de contacto: aleza@ivia.es

La mejora genética de cítricos tiene como objetivos principales la obtención de nuevas variedades resistentes a estreses bióticos, la ampliación de los periodos de recolección tanto para variedades tempranas como tardías, y la mejora de la calidad de los frutos. La biología reproductiva de los cítricos es compleja debido a la apomixis, incompatibilidad sexual, cleistogamia y el largo periodo juvenil, que dificultan la mejora genética y aumentan tremendamente los costes de obtención de nuevas variedades. Una estrategia que permite reducir estos costes es la selección asistida por marcadores moleculares. La mayoría de los genotipos de cítricos son apomícticos, produciendo semillas con un embrión de origen sexual y múltiples embriones nucelares que limitan o impiden el desarrollo del embrión sexual. Esta característica limita la obtención de elevadas poblaciones de híbridos mediante hibridación sexual utilizando como parentales femeninos genotipos apomícticos. La enfermedad provocada por el hongo *Alternaria alternata* es un grave problema en algunos genotipos utilizados en mejora, por lo cual es importante seleccionar híbridos resistentes al hongo. Un carácter cada día más demandado en las nuevas variedades de mandarino es el alto contenido en antocianos, compuestos que les confiere un color rojizo a los frutos. El interés por los antocianos se ha intensificado recientemente debido a que confieren un aspecto más atractivo para el consumidor y a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por ello, la introducción de este carácter en los híbridos es una característica deseable ya que permitiría comercializar estas nuevas variedades como alimentos funcionales o nutraceuticos.

En el programa de mejora genética que estamos desarrollando en el IVIA, se está empleando la selección asistida por marcadores moleculares para la obtención de parentales diploides y tetraploides no apomícticos, a la selección de híbridos diploides y triploides resistentes a *Alternaria* y a la obtención de variedades con frutos de alto contenido en antocianos.



SESIÓN IV

Metabolismo Secundario

SESSION IV

Secondary Metabolism

A large, stylized leaf graphic in a light gray color, positioned in the bottom right corner of the page. It features a prominent vein structure and a curved, pointed shape.

Optimización de la callogénesis en *Stevia rebaudiana* (Bert.) para establecimiento de cultivos celulares

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.

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

Email de contacto: svilarino@algosur.com

Estevia (*Stevia rebaudiana*, Bert.) es una planta con creciente interés en alimentación como sustituto del azúcar y otros endulzantes sintéticos debido a sus altos contenidos en hojas de edulcorantes bajos en calorías. Sin embargo, varios estudios han sugerido que, otros metabolitos secundarios presentes en la hoja, como esteviol e isosteviol, también pueden ofrecer beneficios terapéuticos con acción antihiper glucémica, antihipertensiva, antiinflamatoria, antitumoral, antidiarreica, diurética e inmunomoduladora (Chatsudthipong y Muanprasat, 2009; Álvarez-Robles et al., 2016). En este estudio se comparan las respuestas a diferentes variables experimentales en la obtención de callos friables, a partir de trozos de hoja, previos a suspensiones celulares capaces de potenciar la síntesis de estos metabolitos con posible interés farmacológico. Las variables consideradas son: variedad de estevia (criolla y morita), condiciones de luz/oscuridad y los reguladores de crecimiento, usando el medio MS como medio base, bencil-amino-purina (BAP), ácido naftaleno acético (ANA) y kinetina (Kin), solos o combinados según la siguiente tabla:

Tratamiento	BAP (mg/l)	ANA (mg/l)	Kin (mg/l)
1	2	2	-
2	2	1	-
3	-	1	1
4	-	2	1
5	-	1	2
6	-	2	2

Los resultados obtenidos muestran que tras 47 días de cultivo se producen porcentajes de formación de callo cercanos al 100% independientemente de las condiciones de luz y oscuridad, mejores calidades de callo respecto a friabilidad y peso fresco en condiciones de oscuridad y en presencia de ANA y la concentración más alta de Kin, con una ligera mejor respuesta en todos los parámetros medidos en los callos obtenidos de hojas de la variedad morita.

Álvarez-Robles, M.J., López-Orenes, A., Ferrer, M. A., Calderón A. A. (2016) Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Industrial Crops and Products* 87: 273–279 Chatsudthipong, V. and Muanprasat, Ch. 2009. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*. 121(1): 41-54.

Production of silymarin flavonolignans in metabolically engineered plant cell suspension cultures of *Silybum marianum*

Purificación CORCHETE⁽¹⁾, Antonio IBARLUCEA⁽¹⁾, David VILLAR⁽¹⁾,
Lorena ALMAGRO⁽²⁾, Javier PALAZÓN⁽³⁾

⁽¹⁾ Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Salamanca, Dirección.

⁽²⁾ Departamento de Biología vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

⁽³⁾ Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona

Email de contacto: corchpu@usal.es

Silybum marianum fruits are the main source of the antihepatotoxic drug silymarin (Sm). Sm compounds are synthesized by coupling taxifolin (Tx) from the flavonoid branch of general phenylpropanoid pathway with the monolignol coniferyl alcohol (CA). The discovered property of Sm as antitumoral agent predictably will increase its market demand. Previous studies with cell cultures showed their presence in the extracellular medium and elicitation significantly stimulated production. Manipulation of cell metabolism by metabolic engineering in combination with elicitation can eventually maximize production of valuable products. In this work, we explored this possibility and cell lines were stably transformed with a regulatory gene: AtMYB12, a master regulator of the phenylpropanoid pathway. As Tx is the limiting precursor in cell cultures for Sm synthesis, independent transgenic cell lines were also generated constitutively expressing an heterologous *chalcone synthase (CHS)* gene.

Expression of MYB transcription factor altered metabolite flux distribution among branches of the phenylpropanoid pathway and accumulation of chlorogenic acid was observed in the biomass, while CA, Tx and Sm amounts were reduced in the extracellular medium.

In contrast, cultures constitutively expressing heterologous *CHS* successfully diverted precursor metabolites to the flavonoid pathway and also to the monolignol branch. In not elicited cultures, Sm levels were not significantly altered; however, upon elicitation with methyl jasmonate alone or in combination with cyclodextrins, a nearly 200% increase over non-transformed cultures was observed. Concerning the impact of CHS overexpression on flavonoids, it should be noted that a putative derivative of naringenin, which was tentatively identified as prenyl-naringenin, showed the greater increase (2.5-3.5-fold). This compound was also accumulated in the extracellular medium.

The results demonstrate that engineering the flavonoid pathway is a feasible strategy for Sm synthesis in undifferentiated cell cultures but branching (prenylating) pathways must be controlled to increase the accumulation of the target compounds.

Biomass and cannabinoids content increases by using flowering *Cannabis sativa* L. proceeding from *in vitro* vs. *in vivo* plantlets

Verónica CODESIDO SAMPEDRO, Carlos FERREIRO VERA

Phytoplant Research S.L., The Science and Technology park of Córdoba-Rabanales 21,
Astrónoma Cecilia Payne Street, Centauro Building, B-1, 14014 Córdoba, Spain

Email: v.codesido@phytoplant.es

Hemp (*Cannabis sativa* L.) is an annual herb that has been cultivated for the value of its fiber, as well as for paper manufacturing, oil extraction and medicinal or drug preparations. It belongs to the family Cannabaceae and contains a class of terpene-phenolics compounds known as cannabinoids, mainly accumulated on pedunculated trichomes, more abundant in the bracts of the female flowers.

Phytoplant Research developed a method for successful *in vitro* micropropagation of *Cannabis sativa* L. The next step was to test if the biomass and cannabinoid content of plants micropropagated *in vitro* was similar in plants propagated by *in vivo* cuttings. Sixteen acclimatized plants of four different registered varieties of *Cannabis* (Phytoplant Research intellectual property) with different cannabinoids content profiles (Beatriz THC:CBD, Magda THC, Pilar CBD and Theresa CBD:CBDv) were grown into grow tents during the whole crop cycle and then harvested. Biomass, height and fresh weight were measured at harvest moment while total dry weight and flowers, leaves and stems dry weights were measured separately after the drying stage. Cannabinoids content (THC, CBD and total cannabinoids) were analysed using gas chromatography coupled to a mass detector. Those data were compared with data obtained from the sixteen control plants, grown in the same conditions but propagated by cuttings from mother plants. To avoid methodological errors, the used plantlets were as homogeneous as possible between them (similar height, well-rooted). Before their location inside the grow tents, the plants were forcibly homogenised, leaving only 6 vegetative shoots in each clone (1 apical shoot + 5 axillary shoots in 3 nodes). Plantlets were randomly numbered. Light intensity (measured as PAR) and irrigation were the same for all the studied plantlets.

One-way ANOVA was performed for each trait and it indicated that there were statistically significant differences between plants proceeding from *in vitro* and *in vivo* cuttings for all the studied traits. Moreover, Two-way ANOVA was performed and there was no variety x method interaction, which indicates that the four varieties presented between 10% and 20% higher biomass and cannabinoids content when acclimatized plants from *in vitro* culture were used.

Botanical, chemical and genetic characterization of a 235-year old historical herbarium sample of *Cannabis sativa* L. cultivated in Alava. Proposed efforts for the *in vitro* generation of live tissue from achenes

Guillermo MORENO(1), Javier GAMBOA(2), Tomás E. DIAZ (3) y Paloma MONCALEAN(4)

(1) Abagune Research, Avda. Miguel de Unamuno 3, 2.15. 01006 Vitoria-Gasteiz. Spain.

(2) Biogenetics, Portal de Zurbano, 3 – Pab.6B. 01013 Vitoria-Gasteiz, Spain.

(3) Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo, C/ Catedrático Valentín Andrés s/n. 33006 Oviedo, Spain.

(4) Neiker-Tecnalia. Campus Agroalimentario de Arkaute. 01080 Vitoria-Gasteiz, Spain.

Email de contacto: guillermo@abagunereseach.com

Introducción: Plant collections in herbaria are potentially valuable seed sources for conservation and recovery. Mortality of seeds from herbarium specimens are expected to be high, given that storage conditions are usually not adequate for seed conservation. However, the literature show how it is possible to get seeds to germinate from ancient specimens. Here we describe the efforts to characterize two *Cannabis sativa* L. specimens from the Prestamero historical herbarium, a private collection within the VIT herbarium from the late XVIII century.

Materials y Methods: Two achenes were visually inspected for their botanical identification. Plant DNA was extracted from leaves of the male historical sample (25.5 mg) and extraction yield was compared to four other samples of varying age (0-40 years old) and gender (3 female, one male). A preliminary genetic identification of the cannabinoid profile was attempted by using primers targeting the regions coding for THCA and CBDA synthases. Plant material from seed bracts of the female historical sample (3,3 mg) was analyzed for its chemical content by GC-TOF. A strategy for the germination of achenes is proposed.

Results: Achenes presented an average length of 3.8mm (ranging from 3.5 to 4.0mm) and height of 3.1mm (2.6-3.5mm), which is consistent with a botanical identification of *Cannabis sativa*, subsp. *Sativa* var. *Sativa* (or common hemp, including *C. chinensis*, *C. sativa* var. *Pedemontana* and *C. americana*). Results arising from chemical and genetic test are expected to confirm and deepen on this classification.

Discussion: Legalization of cannabis in several international jurisdictions has prompted the industrial interest for the cultivation of this crop. The recovery of an autochthonous variety of *Cannabis sativa* L. adapted to the climatic conditions of Euskadi could represent a significant stepping stone in the development of a local cannabis industry to stimulate the primary sector.

Estrategia biotecnológica para incrementar la producción de oxi-resveratrol mediante cultivo *in vitro* de morera

Isabel Nicolás Sánchez⁽¹⁾, Laura Di Patria⁽²⁾, Pedro Joaquín Sánchez Pujante⁽¹⁾,
M^a Ángeles Pedreño⁽¹⁾, Ana Belén Sabater Jara⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus 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.

Email de contacto: isanisanchez@hotmail.com

La morera presenta un elevado potencial sobre la salud humana debido a su gran cantidad de compuestos bioactivos de naturaleza fenólica, principalmente flavonoides y estilbenoides, los cuales presentan actividad antiinflamatoria y antioxidante. Los extractos procedentes de esta planta se han relacionado con la prevención y el tratamiento del cáncer, la obesidad y la diabetes, así como enfermedades hepáticas y cardiovasculares (Huang et al., 2013; Chan et al., 2016). Debido a las propiedades beneficiosas de los compuestos bioactivos de la morera, se han desarrollado estrategias alternativas a la extracción directa de estos metabolitos a partir de material cultivado en el campo que consisten en el uso del cultivo *in vitro* de plantas. La elicitación de estas plantas *in vitro* supone una estrategia biotecnológica rentable para incrementar los niveles de estos metabolitos, sobretodo cuando dichos metabolitos se secretan al medio de cultivo, lo que hace que el proceso de extracción sea fácil de realizar y resulte respetuoso con el medio ambiente.

En este estudio, se realizaron experimentos de elicitación con β -ciclodextrinas metiladas al azar, solas o en combinación con jasmonato de metilo. Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de oxi-resveratrol en el medio de cultivo de plantas elicitadas con ciclodextrinas solas o en combinación con jasmonato de metilo, así como una elevada actividad antirradical expresada como equivalentes de Trolox. Estos resultados sugirieron que el medio de cultivo de plantas elicitadas de morera *in vitro* suponen una fuente de compuestos bioactivos de interés para la industria.

Referencias:

Chan, K. C., Ho, H. H., Lin, M. C., Huang, C. N., Huang, H. P., & Wang, C. J. (2016). Impact of polyphenolic components from mulberry on apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 381-391.

Huang, H. P., Ou, T. T., & Wang, C. J. (2013). Mulberry and its bioactive compounds, the chemoprevention effects and molecular mechanisms *in vitro* and *in vivo*. *Journal of traditional and complementary medicine*, 3(1), 7-15.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Seneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (No.19876/GERM/15).

Análisis del perfil génico y su relación con la producción de compuestos terpénicos en cultivos celulares de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom sometidos a elicitación

María BORJA-MARTÍNEZ, María J MARÍN-MARÍN, María A PEDREÑO,
Ana B SABATER-JARA

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

Email de contacto: maria.borja@um.es

El tomate "Micro-Tom" (MT) (*Solanum lycopersicum*) ha demostrado ser un modelo de planta representativo de las Solanáceas y otros cultivos con frutos carnosos de tipo baya. Desde hace años, esta planta se está utilizando para estudios genéticos, genómicos, fisiológicos y de desarrollo debido a que presenta un ciclo biológico corto y tamaño reducido, lo que la hace idónea para llevar a cabo estudios controlados en laboratorio. En el tomate, los terpenos se encuentran en grandes cantidades en los tricomas de hojas, tallos, frutos jóvenes y, en parte, en flores. Los triterpenoides han sido estudiados extensivamente en la cutícula de los frutos de tomate encontrándose diferentes terpenoides como α , β , δ -amirina, taraxasterol, lupeol, lanasterol, cicloartenol, colesterol, estigmasterol y β -sistosterol (1).

La producción biotecnológica de metabolitos secundarios mediante el cultivo in vitro de células, representan una alternativa atractiva a la extracción de material vegetal completo. Se han utilizado múltiples estrategias para aumentar la síntesis de estos metabolitos entre los que destaca la elicitación. En ese sentido, estudios previos han demostrado que el uso de oligosacáridos cíclicos como las metil- β -ciclodextrinas y el metil-jasmonato como elicitores, son muy efectivos para estimular la producción de fitoesteroles y taraxasterol en cultivos celulares de *S. lycopersicum* cv MT (2). Por esta razón, con el objetivo de comprender mejor la producción de compuestos de naturaleza terpenoide, se utilizaron suspensiones celulares de tomate MT sometidas a elicitación, para evaluar el efecto de ciclodextrinas, β -glucano y (Z)-3-hexenol por separado o en combinación, como una alternativa prometedora para la producción sostenible de compuestos triterpenoides y establecer una relación entre los niveles de compuestos terpénicos acumulados y la expresión de los genes relacionados en su ruta biosintética.

Bibliografía

1. Bauer S, Schulte E, Thier HP. (2004) Composition of the surface wax from tomatoes. I. Identification of the components by GC/MS. Eur. Food Res. Technol., 219, 223–228.
2. Briceño Z, Almagro L, Sabater-Jara AB, Calderón AA, Pedreño MA, Ferrer MA, Enhancement of phytosterols, taraxasterol and induction of extracellular pathogenesis-related proteins in cell cultures of *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom elicited with cyclodextrins and methyl jasmonate, J. Plant Physiol, 169, 1050–1058.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Seneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (No.19876/GERM/15).

Eventos de señalización temprana en suspensiones celulares de brócoli elicidadas con coronatina

Pedro Joaquín Sánchez Pujante, Karla Daniela Pavón Ramón, Sarai Belchí Navarro, Lorena Almagro, Ana Belén Sabater-Jara, María Borja Martínez, M^a Ángeles Pedreño

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

Email de contacto: pedrojoaquin.sanchez@um.es

El consumo de brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) se ha incrementado en todo el mundo debido al alto valor nutritivo de esta hortaliza [1]. La mayoría de los efectos beneficiosos del brócoli son atribuidos a su compleja mezcla de fitoquímicos con actividad antioxidante, entre los que destacan los glucosinolatos [2]. Debido a las propiedades de los glucosinolatos, se han desarrollado estrategias biotecnológicas como la utilización de cultivos celulares vegetales elicitados para incrementar la producción de estos compuestos. En este sentido, la coronatina ha sido utilizada como elicitor, ya que incrementa la producción de glucosinolatos en suspensiones celulares de brócoli, induciendo un aumento en la expresión de los genes implicados en su ruta biosintética [3]. El conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de las células de brócoli en condiciones de estimulación con la coronatina resultaría muy útil para su utilización como factorías para producir glucosinolatos. Estos mecanismos moleculares incluyen las vías de señalización temprana y su relación con los eventos finales, en particular la biosíntesis y acumulación de glucosinolatos en el interior celular. La secuencia de los procesos de señalización celular incluye la fosforilación reversible de proteínas de la membrana plasmática y citosólicas, y la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática, en particular, flujos de Ca²⁺ que resultan esenciales para la activación de respuestas de defensa. La implicación del peróxido de hidrógeno y del óxido nítrico es otra característica importante de las respuestas de defensa tempranas, ya que constituye una parte de la cascada de señalización que se activa en las células vegetales en respuesta a elicitores. Para llevar a cabo este estudio, se ha realizado una aproximación farmacológica mediante la utilización de inhibidores de las vías de transducción de señal con el fin de analizar la secuencia de la respuesta celular frente al elicitor.

Bibliografía:

- [1] J.E. Lee, I.Y. Bae, H.G. Lee, C.B. Yang, Tyr-Pro-Lys, an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from broccoli (*Brassica oleracea* Italica), *Food Chem.* 99 (2006) 143-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.050>.
- [2] E.H. Jeffery, M. Araya, Physiological effects of broccoli consumption, *Phytochem. Rev.* 8 (2009) 283-298. doi:10.1007/s11101-008-9106-4.
- [3] P.J. Sánchez-Pujante, A.B. Sabater-Jara, S. Belchí-Navarro, M.A. Pedreño, L. Almagro, Increased glucosinolate production in *Brassica oleracea* var. *italica* cell cultures due to coronatine activated genes involved in glucosinolate biosynthesis, *J. Agric. Food Chem.* (2018). doi:10.1021/acs.jafc.8b04298.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Seneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia (No.19876/GERM/15).



SESIÓN V

Conservación de recursos
genéticos

SESSION V

Conservation of genetic
resources

Análisis fenotípico de plantas regeneradas a partir de embriones somáticos crioconservados

José Manuel CERETO BLANCO, Carolina SÁNCHEZ ROMERO

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

Email de contacto: c.sanchez@uma.es

Los cultivos embriogénicos constituyen un material de gran interés tanto para los programas de mejora clásica como para los basados en aproximaciones biotecnológicas. La crioconservación se considera el único método efectivo para la conservación a largo plazo de tejidos embriogénicos. Sin embargo, la exposición a temperaturas muy bajas, el estrés osmótico o algunos compuestos utilizados en los protocolos de crioconservación, pueden provocar mutaciones o cambios epigenéticos, dando lugar a la aparición de variación somaclonal.

En la presente investigación se evaluó el efecto de la crioconservación, así como de un pretratamiento con alta concentración de sacarosa, sobre la estabilidad fenotípica de plantas de olivo regeneradas vía embriogénesis somática. El análisis fenotípico se llevó a cabo mediante análisis morfológico y biométrico de caracteres vegetativos, cinco años después de la aclimatación.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la existencia de seis fenotipos variantes relacionados con el hábito de crecimiento, la estructura del tallo, la disposición de los brotes axilares, la filotaxia y la morfología de la hoja. La frecuencia de aparición de fenotipos variantes así como la acumulación de fenotipos variantes por planta fueron menores en las plantas crioconservadas que en las regeneradas a partir de cultivos no crioconservados. No se observaron diferencias significativas debidas al tratamiento con alta concentración de sacarosa.

El análisis biométrico puso de manifiesto diferencias significativas en el crecimiento de las plantas procedentes de los distintos tratamientos. En general, las plantas control presentaron mayor crecimiento que las derivadas de cultivos crioconservados, con tallos más largos y gruesos. No se apreciaron diferencias en el resto de parámetros relacionados con la arquitectura de la planta. La representación en diagramas de cajas reveló la existencia de variación intraclonal en relación a algunas de las variables evaluadas.

Manejo y conservación del polen de teca (*Tectona grandis L*)

Ana Hine Gómez⁽¹⁾, Alejandra Rojas Vargas⁽¹⁾, Olman Murillo Gamboa⁽²⁾

⁽¹⁾ Instituto de Investigación y Servicios Forestales (INISEFOR), Universidad Nacional, Dirección: 600 metros este de la plaza de deportes de Santa Lucía de Barva, Heredia, Costa Rica.

⁽²⁾ Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Heredia., 1 km al sur de la Basílica de Nuestra Señora de los Ángeles, Cartago, Costa Rica.

Email de contacto: ana.hine.gomez@una.cr

La teca (*Tectona grandis Linn F.*) originaria de la India y Birmania, Tailandia e Indochina, en el continente asiático, ha sido plantada fuera de su distribución natural en otros países de Asia, África y América Latina. En América tropical se encuentran plantaciones en algunos países, como las islas del Caribe, Centroamérica, México y en varios países suramericanos. Es una especie arbórea de gran interés económico, que representa el 4% de toda la madera que se comercializa en todo el mundo y conocida principalmente por su calidad en el mobiliario y la industria naval.

Con el fin de ofrecer a los programas de mejoramiento genético de teca; una opción de almacenamiento de polen que garantice su disponibilidad en cualquier momento y para cualquier uso; principalmente para realizar cruces controladas. Se buscó adaptar una metodología para el manejo y la almacenamiento del polen de teca. Para lo cual, se propuso estandarizar y adaptar las metodologías de recolección; deshidratación del polen utilizando gel de sílice; pruebas para determinar los porcentajes de viabilidad y germinación del polen antes y después de la conservación. El polen fue almacenado con un contenido de humedad (CH) entre el 33-39%, tanto a largo plazo por inmersión directa en nitrógeno líquido (-196° C) durante un años, como a corto plazo en aceites naturales como: maíz, canola y mineral (25° C); y en cámara de refrigeración (5°C) durante 28 días.

Los resultados indica que al almacenar polen deshidratado a largo plazo en nitrógeno líquido, se obtiene en promedio porcentajes de viabilidad y germinación del 88% y 28% respectivamente. En el caso de almacenamiento a corto plazo, se obtuvo porcentajes de viabilidad y germinación del 81% y 20% respectivamente, al almacenar en cámara de refrigeración. Por otro lado, en el caso de almacenamiento a corto plazo en aceites naturales, los porcentajes de viabilidad se mantuvieron cercanos al 80% en los tres tipos de aceite durante los 28 días, pero los porcentajes de germinación disminuyeron significativamente hasta valores entre el 3 y 0%.



SESIÓN VI

Del laboratorio a la empresa

SESSION VI

From the laboratory to the
Company

A large, stylized leaf graphic in a light gray color, positioned in the bottom right corner of the page. It has a thick stem and several large, rounded leaflets.

Herramientas de inteligencia artificial y de diseño experimental aplicadas al cultivo *in vitro*: nuevas tecnologías para viejos problemas

Pedro Pablo Gallego

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

Email de contacto: pgallego@uvigo.es

En los últimos años el empleo de herramientas de inteligencia artificial han supuesto un avance sin precedentes en muchos ámbitos desde la economía a la industria, desde la sanidad al medioambiente, permitiendo el análisis, gestión y procesamiento de enormes cantidades de datos (big data) y construcción de modelos analíticos (machine learning) que permiten, con la mínima intervención humana, aprender de datos, identificar patrones y facilitan la toma de decisiones.

Nuestro grupo (Gallego et al., 2011) ha sido pionero en la aplicación al ámbito del cultivo *in vitro* de diversas herramientas de inteligencia artificial cómo las redes neuronales artificiales que han mostrado superioridad a los métodos estadísticos tradicionales en la obtención de información útil y con gran aplicabilidad (Gago et al., 2010a, b) y en la modelización del enraizamiento y aclimatación de plántulas micropropagadas (Gago et al., 2010c; Gago et al., 2014). También ha aplicado la lógica difusa para la detección de factores clave en el enraizamiento y aclimatación (Gago et al., 2010d), el diseño de medios de cultivo (Nezami- Alanagh et al., 2014) y para la optimización de las condiciones de cultivo para la obtención de plántulas sanas micropropagadas (Nezami-Alanagh et al., 2017; 2018); por último, también ha permitido elucidar los factores críticos de la germinación de especies en peligro de extinción (Ayuso et al. 2018).

En esta comunicación revisaremos las ventajas que ofrece el empleo de herramientas de diseño experimental y de inteligencia artificial, frente al análisis clásico, en el análisis de datos obtenido de diversos tipos de cultivo *in vitro* de plantas de interés económico como son la vid, el kiwi, el albaricoque o el pistacho.

Adaptación de un protocolo de micropropagación adquirido al sistema productivo en un laboratorio comercial en un clon de granado (*Punica granatum*)

Inés MATAIX VALERO⁽¹⁾, Josefa FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ⁽¹⁾, Elena GARCÍA MARTÍN⁽²⁾, María Pilar LORENTE ALONSO⁽²⁾, Arancha ARBELOA MATUTE⁽²⁾

⁽¹⁾Invisa Biotecnología Vegetal SL, Caracava de la Cruz, Murcia, Spain

⁽²⁾Departamento de Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza, Spain

Email de contacto: invisa.bio@gmail.com

Para la propagación comercial de una variedad de granado (*Punica granatum*) en el laboratorio de Invisa Biotecnología Vegetal partimos de un protocolo de micropropagación creado ad hoc por el Aula Dei, que nos marca las pautas para la iniciación, la multiplicación y el enraizamiento de este material vegetal. Una vez iniciados los trabajos y, cuando contamos con material vegetal suficiente, comienza una fase estratégica para mejorar el proceso, mediante la observación y el análisis y la puesta en marcha de distintos ensayos con el objetivo de adaptar de manera eficiente el protocolo a la cadena de producción, teniendo en cuenta el ahorro de costes, la operatividad y el tiempo de cultivo en el laboratorio, sin disminuir la calidad de la planta.

De la reconstrucción del protocolo base, nace un nuevo sistema de propagación a gran escala. Su procedimiento consta de 3 enfoques:

1. El estudio de la viabilidad del cultivo en fase de multiplicación mediante el uso de envase de plástico desechable: mejora del desarrollo vegetativo y la uniformidad de la planta, aumentando la tasa de proliferación.
2. Se establece una fase intermedia previa al enraizamiento, que consiste en una fase de fortalecimiento de las plántulas, en donde hemos incorporado un regulador de crecimiento: Paclobutrazol, consiguiendo mayor grosor de los vástagos, entrenudos más cortos, desarrollo foliar y una notoria vigorosidad de todas las plántulas. Todo ello, sin perder su estimulación apical y solucionando la problemática de los tallos afinados y endebles.
3. Regulación y equilibrio de los niveles de macro-micro sales y de hierro, en un medio de cultivo DKW. Ajustando al máximo las condiciones óptimas en cámara de cultivo y reduciendo el tiempo de exposición de la auxina IBA a cinco días. Evitando la necrosis, clorosis y la defoliación avanzada en las hojas de granado debido al estrés provocado por exceso de sales y tiempo de cultivo.

Introducción de plantas carnívoras en cultivo *in vitro*

Alberto Coronado, Marybel Jáquez, Vicente Moreno, Alejandro Atarés

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

Email de contacto: aatares@ibmcp.upv.es

‘The most amazing plants in the world’. Así definió a las plantas carnívoras Sir Charles Darwin, naturalista y uno de los primeros en interesarse por este grupo de plantas tan peculiares. Las plantas carnívoras se caracterizan por haber adaptado su metabolismo, morfología y fisiología para sobrevivir en ambientes pobres en nutrientes esenciales. Este proceso evolutivo se ha repetido de forma independiente en especies presentes en hábitats muy diferentes entre sí. Además, estas plantas han desarrollado diferentes estrategias para capturar y digerir pequeños animales: jarros (*Nepenthes*), trompetas (*Sarracenia*), cepos (*Dionaea*), vejigas de succión (*Utricularia*), o superficies adherentes (*Byblis*, *Drosera*, *Drosophyllum*, *Pinguicula*).

Inicialmente, el interés de este grupo de plantas lo da el valor comercial que tiene por sus características ornamentales. Sin embargo, su estudio también tiene un elevado interés desde el punto de vista científico, por ejemplo, para analizar los procesos evolutivos que se han dado hasta llegar a desarrollar estos nuevos mecanismos para captar nutrientes. Además, algunas plantas carnívoras poseen características que pueden resultar interesantes en farmacología (plantas de la familia *Droseraceae* se emplean para obtener naftoquinonas), sustancias atrayentes de insectos (muchas especies los emplean para mejorar su capacidad de captura), nastias (como las que permite capturar insectos a *Dionaea muscipula*), tolerancia a ambientes encharcados, tolerancia a ambientes pobres en nutrientes, etcétera.

En este contexto, las técnicas del cultivo *in vitro* abren toda una gama de posibilidades. Al aplicar técnicas de micropropagación podríamos dar una alternativa a los métodos de propagación tradicionales que usan las empresas que comercializan estas plantas con fines ornamentales. Además, algunas de estas especies se encuentran en peligro crítico de extinción, por lo que podría ser una herramienta esencial para su conservación. Por último, la puesta a punto de métodos de regeneración adventicia puede permitir el empleo de técnicas de mejora, como la transformación y edición génica o el aprovechamiento de la variación somaclonal en estas especies.

En nuestro grupo hace unos años que hemos iniciado un trabajo de introducción y puesta a punto de métodos de cultivo *in vitro* en diferentes especies de plantas carnívoras. Hasta el momento actual hemos introducido con éxito 9 especies procedentes de 6 géneros diferentes. Además de poner a punto métodos de micropropagación como punto de partida, ya se están llevando a cabo experimentos de transformación genética y de aprovechamiento de la variación somaclonal para poder iniciar programas de mejora genética con estas especies.

Estratificación en frío: Un método simple de mejorar la conversión de embriones somáticos de *Pinus taeda* a plantas

Yenny LINEROS, Sandra MARÍN, Ximena MUÑOZ

Laboratorio de Biotecnología, Bioforest S.A, Camino a Coronel km 15 s/n, Coronel, Chile.

Email de contacto: yenny.lineros@arauco.com

Pinus taeda es una de las coníferas con mayor importancia industrial en el mundo. Debido a ésto, investigadores han desarrollado diversos protocolos de producción mediante la técnica de embriogénesis somática. Sin embargo, esta especie al igual que otras de su género, presentan genotipos que son capaces de producir un alto número de embriones somáticos con baja capacidad de germinación. El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de Arauco, ubicado en Chile produce anualmente emblings de *Pinus taeda* para la producción de plantas de sus filiales en Brasil y Argentina. Con el objetivo de optimizar la fase de germinación de los embriones somáticos se estableció un ensayo de estratificación en frío. Para esto se utilizó tejido embriogénico criopreservado de 5 líneas celulares, la cuales fueron maduradas en placa petri con medio Litvay modificado, suplementado con 90 μM de ácido abscísico, 60 g L^{-1} sacarosa y 10 g L^{-1} de Phytigel®, a una concentración de 80 mg de tejido por placa petri. Las placas fueron incubadas durante 4 a 5 meses, hasta la completa maduración de sus embriones, en condiciones de oscuridad a una temperatura de $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 60% de humedad relativa. Los embriones fueron almacenados a 4°C durante 0, 15, 30, 45, 60 y 75 días y fueron germinados en envases de polipropileno con medio Pullman N°55 modificado, suplementado con 20 g L^{-1} sacarosa, 0.6 g L^{-1} carbono activado y 4 g L^{-1} de Phytigel®. Los embriones fueron cultivados con un fotoperiodo de 16 horas luz entre 40 y 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una temperatura de $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los resultados obtenidos fueron 3,8 plantas/g PF en embriones no almacenados, mientras que el mejor tratamiento fue almacenamiento a 4°C por 60 días en 4 líneas celulares, donde se obtuvieron 49,3 plantas por g/PF.

Puede le CTV apoyar las bioeconomías regionales? Casos exitosos en Argentina

Sandra SHARRY⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾, Patricia BOERI⁽²⁾⁽³⁾ y Sebastian GALARCO⁽¹⁾⁽³⁾

⁽¹⁾Laboratorio de Investigaciones de la Madera (LIMAD), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 117, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

⁽²⁾Universidad de Río Negro UNRN, Sede Viedma - CIT-Río Negro

⁽³⁾Red Bioali-CYTED

⁽⁴⁾CICPBA

Email de contacto: ssharry@gmail.com

Es posible utilizar el CTV para potenciar el desarrollo productivo con agregado de valor regional? las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son herramientas que pueden favorecer el desarrollo bioeconómico de una región, contribuyendo al desarrollo sustentable y generando oportunidades laborales. Este trabajo resume experiencias regionales para mostrar las aplicaciones del CTV en bioeconomía. Se presentan casos exitosos de utilización de la técnica: proyectos de investigación y transferencia como *Métodos y tecnologías de propagación y domesticación de plantas para el desarrollo de una bioeconomía local basada en la biodiversidad (UNLP-2019-2022)*; *Bioeconomía regional: rescate, conservación y valorización de las especies nativas de la flora patagónica (UNRN-2018-2020)*; *la Escuela de Jardinería "Ing. Agr. José A. Ruchesi"* del Chaco; la transferencia de conocimiento para la creación del Laboratorio del CEAMSE (Buenos Aires); la empresa *Orquídeas al Sur*, la instalación de Biofábricas (UNLP-Municipios) y el Vivero Humus (El Bolsón). Estas experiencias incluyen regiones, condiciones económicas y sociales diferentes e ilustran las variadas aplicaciones del CTV en las bioeconomías regionales, pasando del "laboratorio a la empresa o el servicio". En estos casos la aplicación de técnicas simples de micropropagación permitieron generar capacidades instaladas, agregar valor en origen y abrir nuevos mercados, con un impacto social importante. Cabe resaltar que las bioeconomías no se generan o crecen sin una política pública clara y direccionada, que requiere que los gobiernos, ciudadanos, sociedad civil, organismos de investigación y empresas participen en su desarrollo.

Transferencia del laboratorio al vivero comercial: propagación masiva del patrón de pistachero UCB-1

José DIAZ-RIQUELME⁽¹⁾, Elena GARCÍA⁽²⁾, Pilar LORENTE⁽²⁾, Juan A. MARÍN⁽²⁾,
Arancha ARBELOA⁽²⁾

⁽¹⁾ Viveros Provedo, Carretera Ex-106, Km 16.6, 06400 Don Benito (Badajoz)

⁽²⁾ Pomología, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Montañana 1005, 50059 Zaragoza

Email de contacto: diaz@provedo.com

El proyecto "Mejora de la propagación del pistacho" (INIA RTA2014-00056-C02-02) tiene como uno de sus objetivos obtener protocolos de propagación de los patrones de pistacho para solucionar la falta de plantas en los viveros que no logran satisfacer la demanda existente, siendo un factor limitante que encarece la planta y permite la difusión de planta de baja calidad. Uno de los resultados del proyecto ha sido la obtención de un protocolo eficaz para la micropropagación clonal del patrón de pistacho UCB1 (*Pistacia atlantica* x *P. integerrima*) en el laboratorio de la Estación Experimental de Aula Dei-CSIC (EEAD). Para comprobar la idoneidad de este protocolo en el sector viverista se ha evaluado en este trabajo la adaptación del protocolo a la producción clonal y masiva del patrón en el vivero colaborador Viveros Provedo.

El resultado, tras 3 años de cultivo, ha sido muy satisfactorio con más de 80.000 plantas aclimatadas a partir de más de 140.000 brotes aptos para enraizar (supervivencia > 60%). Este porcentaje incluye dos procesos: el enraizamiento y la aclimatación a invernadero.

El clon propagado ha sido seleccionado en una pequeña colección de árboles de UCB1 de origen comercial plantada en la EEAD y que ha mostrado un gran vigor en campo y un comportamiento *in vitro* muy adaptado al cultivo.

Los patrones obtenidos han mostrado una aptitud al injerto en maceta similar o superior al injerto en campo en la primera injertada y un desarrollo normal.

Las limitaciones a la producción de planta han estado relacionadas con los recursos destinados, que se han compartido con la propagación *in vitro* de otros patrones frutales.

Se concluye que el protocolo desarrollado en el laboratorio de la EEAD ha sido escalado y adaptado con éxito a una producción comercial, de manera que el coste de producción ha sido rentable.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto INIA-FEDER RTA2014-00056-C02-02 y por el Gobierno de Aragón (Grupo A12_17R).

Improving a culture medium for *Bryophyllum* spp: role of micronutrients

Samuel L. Novoa, Pascual Pérez-García, Pedro P. Gallego, M. Esther Barreal

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

Email de contacto: pgallego@uvigo.es

Plants from genus *Kalanchoe* have been traditionally used due to their therapeutic benefits, treating a wide variety of diseases, mostly in African and Asian countries (García-Pérez et al., 2018). The more these plants are studied, the more interesting compounds are discovered, such as phenolic acids, flavonoids and bufadienolides (García-Pérez et al., 2019). These bioactive compounds work as chemopreventive agents, fundamentally. Their main problem resides in the low concentrations at what these compounds are found, naturally, all over the plant. Our study, focused on subgenus *Bryophyllum*, has the aim of improving the way these plants are propagated in vitro. The objective of this work, was to optimise the culture medium, by modifying MS medium, the most used in plant cell tissue, attending to micronutrients' concentrations and studying how the addition of different concentrations of cytokinins and auxins could affect to shoot regeneration from leaf explants employing direct organogenesis. Results show that there is a toxicity in MS medium for *Bryophyllum tubiflorum*, recommending the use of 1/8 MS for its in vitro culture. Focusing on direct organogenesis, the most relevant phytohormone for direct shoot production was BAP, at tested concentrations.

García-Pérez, P., Barreal, ME., Rojo-De Dios, L., Cameselle-Teijeiro, JF., Gallego, PP. (2018). Bioactive Natural Products From the Genus *Kalanchoe* as Cancer Chemopreventive Agents: A Review. En: Atta-ur-Rahman, FRS. (Ed.). Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 61. Amsterdam: Elsevier, pp. 49-84.

García-Pérez P, Lozano-Milo E, Gallego PP, Tojo C, Losada-Barreiro S & Bravo-Díaz C. (2019). Plant Antioxidants in Food Emulsions. In: En: Jafar Milani (Ed.). Current Aspects of Colloidal Systems in Food Products. London: Intechopen.

Design of culture medium for the rooting of a recalcitrant chestnut clone

Aida López-Díaz⁽¹⁾, Alejandro Pérez-Martínez⁽¹⁾, Laura Iglesias-Bernabé⁽¹⁾, Margarita Fraga⁽²⁾,
M. Esther Barreal⁽¹⁾, Pedro P. Gallego⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Facultad de Biología, Universidad Vigo, Campus Universitario, 36310. Vigo.

⁽²⁾ Cultigar Laboratorio de Biotecnología, Liñares-Brion, 15865, A Coruña.

Email de contacto: pgallego@uvigo.es

Castanea sativa Mill is a plant species with a low capacity for *in vitro* rooting, being considered as recalcitrant (Vidal et al., 2015). Therefore, the main objective of this work has been to determine which media mineral nutrients are key for the development of the root. For this, an assay for the *in vitro* rooting of a hybrid clone of *C. sativa* Mill. X *C. crenata* Sieb. & Zucc. with 32 media that vary their nutrient concentrations from 0x to 1x of the medium 1/4 MS (Vieitez et al., 1983) has been carried out. The mineral components of the media (macro and micronutrients) were grouped into 5 factors using DOE and analyzed using CHAID, which allowed identifying and classifying groups that cause a significantly different effect.

The results showed that rooting has been improved in some of the 14th media used compared with the media control. This allowed to identify among the 5 factors, those 2 which significantly favour the *in vitro* rooting of the chestnut tree mainly NH₄NO₃ and KNO₃.

Nezami-Alanagh E, Garoosi GA, Landin M, Gallego PP. 2018. Combining DOE with Neurofuzzy Logic for Healthy Mineral Nutrition of Pistachio Rootstocks *in vitro* Culture. *Front. Plant Sci.*, 7: 1474 doi: 10.3389/fpls.2018.01474.

Vidal N., Blanco B., Cuenca B. (2015). A temporary immersion system for micropropagation of axillary. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 123: 229-243.

Vieitez A., Ballester A., Vieitez M., Vieitez E. (1983). *In vitro* plant regeneration of mature chestnut. *Horti. Sci.* 58: 457-463.

Tissue culture of ornamental native species from Argentina as a market innovation

Maite ROMERO ALVES⁽¹⁾, Tatiana CINQUETTI⁽¹⁾, Mariano VELAZQUEZ⁽¹⁾,
Sebastián GALARCO⁽²⁾, Diego RAMILO⁽²⁾, Sandra SHARRY⁽¹⁾⁽²⁾.

⁽¹⁾ *U.Pro.Ve*, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 118.

⁽²⁾ Chair of Dasonomía, Escuela Superior de Bosques, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Diagonal 113 y 61.

Email de contacto: mromeroalves@gmail.com

The market of ornamental plants is dependent on the diversification of species and the availability of high-quality propagation materials. Actually, in vitro culture techniques performance a prominent role in the multiplication and maintenance of commercially propagated ornamental plant species, and are promising for the production of thousands of high-quality plants in a relatively short term. The incorporation of native ornamental plant species in green public spaces constitutes an element of the urban landscape, in their renovation processes and expansion. The objective of this work was to optimize In vitro propagation protocols for *Erythrina crista-galli* L. (Ceibo), *Chorisia speciosa* St. Hill (Drunken stick) and *Citharexylum montevidense* (Spreng.) Mold., all of them native of Buenos Aires, Argentina. They all have a beautiful and strong flowering and is using as ornamental plants. Ceibo (Legumes) is the national flower of Argentina and nodal sections from in vitro seedlings were cultured in Murashige & Skoog medium (MS) with 1 mgL⁻¹ of BAP and 0.5 mgL⁻¹ of NAA. The new shoots were subcultured in a WPM medium with 0.1 mgL⁻¹ of IBA where they elongated and for rooting WPM medium with 0.1 mgL⁻¹ of NAA. Floral buttons of *Chorisia speciosa* were kept on induced medium WPM at half of concentration with 1,5 mgL⁻¹ of 2,4-Dichlorophenyl acetic acid and 1 g/L of activated charcoal in order to obtain callus and somatic embryogenesis. Leaves and nodal sections of plants of *Citharexylum montevidense* were placed in a complete MS medium free of plant growth regulators or supplemented with NAA 1mg/L, ANA and 6-benzylaminopurine 1mg/L. In all cases we obtained morphogenic responses.



ÍNDICE DE AUTORES



AUTHOR INDEX



Índice de autores

Author index

- | | |
|-----------------------------------|--|
| Alborch, Álex: 47, 58 | Belchí, Sarai: 92 |
| Alburquerque, Nuria: 52, 66 | Berenguer, Eduardo: 72, 76 |
| Aldrey, Anxela: 75 | Bernal, M ^a Ángeles: 75 |
| Aleza, Pablo: 83 | Bernardeau, Jaime: 66 |
| Allue, Sandra: 31 | Boeri, Patricia: 102 |
| Almagro, Lorena: 87, 92 | Borja-Martínez, María: 91, 92 |
| Arbelaez, Lina María: 81 | Boutilier, Kim: 79 |
| Arbeloa, Arancha: 68, 77, 99, 103 | Breton, David: 26 |
| Arjona-López, Juan M.: 45 | Burgos, Lorenzo: 52, 66 |
| Arrillaga, Isabel: 47, 58 | Calabuig-Serna, Antonio: 67 |
| Atarés, Alejandro: 51, 57, 100 | Camacho-Fernández, Carolina: 79 |
| Atehortúa, Lucía: 36 | Canhoto, Jorge: 28, 42, 43, 53, 59, 70, 71, 73, 80 |
| Bagheri, Sara: 76 | Cano, Diana María: 81 |
| Bárány, Ivett: 72, 76 | Cantos, Manuel: 86 |
| Barceló, Araceli: 69 | Cañal, M ^a Jesús: 32 |
| Barceló, Marta: 69 | Capel, Carmen: 57 |
| Barreal, M. Esther: 104, 105 | |

Capel, Carmen: 51	Costar, Asunción: 31
Carillo, Petronia: 48	Covelo, Purificación: 63
Carmona-Martín, Elisabeth: 64	Cross, Hugh: 30
Carneros, Elena: 30, 72	Cuenca, Beatriz: 75
Carvalho, Kamilla: 47	Cuenca, José: 83
Castander, Ander: 48, 56	Cusido, Rosa M.: 35
Castañeda, Laura: 57	D'Amelia, Luisa: 48
Castillo, Ana M.: 31, 55	De Medeiros, Eliana: 48
Castro, Ricardo: 63	Debiasi, Clayton: 71
Celdrán-Sánchez, Virginia: 65	Dell'Aversana, Emilia: 48
Cereto, José Manuel: 94	Di Patria, Laura: 90
Cinquetti, Tatiana: 106	Diaz, Tomás E.: 89
Codesido, Verónica: 88	Diaz-Riquelme, José: 103
Corchete, Purificación: 87	Ducos, Jean-Paul: 26
Cordeiro, Daniela: 43	Faize, Lydia: 52, 66
Córdoba, Fernando: 50, 65	Faize, Mohamed: 66
Coronado, Alberto: 100	Fernández, Josefa: 99
Corral-Martínez, Patricia: 78, 79	Fernández, Helena: 32
Corredoira, Elena: 37, 46	Fernández-Lorenzo, Juan Luis: 82
Correia, Mariana: 70	Ferreiro, Nuria: 82
Correia, Sandra: 28, 42, 43, 53, 59, 70, 71, 73, 80	Ferreiro, Carlos: 88

Fillodeau, Audrey: 26	Gunnar Fossdal, Carl: 30
Fraga, Margarita: 105	Hernández, Inmaculada: 34
Fresta, Louis: 45	Hernández, María: 83
Friero Molano, Eva: 34	Hine Gómez, Ana: 74, 95
Gago, Diego: 75	Ibarlucea, Antonio: 87
Gago-Calderón, Alfonso: 69	Iglesias-Bernabé, Laura: 105
Galarco, Sebastián: 102, 106	Ilardi, Vicenza: 52
Gallego, Adriana: 36	Jáquez, Marybel: 51, 100
Gallego, Pedro P.: 98, 104, 105	Jiménez, Lucía: 74
Gamboa, Javier: 89	Jiménez, Yolanda: 65
García, José Luis: 86	Jiménez-Díaz, Rafael: 45
García, Elena: 68, 77, 99, 103	Jorrín, Jesús V.: 23, 47
García-Lor, Andrés: 83	Khojasteh, Abbas: 35
García-Sogo, Begoña: 51, 57, 62	Lineros, Yenny: 101
Goicoa, Tomás: 48, 59	Lopes, Tércia: 73
Gökmen, Gökhan: 62	López-Casado, Gloria: 44
Gómez-Garay, Aránzazu: 72	López-Díaz, Aida: 105
González Hernández, Pilar: 82	López-Herrera, Carlos: 75
Gouffi, Naima: 54	López-Pérez, Antonio: 65
Guillén, Alberto: 47	López-Pérez, Antonio José: 50
Guillou, Caroline: 26	Lorente, María Pilar: 99

- Lorente, Pilar: 68, 77, 103
- Lorente-Castro, Ignacio: 79
- Lotfi, Mahmoud: 76
- Lourenço, Rita: 46
- Lozano, Rafael: 51, 57
- Marín, Juan A.: 25, 68, 77, 103
- Marín, Sandra: 101
- Marín-Marín, María J.: 91
- Marques, Antonia Maiara: 56
- Marqués, Paula: 73
- Martín, Daniel: 73
- Martínez, Ana Patricia: 47
- Martínez, María Teresa: 46
- Martins, João: 71
- Mataix, Inés: 99
- Matas, Antonio J.: 44
- Maxi, Carmen: 50
- Mercado, José A.: 44, 45, 54
- Mir, Ricardo: 78
- Moncaleán, Paloma: 48, 56, 59, 80, 89
- Montalbán, Itziar A.: 38, 48, 56, 59, 80
- Morcillo, Marian: 47
- Moreno, Vicente: 22, 57, 62
- Moreno, Guillermo: 89
- Moreno, Montserrat: 50
- Moreno, Vicente: 51, 100
- Mosquera, Rosa: 82
- Muñoz, Ximena: 101
- Murillo, Olman: 95
- Nagy, Nina: 30
- Narváez, Isabel: 45, 54
- Navarro, Luis: 83
- Navarro-García, Nuria: 65
- Nicolás, Isabel: 90
- Nortes, María Dolores: 66
- Novoa, Samuel L.: 104
- Olsen, Jorunn E.: 30
- Pacheco de Freitas, Hugo: 48
- Palazon, Javier: 35, 87
- Palomo-Ríos, Elena: 45, 54
- Pavón, Karla Daniela: 92
- Pedreño, M^a Ángeles: 90, 91, 92

Pedro Guerra, Miguel: 48	Risueño, María C.: 72
Pereira, Cátia: 48, 59, 80	Rito, Miguel: 42
Pérez-Oliver, Amparo: 58	Rivera, Alejandro: 32
Pérez-García, Pascual: 104	Rojas, Alejandra: 74, 95
Pérez-Jiménez, Margarita: 50, 65	Rojas, Luisa F.: 36
Pérez-Martínez, Alejandro: 105	Romero, Maite: 106
Pérez-Perez, Yolanda: 72	Romero, Rosa: 82
Pérez-Tornero, Olaya: 50, 65	Ruiz-Fernandez, Juan Manuel: 66
Petri, César: 64	Ruiz-Galea, María del Mar: 34
Pineda, Benito: 51, 57, 62	Sabater-Jara, Ana B.: 90, 91, 92
Pintos, Beatriz: 72	Salcedo, Estrella: 44
Pliego, Clara: 45, 54	Sales, Ester: 47, 58
Pliego-Alfaro, Fernando: 45, 54	San-José, M. Carmen: 46, 63
Prado, Alba Noelia: 82	Sánchez, Conchi: 63, 75
Puga, Ana: 71	Sánchez, Pedro Joaquín: 90, 92
Puga, Joana: 53	Sánchez, Carolina: 94
Ramilo, Diego: 106	Sánchez-Lucas, Rosa: 47
Ribelles, Carlos: 51, 57, 62	Santiago, J. Javier: 82
Ricci, Ada: 63	Seguí-Simarro, Jose M.: 29, 67, 78, 79
Ric-Varas, Pablo: 44	Segura, Juan: 47, 58
Rigueiro, Antonio: 82	Serrazina, Susana: 46

Shariatpanahi, Mehran E.: 76	Vielba, Jesús M.: 63
Sharry, Sandra: 102, 106	Vilariño, Susana: 86
Slågedal, Kaia: 30	Villar, David: 87
Soler, Salvador: 62	Yakovlev, Igor: 30
Solís, María-Teresa: 72	Yébenes, Marina: 54
Steiner, Neusa: 48	Yuste-Lisbona, Fernando J.: 51, 57
Tavares, Jéssica: 80	Zumaquero, Adela: 54
Tengs, Torstein: 30	
Testillano, Pilar S.: 33, 72, 76	
Toribio, Mariano: 34	
Torres, Maricruz: 74	
Trapero-Casas, José Luis: 45	
Trontin, Jean-François: 24	
Ugarte, María Dolores: 48, 59	
Urrea, Aura Ines: 81	
Valero, Isabel: 31, 55	
Vallés, M. Pilar: 31, 55	
Velázquez, Mariano: 106	
Vidal, Nieves: 63, 75	
Vieitez, Francisco Javier: 46	
Viejo, Marcos: 30	

SECIVTV 2019

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

Organiza



Patrocina



Ayuntamiento
de Vitoria-Gasteiz
Vitoria-Gasteizko
Udala

