

SECIVTVI 2021

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



Cultivo *in vitro*:
conexión de éxito entre investigación y empresa

8 - 10 DE SEPTIEMBRE. ALMERÍA 2021

Editorial: Semillero Laimund S.L.

Editores: - Araceli Barceló Muñoz - Pilar Sánchez Testillano - Teresa Antón Martínez

©textos: sus autores.

Título: Cultivo *in vitro*: Conexión de éxito entre investigación y empresa.

ISBN: 978-84-09-33391-2.

Diseño y Maquetación: Solutions Eventos, S.L.

Almería 2021

Índice general

Presentación	4
Comités.....	5
Programa Científico	9
Conferencia Plenaria Inaugural.....	17
Sesión I . Transformación genética	21
Sesión II . Embriogénesis 1	39
Sesión II . Embriogénesis 2	65
Conferencia Plenaria.....	91
Sesión III . Micropropagación 1	95
Sesión III . Micropropagación 2	129
Conferencia	161
Sesión IV . Empresa	164

Presentación

Semillero Laimund S.L. y la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV) os invitan a participar en la “**XIV Reunión de la SECIVTV**” que tendrá lugar en Almerimar los días 8, 9 y 10 de septiembre de 2021.

Bajo el lema “**Cultivo *in vitro*: conexión de éxito entre investigación y empresa**”, la organización tiene como reto proponer un programa científico que trate temas clásicos y actuales en la investigación del cultivo *in vitro* vegetal, mediante conferencias plenarias, ponencias Invitadas, mesa redonda, Sesiones Científicas orales y pósteres.

Además, los diferentes actos científicos y lúdicos se han adaptado a las características especiales tras la pandemia.

Deseamos crear un punto de encuentro agradable y seguro donde poder aprovechar la presencia de expertos sobre totipotencia celular, organogénesis y regeneración, embriogénesis *in vitro*, conservación y crioconservación *in vitro*, aplicaciones del cultivo *in vitro* en mejora genética vegetal, estabilidad genética y epigenética, biofactorías y avances tecnológicos del cultivo *in vitro*, enfatizando la participación de los jóvenes investigadores.

Puesto que, en esta ocasión, se cuenta con una empresa para la organización, se pretende celebrar una sesión en la que podamos ahondar en temas tan importantes como la aclimatación del material vegetal a condiciones *ex vitro* o la influencia de la iluminación, y discutir las necesidades de mejora y de producción de las empresas, recalcando la importancia del cultivo *in vitro* para lograr sus metas en los tiempos que exigen los mercados.

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

Os esperamos

El Comité Organizador

Teresa Antón (Semillero Laimund S.L.) - Presidenta

Araceli Barceló (IFAPA-Málaga)

Javier Luque (Semillero Laimund S.L.)

Pilar S. Testillano (CIB-CSIC)

Ana Dolores Aguilera (Semillero Laimund S.L.)



Comités organizador y científico

COMITÉ ORGANIZADOR

Presidenta: Teresa Antón (Semillero Laimund S.L.)

Araceli Barceló (IFAPA-Málaga)

Javier Luque (Semillero Laimund S.L.)

Pilar S. Testillano (CIB-CSIC)

Ana Dolores Aguilera (Semillero Laimund S.L.)



COMITÉ CIENTÍFICO

Pablo Aleza Gil (IVIA-Valencia)

Teresa Antón (Semilleros Laimund – Almería)

Araceli Barceló (IFAPA – Málaga)

Elena Carneros García (CIB Margarita Salas – CSIC, Madrid)

Pedro Pablo Gallego Veigas (Universidad de Vigo. Facultad de Biología)

Inés Mataix Valero (Invisa Biotecnología Vegetal. Murcia)

Itziar Montalbán Pérez (Neiker-BRTA, Arkaute-Alava)

Elena Palomo Ríos (IHSM-UMA-CSIC-Málaga)

Benito José Pineda Chaza (IBMCP - Valencia IPV - CSIC)

Manuel Ángel Rey Fraile (Universidad de Vigo. Facultad de Biología)

Saleta Rico Santos (IIAG-CSIC- Galicia)

Pilar S. Testillano (CIB Margarita Salas – CSIC – Madrid)

María Pilar Vallés Brau (Estación Experimental Aula DEI-CSIC. Zaragoza)

Susana Vilariño Rodríguez (Vitrosur Lab SLU. Los Palacios-Sevilla)

ORGANIZA



COLABORA





Programa científico

Miércoles 8 de septiembre

14:00 - 16:00 h	Entrega de documentación y colocación de pósteres
16:00 - 16:30 h	Acto de apertura y presentación
16:30 - 17:30 h	Conferencia plenaria inaugural: “El cultivo <i>in vitro</i> en la investigación agraria española, del desarrollo de tecnologías a su uso en mejora: tres casos de estudio”. <ul style="list-style-type: none">• D. Fernando Pliego Alfaro. Universidad de Málaga
17:30 - 18:30 h	Café y visita pósteres SESIÓN I
18:30 - 19:30 h	SESIÓN I: Transformación genética
20:00 h	Cóctel de bienvenida

Jueves 9 de septiembre

09:00 - 10:30 h	SESIÓN II: Embriogénesis 1
10:30 - 11:30 h	Café y visita pósteres SESIÓN II
11:30 - 13:00 h	SESIÓN II: Embriogénesis 2
13:00 - 14:00 h	Conferencia plenaria: “Las herramientas CRISPR/Cas y su empleo en ingeniería metabólica y en la mejora de plantas biofactoría” <ul style="list-style-type: none">• D. Diego Orzáez Calatayud. Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia
14:30 - 16:00 h	Almuerzo
16:00 - 16:30 h	Visita pósteres SESIÓN III
16:30 - 18:00 h	SESIÓN III: Micropropagación 1
18:00 - 18:30 h	Café y visita pósteres SESIÓN III
18:30 h	Asamblea General de la SECIVTV

Viernes 10 de septiembre

09:00 - 10:30 h	SESIÓN III: Micropropagación 2
10:30 - 11:00 h	Conferencia: “El salto de la iluminación fluorescente a la flexibilidad de la tecnología LED” <ul style="list-style-type: none">• D. Alfonso Gago Calderón. Universidad de Málaga
11:00 - 11:30 h	Café
11:30 - 12:30 h	SESIÓN IV: Empresa
12:30 - 13:30 h	Mesa Redonda
13:30 h	Clausura
14:00 h	Almuerzo de clausura



Programa científico detallado

Miércoles 8 de septiembre

14:00 - 16:00 h Entrega de documentación y colocación de pósteres

16:00 - 16:30 h **Acto de apertura y presentación**

16:30 - 17:30 h **Conferencia plenaria inaugural:
“El cultivo *in vitro* en la investigación agraria española,
del desarrollo de tecnologías a su uso en mejora: tres casos
de estudio”.**

- D. Fernando Pliego Alfaro. Universidad de Málaga

17:30 - 18:30 h Café y visita pósteres SESIÓN I

18:30 - 19:30 h **SESIÓN I: Transformación genética**

Moderadores:

- D. Pablo Aleza Gil (IVIA - Valencia)
- D.^a Elena Palomo Ríos (IHSM - UMA - CSIC - Málaga)

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN DE PROTOPLASTOS PARA LA EDICIÓN GÉNICA EN FRESA	ORAL	PÁG. 22
ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA Y GENOTIPADO DE NÚCLEOS INDIVIDUALIZADOS DE GRANOS DE POLEN DE CÍTRICOS MEDIANTE SEPARACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA Y AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA	POSTER	PÁG. 24
OBTENCIÓN DE POLIPLOIDES EN <i>FRAGARIA</i> PARA SU USO EN MEJORA	POSTER	PÁG. 26
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VID (<i>VITIS VINIFERA L.</i> , CV. MENCIA) CON LA CEPA HIPERVIRULENTE AGL1 DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> : DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL TRANSGEN MEDIANTE qPCR	POSTER	PÁG. 28
ADVENTITIOUS REGENERATION FROM LEAVES OF CHIMERIC CRISPR-CAS9 MELON PLANTS ALLOWS OBTAINING SOLID MUTANTS	POSTER	PÁG. 30
TRANSFER OF SHARKA RESISTANCE FROM RESISTANT PLUM ROOTSTOCKS TO NON-TRANSGENIC APRICOT SCIONS	POSTER	PÁG. 32
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN <i>CSSCL1</i> MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>QUERCUS SUBER</i>	POSTER	PÁG. 34
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CHIRIMOYO Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE GENES DE MADURACIÓN DE LA FRUTA	POSTER	PÁG. 36

20:30 h

Cóctel de bienvenida. Restaurante Maracas. Puerto Deportivo Almerimar

Jueves 9 de septiembre

09:00 - 10:30 h

SESIÓN II: Embriogénesis 1

Moderadores:

- D. Manuel Ángel Rey Fraile (Universidad de Vigo. Facultad de Biología)
- D.ª Elena Carneros García (CIB Margarita Salas - CSIC, Madrid)

NOVEL SMALL MOLECULES TO PROMOTE <i>IN VITRO</i> PLANT CELL REPROGRAMMING AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CROP AND FOREST SPECIES	ORAL	PÁG. 40
CONSERVACIÓN DE RECURSOS FORESTALES: PROPAGACIÓN CLONAL DE PROGENIES DE ALCORNOQUE TOLERANTES A PHYTOPHTHORA CINNAMOMI MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y CRIOCONSERVACIÓN DE LOS MATERIALES GENERADOS	ORAL	PÁG. 42
INHIBIDORES DE DESACETILASAS DE HISTONAS AUMENTAN EL POTENCIAL EMBRIOGÉNICO Y ALTERAN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA VID (<i>VITIS VINIFERA</i> L., CV. MENCÍA)	POSTER	PÁG. 44
INHIBITION OF METACASPASE- AND AUTOPHAGY-DEPENDENT CELL DEATH IMPROVES STRESS-INDUCED MICROSPORE EMBRYOGENESIS IN BRASSICA NAPUS	POSTER	PÁG. 46
LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO VALIOSA HERRAMIENTA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS TOLERANTES A ESTRÉS Y PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL PROCESO.	POSTER	PÁG. 48
MICROPROPAGACIÓN DE PISTACIA TEREBINTHUS: ESTUDIO DE UN PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN EN MASA	POSTER	PÁG. 50
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ENCINA: OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE INDUCCIÓN	POSTER	PÁG. 52
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ENCINA: OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE GERMINACIÓN Y ACLIMATACIÓN	POSTER	PÁG. 54
PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ENCINAS Y ALCORNOQUES ADULTOS COMO ESTRATEGIA FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA	POSTER	PÁG. 56
PROGRAMA NACIONAL DE MEJORA Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DE LA ENCINA Y EL ALCORNOQUE FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA: MICROPROPAGACIÓN DE GENOTIPOS TOLERANTES	POSTER	PÁG. 58
PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALCORNOQUE (<i>QUERCUS SUBER</i>) A PARTIR DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN. PROYECTO CORK2WINE	POSTER	PÁG. 60
PROYECTO CORK2WINE. PRODUCCIÓN MASIVA DE ALCORNOQUES MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	POSTER	PÁG. 62

10:30 - 11:30 h

Café y visita pósteres SESIÓN II

11:30 - 13:00 h

SESIÓN II: Embriogénesis 2

Moderadores:

- D.^a María Pilar Vallés Brau (Estación Experimental Aula DEI - CSIC. Zaragoza)
- D.^a Itziar Montalbán Pérez (Neiker - BRTA. Arkaute - Álava)

DIFERENCIACIÓN MOLECULAR ENTRE GENOTIPOS ASOCIADA A LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES COMPLETOS Y AL ALBINISMO EN LA EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA EN CEBADA	ORAL	PÁG. 66
EL GEN <i>SLMAPKKK17</i> ESTÁ INVOLUCRADO EN EL PROCESO DE REGENERACIÓN ADVENTICIA EN TOMATE	ORAL	PÁG. 68
DYNAMICS OF ENDOGENOUS CYTOKININ DURING MICROSPORE EMBRYOGENESIS OF <i>BRASSICA NAPUS</i>	POSTER	PÁG. 70
DNA DEMETHYLATION BY 5'-AZACYTIDINE IMPROVES SOMATIC EMBRYOGENESIS YIELD FOR REGENERATION AND BREEDING OF CORK OAK	POSTER	PÁG. 72
LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA EN TRIGO PANADERO PRODUCEN CAMBIOS EN LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS	POSTER	PÁG. 74
AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE DOBLEHAPLOIDES DE CEBOLLA MEDIANTE GINOGÉNESIS	POSTER	PÁG. 76
LA APLICACIÓN DE CHOQUES TÉRMICOS, "PRIMING", DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE PINO MARÍTIMO PRODUCE PLANTAS MEJOR ADAPTADAS A LA SEQUÍA	POSTER	PÁG. 78
EFFECTO DE LA ADICIÓN DE ESPERMIDINA SOBRE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE CITOQUININAS Y LA REGENERACIÓN ADVENTICIA EN EXPLANTOS DE LIMONERO	POSTER	PÁG. 80
OBTENCIÓN DE PLANTAS DE OLIVO TETRAPLOIDES MEDIANTE TRATAMIENTOS CON COLCHICINA	POSTER	PÁG. 82
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN BROTES DE OLIVO OBTENIDOS MEDIANTE ORGANOGÉNESIS AXILAR O VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	POSTER	PÁG. 84
REGENERACIÓN DE PLANTAS EN CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CUCAMELÓN O SANDITA	POSTER	PÁG. 86
ANTAGONISTIC ACTION OF YUCASINE AND DMSO ON APOGAMY IN THE FERN <i>DRYOPTERIS AFFINIS</i> SSP. <i>AFFINIS</i>	POSTER	PÁG. 88

13:00 - 14:00 h

Conferencia plenaria:

"Las herramientas CRISPR/Cas y su empleo en ingeniería metabólica y en la mejora de plantas biofactoría"

- D. Diego Orzáez Calatayud.
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Valencia

14:30 - 16:00 h

Almuerzo de trabajo

16:00 - 16:30 h

Visita pósteres SESIÓN III

16:30 - 18:00 h

SESIÓN III: Micropropagación 1

Moderadores:

- D.^a Susana Vilariño Rodríguez (Vitrosur Lab SLU. Los Palacios - Sevilla)
- D.^a Saleta Rico Santos (IIAG - CSIC - Galicia)

PROPAGACIÓN EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL DE TRES GENOTIPOS ADULTOS DE <i>QUERCUS ROBUR</i>	ORAL	PÁG. 96
APLICACIÓN DE <i>MACHINE LEARNING</i> PARA MAXIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	ORAL	PÁG. 98
SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL: UNA ALTERNATIVA PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE VARIEDADES DE ALBARICOQUERO (<i>PRUNUS ARMENIACA</i> L.)	POSTER	PÁG. 100
PROPAGACIÓN DE AVELLANO EN MEDIO LÍQUIDO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE HIERRO Y SACAROSA	POSTER	PÁG. 102
IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN MEDIO LÍQUIDO MEDIANTE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL EN <i>CANNABIS SATIVA</i>	POSTER	PÁG. 104
REDUCIR COSTES, INCREMENTAR BENEFICIOS: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE BAJO COSTE PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE CASTAÑO	POSTER	PÁG. 106
EVALUATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF VITAMINS ON THE GROWTH AND REPRODUCTION OF THREE <i>IN VITRO</i> -CULTURED BRYOPHYLLUM SPP.	POSTER	PÁG. 108
EFECTO DEL LINDANO (γ -HCH) SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE BROTES DE <i>PRUNUS</i> CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> . UN ESTUDIO PRELIMINAR	POSTER	PÁG. 110
ACOLCHADOS PLÁSTICOS BIODEGRADABLES DE USO AGRÍCOLA: ESTUDIO DEL IMPACTO DE SUS COMPONENTES EN PLANTAS DE PATATA MEDIANTE EL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	POSTER	PÁG. 112
PROPAGACIÓN DE LA VARIEDAD DE PISTACHO 'ASHOURY' APLICANDO TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN E INJERTO	POSTER	PÁG. 114
ENRAIZAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE BROTES DERIVADOS DE ÁRBOLES ADULTOS DE <i>QUERCUS SUBER</i>	POSTER	PÁG. 116
ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE ROMERO (<i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> L.) A PARTIR DE SEMILLAS GERMINADAS <i>IN VITRO</i>	POSTER	PÁG. 118
ACLIMATACIÓN DEL PORTAINJERTO DE AVELLANO 'DUNDEE' MICROPROPAGADO	POSTER	PÁG. 120
ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>BOLETUS</i> SP. A PARTIR DE CARPÓFOROS.	POSTER	PÁG. 122
DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>BOLETUS EDULIS</i> Y <i>BOLETUS RETICULATUS</i>	POSTER	PÁG. 124
EL SANEAMIENTO DE LA CHUFA: UNA HERRAMIENTA IDÓNEA PARA MEJORAR RENDIMIENTOS Y FRENAR EL AVANCE DE LA MANCHA NEGRA	POSTER	PÁG. 126

18:00 - 18:30 h

Café y visita pósteres SESIÓN III

18:30 h

Asamblea General de la SECIVTV

Viernes 10 de septiembre

09:00 - 10:30 h

SESIÓN III: Micropropagación 2

Moderadores:

- D. Benito José Pineda Chaza (Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas - Valencia. UPV - CSIC)
- D.ª Inés Mataix Valero (Invisa Biotecnología Vegetal, Murcia)

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE RESPUESTA A ESTRÉS SALINO EN RAÍCES DE <i>PRUNUS</i> CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	ORAL	PÁG. 130
EFFECTO DE LAS FUENTES DE ILUMINACIÓN FLUORESCENTE Y LED SOBRE LA TEMPERATURA EN LOS CULTIVOS <i>IN VITRO</i>	ORAL	PÁG. 132
MICROPROPAGACIÓN Y OBTENCIÓN DE NUEVOS CULTIVARES EN <i>DIONAEA MUSCIPULA</i> ELLIS	POSTER	PÁG. 134
LA MICROPROPAGACIÓN: UNA HERRAMIENTA EFICAZ EN UN PROYECTO DE MEJORA DE CEREZO	POSTER	PÁG. 136
MICROPROPAGACIÓN DE ALCORNOQUES JUVENILES TOLERANTES A <i>PHYTOPHTHORA CINNAMOMI</i> MEDIANTE CULTIVO DE YEMAS AXILARES: PROGRAMA NACIONAL DE MEJORA Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DE LA ENCINA Y EL ALCORNOQUE FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA	POSTER	PÁG. 138
ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE DOS ECOTIPOS DE ESPLIEGO (<i>LAVANDULA LATIFOLIA</i> MEDIK.) DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	POSTER	PÁG. 140
RECUPERACIÓN DEL GERMOPLASMA DE UN EJEMPLAR ADULTO DE <i>QUERCUS ROBUR</i> : ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN DEL “CARBALLO DAS MENTIRAS”	POSTER	PÁG. 142
MICROPROPAGACIÓN DE UNA VARIEDAD DE ROSA CULTIVADA ANTIGUA CON INTERÉS PARA LA INDUSTRIA DEL PERFUME	POSTER	PÁG. 144
EFFECTO DE LA ILUMINACIÓN LED SOBRE LA MICROPROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS DE ESPECIES FRUTALES	POSTER	PÁG. 146
MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR ADULT <i>MYRICA GALE</i>	POSTER	PÁG. 148
MICROPROPAGATION OF AXILLARY SHOOTS OF <i>ILEX X KOEHNNEANA</i> ‘CHESTNUT LEAF’	POSTER	PÁG. 150
OPTIMIZACIÓN DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO DE UN CLON DE “GARNEM” (<i>PRUNUS AMYGDALUS</i> × <i>PRUNUS PERSICA</i>) PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS ACLIMATADAS DE MAYOR CALIDAD	POSTER	PÁG. 152
INFLUENCE OF LIGHT SOURCE AND PGRS ON THE MICROPROPAGATION OF THE ENDANGERED SPECIES <i>CENTAUREA ULTREIAE</i> SILVA-PANDO	POSTER	PÁG. 154
<i>CANNABIS</i> TISSUE CULTURE: WHAT WE KNOW AND HOW TO IMPROVE IT?	POSTER	PÁG. 156
DESCRIPCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA ILUMINACIÓN LED PARA SU UTILIZACIÓN EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PLANTAS	POSTER	PÁG. 158

10:30 - 11:00 h

Conferencia:

“El salto de la iluminación fluorescente a la flexibilidad de la tecnología LED”

- D. Alfonso Gago Calderón. Universidad de Málaga

11:00 - 11:30 h

Café

11:30 - 12:30 h

SESIÓN IV: Empresa

Moderadores:

- D. Pedro Pablo Gallego Veigas (Universidad de Vigo. Facultad de Biología)
- D. David Lapuente (Biovegen, Madrid)

12:30 - 13:30 h

Mesa Redonda

13:30 h

Clausura

14:00 h

Cóctel de Clausura. Hotel Golf Almerimar



Conferencia Plenaria Inaugural

EL CULTIVO *IN VITRO* EN LA INVESTIGACIÓN AGRARIA ESPAÑOLA, DEL DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS A SU USO EN MEJORA: TRES CASOS DE ESTUDIO.

FERNANDO PLIEGO-ALFARO

INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA “LA MAYORA” (IHSM-UMA-CSIC), DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLÓGIA VEGETAL, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071 MÁLAGA, ESPAÑA.

Email de contacto: ferpliego@uma.es

El informe elaborado, en la década de los 60, por expertos del Banco Internacional de Reconstrucción y Fomento (BIRF) sobre la investigación agraria en nuestro país, puso de manifiesto la existencia de graves deficiencias; así, la mayoría del personal de INIA carecía de doctorado y llevaba a cabo actividades diversas y fragmentadas, mientras que el personal del CSIC, aunque formado en su mayor parte por doctores, llevaba a cabo una investigación de tipo académico sin repercusión alguna en el sector. Curiosamente, no se evaluó la actividad investigadora en las universidades. La firma del convenio INIA-BIRF permitió abordar la modernización de las infraestructuras, así como la formación de personal investigador en distintas especialidades, incluida la de cultivo *in vitro* (Navarro, L. y Tortosa, E. 2007. *Arbor, Ciencia, Pensamiento y Cultura*, Vol. CLXXXIII, 727, 655-668). A continuación, se explica la evolución de los trabajos *in vitro* en tres especies de interés hortofrutícola, fresa, olivo y aguacate, para su uso en mejora (véanse Ric-Varas et al. La fresa, pp. 418-439; Rugini et al. El olivo, pp. 343-376; Pliego-Alfaro et al. El aguacate, pp. 258-281, en: *Biotechnology of Fruit and Nut Crops, 2020, 2nd Edition*, R.E. Litz, F. Pliego-Alfaro and J.I. Hormaza, eds., CAB International, Wallingford). En fresa, el desarrollo de técnicas eficientes de micropropagación permite acortar el periodo para producir material certificado. Por otra parte, mediante la transformación vía *A. tumefaciens*, se ha avanzado en el conocimiento de los genes implicados en el reblandecimiento del fruto mientras que la regeneración de plantas a partir de protoplastos permite abordar con optimismo nuevos retos en la edición genética. En olivo, el material micropropagado se adapta mejor a las plantaciones de alta densidad; asimismo, la disponibilidad de técnicas eficientes de regeneración mediante embriogénesis somática junto a la transformación vía *A. tumefaciens*, está permitiendo profundizar en las bases moleculares de la resistencia a patógenos fúngicos, inducción floral y contenido en volátiles. En paralelo, se estudia el efecto de la tetraploidía en el aumento de la plasticidad fenotípica e incremento de la tolerancia a estrés biótico en variantes somaclonales tolerantes a filtrados crudos de hongos. En ambas especies, el genotipo tiene un efecto relevante en la capacidad morfogenética; sin embargo, este efecto es mucho más acentuado en el aguacate, especie en la que la técnica de micropropagación solo se ha usado con éxito en algunos genotipos tolerantes a *R. necatrix*, en el programa de mejora del IFAPA-Málaga. Por otra parte, también en aguacate, se ha desarrollado una metodología para rescate de embriones inmaduros; sin embargo, este protocolo, aplicado a embriones somáticos, no ha permitido mejorar sus tasas de conversión; de hecho, las tecnologías de regeneración y transformación disponibles necesitan ser optimizadas para su uso en material adulto. Por tanto, en el caso de la fresa, se ha pasado de trabajar en cultivo *in vitro*, a su uso como herramienta en mejora con protocolos ya estandarizados. En olivo, quedan aspectos de la regeneración por optimizar, pero la tecnología desarrollada permite su uso parcial en mejora, mientras que en aguacate, exceptuando el cultivo de embriones zigóticos inmaduros, los protocolos de regeneración deben ser optimizados para su uso de forma rutinaria. Los continuos avances en el conocimiento de las bases fisiológicas y moleculares de los procesos de regeneración *in vitro*, permiten ser optimistas de cara al futuro y esta tecnología será, cada vez más, una herramienta imprescindible en los programas de mejora de especies hortofrutícolas.



SESIÓN I

Transformación genética

OPTIMIZACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN DE PROTOPLASTOS PARA LA EDICIÓN GÉNICA EN FRESA

CRISTINA SÁNCHEZ-RAYA¹, GLORIA LÓPEZ-CASADO¹, ROSARIO BLANCO-PORTALES², SARA POSE¹, FERNANDO PLIEGO-ALFARO¹, ANTONIO J. MATAS¹, JOSÉ A. MERCADO¹

¹INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA “LA MAYORA” IHSM-UMA-CSIC; DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLÓGIA VEGETAL, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, SPAIN.

csanray@uma.es, glorialcasado@gmail.com, sarapose@uma.es, antoniojmatas@uma.es, MERCADO@UMA.ES.

²DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA, SPAIN.

Bb2blpor@uco.es

La fresa es un fruto blando de gran importancia económica, particularmente en Andalucía. La mejora de las cualidades organolépticas del fruto y la disminución del reblandecimiento para alargar la vida postcosecha del fruto, son unos de los principales objetivos de los programas de mejora en este cultivo. El reblandecimiento del fruto es consecuencia del desmantelamiento de la pared celular, la disolución de la lámina media y la pérdida de turgencia. En fresa, el silenciamiento mediante la transformación en antisentido de genes que codifican poligalacturonasas (PG) aumenta la firmeza del fruto y la vida postcosecha (Paniagua *et al.*, 2020). Por tanto, estos genes son excelentes dianas para la edición génica con el fin de mejorar la calidad del fruto de la fresa. La transfección de protoplastos con complejos preensamblados Cas9-sgRNA permite la producción de plantas editadas vía CRISPR/Cas9 libres de ADN foráneo, que podrían ser consideradas como no transgénicas. En esta investigación, se ha optimizado un protocolo para la transfección de protoplastos de fresa, con el objetivo final de producir plantas no transgénicas con el gen de poligalacturonasa *FaPG1* mutado. Como fuente de material vegetal se utilizaron hojas de plantas de *Fragaria x ananassa*, cv. ‘Chandler’, micropropagadas en medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con 2 mg/L de BA. Para la extracción de protoplastos se utilizó el protocolo descrito por Barceló *et al.* (2019). A las 24 h del aislamiento, los protoplastos fueron transfectados con el plásmido pHBT-sGFP(S65T)-NOS que contiene el gen marcador GFP, mediante un tratamiento con polietilenglicol (PEG), como se describe en Yoo *et al.* (2007). Se evaluaron, entre otras variables, el efecto de la concentración y tiempo de incubación en PEG y la concentración de ADN. Los valores más altos de protoplastos con actividad GFP a las 48 h de la transfección, entre el 15-18%, se obtuvieron tras la incubación en 20% de PEG en presencia de 5 µg de ADN. Este protocolo se está utilizando actualmente para la transfección de protoplastos de fresa con el sistema CRISPR/Cas9 para editar el gen *FaPG1*.

Esta investigación ha sido financiada por los fondos FEDER EU, el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2017-86531-C2-1-R), y el contrato FPI PRE2018-085509.

Transformación genética, Agrobiotecnología.

Referencias:

- Barceló *et al.* (2019). Isolation and culture of strawberry protoplasts and field evaluation of regenerated plants. *Scientia Horticulturae* 256, 108552.
- Paniagua *et al.* (2020). Elucidating the role of polygalacturonase genes in strawberry fruit softening. *Journal of Experimental Botany* 71, 7103–7117.
- Yoo *et al.* (2007). *Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis.* *Nat Protoc* 2, 1565–1572

ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA Y GENOTIPADO DE NÚCLEOS INDIVIDUALIZADOS DE GRANOS DE POLEN DE CÍTRICOS MEDIANTE SEPARACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA Y AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA

MIGUEL GARAVELLO^{1,2}, JOSÉ CUENCA², STEVEN DREISSIG³, JÖRG FUCHS³, ANDRÉS GARCÍA-LOR², MARÍA HERNÁNDEZ², LAURA PRÓSPER², ANDREAS HOUBEN³, PABLO ALEZA²

¹ ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA DE CONCORDIA, INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA, ARGENTINA

² CENTRO DE CITRICULTURA Y PRODUCCIÓN VEGETAL, INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS (IVIA), MONCADA, VALENCIA, SPAIN

³ DEPARTMENT OF BREEDING RESEARCH, LEIBNIZ INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH (IPK) GATERSLEBEN, SEELAND, GERMANY

aleza@ivia.es

Uno de los principales objetivos de los programas de mejora genética de mandarina es generar nuevas variedades que no produzcan semillas en ninguna circunstancia, como es el caso de los híbridos 3x. Estos se pueden obtener a partir de hibridaciones entre dos genotipos 2x, como consecuencia de la formación de gametos no reducidos (gametos 2n), o mediante hibridaciones entre parentales 2x y 4x. En cítricos, la citometría de flujo se ha empleado para determinar el tamaño del genoma y el nivel de ploidía de plantas regeneradas mediante técnicas de cultivo *in vitro* e hibridación sexual. Sin embargo, no se ha aplicado para el análisis del nivel de ploidía de granos de polen debido a la inexistencia de una metodología apropiada de extracción de núcleos. La Separación de Células Activadas por Fluorescencia (FACS, por su sigla en inglés Fluorescence Activated Cell Sorting) es una técnica que permite aislar y clasificar los núcleos de los granos según su nivel de ploidía para su posterior análisis genético con marcadores moleculares. No obstante, los análisis con marcadores se encuentran limitados por la escasa cantidad de ADN que poseen los núcleos individualizados. Una opción para solventar este problema es el uso de kits de Whole Genome Amplification (WGA) que permiten generar mayor cantidad de ADN a partir del contenido de un solo núcleo.

En este trabajo, se ha utilizado por primera vez la citometría de flujo para determinar el nivel de ploidía de poblaciones de granos de polen de diferentes especies 2x, 3x y 4x de cítricos. Los granos de polen de genotipos 2x mostraron dos picos perfectamente definidos, correspondiendo el primero a la población de núcleos vegetativos y el segundo a los núcleos generativos. Una excepción fue la lima Mexicana, en la que se identificaron gametos 2n. Las poblaciones de granos de polen de genotipos 3x no evidenciaron picos claros y definidos, mientras que los genotipos 4x revelaron dos poblaciones de núcleos, núcleos vegetativos y generativos, con el doble de intensidad de fluorescencia que sus núcleos homólogos en los genotipos 2x. Posteriormente, mediante FACS, se aislaron individualmente los núcleos de las poblaciones identificadas para determinar la estructura genética de los núcleos de los granos de polen de genotipos 2x y 4x mediante la amplificación del genoma de cada núcleo utilizando un kit de WGA y su posterior análisis con marcadores SSR y SNP. El uso combinado de FACS y WGA es una metodología válida para la individualización y amplificación genómica de núcleos haploides de granos de polen de genotipos 2x. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de los núcleos 2x aislados de hoja como control y de granos de polen de genotipos 4x, evidenciaron una amplificación desbalanceada hacia uno de los dos alelos, indicando que esta metodología no es adecuada para la realización de estudios genéticos con núcleos no haploides.

La utilización conjunta de FACS y WGA permitirá realizar trabajos más aplicados sobre la influencia de factores bióticos y/o abióticos en la frecuencia de formación de gametos 2n y para la realización de estudios genéticos básicos relacionados con el mapeo genético, recombinación, distorsiones alélicas así como la obtención de haplotipos sin la necesidad de regenerar plantas haploides utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, ya que en muchos casos es un tarea muy difícil con muy baja eficiencia.

OBTENCIÓN DE POLIPLÓIDES EN *FRAGARIA* PARA SU USO EN MEJORA

MANUEL ÁLVAREZ-VIGIL, ELENA PALOMO-RÍOS, ANTONIO J. MATAS-ARROYO, JOSÉ A. MERCADO

¹INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA “LA MAYORA” IHSM-UMA-CSIC; DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y FISIOLÓGIA VEGETAL, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA.

mavigil13@gmail.com

La fresa es un cultivo de gran importancia en nuestro país, particularmente en la provincia de Huelva, siendo España el quinto productor mundial de este fruto y el principal proveedor de fresas en Europa. La fresa cultivada, *Fragaria* × *ananassa* Duch., es una especie octoploide procedente de un híbrido interespecífico entre las especies silvestres *F. virginiana* Duch. y *F. chiloensis* L. Los cruces intraespecíficos de *F* × *ananassa* se utilizan extensivamente para la obtención de nuevos cultivares con características agronómicas mejoradas. A pesar de esto, esta especie muestra una alta susceptibilidad a patógenos fúngicos y bacterianos y una baja tolerancia a estrés abióticos. Especies silvestres de menor ploidía, e.g. *F. vesca* (2x), pueden ser una fuente genética de gran valor para la mejora de esos caracteres en la fresa cultivada, pero las diferencias en ploidía representan una barrera reproductiva para los cruzamientos interespecíficos. La duplicación del número de cromosomas mediante tratamientos con colchicina de meristemas procedentes de estolones se ha utilizado para facilitar la hibridación interespecífica entre fresas diploides y comerciales. En este trabajo, se ha puesto a punto la metodología para la obtención de poliploides en fresa mediante la aplicación de colchicina durante la regeneración de brotes *in vitro*. Para ello, discos de hoja de plantas micropropagadas de *F. vesca*, procedentes de semillas de una población silvestre, y *F* × *ananassa*, cv. ‘Chandler’, fueron incubados en el medio óptimo de regeneración de cada especie, suplementado con distintas concentraciones de colchicina (0.1-1%). La tasa de regeneración de brotes varió entre el 6 y 30%, dependiendo de la concentración de colchicina y el genotipo. En general, *F. vesca* mostró una alta sensibilidad a la colchicina y la mayoría de explantos se necrosaron a concentraciones superiores a 0.25%. Entre todos los tratamientos, se obtuvieron unos 80 regenerantes por genotipo que fueron micropropagados para su análisis de ploidía. En el caso de *F* × *ananassa*, solo 6 de los 71 regenerantes analizados mostraron alteraciones en el nivel de ploidía, 4 decaploides y 2 mixoploides. Por el contrario, en *F. vesca* se obtuvieron 3 líneas triploides, 17 tetraploides y 1 mixoploide, de un total de 85 regenerantes. Estas líneas poliploides están siendo aclimatadas actualmente para su análisis fenotípico.

Esta investigación ha sido financiada por los fondos FEDER EU y el Ministerio de Economía y Competitividad de España (AGL2017-86531-C2-1-R).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VID (*VITIS VINIFERA L.*, CV. MENCÍA) CON LA CEPA HIPERVIRULENTE AGL1 DE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*: DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS DEL TRANSGEN MEDIANTE qPCR

ÓSCAR MARTÍNEZ¹, ELENA PALOMO RÍOS², FERNANDO PLIEGO ALFARO², M^a VICTORIA GONZÁLEZ³, MANUEL REY¹

¹ DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y CIENCIA DEL SUELO, CAMPUS UNIVERSITARIO, UNIVERSIDAD DE VIGO, 36310 VIGO

² DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA "LA MAYORA" (IHSM-UMA-CSIC), UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071 MÁLAGA

³ DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL, UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, CAMPUS SUR, 15872 SANTIAGO DE COMPOSTELA

mrey@uvigo.es

La transformación mediante *Agrobacterium* es la metodología de referencia para la mejora de las plantas. En la vid (*Vitis vinifera L.*) ha sido aplicada con éxito en numerosas variedades, aunque la eficiencia de transformación obtenida es generalmente baja y varía significativamente entre cultivares. Ello hace necesario el establecimiento del protocolo para cada genotipo nuevo ensayado. Uno de los factores esenciales para el éxito del proceso de transformación es el uso de una cepa adecuada de *Agrobacterium* combinada con un vector de transformación eficiente. Los primeros protocolos de transformación mediante *Agrobacterium* desarrollados para vid se realizaron con la cepa LBA4404. Debido a las bajas eficiencias de transformación obtenidas, se han ensayado otras cepas más virulentas como EHA105, que es la más utilizada en vid en los últimos años. La cepa hipervirulenta AGL1, utilizada con buenos resultados en otras especies leñosas recalcitrantes a la aplicación de esta tecnología, también ha sido utilizada en diversos cultivares de vid.

El presente trabajo permitió establecer un protocolo eficiente utilizando la cepa hipervirulenta AGL1 de *A. tumefaciens* para la transformación genética de agregados embriogénicos de vid cv. Mencía, genotipo para el que no existen trabajos previos. El ensayo de diferentes esquemas de selección durante las primeras 4 semanas dió como resultado que la mejor respuesta embriogénica se obtuvo en medio con kanamicina 25 mg L⁻¹. La existencia de escapes al proceso de selección, que sobreestiman la eficiencia real de la transformación, se evitó ensayando una selección adicional en medio líquido suplementado con 50 mg L⁻¹ de kanamicina durante 5 semanas. La combinación de ambos procesos de selección permitió obtener una eficiencia de transformación final del 19'8%, sin escapes y con una capacidad de respuesta embriogénica del material tras selección del 74'2%.

La expresión del gen insertado en el tejido transformado depende de múltiples factores, en particular el número de copias integradas. La determinación temprana del número de copias del transgén permite la selección de las líneas de interés en las primeras etapas del proceso, con el consiguiente ahorro de tiempo y material. La metodología habitual para este fin es el Southern blot, pero su aplicación es laboriosa y se necesitan grandes cantidades de material vegetal, lo cual es incompatible con un análisis temprano. Se ha demostrado que, mediante PCR cuantitativa (qPCR) con fluoróforos intercalativos, es posible estimar el número de copias integradas de un transgén utilizando como control un gen endógeno del que se conoce su número de copias en el genoma.

En este trabajo se estableció un método para la determinación precoz del número de copias insertadas de los genes *np11* y *uidA* en el genoma de la vid mediante qPCR, utilizando como controles endógenos los genes de copia única *NCED2*, que codifica una 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa y *chi*, que a su vez codifica una chalcona isomerasa. El número de copias integrado varió entre líneas transgénicas de 1 a 8, con el mismo número de copias en general para ambos transgenes en las líneas analizadas. El análisis de expresión del gen *uidA* mediante qPCR indicó una tendencia hacia mayores niveles de expresión en líneas con un mayor número de copias del transgén.

ADVENTITIOUS REGENERATION FROM LEAVES OF CHIMERIC CRISPR-CAS9 MELON PLANTS ALLOWS OBTAINING SOLID MUTANTS

BEGOÑA GARCÍA-SOGO¹, VERÓNICA ARAGONÉS², IGNACIO MORENO¹, ALEJANDRO ATARÉS¹, CARMELO LÓPEZ DEL RINCÓN³, ANA PÉREZ³, CRISTINA SAEZ³, JOSÉ RIADO⁴, BELÉN PICÓ³, JOSÉ-ANTONIO DARÓS², VICENTE MORENO¹, BENITO PINEDA¹

(¹) CULTIVO IN VITRO Y MEJORA VEGETAL, INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP; UPV-CSIC). 46022 VALENCIA, SPAIN.

(²) BIOTECNOLOGÍA DE VIRUS DE PLANTAS, INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP; UPV-CSIC). 46022 VALENCIA, SPAIN.

(³) MEJORA GENÉTICA DE CUCURBITACEAS, INSTITUTO UNIVERSITARIO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD VALENCIANA (COMAV; UPV). 46022 VALENCIA, SPAIN.

(⁴) SAKATA SEED IBÉRICA, S.L.U., 46021 VALENCIA, SPAIN

bpineda@btc.upv.es

Genetic transformation via *Agrobacterium* is the most effective strategy for genome editing in crop species through the expression of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR associated (Cas) components. As a tool not only for gene-function analysis but also for molecular plant breeding, this technology is very attractive because the transgenes required for genome editing can be later removed from the plant genome by mendelian genetic segregation.

Although CRISPR/Cas is a powerful and precise method for inducing targeted mutagenesis, it can also generate both phenotypically and genotypically chimeric mutants. A plant is said to be a chimera when cells of more than one genotype are found growing adjacent in the tissues of that plant. Chimeric plants are likely produced because Cas9 is active during a period of time until the transgene is segregated, and this can create a mosaic of different editing events between cells of the same plant.

In the context of the project EDIMELO (RTC-2017-6023-2), we are developing strategies, tools and protocols for CRISPR-Cas-mediated genome editing in different melon cultivars. To set up protocols for melon genome editing, the phytoene desaturase gene of melon (*CmPDS*) has been used as target for the CRISPR/Cas9 system. Transgenic plants were obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledon explants, and several chimeric plants, showing albino and green tissues, were regenerated. Leaves from these transgenic plants were again cultured on selective organogenic medium. Our results indicated that adventitious regeneration allows obtaining solid mutants with different gene editing events.

Acknowledgements: this work was funded by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (RTC-2017-6023-2; co-financed European Commission ERDF).

TRANSFER OF SHARKA RESISTANCE FROM RESISTANT PLUM ROOTSTOCKS TO NON-TRANSGENIC APRICOT SCIONS

CRISTIAN PÉREZ-CASELLES, NURIA ALBURQUERQUE, LYDIA FAIZE, LORENZO BURGOS

GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA DE FRUTALES, DEPARTAMENTO DE MEJORA, CEBAS-CSIC. CAMPUS UNIVERSITARIO DE ESPINARDO, 30.100 MURCIA (SPAIN)

burgos@cebas.csic.es

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

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

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

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

Plants were evaluated for virus presence by RT-PCR after three consecutive cycles of artificial winter in cold chamber and sprouting of buds in the greenhouse. Virus was consistently found in 13 out of 14 (93%) of apricots grafted onto susceptible St5⁻⁷ rootstocks. In the intermediate St5⁻⁶ line the virus was found in 16 out of 29 (55%) of apricots grafted onto these rootstock plants. Finally, both resistant lines St5⁻¹ and St5⁻⁹ behaved similarly and the virus was found in 12 out of 26 (46%) and 8 out of 20 (40%) apricot grafted onto them, respectively.

Results seem to indicate that the silencing mechanism works on the long term, eliminating viral particles from the apricot grafted onto resistant plums rootstocks although the mechanism is not 100% successful. Although results are promising it would be necessary to evaluate these plants in field conditions to determine if symptoms are lower in those plants grafted onto resistant rootstocks even if some viral particles can still be found.

Acknowledgments: This work has been partially financed by Project INIA RTA2017-00011-C03-02. Cristian Pérez-Caselles has a Ph.D. fellowship (FPU) from Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *CsSCL1* MEDIANTE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *QUERCUS SUBER*

JESÚS VIELBA¹, NIEVES VIDAL¹, PURIFICACIÓN COVELO¹, RICARDO CASTRO¹, ELENA VARAS^{1,2}, SALETA RICO¹, ANXELA ALDREY¹, CONCHI SÁNCHEZ¹

¹DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (IIAG-CSIC)

² DIRECCIÓN ACTUAL: LABORATORIO BIOTECNOLOGÍA VEGETAL, FUNDACIÓN PROMIVA, CRTA M-501, KM 5.1 VÍA DE SERVICIO, 28670 VILLAVICIOSA DE ODÓN, SPAIN

conchi@iiag.csic.es

El gen *Scarecow-like 1* aislado en *Castanea sativa* (*CsSCL-1*) pertenece a la familia de factores de transcripción de la familia GRAS. Los análisis de la expresión del gen realizados durante el enraizamiento de brotes de castaño del mismo genotipo con alta y baja capacidad de enraizamiento, mostraron que *CsSCL-1* se induce por auxina y que se expresa preferencialmente en las células del cambium de los brotes competentes para la formación de raíces (Sánchez et al., 2007; Vielba et al., 2011). Estos resultados sugieren un papel importante del gen en la inducción de raíces adventicias, entre otras funciones.

El objetivo de este trabajo ha sido realizar el análisis funcional del gen, mediante la transformación genética de embriones somáticos de *Quercus suber* iniciados a partir de hojas de un árbol adulto (Qs3). Los embriones se co-cultivaron con la cepa C58pMP90 de *Agrobacterium tumefaciens* que contenía el vector pH7WG2D-SCL-1. El vector pH7WG2D,1 incluye un promotor 35S para la expresión constitutiva del transgén, un gen de resistencia a higromicina y un gen Egfp para la visualización de los tejidos transformados.

La evaluación de la transformación estable de las líneas embriogénicas de *Q. suber* se realizó por PCR y mediante fluorescencia de GFP. El análisis mediante PCR se realizó con dos juegos de cebadores que amplifican fragmentos que solapan la región codificante de *CsSCL1* y ambas regiones flanqueantes dentro del vector. Mediante la germinación de embriones somáticos obtenidos en diferentes eventos de transformación se obtuvieron brotes transgénicos que se propagaron por yemas axilares para disponer de líneas transformadas. Se evaluó la respuesta rizogénica tanto de los brotes transformados (Qs3-T) como la de dos líneas utilizadas como control, brotes establecidos directamente a partir del árbol (Qs3) y brotes obtenidos a partir de la germinación de embriones no transformados (Qs3-WT).

Los resultados mostraron que la inserción *CsSCL-1* mejoró la respuesta rizogénica de los brotes, así como el sistema radicular. Además, en las líneas analizadas, las plantas transgénicas presentan un aspecto más saludable, menos necrosis apical y un mayor re-emprendimiento de crecimiento con respecto a los controles.

Sánchez et al. (2007). *Tree Physiology* 27, 1459–1470. doi.org/10.1093/treephys/27.10.1459

Vielba et al. (2011). *Tree Physiology* 31, 1152–1160. doi:10.1093/treephys/tp1086

Este trabajo fue financiado por la Xunta de Galicia a través de los proyectos IN607A y Contrato Programa 2019-2020

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CHIRIMOYO Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE GENES DE MADURACIÓN DE LA FRUTA

LAURA ESPAÑA^{1,2}, AMALIA CABEZA DUARTE ², JOSÉ DAVID TOLEDO GUERRERO², ROCÍO BAUTISTA³, JIMMY BOTELLA⁴, ISABEL MARÍA GONZALEZ PADILLA²

¹ DEPARTAMENTO DE FRUTICULTURA SUBTROPICAL, ISHM-LA MAYORA, CSIC, ALGARROBO-COSTA, 29750 MÁLAGA, ESPAÑA.

² DEPARTAMENTO DE GENÓMICA Y BIOTECNOLOGÍA, IFAPA CENTRO DE MÁLAGA, CORTIJO DE LA CRUZ S/N, 29140 MÁLAGA, ESPAÑA

³ PLATAFORMA ANDALUZA DE BIOINFORMÁTICA, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, MÁLAGA, ESPAÑA.

⁴ PLANT GENETIC ENGINEERING LABORATORY, UNIVERSITY OF QUEENSLAND, BRISBANE QLD 4072, AUSTRALIA

isabelm.gonzalez.padilla@juntadeandalucia.es

España es el primer productor mundial de chirimoya. Su cultivo se concentra en la costa subtropical de Granada y Málaga, donde tiene gran importancia socioeconómica. La chirimoya es una fruta climatérica de rápida maduración, lo que está limitando su comercialización y exportación al resto de Europa. La aplicación de técnicas biotecnológicas como la transformación genética son de gran interés en chirimoyo, ya que permitiría silenciar genes responsables de la maduración y obtener fruta con maduración retardada. En este trabajo hemos desarrollado un protocolo de transformación genética mediada por *Agrobacterium* utilizando explantos de hipocótilos de semillas de chirimoyo germinadas *in vitro*. Para ello, se ensayaron diferentes cepas de *Agrobacterium* albergando el plásmido pBINUbiGUSint, que contiene en gen de selección NPTII y el gen marcador GUS. De igual manera, se estudió el efecto de diferentes antibióticos en la regeneración de los explantos y se diseñó un sistema de selección basado en la utilización de concentraciones crecientes de kanamicina. Los brotes obtenidos se enraizaron *in vitro* y se aclimataron a invernadero. Las plantas se analizaron molecularmente para determinar la presencia y número de copias de los genes NPTII y GUS. La eficiencia de transformación fue diferente según la cepa de *Agrobacterium* utilizada. El protocolo desarrollado nos ha permitido obtener plantas transgénicas aclimatadas en el invernadero en menos de un año. Este trabajo también ha servido para conformar el primer transcriptoma completo del fruto de chirimoyo, desde el cual hemos podido determinar el perfil transcripcional de la maduración postcosecha. A partir de estos datos se han seleccionado una serie de genes de interés implicados en la maduración. Estos genes se utilizarán para realizar construcciones CRISPR de silenciamiento con las que transformar las plantas mediante el sistema de transformación desarrollado.

Financiado por:

Este trabajo de investigación ha sido cofinanciado al 80% con fondos FEDER (Proyecto AVA2019-038) y con fondos MINECO (AGL2013-43732-R).



SESIÓN II

Embriogénesis 1

NOVEL SMALL MOLECULES TO PROMOTE *IN VITRO* PLANT CELL REPROGRAMMING AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CROP AND FOREST SPECIES

ELENA CARNEROS¹, EDUARDO BERENGUER¹, YOLANDA PÉREZ-PÉREZ¹, CARMEN GIL², ANA MARTÍNEZ², PILAR S. TESTILLANO¹

¹POLLEN BIOTECHNOLOGY OF CROP PLANTS GROUP, CENTER OF BIOLOGICAL RESEARCH MARGARITA SALAS, CIB-CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, SPAIN

²TRANSLATIONAL MEDICINAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY GROUP, CENTER OF BIOLOGICAL RESEARCH MARGARITA SALAS, CIB-CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, SPAIN

testillano@cib.csic.es

Plant *in vitro* regeneration systems, like somatic embryogenesis, are essential players in breeding, since they permit to propagate elite genotypes, to produce double-haploids, and to convert gene editing or transformation events into plants. However, in many crop and forest species somatic embryogenesis is highly inefficient, either from microspores or other somatic cells. Knowledge gained in recent years has revealed that initiation and progression of somatic embryogenesis involve a complex network of factors, whose roles are not yet well understood (Testillano 2019, Ibañez et al. 2020). Recent advances in chemically-controlled reprogramming of specialized mammalian cells have demonstrated the enormous potential of application of cell permeable synthetic small molecules to regulate cellular reprogramming. We have initiated a pioneer line of research, in collaboration with experts in chemical biology to evaluate the potential of screening novel small molecules from chemical libraries of the pharmaceutical field, to improve *in vitro* plant cell reprogramming, embryogenesis and regeneration.

Here, we report a new strategy to improve *in vitro* embryogenesis using synthetic small molecule inhibitors of mammalian glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β), never used in plants (Patent PCT/EP2020/083316). These inhibitors led to significant increase of embryogenesis initiation rates and embryo production in three different systems and species, microspore embryogenesis of *Brassica napus* and *Hordeum vulgare*, and somatic embryogenesis of *Quercus suber*. Further assays with one of the small molecules, as representative compound of the inhibitors tested, revealed that the compound inhibited GSK-3 activity in plant cell cultures, like it does in mammalian cells. Additional analyses showed that the small molecule inhibitors increased expression of embryogenesis-genes *FUS3*, *LEC2* and *AGL15*, and activated the brassinosteroid (BR) signalling pathway, probably by targeting the plant GSK-3 kinase BIN2, master regulator of BR pathway (Berenguer et al. 2021). These findings open the way for new strategies using GSK-3 β inhibitors that could be extended to other species for improvement of *in vitro* embryogenesis and plant regeneration.

References

- Berenguer E, Carneros E, Pérez-Pérez Y, Gil C, Martínez A, Testillano PS (2021) Small molecule inhibitors of mammalian GSK-3 β promote *in vitro* plant cell reprogramming and somatic embryogenesis in crop and forest species. Submitted.
- Ibañez S, Carneros E, Testillano PS, Perez-Perez JM. 2020. Advances in Plant Regeneration: Shake, Rattle and Roll. Plants (Basel) 9.
- Testillano PS. 2019. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. J Exp Bot 70, 2965-2978.

Acknowledgements

Supported by the Spanish National Agency of Research (Agencia Estatal de Investigación, AEI) and European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) by grants AGL2017-82447-R and PDI2020-113018RB-I00.

CONSERVACIÓN DE RECURSOS FORESTALES: PROPAGACIÓN CLONAL DE PROGENIES DE ALCORNOQUE TOLERANTES A *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y CRIOCONSERVACIÓN DE LOS MATERIALES GENERADOS

ISABEL ARRILLAGA¹, ALEX ALBORCH¹, MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ¹,
MARÍA AMPARO PÉREZ-OLIVER¹, M^a TERESA MARTÍNEZ², ELENA CORREDOIRA²

¹ INSTITUTO BIOTECMED, DEPARTAMENTO BIOLOGÍA VEGETAL, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VICENT ANDRÉS ESTELLÉS S/N, 46100 BURJASSOT, VALENCIA

² DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA Y MEJORA FORESTAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA (IAG), CSIC, ADV VIGO S/N, 15705, SANTIAGO DE COMPOSTELA

isabel.arrillaga@uv.es

El progresivo deterioro de las dehesas y otros montes con especies del género *Quercus* (*Q. ilex* y *Q. suber*), debido fundamentalmente al llamado “síndrome de la seca”, junto a la falta de regeneración del arbolado, han promovido desde el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, subvencionado por la Unión Europea, la creación de un ambicioso programa para la mejora y conservación de los recursos genéticos de ambas especies.

El objetivo de este trabajo es la micropropagación, mediante embriogénesis somática, de progenies de alcornoques tolerantes a *Phytophthora cinnamomi* que además han presentado cierta adaptación a la sequía (material seleccionado en el programa RESSECA,

https://www.tragsa.es/es/comunicacion/noticias/Paginas/210419_mejora-contra-la-seca.aspx). También se pretende crioconservar las líneas embriogénicas generadas para crear un banco de germoplasma que pueda ser utilizado como MFR (Material forestal de reproducción).

En la primera parte del programa se ha partido de 30 genotipos-progenies procedentes de 5 árboles madre. Para la inducción de embriogénesis somática se utilizó el protocolo descrito por el IMIDRA (Hernández y col, 2011). Este protocolo utiliza hojas en expansión que, una vez esterilizadas, se transfieren sucesivamente a los medios de establecimiento, inducción y manifestación. Este protocolo ha permitido capturar el 75 % de los genotipos ensayados observándose un efecto materno en la respuesta embriogénica (entre el 33.3 y el 100 % según el parental femenino). Una vez diferenciados, los embriones somáticos (ES) proliferan mediante embriogénesis secundaria en medio SH (Schenck y Hildebrandt) sin reguladores de crecimiento lo que ha permitido producir más de 11.000 ES. Parte de estos embriones se utilizaron para los ensayos de crioconservación y el resto de los embriones cotiledonares bien formados se almacenaron a 4 °C durante 6-8 semanas antes de proceder a su germinación y posterior aclimatación a condiciones ex vitro. Las tasas de conversión a planta oscilaron entre el 20-70% dependiendo de la línea embriogénica. La aclimatación de las plántulas obtenidas es, en la actualidad, el principal cuello de botella para poder producir el suficiente número de ejemplares para el programa de mejora. Hasta el momento, se han obtenido plantas con crecimiento vigoroso en el 53.3 % de los genotipos ensayados.

La crioconservación de las líneas embriogénicas se abordó siguiendo el protocolo de vitrificación definido por Valladares y col. (2004). Utilizando como explanto inicial ES en estado globular, precultivándolos 3 días en sacarosa 0.3 M y aplicando 60 min a 0 °C la solución vitrificadora PVS2 (Sakai y col, 1990), se obtuvieron tasas de recuperación embriogénica entre 63-96 %.

Agradecimientos. Trabajo subvencionado por el MAPA y los fondos FEADER, promovido por el MITERD en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020.

Referencias

Hernández y col. (2011). Tree For Sci Biotechnol 5(Special issue 1):19-26
Valladares y col. (2004). CryoLetters 25: 177-186
Sakai y col. (1990). Plant Cell Reports 9: 30-33

INHIBIDORES DE DESACETILASAS DE HISTONAS AUMENTAN EL POTENCIAL EMBRIOGENICO Y ALTERAN LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA VID (*VITIS VINIFERA* L., CV. MENCÍA)

ÓSCAR MARTÍNEZ¹, VERÓNICA ARJONES¹, M^a VICTORIA GONZÁLEZ², MANUEL REY¹

¹ DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y CIENCIA DEL SUELO, CAMPUS UNIVERSITARIO, UNIVERSIDAD DE VIGO, 36310 VIGO

² DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL, UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, CAMPUS SUR, 15872 SANTIAGO DE COMPOSTELA

mrey@uvigo.es

Los explantos utilizados con más éxito en la inducción de embriogénesis somática en la vid (*Vitis vinifera* L.) son estructuras reproductivas como anteras, ovarios, estigmas, filamentos de estambres o flores enteras. En cambio, la adquisición de competencia embriogénica utilizando estructuras vegetativas como hojas, peciolo o explantos nodales se ha logrado en pocas ocasiones y con bajas tasas de inducción. La implicación práctica de este fenómeno es que el establecimiento de nuevos cultivos embriogénicos se restringe, en la mayoría de los casos, al periodo de floración de la vid, cuando las estructuras reproductivas están disponibles en la fase de desarrollo adecuada (sólo una semana al año). Por esta razón, el establecimiento de una metodología para obtener embriones somáticos a partir de otros tejidos representa un paso clave para optimizar la embriogénesis somática de esta especie. Además, aunque se han identificado algunos genes implicados en la adquisición de la competencia embriogénica, la regulación de este proceso todavía no está claro, lo que, junto con las bajas tasas de inducción de la embriogénesis somática, impide su aplicación rutinaria en la vid.

Se ha descubierto que cambios reversibles en la acetilación de las histonas desempeñan un papel esencial en la regulación de la expresión génica durante la regeneración de plantas. En términos generales, la acetilación de los restos de lisina de las histonas produce una relajación de la estructura de la cromatina, y este fenómeno se asocia a un aumento de la actividad de los genes. Se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de desacetilasas de histonas detiene parcialmente el progreso de germinación, manteniendo el potencial embriogénico en especies de pino y abeto.

En este trabajo hemos estudiado el efecto de inhibidores de desacetilasas de histonas sobre la respuesta embriogénica en diferentes explantos de vid, derivados de cultivos embriogénicos del cv. Mencía. Para aportar información sobre el papel que juegan los inhibidores de desacetilasas de histonas en la respuesta embriogénica, hemos analizado la expresión de genes de vid relacionados con la embriogénesis y otros que codifican dichas enzimas.

El uso de un medio de inducción que contiene inhibidores de desacetilasas de histonas (tricostatina A y, principalmente, butirato sódico) mejoró las respuestas embriogénicas en embriones somáticos cotiledonares y recién germinados. El estudio de la expresión relativa de genes de vid relacionados con la competencia embriogénica se llevó a cabo en embriones somáticos cotiledonares cultivados en presencia de 0.5 mM de butirato sódico. Los resultados mostraron una sobreexpresión significativa de los genes de vid *BBM* y *VvSERK2* ya desde las 24 h de cultivo, mientras que el gen *VvWOX2* estaba menos reprimido en comparación con el medio de control sin butirato sódico. Estos resultados sugieren que la hiperacetilación de las histonas provocada por este inhibidor parece desencadenar una respuesta molecular relacionada con el aumento de la competencia embriogénica y con cambios en la expresión de los genes asociados. El tratamiento con butirato sódico también produjo variaciones significativas en la expresión de varios genes codificantes de desacetilasas de histonas. Los resultados obtenidos indican que se pueden mejorar las posibilidades de obtener embriones somáticos a partir de diversos explantos, reduciendo las limitaciones estacionales asociadas al uso de explantos florales en la vid.

INHIBITION OF METACASPASE- AND AUTOPHAGY-DEPENDENT CELL DEATH IMPROVES STRESS-INDUCED MICROSPORE EMBRYOGENESIS IN *BRASSICA NAPUS*

EDUARDO BERENGUER¹, ELENA A. MININA², ELENA CARNEROS¹, IVETT BÁRÁNY¹, PETER V. BOZHKOV², PILAR S. TESTILLANO¹

¹POLLEN BIOTECHNOLOGY OF CROP PLANTS GROUP, CENTER OF BIOLOGICAL RESEARCH MARGARITA SALAS, CIB-CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, SPAIN

² DEPARTMENT OF MOLECULAR SCIENCES, UPPSALA BIOCENTER, SWEDISH UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND LINNEAN CENTER FOR PLANT BIOLOGY, PO BOX 7015, SE-75007 UPPSALA, SWEDEN.

testillano@cib.csic.es

Microspore embryogenesis is a biotechnological process that allows to rapidly obtain doubled haploid plants for breeding programs. The process is initiated by the application of stress treatment which reprograms microspores to embark on embryonic development. Typically, a part of the microspores undergoes cell death that reduces the efficiency of the process. Metacaspases (MCAs), a phylogenetically broad group of cysteine proteases, and autophagy, the major catabolic process in eukaryotes, are critical regulators of the balance between cell death and survival in various organisms.

In this study we analyzed the role of MCAs and autophagy in cell death during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus*. We demonstrate that this cell death is accompanied by transcriptional upregulation of three *BnMCA* genes (*BnMCA-Ia*, *BnMCA-IIa* and *BnMCA-IIi*), increase in MCA proteolytic activity, and activation of autophagy. Accordingly, inhibition of autophagy and MCA activity, either individually or in combination, suppressed cell death and increased the number of proembryos, indicating that both components play a pro-cell death role and account for decreased efficiency of early embryonic development. Therefore, MCAs and/or autophagy can be used as new biotechnological targets to improve in vitro embryogenesis in *Brassica* species and doubled-haploid plant production in crop breeding and propagation programmes.

References

Berenguer E, Minina EA, Carneros E, Bárány I, Bozhkov PV, Testillano PS (2020) Suppression of metacaspase and autophagy-dependent cell death improves stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant and Cell Physiology*, 61, 2097-2110. DOI: 10.1093/pcp/pcaa128.

Acknowledgements

Supported by the Spanish National Agency of Research (Agencia Estatal de Investigación, AEI) and European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) by grants AGL2017-82447-R and PDI2020-113018RB-I00.

LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO VALIOSA HERRAMIENTA PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS TOLERANTES A ESTRÉS Y PARA EL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN EL PROCESO

CASTANDER-OLARIETA A., NASCIMENTO, A.M.M. DO, PEREIRA C., MONTALBÁN I.A.*, MONCALEÁN P.*

NEIKER-BRTA, CENTRO DE ARKAUTE. 01192 VITORIA-GASTEIZ.

**pmoncalean@neiker.eus; imontalban@neiker.eus*

La aplicación de altas temperaturas durante el proceso de embriogénesis somática puede desencadenar la formación de una memoria epigenética estable que conduzca a la obtención de plantas somáticas con una capacidad alterada para hacer frente al estrés. Basándonos en esta hipótesis, hemos estudiado el efecto de las altas temperaturas y el estrés hídrico en el éxito de las diferentes etapas del proceso embriogénico. Además, hemos evaluado si las plantas somáticas generadas al final del proceso muestran un incremento en la tolerancia a estrés abiótico. Paralelamente, hemos analizado las bases fisiológicas, genómicas, proteómicas y metabólicas de la respuesta a estrés abiótico. Nuestros estudios abren la posibilidad de poder inducir tolerancias a otros tipos de estrés además de seguir profundizando en los mecanismos de control de dichas tolerancias.

Agradecimientos:

Este estudio ha sido financiado por MINECO (AGL2016-76143-C4-3R), CYTED (P117RT0522), DECO (Gobierno Vasco) y proyecto MULTIFOREVER (ERA-NET Cofund ForestValue by ANR (FR), FNR (DE), MINCyT (AR), MINECO-AEI (ES), MMM (FI), and VINNOVA (SE). ForestValue has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under grant agreement no. 773324. Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) (SFRH/BD/123702/2016), Fundo Social Europeu (FSE), Programa Operacional Regional do CENTRO-Centro 2020 (UE).

MICROPROPAGACIÓN DE PISTACIA TEREBINTHUS: ESTUDIO DE UN PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN EN MASA

NOELIA RAMÍREZ-MARTÍN, PABLO GARCÍA-ESTRÍNGANA, EDUARDO FERNÁNDEZ-SUELA,
JESÚS ALEGRE.

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL, INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDRA). AUTOVÍA A-2, KM 38,800. ALCALÁ DE HENARES. 28805 MADRID.

noelia.ramirez.martin@madrid.org

Pistacia terebinthus es el patrón más utilizado en el cultivo del pistacho en España abarcando aproximadamente el 70% de la superficie cultivada en la actualidad. Su carácter autóctono y el precio económico produjo una gran implantación en nuestro país, sin embargo, la falta de vigor, la heterogeneidad, y la susceptibilidad a *Verticillium* ha provocado que en los últimos años haya disminuido la demanda en favor del patrón comercial UCB1 (*P. atlántica* x *P. integerrima*).

A pesar de los inconvenientes inherentes de *P. terebinthus*, hay que tener en cuenta que también posee características que pueden ser útiles en determinadas circunstancias, como una alta resistencia a las bajas temperaturas, una alta eficiencia nutricional (especialmente en la absorción de Zinc y Cobre), y una mayor resistencia a *Armillaria*. Además, su bajo vigor puede suponer una característica interesante en plantaciones de superintensivo.

Su carácter autóctono sumado a sus ventajas hace que esta especie posea un considerable potencial, haciendo necesario desarrollar programas de selección y mejora para capturar genotipos interesantes, así como desarrollar protocolos eficientes de multiplicación a través de la micropropagación.

Con el fin de proporcionar un protocolo para la producción en masa de *Pistacia terebinthus*, se han evaluado cuatro concentraciones del quelante de hierro Fe-EDDHA (200, 230, 272 y 300 μM) después de 7 semanas de cultivo (3 semanas en medio de multiplicación y 4 semanas en medio de elongación). También se ha comparado la proliferación cultivando la fase de elongación en medio semisólido y en medio líquido con dos biorreactores distintos (MATIS[®] y PLANTFORM[®]).

La combinación de un medio de multiplicación semisólido con un medio de elongación líquido en biorreactores tipo MATIS[®] incrementó significativamente tanto la tasa de proliferación como la longitud media de los brotes cultivados. Sin embargo, las distintas concentraciones del quelante de hierro Fe-EDDHA no influyó de forma significativa en el crecimiento de los cultivos.

Este trabajo se encuentra dentro del Proyecto “Obtención de patrones clonales para el cultivo del pistacho (Patrón)” del GO-Pistaclon, financiado en el marco del PDR-CM 2014-2020, programa operativo del Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Rural (FEADER), financiado por la UE, el MAPA, y la CM a través del IMIDRA.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ENCINA: OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE INDUCCIÓN

M^a TERESA MARTÍNEZ, ELENA CORREDOIRA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS (IIAG), CSIC, ADV VIGO S/N, 15705, SANTIAGO DE COMPOSTELA

elenac@iiag.csic.es

La encina (*Quercus ilex* L.) es uno de los robles más representativos del bosque mediterráneo. En las últimas décadas, sus poblaciones han experimentado un paulatino deterioro que perdura hasta la actualidad y que continúa expandiéndose. La embriogénesis somática (ES) se ha revelado como una poderosa herramienta para la propagación, mejora y conservación de especies recalcitrantes, como la encina. En línea con nuestros estudios previos sobre la iniciación de ES en esta especie a partir de material adulto, el objetivo de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de esta etapa a fin de mejorar las tasas de inducción. Para ello hemos evaluado el efecto del: (i) tipo de explanto utilizado (hojas, nudos y ápices caulinares), (ii) la adición de diferentes auxinas al medio de inducción (ácido naftalenacético (ANA) o ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (AIB)) y (iii) el tiempo de exposición al medio de inducción.

El proceso embriogénico se ha iniciado mediante cultivo de los diferentes explantos aislados de cultivos de brotes axilares de tres genotipos adultos de encina (E00, Q10-1 y Q3-5) en medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 4 mg/l ANA, 4 mg/l AIA o 3 mg/l AIB durante 2, 4 u 8 semanas. Transcurrido este tiempo, los explantos son transferidos al mismo medio mineral desprovisto de reguladores, donde normalmente se desarrollan los embriones somáticos. La respuesta embriogénica se observó con la formación de masas nodulares proembriogénicas y/o embriones somáticos entre las 10-36 semanas del inicio del cultivo. Aunque se ha logrado la inducción de embriones somáticos en los tres genotipos, los porcentajes de inducción varían sustancialmente entre ellos siendo los genotipos Q10-1 y Q3-5 los que tienen mayor respuesta embriogénica (37% y 33%, respectivamente). En los tres genotipos, las hojas fueron el explanto menos reactivo, independientemente del tipo de auxina y del tiempo de exposición aplicado. La respuesta de los ápices y los nudos varía entre genotipos, de tal manera que en Q3-5 y E00 son los ápices los que muestran mayores tasas de inducción, mientras que en Q10-1 son los nudos los explantos más reactivos. El efecto del tipo de auxina también se vio afectado por el genotipo. En los genotipos E00 y Q10-1 las mayores tasas de inducción se obtuvieron con AIA, mientras que en Q3-5 los mejores resultados se observaron en presencia de ANA. AIB solo mostro una buena efectividad en el genotipo Q3-5. Aunque la inducción de embriones fue posible en los tres tiempos de exposición, 2 semanas en el medio con auxina es el que obtuvo los mejores porcentajes. Como conclusión podemos afirmar que los resultados obtenidos en el presente trabajo suponen una mejora considerable del método previamente publicado (Martínez et al., 2017), al haber logrado la simplificación del procedimiento (reducción de 10 semanas), al mismo tiempo que se incrementaron significativamente los porcentajes de inducción.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (España) mediante el proyecto AGL2016-76143-C4-4-R.

Referencias

Martínez et al. (2017) Plant Cell Tissue and Organ Culture 131:321–333
Murashige T, Skoog F (1962) Physiologia Plantarum 15:473-497

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ENCINA: OPTIMIZACIÓN DE LAS ETAPAS DE GERMINACIÓN Y ACLIMATACIÓN

M^a TERESA MARTÍNEZ¹, ARACELI BARCELÓ², MARTA BARCELÓ², FRANCISCO JAVIER
VIEITEZ¹, ISABEL ARRILLAGA³, ELENA CORREDOIRA¹

¹DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA Y MEJORA FORESTAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA (IIAG), CSIC, ADV VIGO S/N, 15705, SANTIAGO DE COMPOSTELA

²IFAPA CENTRO DE MÁLAGA, CORTIJO DE LA CRUZ, PASEO DE LAS CARMELITAS, S/N, 29140, MÁLAGA

³INSTITUTO BIOTECMED, DEPARTAMENTO BIOLÓGIA VEGETAL, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE VALENCIA, VICENT ANDRÉS ESTELLÉS S/N, 46100 BURJASSOT, VALENCIA

temar@iiag.csic.es

En las últimas décadas, las poblaciones de *Quercus ilex* L., especie con gran importancia económica, ecológica y social en la Península Ibérica, han sufrido un gran deterioro debido entre otras causas al “síndrome de la seca”. La embriogénesis somática (ES) es una herramienta biotecnológica de gran potencial para ser aplicada en la propagación y conservación de esta especie, pues permite la propagación clonal a gran escala de genotipos seleccionados (tolerantes a estreses abióticos y abióticos, producción de fruto, etc...), la transformación genética y el almacenamiento a largo plazo de germoplasma (crioconservación) del material seleccionado o de los productos biotecnológicos generados. En trabajos previos con encina se ha logrado inducir ES a partir de diferentes explantos de origen adulto como tegumentos (Barra-Jiménez et al., 2014), amentos (Blasco et al., 2013), ápices y hojas (Martínez et al., 2017), estableciéndose diferentes líneas embriogénicas que se conservan mediante embriogénesis secundaria y/o crioconservadas. El gran hándicap de la ES en encina es la baja capacidad de conversión a planta que se produce tras la germinación de los embriones somáticos, así como la gran dificultad que existe para la aclimatación de las plantas generadas a las condiciones ex vitro. A fin de optimizar la etapa de germinación se ha evaluado por un lado el efecto de la aplicación de un tratamiento de maduración (sorbitol 6% y sacarosa 3%) previo al periodo de 2 meses de almacenamiento a 4°C. Por otro lado, se evaluó el efecto de la composición del medio de germinación estudiándose el efecto del tiosulfato de plata (STS) un inhibidor del etileno, y el efecto de diferentes reguladores de crecimiento (BA 0,1 mg/l sola o en combinación con ácido indolbutírico (AIB; 0,05-0,1 mg/l) y fuentes de carbono (sacarosa y glucosa al 1, 2, 3%). Los datos obtenidos después de 8 semanas en medio de germinación muestran que el tratamiento previo de desecación con sorbitol no mejoro tasas de conversión a planta con respecto a embriones que son directamente almacenados en frío. La incorporación de STS 20 µM aumenta significativamente el número de embriones que desarrollan plantas completas, así como la calidad de las mismas (mayor longitud del brote y número de hojas). La conversión también está afectada por el tipo de azúcar obteniéndose los mejores resultados cuando el medio de germinación fue suplementado con sacarosa 3%. Por último, la incorporación al medio de germinación de 0,05 mg/l de ácido AIB no solo mejoró los porcentajes de conversión, sino que también mejora notablemente la calidad de la planta obtenida, requisito imprescindible para afrontar con éxito la fase de aclimatación. Resultados preliminares muestran que, consiguiendo la rápida entrada en crecimiento de las plántulas, mediante choques de baja humedad, se pueden alcanzar porcentajes de supervivencia cercanos al 50%, con un buen crecimiento posterior de las plántulas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MINECO (España) mediante el proyecto AGL2016-76143-C4-4-R.

Referencias

- Blasco et al. (2013) *Plant Growth Regul.* 71:261–270.
Barra-Jiménez et al. (2014) *Trees* 28: 657–667.
Martínez et al. (2017) *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 131:321–333.

PROPAGACIÓN CLONAL MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ENCINAS Y ALCORNOQUES ADULTOS COMO ESTRATEGIA FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA

INMACULADA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ¹, CELINA VILLARREAL CRIADO², MARTA MÁRQUEZ NOGUERA², EVA FRIERO MOLANO¹, BEATRIZ CUENCA VALERA², ELENA CORREDOIRA CASTRO³,^{ma} TERESA MARTÍNEZ SANTIAGO³, MARÍA DEL MAR RUIZ GALEA¹

¹ DEPARTAMENTO INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL, GRUPO BIOTECNOLOGÍA FORESTAL. INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDRA). FINCA EL ENCÍN. CTRA. A-2, KM,38,200. 28800 ALCALÁ DE HENARES (MADRID).

² VIVERO DE MACEDA. TRAGSA. CRTA. MACEDA- BALDREI, KM. 2. 32700 MACEDA. (OURENSE)

³ GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA Y MEJORA FORESTAL. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA (IAG-CSIC). AVDA. DE VIGO S/N. 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA (A CORUÑA)

mdelmar.ruiz@madrid.org

En la Península Ibérica, las poblaciones de encina y alcornoque están sufriendo continuos episodios de deterioro y mortandad debido al síndrome de la seca. La Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico (MITERD) inició en 2019 un Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos frente al síndrome de la seca, con la participación de TRAGSA, como coordinador, y varios organismos públicos de investigación. Una de las estrategias del programa es la micropropagación de plantas tolerantes procedentes de proyectos y actuaciones previas, con el objetivo de obtener un material mejorado para establecer parcelas de ensayo y poblaciones de mejora.

El grupo de Biotecnología Forestal del IMIDRA tiene experiencia en la clonación de árboles adultos de encina y alcornoque. Dentro de este programa de mejora, se encarga de la propagación mediante Embriogénesis Somática (ES) de árboles adultos de ambas especies (30 encinas y 60 alcornoques) cuya progenie ha mostrado tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* y estrés hídrico. Los genotipos seleccionados pertenecen a las colecciones de varios proyectos: SEFEAL, RESECA, Universidad de Extremadura y Universidad de Huelva.

En la encina, se sigue el protocolo de ES definido por Barra-Jiménez et al. (2014) a partir de tegumento de bellotas y en el alcornoque, el protocolo de ES a partir de hojas definido por Toribio et al. (2005). Durante el año 2020, se recibieron estacas de 18 alcornoques y se han obtenido líneas embriogénicas de 17, con tasas de germinación superiores al 80% y porcentajes medios de aclimatación del 50%, aunque muy variable entre genotipos. Las plantas somáticas se enviarán en lotes de 60 unidades a TRAGSA para iniciar la evaluación de su tolerancia.

Las líneas embriogénicas generadas fueron crioconservadas por el grupo del IAG-CSIC siguiendo el protocolo de vitrificación previamente definido por Valladares et al. (2004). Embriones somáticos en estado globular se precultivaron 3 días en elevadas concentraciones de sacarosa y posteriormente se les aplicó la solución vitrificadora PVS2 durante 60 minutos a 0°C. Las tasas de recuperación embriogénica obtenidas tras la crioconservación fueron elevadas aunque los valores varían en función del genotipo.

Barra-Jiménez et al (2014) *Trees* 28:657–667; Toribio et al (2005) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. *Springer*: 445–457; Valladares et al (2004) *CryoLetters* 25(3):177-186

Financiado por el Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020 (submedida 15.2) con financiación FEADER al 75%.

PROGRAMA NACIONAL DE MEJORA Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DE LA ENCINA Y EL ALCORNOQUE FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA: MICROPROPAGACIÓN DE GENOTIPOS TOLERANTES

ISABEL ARRILLAGA¹, ELENA CORREDOIRA CASTRO², MANUEL FERNÁNDEZ MARTÍNEZ³, INMACULADA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ⁴, M^o TERESA MARTÍNEZ SANTIAGO², BEGOÑA RENAU MORATA¹, M^o MAR RUIZ GALEA⁴, RAÚL TAPIAS MARTÍN³, BEATRIZ CUENCA VALERA⁵

¹ INSTITUTO BIOTECMED, DEPARTAMENTO BIOLOGÍA VEGETAL, FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE VALENCIA, VICENT ANDRÉS ESTELLÉS S/N, 46100 BURJASSOT (VALENCIA)

² GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA Y MEJORA FORESTAL. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA (IIAG-CSIC). AVDA. DE VIGO S/N. 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA. (A CORUÑA)

³ DEPARTAMENTO CIENCIA AGROFORESTALES. UNIVERSIDAD DE HUELVA. CAMPUS LA RÁBIDA. 21819 PALOS DE LA FRONTERA (HUELVA)

⁴ DEPARTAMENTO INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL. GRUPO BIOTECNOLOGÍA FORESTAL. INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL, AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDRA). FINCA EL ENCÍN. CTRA. A-2, KM. 38.2. 28800 ALCALÁ DE HENARES (MADRID).

⁵ VIVERO DE MACEDA. TRAGSA. CRTA. MACEDA- BALDREI, KM. 2. 32700 MACEDA. (OURENSE)

bcuenca@tragsa.es

La Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, del Ministerio para Transición Ecológica y reto Demográfico (MITERD) inició a finales de 2019 el Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la seca, desarrollado en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020 (submedida 15.2) y con financiación FEADER al 75%. En el Programa colaboran 9 organismos públicos de investigación además de la empresa TRAGSA, que lo coordina. Una de las acciones que contempla dicho programa, es la clonación utilizando técnicas biotecnológicas, de material de encina y alcornoque seleccionado por su tolerancia al estrés hídrico y a *Phytophthora cinannomi*, procedente de proyectos y actuaciones previas de algunos de los organismos colaboradores, con el objetivo final de poner a disposición del sector forestal materiales mejorados tolerantes a la seca. Las técnicas de micropropagación utilizadas (organogénesis o embriogénesis somática), se han elegido en función de la especie, el tipo de material (adulto o juvenil) y experiencia de cada grupo. Las colecciones cuya micropropagación se está abordado son las siguientes:

- Colección proyecto RESSECA: 51 brinzales de encina y 142 de alcornoque supervivientes a 2 años de inoculación con *P. cinannomi* y estrés hídrico, así como sus progenitores, 6 genotipos encina y 6 de alcornoque adultos.
- Colección de la Universidad de Extremadura: 34 brinzales de encina seleccionadas por tolerancia a *P. cinannomi* y estrés hídrico, así como sus progenitores, 8 encinas adultas.
- Colección de la Universidad de Huelva: 16 brinzales de encina y 14 de alcornoque, seleccionados por tolerancia a *P. cinannomi*, así como sus progenitores, 8 encinas y 8 alcornoques adultos.

El IMIDRA está trabajando en la micropropagación de los genotipos adultos de encina y alcornoque mediante embriogénesis somática a partir de bellotas inmaduras (encina) y de hojas de brotes inducidos en estacas de ramas (alcornoque). La micropropagación de los genotipos juveniles de alcornoque se está abordando tanto por embriogénesis somática a partir de hojas de los brinzales, por parte de la Universidad de Valencia, como mediante cultivo de yemas axilares por parte de la Universidad de Huelva y de TRAGSA. El protocolo de micropropagación mediante cultivo de yemas axilares de los genotipos juveniles de encina, más recalcitrantes al cultivo *in vitro*, está siendo investigado en el IIAG y en la Universidad de Huelva. Todas las líneas embriogénicas generadas en el programa serán crioconservadas por el IIAG. El destino de las vitroplantas generadas, será la confirmación de la tolerancia mediante ensayos con suficientes copias clonales de cada genotipo, así como el establecimiento de parcelas de ensayo y poblaciones de mejora (bancos clonales y huertos semilleros). Cada uno de los grupos presenta en esta Reunión diferentes posters donde de manera más pormenorizada describen el avance de sus trabajos.

PRODUCCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE ALCORNOQUE (*QUERCUS SUBER*) A PARTIR DE CULTIVOS EN SUSPENSIÓN. PROYECTO CORK2WINE

CAROLINA KREMER MORALES¹, GONZALO DEL OLMO BERENGUER¹, CRISTIHAN D. QUINCHUELA BARAHONA, INMACULADA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ², EVA FRIERO MOLANO², JOSÉ P. FERNANDES¹, FRANCISCO CARVALHO¹, MARÍA DEL MAR RUIZ-GALEA²

¹ AMORIM FLORESTAL ESPAÑA S.L., POLÍGONO INDUSTRIAL PELAGOCOTES S/N. 06500. SAN VICENTE DE ALCÁNTARA (BADAJOZ).

² DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL, GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA FORESTAL. INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL AGRARIO Y ALIMENTARIO (MIDRA), FINCA EL ENCÍN, AUTOVÍA A-2 KM38,2. 28800. ALCALÁ DE HENARES. MADRID.

mdelmar.ruiz@madrid.org

El alcornoque (*Quercus suber L.*) es un árbol mediterráneo de la familia de las Fagáceas de gran interés económico para la producción de corcho. Los protocolos actuales de embriogénesis somática permiten clonar alcornoques adultos, en los que se observa la calidad corchera (Hernández, I. 2011). Sin embargo, para aplicar esta técnica de propagación vegetativa a escala comercial y reducir su coste, es necesario desarrollar protocolos de cultivo en medio líquido para aumentar la producción de embriones.

Los cultivos en medio líquido se establecieron a partir de dos genotipos mantenidos en medio con agar durante años. Las suspensiones de embriones globulares se obtuvieron subcultivando 8g/l de la fracción inferior a 800µm (Ruiz-Galea, M. et al. 2018). Se realizaron varios ensayos para mejorar la diferenciación de embriones somáticos individualizados de alcornoque a partir de estos cultivos en suspensión. Se estudió el efecto de la densidad inicial de inóculo; 3g/l frente a 8g/l, y de añadir 6-Bencilaminopurina (BAP), Ácido indol-3butírico (IBA), o polietilenglicol (PEG) en el medio de proliferación en diferentes concentraciones. Los envases se cultivaron durante 30 días, en agitación a 110rpm y en cámara de cultivo a 23°C.

Para observar diferencias entre los tratamientos, a las 6 semanas se filtraron los cultivos y de cada tratamiento se subcultivaron 50 mg sobre un filtro de Nylon de 41µm de poro en una placa con medio de cultivo (Macros SH y resto MS), 6 g/l de agar, 10 g/l de carbón activo y 30g/l de sacarosa. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento. La mayor producción de embriones aislados cotiledonares se obtuvieron con la mayor densidad inicial, al añadir 5 µM de BAP o 30 g/l de PEG en el medio de cultivo.

Hernández et al 2011. Application of plant regeneration of selected cork oak trees by somatic embryogenesis to implement multivarietal forestry for cork production. Focus on Tree Micropropagation and Tissue Culture. Tree and Forestry Science and Biotechnology Vol 5 (Special Issue 1):19-26. ISSN 1752-3753/ ISBN 978-4-903313-64-1. Nageswara-Rao M, Soneji JR (eds), 2011.

Ruiz-Galea et al. 2018. CORK OAK, QUERCUS SUBER L. Embryogenic Liquid Cultures. S.M. Jain and P.K.Gupta (eds.). *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants*, 243-253 ©Springer International Publishing AG, 2018

Financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), y en parte, con Fondos FEDER de la Unión Europea. Los trabajos de ejecución se desarrollarán entre julio de 2019 y junio de 2023.

PROYECTO CORK2WINE. PRODUCCIÓN MASIVA DE ALCORNOQUES MEDIANTE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

MARÍA DEL MAR RUIZ-GALEA¹, CAROLINA KREMER MORALES², GONZALO DEL OLMO BERENGUER², EVA FRIERO MOLANO¹, INMACULADA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ¹, JOSE PEDRO FERNANDES², FRANCISCO CARVALHO²

¹ DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN AGROAMBIENTAL, GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA FORESTAL. INSTITUTO MADRILEÑO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO RURAL AGRARIO Y ALIMENTARIO, FINCA EL ENCÍN, AUTOVÍA A-2 KM38,2. 28800. ALCALÁ DE HENARES. MADRID.

¹ AMORIM FLORESTAL ESPAÑA S.L., POLÍGONO INDUSTRIAL PELAGOCOTES S/N. 06500. SAN VICENTE DE ALCÁNTARA (BADAJOZ).

mdelmar.ruiz@madrid.org

CORK2WINE es un proyecto de Investigación y Desarrollo CDTI100 que surge por iniciativa de seis grandes empresas del sector corchero vinculadas a la fabricación de tapones de corcho para el sector vitivinícola. Abarca desde el cultivo de nuevas explotaciones de alcornoco (*Quercus suber L.*) con individuos de máxima calidad corchera obtenidos por embriogénesis somática, hasta la mejora de los procesos de transformación y la obtención de un tapón de corcho de gran calidad: desde el alcornocal hasta la bodega.

El proyecto se estructura en tres aspectos: 1. aspectos forestales, genéticos, fisiológicos e histológicos del alcornocal que afectan a la calidad visual, física y sensorial del corcho (*Acrónimo: FOREST*); 2. Procesado del corcho, elaboración del tapón y nuevas aplicaciones para los subproductos generados en su fabricación (*Acrónimo: PROCORK*); 3. Mejora de la calidad sensorial del tapón de corcho (*Acrónimo: QUALITA*). Siendo en la línea FOREST, donde se aborda el objetivo de producir un gran número de individuos plus mediante la aplicación de técnicas de propagación de cultivo *in vitro*.

Los protocolos actuales de embriogénesis somática para el alcornoco permiten clonar ejemplares adultos en los que se observa la calidad corchera. Sin embargo, para la propagación a escala comercial, es necesario desarrollar los sistemas de cultivo en medio líquido y mejorar los porcentajes de aclimatación. Los objetivos son:

- 1.- Aumentar la producción de embriones somáticos cotiledonares individualizados de alcornoco usando cultivos en suspensión. Se evaluó el efecto de añadir al medio de proliferación diferentes concentraciones de ABA, BAP, IAA, IBA, NAA, glutamina y PEG, sobre la capacidad de diferenciar embriones aislados.
- 2.- Lograr la maduración de los embriones somáticos en un sistema de inmersión transitoria (RITA® MATIS®). Se evaluó el efecto de distintas concentraciones de sacarosa en el medio.
- 3.- Facilitar la siembra directa en contenedor forestal.

El logro de cada uno de estos objetivos y su combinación permitirá eliminar las fases más críticas del protocolo de cultivo *in vitro* y aplicar la embriogénesis somática a la producción masiva de alcornoques.

Financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), y en parte, con Fondos FEDER de la Unión Europea. Los trabajos de ejecución se desarrollarán entre julio de 2019 y junio de 2023.



SESIÓN II

Embriogénesis 2

DIFERENCIACIÓN MOLECULAR ENTRE GENOTIPOS ASOCIADA A LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES COMPLETOS Y AL ALBINISMO EN LA EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA EN CEBADA

M^ª PILAR VALLÉS BRAU, BEGOÑA ECHAVARRI RAZQUIN, ISABEL VALERO RUBIRA, SANDRA ALLUÉ DURANGO, ANA M^ª CASTILLO ALONSO.

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y PRODUCCIÓN VEGETAL, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI-CSIC, AVDA. MONTAÑANA 1005, 50059-ZARAGOZA.

valles@eead.csic.es

La producción de plantas doblehaploides (DHs) mediante embriogénesis de la microspora tiene una gran dependencia del genotipo en cereales. Existen factores que limitan la aplicación del cultivo de anteras en distintos genotipos de cebada. Entre ellos, destacan la baja la formación de embriones completos a partir de las estructuras embriogénicas, una vez que ya se ha producido la reprogramación celular, y la alta proporción de planta albinas. Aunque estos factores han sido estudiados en mayor o menor medida, todavía no se conocen con profundidad los mecanismos moleculares implicados [1, 2]. La diferenciación molecular durante las primeras fases del desarrollo embriogénico entre genotipos puede ayudar a discriminar factores clave que determinan la embriogénesis de la microspora.

En este estudio se ha analizado la expresión de genes que se activan durante el desarrollo embriogénico en dos líneas isogénicas de cebada, que se caracterizan por diferencias en el porcentaje de embriogénesis y de albinismo [2]. Se han podido determinar diferentes patrones de expresión de genes que se han asociado al desarrollo de embriones completos o al de plantas verdes según la funcionalidad de dichos genes. La pertenencia de los genes identificados a redes de expresión nos ha permitido identificar mecanismos moleculares implicados en la producción de DH en cebada.

[1]: Muñoz-Amatriain, M., Svensson, J. T., Castillo, A. M., Close, T. J., & Vallés, M. P. (2009). Microspore embryogenesis: assignment of genes to embryo formation and green vs. albino plant production. *Functional & integrative genomics*, 9(3), 311-323

[2]: Sánchez-Díaz, R. A. (2014). Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la embriogénesis de la microspora en cebada y trigo.

EL GEN *SLMAPKKK17* ESTÁ INVOLUCRADO EN EL PROCESO DE REGENERACIÓN ADVENTICIA EN TOMATE

MARYBEL JÁQUEZ-GUTIÉRREZ¹, JORGE SÁNCHEZ-LÓPEZ¹, ALEJANDRO ATARÉS¹, ANA ORTIZ-ATIENZA², CARMEN CAPEL², BENITO PINEDA¹, BEGOÑA GARCÍA-SOGO¹, FERNANDO J. YUSTE-LISBONA², RAFAEL LOZANO², VICENTE MORENO¹

¹ CULTIVO IN VITRO Y MEJORA VEGETAL, INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP; UPV-CSIC). 46022 VALENCIA, SPAIN.

² CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA (BITAL). UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, 04120-ALMERÍA, SPAIN

aatares@ibmcp.upv.es

Gracias al extenso cribado realizado en nuestra colección de líneas T-DNA de tomate, se han identificado diversos mutantes afectados en diferentes etapas del proceso de regeneración adventicia. Se ha identificado un mutante que no es capaz de formar callo desorganizado en condiciones favorables para la regeneración adventicia (*tdc-1* por *tomato defective in callus proliferation*). Se han identificado tres mutantes en los que, aunque generan callo desorganizado, no aparece ninguna estructura organogénica (*tdb-1*, -2 y -3 por *tomato defective in bud differentiation*). Además, se ha identificado un mutante que, aunque es capaz de formar yemas adventicias, estas no son capaces de seguir su desarrollo tras la formación de unas pocas hojas (*tds-1* por *tomato defective in shoot development*).

Curiosamente, las plantas mutantes *tdc-1* y *tds-1* eran indistinguibles de los WT, lo que indica que los genes alterados en estas líneas desempeñan funciones específicas en la proliferación celular de zonas de corte de explante (gen *TDC-1*) o en el desarrollo de los meristemas de las yemas adventicias (gen *TDS-1*). A diferencia estos, las plantas de los tres mutantes defectuosas en la diferenciación de brotes adventicios (*tdb-1*, -2 y -3) mostraron múltiples cambios en los rasgos vegetativos y reproductivos. El mutante *tdb-1* tiene menor porte que las plantas WT, *tdb-2* tiene afectado el desarrollo radicular y no es capaz de formar flores ni frutos y *tdb-3* tiene alteraciones importantes en el desarrollo de las hojas, flores y frutos.

Los análisis de cosegregación revelaron la existencia de una asociación entre el fenotipo del mutante *tdb-3* y un inserto de T-DNA. Tras realizar un Anchor-PCR se secuenciaron las regiones flanqueantes al T-DNA y se determinó que el gen *SLMAPKKK17* de tomate era el responsable del fenotipo mutante observado. Se comprobó que este gen tenía parcialmente anulada su expresión en todos los órganos de la planta analizados (tallo, hoja, ápice, yema floral, flor en antesis y fruto). En definitiva, se puede concluir que el gen *SLMAPKKK17* está involucrado en el proceso de diferenciación de yemas y brotes.

Agradecimientos

Vicente Moreno y Rafael Lozano agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación la financiación obtenida en los proyectos PID2019-110833RB-C32 y PID2019-110833RB-C31. Benito Pineda agradece al Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de la Universitat Politècnica de València (UPV) la financiación obtenida en el Programa de Ayuda para los primeros proyectos de investigación (PAID-06-18). Jorge Sánchez-López y Marybel Jáquez-Gutiérrez agradecen las becas obtenidas para su doctorado de la Universidad de Sinaloa y la CONACYT de México.

DYNAMICS OF ENDOGENOUS CYTOKININ DURING MICROSPORE EMBRYOGENESIS OF *BRASSICA NAPUS*

YOLANDA PÉREZ-PÉREZ¹, ALFONSO ALBACETE^{2,3}, PILAR S. TESTILLANO¹

¹POLLEN BIOTECHNOLOGY OF CROP PLANTS GROUP, CENTER OF BIOLOGICAL RESEARCH MARGARITA SALAS, CIB-CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040 MADRID, SPAIN

²DEPARTMENT OF PLANT NUTRITION, CEBAS-CSIC, CAMPUS UNIVERSITARIO DE ESPINARDO 25, 3100 MURCIA, SPAIN

³PRESENT ADDRESS: DEPARTMENT OF PLANT PRODUCTION AND AGROTECHNOLOGY, INSTITUTE FOR AGRI-FOOD RESEARCH AND DEVELOPMENT OF MURCIA, IMIDA, C/ MAYOR S/N, 30150 LA ALBERCA, MURCIA, SPAIN

testillano@cib.csic.es

In vitro, isolated microspores, at the responsive stage of vacuolated microspore, can be reprogrammed by stress treatments, becoming totipotent cells and producing haploid and doubled-haploid (DH) embryos and plants. This process, known as stress-induced microspore embryogenesis, is widely used in plant breeding to rapidly obtain DH plants, which represent a source of new genetic variability, fixed in complete homozygous plants in only one generation step. Production of DH lines is currently a standard method of the creation of new material in many modern breeding programs, although its application is limited in many crop species due to low efficiency. Despite knowledge gained in recent years, the complex regulatory network of cell reprogramming leading to embryogenesis is still far to be fully elucidated. Several studies have revealed the relevance of auxins and cytokinins (CKs) as regulating factors for cell fate, proliferation and differentiation. Our previous studies have shown the key role of endogenous auxin in rapeseed and barley microspore embryogenesis (Testillano 2019, Pérez-Pérez et al. 2019). However, much less is known on the involvement of endogenous CKs in the process of microspore embryogenesis.

In the present work we have analyzed the dynamics and possible role of endogenous CKs during stress-induced microspore embryogenesis in *Brassica napus*, a model system to study this process in which no exogenous phytohormones are present in the culture media. The results showed that endogenous CK concentration was low in microspores and at early stages after embryogenesis initiation, in proembryos, while it increased at advanced stages, with embryo development and differentiation. These changes in CK levels correlated with immunolocalization results and the expression patterns of the CK biosynthesis genes *BnIPT-9* and *BnIPT-2*, and CK signalling element type B, *BnARR-21* which were up-regulated at advanced stages of embryogenesis. In contrast, *BnARR5* signalling element of type A and *BnCKX-2*, enzyme of CK degradation pathway, showed decreased expression during embryogenesis progression. Pharmacological treatments with PI-55, inhibitor of CK signalling, did not affect embryogenesis initiation but severely impaired further embryo development. The results indicate that endogenous CKs would play a key role at advanced stages, during embryo differentiation, while embryogenesis initiation occurs with low CK concentration.

References

Perez-Perez Y, El-Tantawy AA, Solis MT, Risueno MC, Testillano PS. 2019. Stress-Induced Microspore Embryogenesis Requires Endogenous Auxin Synthesis and Polar Transport in Barley. *Front Plant Sci* 10, 1200.

Testillano PS. 2019. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *J Exp Bot* 70, 2965-2978.

Acknowledgements

Supported by the Spanish National Agency of Research (Agencia Estatal de Investigación, AEI) and European Regional Development Fund (ERDF/FEDER) by grants AGL2017-82447-R and PDI2020-113018RB-I00.

DNA DEMETHYLATION BY 5'- AZACYTIDINE IMPROVES SOMATIC EMBRYOGENESIS YIELD FOR REGENERATION AND BREEDING OF CORK OAK

ELENA CARNEROS, ESTEBAN M. DÍAZ-LUZZA, YOLANDA PÉREZ-PÉREZ, IVETT BÁRÁNY, PILAR S. TESTILLANO

POLLEN BIOTECHNOLOGY OF CROP PLANTS GROUP, CENTER OF BIOLOGICAL RESEARCH MARGARITA SALAS, CIB-CSIC, RAMIRO DE MAEZTU 9, 28040, MADRID, SPAIN

testillano@cib.csic.es

Somatic embryogenesis is a biotechnological tool for large-scale mass propagation of selected material, genetic transformation and breeding, with many advantages in the case of forest tree improvement. However, its application is limited in woody species due to low efficiency and recalcitrance. Cell reprogramming, totipotency acquisition and somatic embryogenesis initiation involve changes in global genome organization in which DNA methylation plays a key role. We have reported, in rapeseed and barley, that microspore embryogenesis initiation is associated with DNA hypomethylation (Solís et al. 2012, 2015). However little is known in trees about DNA methylation dynamics during somatic embryogenesis (Rodríguez-Sanz et al. 2014, Corredoira et al. 2017).

In this work we analyzed the changes in global DNA methylation levels and nuclear distribution of methylated DNA as well as gene expression profiles of several DNA methyl transferases during somatic embryogenesis in *Quercus suber* L. (cork oak), by biochemical, molecular and immunocytochemical approaches. Furthermore, effects of a small bioactive molecule, the DNA demethylating agent 5'-azacytidine (AzaC), on somatic embryogenesis were analyzed. Results showed low levels of global DNA methylation at early stages of somatic embryogenesis, in proembryogenic masses, followed by a progressive increase in DNA methylation at later stages, during somatic embryo differentiation. This pattern correlated with the expression profile of the DNA methyl transferase *QsMET1* which was up-regulated during somatic embryo development. AzaC treatment reduced global DNA methylation of proembryogenic masses, while promoted its proliferation and favored somatic embryogenesis initiation. At advanced stages, AzaC prevented embryo differentiation, an effect that reverted by eliminating the drug from culture medium. AzaC treatment increased the expression of the early embryogenesis marker gene *QsSERK1-LIKE*, while the late embryogenesis gene *QsLEA-LIKE* was repressed. Short AzaC treatment followed by a recovery period resulted in a significant increase of somatic embryo production, in comparison to control cultures.

These findings provide new insights into the epigenetic regulation underlying somatic embryogenesis in cork oak, a forest species of high economic and ecologic value. Moreover, they provide a promising avenue for pharmacological intervention by using small molecule epigenetic modulators, to improve somatic embryogenesis yields for forestry breeding and propagation programs.

Corredoira et al (2017) J Plant Phys. 213: 42-54.
Rodríguez-Sanz et al. (2014) BMC Plant Biol. 14:224.
Solís et al. (2012) J Exp Bot. 63: 6431-6444.
Solís et al (2015) Front Plant Sci. 6: 472

Work supported by projects AGL2017-82447-R and PDI2020-113018RB-I00 funded by Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities (MCIU) and European Regional Development Fund (ERDF/ FEDER).

LA INDUCCIÓN Y LAS PRIMERAS FASES DE LA EMBRIOGÉNESIS DE LA MICROSPORA EN TRIGO PANADERO PRODUCEN CAMBIOS EN LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE HISTONAS

ISABEL VALERO RUBIRA¹, ANA M^a CASTILLO ALONSO¹, M^a ÁNGELA BURRELL BUSTOS², M^a PILAR VALLÉS BRAU¹.

¹ DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y PRODUCCIÓN VEGETAL, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEL-CSIC, AVDA. MONTAÑANA 1005, 50059-ZARAGOZA.

² DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA, ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA, UNIVERSIDAD DE NAVARRA, C/ IRRUNLARREA 1, 31008-PAMPLONA.

valles@eead.csic.es

La embriogénesis de la microspora (EM) es un proceso en el cual las microsporas, después de aplicar un tratamiento de estrés, cambian su patrón de desarrollo y en vez de formar granos de polen inician una vía de desarrollo embriogénico. La reorganización de la cromatina es una de las características esenciales de la activación de esta nueva ruta de desarrollo. Las modificaciones post-traduccionales (MPTs) de histonas y la metilación del DNA son los mecanismos epigenéticos principales que se asocian con la inducción de la EM [1]. En especies modelo como *B. napus* y *H. vulgare* se han descrito cambios en las MPTs de las histonas, principalmente en la acetilación y la metilación, como consecuencia de la aplicación de un tratamiento de estrés inductor de la EM [2, 3].

Mediante técnicas de inmunolocalización se ha analizado el efecto de un tratamiento inductor de la EM con manitol sobre las MPTs de histonas en trigo panadero. Para ello, se ha hecho una comparación entre microsporas no tratadas (frescas), microsporas que siguen un desarrollo gametofítico, microsporas inducidas durante el tratamiento con manitol y después de 3 días en cultivo. En particular, se ha estudiado la acetilación de las histonas H3 (Lys9) y H4 (Lys5, Lys16) y la metilación de H3 (Lys9, Lys27) en dos cultivares de trigo con alta y media-baja respuesta androgénica.

Se han observado diferencias en la localización de histonas acetiladas y metiladas entre microsporas frescas, durante el desarrollo gametofítico, y microsporas inducidas, y también entre los cultivares. Durante la aplicación del tratamiento de estrés se observan cambios en la localización de acetilación de la histona H4 (Lys5) y de la metilación de H3 (Lys9), con diferencias entre cultivares. El inicio de la fase de cultivo modifica la localización de las marcas de acetilación en H3 (Lys9) y H4 (Lys16), y en la metilación de H3 (Lys9 y Lys27) respecto a la situación tras el tratamiento de estrés. El patrón de localización de la acetilación H3 (Lys9) al inicio de la embriogénesis marca las diferencias con el patrón de desarrollo gametofítico en los dos cultivares, mientras que los cambios en la metilación de la H3 (Lys9 y Lys27) solo se observan en el cultivar de alta respuesta.

[1]: Testillano P.S. Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal Exp Bot* 70 (11), 2965–2978 (2019). <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>

[2]: Li, H., Soriano, M., Cordewener, J. y col. The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *The Plant Cell* 26 (1), 195-209 (2014). DOI: 10.1105/tpc.113.116491

[3]: Pandey, P., Daghma, D.S., Houben, A. y col. Dynamics of post-translationally modified histones during barley pollen embryogenesis in the presence or absence of the epi-drug trichostatin A. *Plant Reprod* 30, 95–105 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00497-017-0302-5>

AVANCES EN LA OBTENCIÓN DE DOBLEHAPLOIDES DE CEBOLLA MEDIANTE GINOGÉNESIS

ORETO FAYOS AVELLÁN¹, M^a PILAR VALLÉS BRAÚ², CRISTINA MALLOR GIMÉNEZ¹, ANA GARCÉS-CLAVER¹, ANA M^a CASTILLO ALONSO²

¹UNIDAD DE HORTOFRUTICULTURA. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN, INSTITUTO AGROALIMENTARIO DE ARAGÓN - IA2 (CITA-UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA), AVDA. MONTAÑANA 930, 50059-ZARAGOZA.

²DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y PRODUCCIÓN VEGETAL, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI-CSIC, AVDA. MONTAÑANA 1005, 50059-ZARAGOZA.

amcast@ead.csic.es

La producción de plantas doblehaploides (DH) de cebolla, cultivo bienal, tiene un gran interés para la obtención de híbridos F1 uniformes y estables, ya que es la única forma de conseguir líneas puras en esta especie alógama. El método utilizado para obtener plantas DH de cebolla es el cultivo *in vitro* de óvulos u ovarios no fecundados (ginogénesis). Los principales problemas de este método son las bajas frecuencias de inducción de embriones en la mayoría de las accesiones, la pérdida de una gran cantidad de líneas ginogenéticas a lo largo del proceso y los altos porcentajes de plantas haploides (85-100%). La micropropagación de los embriones o plántulas obtenidas permite obtener varias plantas de la misma línea. Por otro lado, se han descrito diferentes estrategias para la aplicación de agentes diploidizantes según el explanto: embriones-plántulas jóvenes (5-20 días) o microbulbos (enteros o partidos por la mitad) formados durante el cultivo *in vitro* (3-4 meses) (Khar y col 2019). De las dos estrategias, la utilización de embriones-plántulas jóvenes es la forma más rápida. Las principales desventajas de esta estrategia son la obtención de una única plántula de cada línea y un elevado porcentaje de plantas mixoploides y haploides. En relación a esto último, se ha descrito que induciendo la embriogénesis somática a partir de las flores de las líneas haploides o mixoploides se obtiene plantas DH, aunque supone alargar dos años el proceso (Fayos y col 2015).

El objetivo de este trabajo ha sido aumentar el número de líneas DH en el menor tiempo posible. Para ello, los embriones-plántulas, obtenidos del cultivo de ovarios de 14 accesiones de cebolla, fueron tratados con el agente diploidizante amiprosfometil (AMP). Posteriormente, mediante una modificación del protocolo descrito por Fayos y col (2015), las plántulas se sometieron a un proceso de micropropagación y bulbificación *in vitro* antes de ser aclimatadas. Se obtuvieron embriones de todas las accesiones, con frecuencias de inducción de embriogénesis que variaron desde 0,28 a 5,97. De un total de 139 líneas ginogenéticas aclimatadas, 32 sobrevivieron después del proceso de bulbificación en tierra. De éstas, 26 tenían al menos 3 plantas por línea, y en 23 se consiguieron plantas DH. Estos cambios introducidos han permitido aumentar el número de plántulas de cada línea ginogenética, asegurando así su supervivencia, y conseguir plantas DH de 13 de las 14 accesiones utilizadas en tan solo dos años.

[1]: Khar, A., Islam, S., Kalia, P., y col. Present status of haploidy research in onion (*Allium cepa*) – A review. *Indian J Agric Sci* 89 (3), 396–405 (2019).

[2]: Fayos, O., Vallés, M.P, Garcés-Claver, A. y col. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium, cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. *Front Plant Sci* 6, 384 (2015). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00384>

LA APLICACIÓN DE CHOQUES TÉRMICOS, “PRIMING”, DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE PINO MARÍTIMO PRODUCE PLANTAS MEJOR ADAPTADAS A LA SEQUÍA

MARÍA AMPARO PÉREZ-OLIVER¹, MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ¹, ÁLEX ALBORCH¹, JUAN SEGURA¹, ESTER SALES², ISABEL ARRILLAGA¹

¹ INSTITUTO BIOTECMED, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, AVDA. VICENT ANDRÉS ESTELLÉS S/N, 46100 BURJASSOT, VALENCIA, ESPAÑA.

² DEPARTAMENTO DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL MEDIO NATURAL, INSTITUTO UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AMBIENTALES (IUCA), UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR, CTRA CUARTE S/N, 22071 HUESCA, ESPAÑA.

isabel.arrillaga@uv.es

Los eventos de sequía extremos, una de las consecuencias del cambio climático, afectan especialmente a especies con ciclos de vida largos como las coníferas. Estudios recientes han demostrado que la aplicación de pulsos de temperatura durante la embriogénesis somática y/o zigótica (*priming*) induce marcas epigenéticas que aumentan la resiliencia de las plantas derivadas de estos embriones frente a un posterior estrés. El objetivo de este trabajo es la producción de plantas de pino marítimo (*Pinus pinaster* Aiton) mejor adaptadas a estrés hídrico, mediante la aplicación de un *priming* de temperatura a megagametofitos durante la fase de inducción de la embriogénesis somática (ES).

En investigaciones previas se aplicó *priming* de 37 °C o 50 °C a megagametofitos aislados de semillas inmaduras de pino marítimo. Estos megagametofitos se cultivaron siguiendo el protocolo de ES desarrollado por nuestro grupo (Arrillaga et al. 2019). La aplicación de choques térmicos durante la fase de inducción de la ES afectó negativamente al porcentaje de líneas establecidas. No obstante, favoreció la maduración de las líneas embriogénicas y las plantas generadas mostraron una mejor adaptación a un posterior estrés térmico (Pérez-Oliver et al. 2021).

En esta comunicación se presentan los resultados de un ensayo posterior, en el que las plantas primadas y control, mantenidas durante tres años en invernadero, se sometieron a un estrés prolongado (30 días) de sequía. Se analizó, mediante PCR cuantitativa (qPCR), la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés hídrico en acículas. También se midieron parámetros fisiológicos como el ajuste osmótico, el rendimiento fotosintético y el contenido en pigmentos fotosintéticos y azúcares solubles. El muestreo se realizó antes de iniciar el experimento (T0), a los 15 días (T15), al finalizar el estrés (T30), y tras el periodo de recuperación (TR).

Las plantas derivadas de megagametofitos primados a 37 y 50 °C presentaron una expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta a estrés (*WRKY*, *HSP*, *SOD*, *APX* y *Dehidrinas*). A nivel fisiológico, las plantas derivadas de megagametofitos primados a 37 °C sometidas a un periodo de sequía presentaron una mayor recuperación de la actividad fotosintética, acompañada de un incremento en el contenido en clorofila total, azúcares y almidón tras el periodo de recuperación.

Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de pulsos de temperatura durante la fase de inducción de la ES genera marcas epigenéticas que derivan en cambios transcriptómicos y fisiológicos en las plantas de pino marítimo, promoviendo una tolerancia cruzada frente a un posterior estrés por sequía.

Referencias

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

Pérez-Oliver MA, Haro JG, Pavlović I, Novák O, Segura J, Sales E, Arrillaga I (2021) *Plants* 10:446. DOI: 10.3390/plants10030446.

Este trabajo está financiado por el MINECO y la UE (AGL2016-76143-C4-R).

EFECTO DE LA ADICIÓN DE ESPERMIDINA SOBRE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE CITOQUININAS Y LA REGENERACIÓN ADVENTICIA EN EXPLANTOS DE LIMONERO

MARGARITA PÉREZ-JIMÉNEZ, VIRGINIA CELDRÁN-SÁNCHEZ, FERNANDO CÓRDOBA LÓPEZ,
YOLANDA JIMÉNEZ, OLAYA PÉREZ-TORNERO

EQUIPO DE MEJORA GENÉTICA DE CÍTRICOS, INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDA), 30150, MURCIA, SPAIN

margarita.perez@carm.es

El limonero (*Citrus limon* (L.) Osbeck) es un cítrico perenne que crece en climas templados y de especial importancia en la cuenca mediterránea. Debido a su importancia económica y a la falta de regeneración varietal, en los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda de nuevas variedades. Sin embargo, las limitaciones a las que se enfrenta la mejora clásica de esta especie, con altos niveles de heterocigosis, poliembrionía y complicados ciclos reproductivos, ha hecho que muchos mejoradores confíen en la biotecnología. Para el desarrollo de ciertas técnicas biotecnológicas, como la transformación genética o la obtención de mutantes *in vitro* de limonero, es fundamental la obtención de un protocolo estable, reproducible y eficiente de regeneración adventicia.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la espermidina sobre la concentración endógena de citoquininas y la organogénesis somática de explantos de limonero. Para ello, se añadieron cuatro concentraciones de espermidina (0, 0.3, 0.6 y 0.9 mM) al medio estándar de regeneración (Navarro-García et al., 2016). El estudio se realizó con segmentos nodales de explantos de la variedad de limonero 'Verna 51', a los cuales se les eliminó previamente las yemas pre-existentes. Tras 8 semanas de cultivo se registró el porcentaje de explantos regenerantes, la tasa de regeneración y se midió mediante HPLC-MS la concentración endógena de zeatina (Z), BA, N6- benciladenosina (BAR), isopenteniladenina (iP), y citoquininas totales. Como resultado, en 'Verna 51' se observó un efecto positivo de las concentraciones intermedias de espermidina (0.3 y 0.6 mM) sobre el porcentaje y la tasa (nº yemas totales/nº explantos) de regeneración. Los mejores resultados se obtuvieron con 0,3 mM de espermidina, aumentando el porcentaje de regeneración en un 52% y la tasa de regeneración en un 72%, con respecto al control, sin diferencias significativas con 0.6 mM. Las concentraciones control y 0.9 mM de espermidina produjeron un porcentaje de regeneración por debajo del 30 %. Cuando se analizaron los niveles endógenos de citoquininas se pudo observar que estos eran más bajos en 0.3 y 0.6 mM de espermidina, excepto para BA que no se vio afectada por la espermidina. Los explantos que crecieron en condiciones control o con 0.9 mM de espermidina mostraron las mayores concentraciones de citoquininas endógenas. En este estudio se pudo observar como la espermidina juega un importante papel en la regeneración adventicia de explantos de la variedad de limonero 'Verna 51', y que este efecto positivo está asociado a una disminución de los niveles de las citoquininas endógenas.

Bibliografía:

Navarro-García N, Morte A & Pérez-Tornero O. 2016a. In vitro adventitious organogenesis and histological characterization from mature nodal explants of *Citrus limon*. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52 (2):161–173.

OBTENCIÓN DE PLANTAS DE OLIVO TETRAPLOIDES MEDIANTE TRATAMIENTOS CON COLCHICINA

LAIA RIBALTA¹, ISABEL NARVÁEZ¹, FERNANDO PALENCIA¹, JOSE ANGEL MERCADO¹, ELENA PALOMO-RÍOS¹, FERNANDO PLIEGO-ALFARO¹

¹INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA “LA MAYORA” (IHSM-UMA-CSIC), DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, 29071 MÁLAGA, ESPAÑA.

lrc3@uma.es

La mejora genética del olivo (*Olea europaea*) es crucial para satisfacer la creciente demanda de aceite de oliva a nivel mundial. El objetivo de esta investigación ha sido la inducción de poliploidía en callo embriogénico, para la obtención de plantas tetraploides con características agronómicas deseables, tales como mayor plasticidad frente a estrés y/o vigor reducido. Para ello se utilizaron embriones somáticos globulares con un tamaño de 1-2 mm procedentes de la línea P1, obtenidos de la radícula de un embrión zigótico maduro del cv. Picual. Se expusieron 0,5 g de material embriogénico a 0,1 % de colchicina durante 2, 3 y 6 días; posteriormente, los embriones somáticos se cultivaron en medio de embriogénesis cíclica de olivo (ECO) para inducir proliferación. Tras 5 meses de cultivo, se procedió al análisis de ploidía en el citómetro de flujo (PA-II Ploidy Analyzer; Partec), obteniéndose un 2,8 % (5 líneas) de tetraploides para las líneas expuestas durante 2 días, 9,3 % (11 líneas) para las de 3 días y 12,5 % (2 líneas) para las de 6 días. A los 3 meses se realizó otro análisis de ploidía en el material tetraploide obtenido para comprobar su estabilidad en el tiempo. Para ello se dividieron los callos embriogénicos en secciones, obteniéndose un total de 10 líneas tetraploides y 4 líneas mixtas (con secciones tetraploides y diploides en la misma línea), manteniéndose el número inicial de líneas tetraploides excepto para las de 3 días que fueron cuatro donde todas las secciones resultaron diploides. Posteriormente, se procedió a la maduración y germinación de las líneas embriogénicas obtenidas. El porcentaje de maduración fluctuó entre 8 y 22 % en las líneas tetraploides, mientras que en las mixtas fue entre 8 y 17 %, respecto a los valores de las líneas control diploides (18-27 %). La germinación para las líneas tetraploides fue del 8 %, mientras que en las mixtas fue superior al valor del control (13 %). Se repitió el análisis de ploidía en hojas de las plantas recuperadas; los resultados confirmaron que las líneas tetraploides dieron lugar a plantas tetraploides, a diferencia de las líneas mixtas, en las que algunas plantas resultaron ser diploides. Aun así, la aparición de plantas diploides regeneradas a partir de secciones tetraploides fue muy reducida, lo que confirma la eficiencia de la división del callo por secciones para el análisis de ploidía, pudiéndose acotar la superficie tetraploide del callo embriogénico de forma precisa. Otros análisis serán necesarios en el futuro para la confirmación del nivel de ploidía en las plantas regeneradas y el estudio de los fenotipos obtenidos.

Este trabajo se ha llevado a cabo en el marco del proyecto AGL2017-83368-C2-1-R.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA EN BROTES DE OLIVO OBTENIDOS MEDIANTE ORGANOGÉNESIS AXILAR O VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

ISABEL NARVÁEZ¹, SINDA BEN MARIEM¹, ELENA PALOMO-RÍOS¹, JOSÉ ÁNGEL MERCADO¹,
CARMEN MARTÍN², FERNANDO PLIEGO-ALFARO¹

¹ INSTITUTO DE HORTOFRUTICULTURA SUBTROPICAL Y MEDITERRÁNEA “LA MAYORA” (IHSM-UMA-CSIC), DPTO. BOTÁNICA Y FISIOLÓGIA VEGETAL, FACULTAD DE CIENCIAS, CAMPUS DE TEATINOS, S/N, 29071, MÁLAGA, SPAIN.

² DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL, ETS INGENIERÍA AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS, UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID, CIUDAD UNIVERSITARIA, S/N, 28040, MADRID, SPAIN.

narvaez@uma.es

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede inducir alteraciones en las células, lo que se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981, TAG, 60, 197-214). Estas alteraciones pueden ser útiles como fuente de variabilidad, pero pueden ser un problema si se quiere mantener la estabilidad genética. Factores como el genotipo, tipo de explanto, sistema de regeneración, tiempo y frecuencia de cultivo, así como el uso de reguladores de crecimiento, pueden afectar a este fenómeno. La estabilidad genética debe ser asegurada lo antes posible, para ello se dispone de marcadores tanto morfológicos, para la detección de variación de características fenotípicas, como moleculares, siendo los más utilizados los Simple Sequence Repeat (SSR) y Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). El objetivo de este trabajo fue el estudio de la estabilidad genética de material obtenido vía embriogénesis somática (ES), a partir del cultivo de radícula de embriones zigóticos maduros de la variedad Picual de olivo (*Olea europaea*), así como por proliferación de brotes axilares, mediante el cultivo del ápice del mismo embrión, usando marcadores RAPDs. La inducción de callo se realizó en medio OMc suplementado con 25 μM IBA - 2.5 μM 2ip. A las 3 semanas, el callo se transfirió al mismo medio pero conteniendo 2.5 μM IBA y sin 2ip. Posteriormente, se cultivó en medio de embriogénesis cíclica de olivo (ECO) conteniendo 0.25 μM IBA, 0.5 μM 2ip - 0.44 μM BA (Pérez-Barranco et al., 2009, PCTOC, 97, 243-251) y suplementado con 200 mg/L de cefotaxima. El callo embriogénico se mantuvo en este medio, con subcultivos cada 4 semanas. Los ápices se cultivaron en medio de germinación (Clavero-Ramírez y Pliego-Alfaro, 1990, Actas de Horticultura, 1, 512-516) durante 12 semanas y los brotes obtenidos se mantuvieron en medio RP suplementado con 2 mg/L de ribósido de zeatina (Vidoy-Mercado et al., 2012, Acta Horticulturae 949, 27-30). Se seleccionaron 3 líneas, P138, P357 y P269 de las cuales se disponía de callo embriogénico derivado de la radícula y de brotes derivados del ápice del mismo embrión. Embriones de las 3 líneas obtenidas se maduraron siguiendo el protocolo de Cerezo et al. (2011, PCTOC, 106, 337-344) y se germinaron para la obtención de brotes. Para el análisis de estabilidad genética se emplearon 7 marcadores RAPDs y se analizaron entre 3 y 10 muestras de callo embriogénico de las 3 líneas mantenidas *in vitro* durante 36 meses, así como entre 1 y 10 plantas regeneradas a partir de estos callos (16 meses mantenidas en fase de callo y 20 meses aproximadamente como brotes en proliferación) y entre 8 y 10 plantas obtenidas a partir del cultivo del ápice, mantenidas durante 36 meses. El material analizado de las líneas P138 y P269 no mostró polimorfismo; sin embargo, en el caso de la línea P357, se detectó una banda de aproximadamente 400 pb que estaba ausente en uno de los brotes procedentes del material micropropagado derivado del ápice, así como la amplificación de una banda adicional, de unas 450 pb, con uno de los RAPD utilizados.

Proyecto UMA18-FEDERJA-096

REGENERACIÓN DE PLANTAS EN CULTIVO *IN VITRO* DE CUCAMELÓN O SANDITA

IGNACIO MORENO GARCÍA, NURIA ARBONA CRESPO, BEGOÑA GARCÍA-SOGO, ALEJANDRO ATARÉS HUERTA, BENITO PINEDA CHAZA, VICENTE MORENO FERRERO.

LABORATORIO DE CULTIVO *IN VITRO* Y MEJORA VEGETAL. INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (UPV-CSIC). UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA, 46022 VALENCIA.

igmogar@etsiamn.upv.es

El ‘cucamelón’ o ‘sandita’ (*Melothria scabra* Naudin) es una cucurbitácea nativa del sur de Norteamérica que produce frutos de tamaño muy pequeño (algo más grandes que un grano de uva de mesa), con una forma elipsoide (similar a la de algunos tipos de melón), de color verde opaco con rayas longitudinales o reticulaciones más oscuras (similar al de algunos tipos de sandía) y con una carne ocupada por multitud de semillas (que semeja a la de algunos pepinillos). Además de compartir características con las tres cucurbitáceas más importantes a nivel económico, sus frutos tienen un sabor ligeramente amargo que es muy apreciado en distintas zonas de Méjico, donde recibe nombres muy diversos: ‘cucamelón’, ‘sandita’, ‘pepino amargo mexicano’, ‘sandía miniatura mexicana’, ‘sandía ratón’, ‘melón riata’, ‘pepinillo agrio’, etc.

Tanto por el peculiar sabor amargo de su piel como por su curiosa apariencia, los frutos de esta especie podrían tener una buena aceptación aquí como un nuevo alimento, sea como un postre alternativo o quizá mejor como aperitivo. Es más, teniendo en cuenta el especial atractivo de estos pequeños frutos, no sería de extrañar que su consumo se pusiera de moda dentro de lo que se denomina como ‘gastronomía imaginativa’. Con todo, habría que abordar programas de mejora que hicieran rentable su cultivo por parte de los agricultores y facilitarían su aceptación por parte del consumidor. Con relación a lo primero, el cucamelón es una especie semidomesticada, cuyo desarrollo vegetativo, casi arbustivo, es difícilmente compatible con sistemas intensivos de producción. Convendría, pues, modificar su hábito de crecimiento y emprender programas de mejora dirigidos a la introducción de resistencia a enfermedades y plagas. Por lo que respecta al consumidor, convendría reducir el número de semillas, lo que redundaría en una mayor calidad organoléptica.

El desarrollo de métodos de regeneración en cultivo *in vitro* haría factible el uso de aproximaciones biotecnológicas para la mejora de esta especie. En este contexto, el primer objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de métodos que permitan la inducción de organogénesis axilar y adventicia a partir de explantes de cucamelón. El segundo ha sido analizar la estructura polisomática en distintos explantes con el fin de inferir qué métodos de regeneración podrían ser más adecuados para abordar la obtención de frutos sin semillas. El tercer y último objetivo ha sido la caracterización del desarrollo vegetativo y reproductivo en plantas cultivadas en el invernadero, a fin de obtener unos datos fiables que pueden ser relevantes a la hora de abordar programas de mejora en esta especie.

ANTAGONISTIC ACTION OF YUCASINE AND DMSO ON APOGAMY IN THE FERN *DRYOPTERIS AFFINIS* SSP. *AFFINIS*

EUGENIO SÁNCHEZ, ALEJANDRO MENÉNDEZ, ALEJANDRO RIVERA,
M^a JESÚS CAÑAL AND HELENA FERNÁNDEZ

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA DE ORGANISMOS Y SISTEMAS, UNIVERSIDAD DE OVIEDO, C)
CATEDRÁTICO R URÍA S/N OVIEDO SPAIN

fernandezelena@uniovi.es

Apogamy is a peculiar case of apomixis, very frequent in ferns, in which an asexual embryo derived from somatic cells of the gametophyte generation. This work reports about the effect of yucasine, an inhibitor of the auxin biosynthesis, on vegetative and reproductive development of the gametophyte of *Dryopteris affinis* ssp. *affinis*, an obligate apogamous species. To cope with it, *in vitro* cultures of homogenized gametophytes were started up in liquid Mustashige and Skoog medium, supplemented with yucasine (0.47, 4.7 and 23.6 μ M). This compound was dissolved using DMSO, and therefore a control with the maximum dose (0.5%) used of this agent was included in the experiment. While yucasine has demonstrated an inhibitory power of gametophyte development as expected, surprisingly, DMSO exhibited an opposite effect, increasing either vegetative development as apogamy. The results inspired us to think that both substances could have been counteracted, throwing new evidence about the role of auxins and the compound DMSO on apogamy. Further research should be addressed to clarify the antagonistic action of yucasine and DMSO.



Conferencia Plenaria

HERRAMIENTAS CRISPR EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL: DE LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA A LA BIOLOGÍA SINTÉTICA

MARTA VAZQUEZ-VILAR¹, SARA SELMA¹, DIEGO ORZAEZ¹

¹ DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP-CSIC-UPC), CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, AVDA. TARONGERS S/N 46022, VALENCIA.

La mejora genética de plantas se ha convertido en una de las principales bazas a nuestro alcance para responder a las amenazas del cambio climático con un crecimiento sostenible. Los límites tradicionales entre la mejora transgénica y no transgénica se han difuminado con la aparición de las llamadas “Nuevas técnicas de mejora de plantas” (NPBT de sus siglas en inglés), que comprenden desde la cisgénesis a la biología sintética. Las NPBTs que mayor impacto han tenido en los últimos años son aquellas basadas en la utilización de Nucleasas sitio-específicas (SSN de sus siglas en inglés), y muy especialmente la nucleasa CRISPR/Cas. Esta tecnología se ha aplicado con éxito como agente mutagénico guiado por ARN a muchas especies de cultivos, produciendo docenas de ejemplos exitosos de mejora genética. El intenso esfuerzo de investigación que siguió al descubrimiento de CRISPR/Cas9 y sus prometedoras aplicaciones ha llevado, como en una profecía autocumplida, al desarrollo de nuevas herramientas relacionadas con CRISPR, pero ampliadas en sus usos y aplicaciones. Esto ha sido posible gracias a la sorprendente capacidad de las ribonucleoproteínas CRISPR/Cas para aceptar la adición de nuevos módulos con funciones adicionales, ya sea unidas a la proteína en sí o a la estructura del ARN guía, utilizando para ello un armazón extendido de aptámeros de ARN. En esta charla revisaremos las aplicaciones ampliadas de las proteínas CRISPR/Cas en mejora genética de plantas, desde la mutagénesis múltiple hasta la regulación transcripcional programable, y presentaremos una nueva colección de herramientas web para ingeniería genómica de plantas (GoldenBraid4.0), que facilita el ensamblaje modular de todo tipo de construcciones CRISPR/Cas. Además, presentaremos ejemplos de validación funcional de estas herramientas en ingeniería genómica de plantas solanáceas, entre otras aplicaciones, para su uso como biofactorías.



SESIÓN III

Micropropagación 1

PROPAGACIÓN EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL DE TRES GENOTIPOS ADULTOS DE *QUERCUS ROBUR*

CONCHI SÁNCHEZ¹, JULIA SERRANO¹, ANXELA ALDREY¹, DAVID BARBA¹, MARTÍN FERNÁNDEZ¹, SALADINA VILAVERT¹, NIEVES VIDAL¹

¹ DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CSIC, AVDA DE VIGO S/N, 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA.

nieves@iiag.csic.es

El cultivo en medio líquido puede ser beneficioso para la propagación de especies recalcitrantes, pero hasta el momento no se ha descrito su aplicación a árboles adultos de roble (*Quercus robur* L.) propagados por el sistema de yemas axilares (Vidal y Sánchez 2019).

En este trabajo presentamos los resultados de cultivar en biorreactores tres genotipos de roble (Ch1Rb, SL y CM) establecidos *in vitro* a partir de árboles cuyas edades rondan los 60, 200 y 300 años respectivamente y que llevaban entre 1 y 25 años en cultivo sucesivo por yemas axilares (Vieitez et al. 1994). Se utilizaron biorreactores de inmersión temporal RITA[®] dispuestos en una cámara convencional con intensidad de luz de 50 PPF (flujo fotosintético de fotones) o en un prototipo de propagación fotoautotrófica con 150 PPF y que puede suministrar aire enriquecido en CO₂ (Aldrey et al. 2018). En todos los casos a los biorreactores se les inyectó aire filtrado (enriquecido o no con CO₂) durante 1 minuto cada 6 horas.

Los parámetros analizados fueron: condiciones de cultivo (cámara convencional o prototipo fotoautotrófico), medio mineral de cultivo (GD o MS con los nitratos a la mitad), uso de soporte (cubos de lana de roca de 1 cm³), tamaño de explanto (15 o 25 mm), tipo de explanto (sección basal o apical), orientación del explanto (vertical u horizontal), origen del explanto (de medio líquido o semisólido), número de recultivos del explanto inicial y aporte de sacarosa (10 o 30 g/l).

En todos los casos las secciones basales con callo presentaron mayor crecimiento que las secciones apicales, y se obtuvieron mejores resultados en la cámara fotoautotrófica que en la cámara convencional, siendo más evidentes estas diferencias cuando se disminuyó el aporte de sacarosa. Se han detectado interacciones entre varios factores, como entre el medio de cultivo, el genotipo y el tipo de explanto y también entre el tipo de explanto y la necesidad de soporte inerte, puesto que este es esencial para el desarrollo de las secciones apicales y no para las basales.

En los tres genotipos utilizados se han conseguido brotes vigorosos que pudieron recultivarse en medio líquido o utilizarse para el enraizamiento y aclimatación, abriendo el camino a la utilización del medio líquido en el cultivo de esta especie.

Aldrey et al. (2018) Photomixotrophic and photoautotrophic micropropagation of *Phytophthora* resistant chestnut genotypes using liquid medium. Acta Hort. 1220:177-184.

Vidal y Sánchez (2019) Use of bioreactor systems in the propagation of forest trees. Eng Life Sci 19: 896-915.

Vieitez et al. (1994) Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. PCTOC 37:287-295.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante los proyectos IN607A y el Contrato Programa 2019-2020.

APLICACIÓN DE MACHINE LEARNING PARA MAXIMIZAR LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS *IN VITRO*

PEDRO P. GALLEGO¹, M. ESTHER BARREAL¹

¹AGROBIOTECH FOR HEALTH GROUP, PLANT BIOLOGY AND SOIL SCIENCE DEPARTMENT. FACULTY OF BIOLOGY. UNIVERSITY OF VIGO. SPAIN.

pgallego@uvigo.es

El *machine learning*, en castellano aprendizaje automatizado o de máquinas es una disciplina de la ciencia de la computación y una rama de la inteligencia artificial, cuyo objetivo principal es que los ordenadores puedan aprender por sí mismos a través de procesos de entrenamiento en las bases de datos, es decir, que en base al entrenamiento mejora sus procesos [1,2]. Nuestro grupo ha sido pionero en el empleo de algoritmos de inteligencia artificial, concretamente redes neuronales y lógica difusa en el ámbito de la biotecnología vegetal [3,4], demostrando su superioridad frente a la estadística tradicional [5,6]. En esta ponencia, se revisa como la tecnología del *machine learning* combinada con la biotecnología vegetal ha permitido elucidar que factores son claves para la germinación [7], la organogénesis [8,9] y la valoración fitoquímica [10,11] de plantas medicinales.

References

1. Silva, J. C. F., Teixeira, R. M., Silva, F. F., Brommonschenkel, S. H., & Fontes, E. P. Machine learning approaches and their current application in plant molecular biology: A systematic review. *Plant Sci.* **2019**, 284, 37-47.
2. Gallego, P. P., Gago, J., & Landín, M. Artificial neural networks technology to model and predict plant biology process. In *Artificial Neural Networks-Methodological Advances and Biomedical Applications*, ed. K. Suzuki. **2011**, London: IntechOpen, Pp. 197–216.
3. Gago, J., Landín, M., & Gallego, P. P. Artificial neural networks modeling the *in vitro* rhizogenesis and acclimatization of *Vitis vinifera* L. *J. Plant Physiol.*, **2010**, 167, 1226-1231.
4. Gago, J., Pérez-Tornero, O., Landín, M., Burgos, L., & Gallego, P. P. Improving knowledge of plant tissue culture and media formulation by neurofuzzy logic: a practical case of data mining using apricot databases. *J. Plant Physiol.*, **2011**, 168, 1858-1865.
5. Gago, J., Martínez-Núñez, L., Landín, M. & Gallego, P.P. Artificial neural networks as an alternative to the traditional statistical methodology in plant research. *J. Plant Physiol.*, **2010**, 167, 23-27.
6. Landín, M., Rowe, R.C. & York, P. Advantages of neurofuzzy logic against conventional experimental design and statistical analysis in studying and developing direct compression formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2009**, 38, 325-331.
7. Ayuso, M., Ramil-Rego, P., Landín, M., Gallego, P. P., & Barreal, M. E. Computer-assisted recovery of threatened plants: Keys for breaking seed dormancy of *Eryngium viviparum*. *Front. Plant Sci.*, 2018, 8, 2092.
8. García-Pérez P., Lozano-Milo E., Landín M. & Gallego P.P. Machine learning unmasked nutritional imbalances on the medicinal plant *Bryophyllum* sp. cultured *in vitro*. *Front Plant Sci.* **2020**, 11, 576177.
9. García-Pérez P., Lozano-Milo E., Landín M. & Gallego P.P. Machine learning technology reveals the concealed interactions of phytohormones on medicinal plant *in vitro* organogenesis. *Biomolecules.* **2020**, 10, 746.
10. García-Pérez, P., Lozano-Milo, E., Landín, M., & Gallego, P.P. From ethnomedicine to plant biotechnology and machine learning: the valorization of the medicinal plant *Bryophyllum* sp. *Pharmaceuticals*, **2020**, 13, 444
11. Ayuso, M., Pinela, J., Dias, M.I., Barros, L., Ivanov, M., Calhella, R.C., Sokovic, M., Ramil-Rego, P., Barreal, M.E., Gallego, P.P. & Ferreira, I. C.. Phenolic composition and biological activities of the *in vitro* cultured endangered *Eryngium viviparum* J. Gay. *Ind. Crops Prod.*, **2020**, 148, 112325.

SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL: UNA ALTERNATIVA PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE VARIEDADES DE ALBARICOQUERO (*PRUNUS ARMENIACA* L.)

CRISTIAN PÉREZ-CASELLES¹, LORENZO BURGOS¹, VALENTINA ORIGÜELA¹ Y NURIA ALBURQUERQUE¹

¹ GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA DE FRUTALES. DEPARTAMENTO DE MEJORA VEGETAL. CENTRO DE EDAFOLOGÍA Y BIOLOGÍA APLICADA DEL SEGURA (CEBAS-CSIC). CAMPUS DE ESPINARDO, 30100. MURCIA.

cperez@cebas.csic.es

Disponer de protocolos eficientes de micropropagación permite la obtención de gran cantidad de material vegetal clonal en condiciones controladas y asépticas. En nuestro grupo se han desarrollado protocolos de micropropagación para distintas variedades de albaricoquero utilizando medio semisólido. Aunque estos protocolos son eficientes, es interesante establecer nuevos métodos en los que la tasa de multiplicación y la calidad del material vegetal sean óptimas. Los Sistemas de Inmersión Temporal (SITs) son un método de cultivo efectivo para la producción de material vegetal a gran escala en medio líquido. El objetivo de este trabajo consiste en estudiar la micropropagación de dos variedades de albaricoquero en biorreactores de inmersión temporal y su comparación frente al tradicional medio semisólido.

Se utilizaron contenedores Plantform con medio líquido optimizado para la micropropagación de las variedades de albaricoquero 'Canino' y 'Mirlo Rojo'. Las condiciones de inmersión fueron de 2 minutos 4 veces al día y de aireación 3 minutos 8 veces al día. Tras dos ciclos de cuatro semanas de cultivo en los SITs, se midió la tasa de proliferación (número de brotes nuevos/ número de brotes inicial), la longitud de los nuevos brotes y la productividad (número de brotes obtenidos por explanto inicial x longitud media de los brotes).

El cultivo en SITs ha mejorado la micropropagación de ambas variedades con respecto al cultivo en medio semisólido. La tasa de proliferación pasó de 2,3 a 2,7 en la variedad 'Canino' y de 1,3 a 1,8 en 'Mirlo Rojo'. De la misma forma, la longitud media de los brotes mejoró en el cultivo en SITs, siendo de 2,8 cm frente a 2 cm en semisólido para 'Canino' y de 2,2 cm frente a 1,8 cm para 'Mirlo Rojo'. La variable que más se vio afectada por el cultivo en SITs fue la productividad, alcanzando valores de 7,3 en 'Canino', mientras que en cultivo semisólido los valores fueron de 4,8 y en 'Mirlo Rojo' 3,7 en cultivo en SITs frente a 2,1 en semisólido. Además, la calidad de los brotes micropropagados fue mejor en los SITs que en el sistema de cultivo convencional presentando un color verde intenso y un aspecto más saludable.

Agradecimientos: este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Proyecto INIA RTA2017-00011-C03-02. Cristian Pérez-Caselles cuenta con una Beca de Formación del Personal Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades

PROPAGACIÓN DE AVELLANO EN MEDIO LÍQUIDO: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE HIERRO Y SACAROSA

CONCHI SÁNCHEZ¹, ANXELA ALDREY¹, JULIA SERRANO¹, NIEVES VIDAL¹

¹ DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CSIC, AVDA DE VIGO S/N, 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA.

nieves@iiag.csic.es

El avellano (*Corylus avellana* L.) es una especie autóctona en gran parte de Europa, aunque a nivel económico tiene importancia principalmente en Turquía, Italia y España. Desde el punto de vista ecológico, los avellanos intervienen en el mantenimiento de los ecosistemas de ribera y en la alimentación de especies amenazadas como el oso pardo. La demanda global de avellanas está creciendo debido a la industria del chocolate y a sus beneficios para prevenir enfermedades cardiovasculares. Además, subproductos como la cáscara contienen antioxidantes utilizables en nutrición humana y animal, y las hojas y otros órganos pueden usarse para la extracción de taxol (Gallego et al. 2017).

Para hacer frente a la demanda actual y a las condiciones cambiantes del clima se necesitan árboles de calidad de variedades comerciales, libres de enfermedades y resistentes a estreses bióticos y abióticos. Además, para mitigar el cambio climático es necesario planificar la conservación *ex situ* de la biodiversidad presente en cultivares locales y material silvestre.

Los protocolos de micropropagación de avellano descritos hasta el momento son genotipo-dependientes, sobre todo en relación al aporte de hierro y reguladores de crecimiento (Sgueglia et al. 2019). El objetivo de este trabajo es el desarrollo de métodos de micropropagación en medio líquido para cuatro genotipos silvestres de avellano recogidos en el noroeste de la península ibérica.

Se han utilizado cultivos en medio semisólido y en biorreactores RITA de inmersión temporal y se han estudiado factores como tipo de explanto, concentración de citoquininas, fuente y concentración de hierro, régimen de subcultivo, uso de soporte, suplementación de sacarosa y sistema de enraizamiento.

Los resultados obtenidos indican que el uso de biorreactores favorece el cultivo de avellano, pues permite obtener en menos tiempo brotes más desarrollados y menos cloróticos que en medio semisólido, incluso sin suplementación con hierro y reduciendo a la mitad el aporte de citoquinina. Los brotes cultivados en RITA son más largos y numerosos, producen mayor número de segmentos y de brotes enraizables que en medio semisólido y se adaptan mejor a la disminución del aporte de sacarosa en el medio de cultivo. Los brotes obtenidos en biorreactores no han presentado dificultades para el enraizamiento ni la aclimatación.

Gallego et al. (2017) Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 129:1–16.

Sgueglia et al. (2019) Micropropagation of Sicilian cultivars with an aim to preserve genetic diversity in hazelnut (*Corylus avellana* L.), *Plant Biosystems* 153:5, 720-724, doi: 10.1080/11263504.2018.1549600.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante los proyectos IN607A y el Contrato Programa 2019-2020.

IMPLEMENTACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* EN MEDIO LÍQUIDO MEDIANTE BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL EN *CANNABIS SATIVA*

SALETA RICO¹, JOSÉ GARRIDO², CARLOS FERREIRO-VERA², CONCHI SÁNCHEZ¹, NIEVES VIDAL¹

¹ DPTO. FISIOLÓGIA VEGETAL. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA. IIAG (CSIC). AVDA DE VIGO S/N. 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA, SPAIN. CONCHI@IIAG.CSIC.ES

² DPTO. HIBRIDACIÓN Y CULTIVO. PHYTOPLANT RESEARCH S.L.U. RABANALES 21-PARQUE CIENTÍFICO TECNOLÓGICO DE CÓRDOBA. CALLE ASTRÓNOMA CECILIA PAYNE. EDIFICIO CENTAURO MODULO B-1. 14014 CÓRDOBA, SPAIN

saleta@iiag.csic.es & c.ferreiro@phytoplant.es

El sistema de inmersión temporal supone un avance en las técnicas de micropropagación ya que se elimina el uso de sustancias orgánicas de soporte como el agar y mejora la calidad de las plantas al permitir el intercambio gaseoso con el exterior mientras se mantienen las condiciones asépticas en el interior de los contenedores. Los principales beneficios del sistema de inmersión temporal son la mayor tasa de crecimiento de los brotes y su mayor calidad, ya que el intercambio gaseoso promueve la realización de la fotosíntesis en mayor medida que en frascos totalmente cerrados. Este estado fisiológico más autótrofo permite asimismo la reducción de los carbohidratos suministrados al medio de cultivo, disminuyendo la probabilidad de contaminaciones fúngicas. Otras ventajas son la posibilidad de automatización para propagación a gran escala y la reducción de costes al prescindir de agar. Para que la propagación por inmersión temporal sea eficiente es necesario optimizar ciertos parámetros.

El objetivo del presente trabajo es la optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* en medio líquido en *Cannabis sativa* L. Para ello se han empleado 6 genotipos proporcionados por la empresa Phytoplant Research SLU, especializada en el desarrollo de la cadena industrial de plantas medicinales. En este estudio se ha evaluado el efecto de los parámetros número de las inmersiones (3 inmersiones / 1 minuto y 6 inmersiones / 1 minuto), número de explantos (8, 10 y 16 explantos en RITA® y 18 y 24 explantos en Plantform™), medio de cultivo (medio MS ½ Nitratos, fórmula β-A y fórmula β-H), suplementación de carbohidratos (2% sacarosa, 0,5% sacarosa y 0% sacarosa), tipo de explanto (ápices y bases), tiempo de cultivo (4 y 6 semanas) y tipo de biorreactor (RITA® y Plantform™).

Se ha optimizado un protocolo de cultivo *in vitro* de *C. sativa* en medio líquido mediante biorreactores comerciales de inmersión temporal RITA® y Plantform™. Los resultados muestran que es más eficiente el uso de ápices como explanto inicial y un régimen de subcultivo de cuatro semanas. Además, son más adecuadas 3 inmersiones/1 minuto, 8 explantos por biorreactor RITA® y 24 por biorreactor Plantform™. Con respecto al medio mineral, el medio β-A es el que produce mayor rendimiento, seguido del β-H. En medio β-A los brotes alcanzan un buen desarrollo con la adición de solo 0,5 % de sacarosa. Este comportamiento es diferente en la propagación en medio semisólido, donde la disminución del aporte de sacarosa a esos niveles implica el detrimento de los cultivos.

Este trabajo ha sido financiado por el contrato Phytoplant-IIAG “Optimización del uso de biorreactores y otras técnicas alternativas para la regeneración de plantas de *Cannabis sativa* L”. Ref. 20190548

REDUCIR COSTES, INCREMENTAR BENEFICIOS: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE BAJO COSTE PARA LA MICROPROPAGACIÓN DE CASTAÑO

RICARDO CASTRO¹, JESÚS VIELBA¹, NIEVES VIDAL¹, CONCHI SÁNCHEZ¹

¹ DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CSIC, AVDA DE VIGO S/N, 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA.

ricardo.castro.mgb@gmail.com

El cultivo *in vitro* tiene un enorme potencial en la producción y mejora forestal ya que permite a los productores maximizar el rendimiento mediante la plantación de árboles con genotipos *plus*. Dentro del cultivo *in vitro*, la micropropagación mediante la proliferación de yemas axilares es una de las técnicas más empleadas para la propagación clonal y la producción de grandes cantidades de plantas en un corto período de tiempo. Sin embargo, su elevado coste, debido a la mano de obra requerida y a consumibles como el agar, es uno de los principales factores que limitan su generalización, disuadiendo de su implementación a los pequeños productores y laboratorios. Por ello es necesario desarrollar protocolos más baratos que permitan una mejor relación calidad/coste de la planta manteniendo el potencial productivo de la micropropagación.

El castaño común europeo (*Castanea sativa* Mill.) es una de las especies forestales más rentables del sur de Europa. La identificación de genotipos *plus* permite la selección de ejemplares altamente productores de castaña, madera o componentes químicos, por lo que su propagación a través de las técnicas de cultivo *in vitro* es una potente herramienta para la industria relacionada con el aprovechamiento del castaño. Para contribuir a este objetivo Viéitez et al. (2007) desarrollaron un protocolo eficiente para la micropropagación del castaño.

El objetivo de este estudio es reducir costes en el protocolo actual de micropropagación de castaño, que pueda ser extensible a otras especies, favoreciendo la introducción de la micropropagación en los procesos productivos habituales de pequeñas y medianas empresas. Para ello nos centramos en dos componentes básicos del medio de cultivo, la fuente de carbono y el agente gelificante, y valoramos la posibilidad de sustituir las marcas habituales de sacarosa y agar de laboratorio por el azúcar común de supermercado y por agar común producido localmente.

Como material vegetal empleamos un clon de castaño (P2RB, derivado de los renuevos basales de un árbol adulto), en el cual evaluamos la tasa de multiplicación y la calidad de los brotes obtenidos durante la micropropagación, así como las tasas de enraizamiento y desarrollo del sistema radicular tras los experimentos de enraizamiento con ácido indol-3-butírico. Se realizaron tres repeticiones en cultivos sucesivos y con un número mínimo de 18 explantos por cada repetición.

Los resultados obtenidos indican que la sustitución de agar y sacarosa de laboratorio por azúcar comercial y agar común conlleva una importante reducción del coste del medio de cultivo, sin producir ningún perjuicio en la calidad de los brotes micropropagados ni en la eficiencia del enraizamiento en el castaño. La extensión de estos protocolos a otros clones puede contribuir a que la micropropagación del castaño sea una técnica competitiva y rentable que permita su implementación a gran escala.

Viéitez AM, Sánchez C, García-Nimo ML, Ballester A (2007) Protocol for micropropagation of *Castanea sativa*. In: Jain SM, Häggman H (eds) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Heidelberg, pp 299–312

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante los proyectos IN607A y el Contrato Programa 2019-2020.

EVALUATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF VITAMINS ON THE GROWTH AND REPRODUCTION OF THREE *IN VITRO*-CULTURED BRYOPHYLLUM SPP.

EVA LOZANO-MILO¹, PASCUAL GARCÍA-PÉREZ^{1,*}, M. ESTHER BARREAL¹, PEDRO P. GALLEGO¹

¹ AGROBIOTECH FOR HEALTH GROUP, PLANT BIOLOGY AND SOIL SCIENCE DEPARTMENT. FACULTY OF BIOLOGY, UNIVERSITY OF VIGO, SPAIN.

* PRESENT ADDRESS: NUTRITION AND BROMATOLOGY GROUP, ANALYTICAL AND FOOD CHEMISTRY DEPARTMENT. FACULTY OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, UNIVERSITY OF VIGO, OURENSE CAMPUS, E-32004 OURENSE, SPAIN.

pgallego@uvigo.es

Vitamins are important regulators of cellular metabolism, acting as antioxidant agents and cofactors in many enzymatic reactions [1]. Vitamins are widely distributed in the plant kingdom, however, the requirements of plant cells in terms of type and vitamin concentration vary according to the plant species, even not being necessary their addition into culture medium [2].

In order to evaluate the effect of vitamins on plant growth, three species to *Bryophyllum* subgenus were cultured *in vitro* as described previously [3,4]: *B. daigremontianum* Raym.-Hamet *et* Perr. (BD), *B. tubiflorum* Harv. (BT) and *B. × houghtonii* D.B. Ward (BH). An experimental design involving five culture media was carried out using Murashige and Skoog [5] medium (MS) as control, three culture media with decreasing concentration of vitamins half, quarter and eighth concentration of nicotinic acid, pyridoxine and thiamine ($\frac{1}{2}$ Vit, $\frac{1}{4}$ Vit and $\frac{1}{8}$ Vit, respectively) and vitamins-free MS medium (0Vit). Culture media were supplemented with 3% sucrose and solidified with 0.8% agar at pH=5.8. Epiphyllous buds of each species were grown under a photoperiod of 16 h light and 8 h dark at 25 ± 1 °C for 12 weeks. After this period, plant growth-related parameters (shoot length, root length, leaf number, shoot fresh weight and root fresh weight) as well as the reproductive capacity of plants (plantlet number) and plant quality were determined. For all the parameters measured, BD and BT species achieved the best results in $\frac{1}{4}$ Vit. On the contrary, BH showed similar growth in all culture media regardless of the concentration of vitamins, not seeming to require an exogenous supply of vitamins in the culture medium.

References

1. Abrahamian, P. and Kantharajah A. Effect of vitamins on *in vitro* organogenesis of plant. Am. J. Plant Sci. 2011, pp.669-674.
2. Asensi-Fabado, M.A. and Munné-Bosch, S. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. Trends Plant Sci. 2010, 15, 582-591.
3. García-Pérez P, , Lozano-Milo E, Landín M & Gallego PP. Machine learning unmasked nutritional imbalances on the medicinal plant *Bryophyllum* sp. cultured *in vitro*. Front Plant Sci. 2020a, 11, 576177.
4. García-Pérez P, Lozano-Milo E, Landín M & Gallego PP. Machine learning technology reveals the concealed interactions of phytohormones on medicinal plant *in vitro* organogenesis. Biomolecules. 2020b, 10, 746.
5. Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962, 15, 473-497.

EFECTO DEL LINDANO (γ -HCH) SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE BROTES DE *PRUNUS* CULTIVADOS *IN VITRO*. UN ESTUDIO PRELIMINAR

JORGE GUIO MARTINEZ¹, EMMA SEVILLA MIGUEL¹, MARÍA F. FILLAT CASTEJON¹, JUAN MARIN VELAZQUEZ², ELENA GARCÍA MARTÍN², ARANCHA ARBELOA MATUTE², MARÍA LUISA PELEATO SANCHEZ¹

¹DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, PEDRO CERBUNA 12. 50009-ZARAGOZA.

²POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI-CSIC, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 5059 ZARAGOZA.

mpeleato@unizar.es

El cultivo *in vitro* ha demostrado ser una excelente herramienta para el estudio de la fisiología de las plantas y de las respuestas a diferentes estreses. Este trabajo explora el efecto de uno de los diversos xenobióticos contaminantes en el crecimiento de las plantas utilizando el cultivo *in vitro*. El lindano es un insecticida que ha sido ampliamente utilizado a nivel mundial, y que, aunque su uso fue prohibido en la mayoría de los países desarrollados, sigue presente en el medio ambiente, dado que es un pesticida muy persistente.

Se describe el efecto de distintas dosis de lindano (γ -HCH) sobre brotes de un patrón frutal del grupo ciruelo (*Prunus sp.*) cultivados *in vitro* en medio Murasihge y Skoog (MS) + IBA (0.5 μ M) + BAP (5 μ M), y en medio ME (MS con $\frac{1}{2}$ de macronutrientes + IBA (5 μ M)) para el estudio del desarrollo de raíces. Los cultivos se llevaron a cabo a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a una irradiancia de 40 μ mol m⁻² s⁻¹.

Brotes similares en cuanto a longitud y número de hojas se cultivaron tanto en medio MS como en medio ME (20 mL de medio por frasco). Se aplicaron cuatro tratamientos con 3 repeticiones en cada medio de cultivo:

- Control: H₂O mili Q estéril
- Control de solvente: DMSO
- γ -HCH 10 mg L⁻¹
- γ -HCH 50 mg L⁻¹

Se analizó la evolución de los cultivos 1, 5 y 9 semanas después del inicio del cultivo. Además, se determinó el número de brotes y peso de los callos basales en medio MS y el número de brotes, peso de los callos, número de raíces y longitud de las mismas tras 9 semanas en medio ME.

El lindano afectó negativamente, tanto a la formación de brotes, como al crecimiento de raíces al aumentar su concentración en el medio de cultivo, y este efecto fue muy acusado. Sin embargo, a concentraciones bajas estimuló la formación y crecimiento de brotes y raíces. Estos resultados sugieren la posibilidad de utilizar este modelo como herramienta para seleccionar especies tolerantes a ambientes contaminados con este pesticida que permitan la restauración de la cubierta vegetal.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-I00 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

ACOLCHADOS PLÁSTICOS BIODEGRADABLES DE USO AGRÍCOLA: ESTUDIO DEL IMPACTO DE SUS COMPONENTES EN PLANTAS DE PATATA MEDIANTE EL CULTIVO *IN VITRO*

HADALY SERRANO-RUIZ¹, LLUÍS MARTÍN¹, ANA M. PELACHO¹

¹ DEPARTAMENTO DE HORTOFRUTICULTURA, BOTÁNICA Y JARDINERÍA, UNIVERSIDAD DE LLEIDA, AV. ALCALDE ROVIRA ROURE, 191, 25198, LLEIDA, ESPAÑA

hadaly.serrano@udl.cat

La utilización de acolchados plásticos de polietileno en agricultura es una técnica altamente extendida por todo el mundo que reduce el uso de herbicidas y el consumo hídrico y aumenta la precocidad, producción y calidad de las cosechas. Sin embargo, su uso masivo conlleva un fuerte impacto ambiental debido a la generación de residuos plásticos, que frecuentemente se acumulan en el suelo agrícola y en el medio ambiente. La alternativa que ha ganado interés creciente es su sustitución por acolchados plásticos biodegradables que se integren en el suelo al finalizar el cultivo y se biodegraden por los microorganismos, evitando así la generación y persistencia de residuos. Sin embargo, durante su biodegradación liberan compuestos químicos al suelo de los que apenas se conoce su naturaleza y efecto en las plantas cultivadas.

Estudios previos mostraron que acolchados biodegradables de diferente composición liberan con facilidad diversos componentes químicos. Se ha demostrado también que los compuestos liberados de algunos de estos acolchados interfieren en el desarrollo de plántulas de lechuga y tomate cultivados *in vitro*, especialmente en el de sus raíces. Este estudio pretende investigar si los efectos ecotóxicos encontrados son persistentes o bien si las plantas desarrollan mecanismos de adaptación. Para ello se analiza el efecto de la exposición continuada a extractos procedentes de 8 acolchados de plástico biodegradable de diferente composición (BP1-BP8) sobre el desarrollo *in vitro* de explantos de patata subcultivados repetidamente durante 9 ciclos de cultivo en un medio de cultivo con los extractos.

Los extractos afectaron a la altura y al desarrollo morfológico de los explantos ya desde el primer mes de exposición y persistieron a lo largo de los subcultivos. El extracto de uno de los materiales (BP4) afectó drásticamente a las raíces, que crecieron cortas y altamente ramificadas; el de otro material (BP7) provocó un severo acortamiento y ramificación del tallo e inhibió en gran medida el desarrollo foliar; en ambos casos los efectos se intensificaron con el tiempo. El resto de extractos indujo cambios menos severos pero también mantenidos en el tiempo. Tras los nueve meses de exposición a los extractos, las raíces fueron el órgano más sensible, disminuyendo significativamente su peso en la presencia de todos los extractos excepto del BP4, lo que en la mayoría de los casos fue acompañado de la reducción del peso de la parte aérea. Por el contrario, los niveles de prolina, utilizados como marcador de estrés, se mantuvieron estables y los de clorofila sólo disminuyeron con BP4.

Los resultados sugieren que las plantas de patata son sensibles a compuestos liberados por los acolchados biodegradables, y que la magnitud de los efectos es estable o puede aumentar con el tiempo de exposición a los acolchados en función de su composición. Algunos acolchados provocaron efectos similares a los previamente observados en plantas de lechuga y tomate, lo que sugiere que los compuestos que liberan interfieren en procesos del desarrollo comunes entre especies vegetales. Otros acolchados afectaron de forma diferente a las especies que han sido evaluadas, indicando su diferente sensibilidad en función del material. En conjunto, se evidencia un efecto de los compuestos liberados por los acolchados de plástico biodegradable sobre plantas cultivadas y la necesidad de investigar en los efectos derivados de su composición.

PROPAGACIÓN DE LA VARIEDAD DE PISTACHO 'ASHOURY' APLICANDO TÉCNICAS DE MICROPROPAGACIÓN E INJERTO

ELENA GARCÍA, PILAR ANDREU, M. PILAR LORENTE, JUAN A. MARÍN, ARANCHA ARBELOA

POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 50059 ZARAGOZA

egarcia@eead.csic.es

La expansión del cultivo del pistacho en España se ve ralentizada por la dificultad de propagación de la especie, lo que conduce a una mayor demanda que oferta, así como a un alto precio de la planta. La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en el género *Pistacia* permite su propagación masiva y clonal, facilitando además la miniaturización de las yemas que posibilita la realización de injertos en pequeñas plantas en maceta. El cultivar 'Ashoury' muestra una floración temprana, así como un 90% de apertura de fruto y una alta calidad, por lo que su cultivo se ha expandido por los países mediterráneos, desde Siria, su país de origen.

Establecimiento: Los cultivos se iniciaron a partir de planta adulta. El uso de antioxidantes durante la fase de preparación y procesado de los explantos, así como en el medio de cultivo fue determinante para evitar el oscurecimiento del medio por los exudados de los explantos. Los cultivos fueron iniciados a partir de explantos nodales con una supervivencia del 40% de los explantos a las 12 semanas de cultivo.

Multiplificación: La aparición de necrosis apical es frecuente durante esta fase y fue perjudicial para la obtención de buenos brotes para el enraizamiento. Se probaron diferentes tratamientos para disminuir la necrosis incluyendo reguladores de crecimiento, composición del medio de cultivo, frío basal, o densidad de plantación. Todos los factores estudiados mostraron que afectaban al porcentaje de necrosis.

Enraizamiento: La falta de enraizamiento es frecuente en la micropropagación de variedades y también en distintas especies del género *Pistacia*. Se estudiaron diversos factores, y entre ellos, los reguladores de crecimiento y la composición del medio de cultivo resultaron determinantes para conseguir un porcentaje de enraizamiento del 80%.

Aclimatación: La falta de síntomas visuales de marchitez llevaba a la obtención de bajos porcentajes de supervivencia. Se propone un protocolo basado en bajas exposiciones a baja humedad relativa que aumentan con el tiempo.

Injerto: La propagación de esta variedad se estudió siguiendo tres procedimientos:

- 1) No injerto, variedad autoenraizada. Nuestros datos de desarrollo en campo no apoyaron esta técnica
- 2) Miniinjerto con yemas de Ashoury procedentes directamente de cultivo *in vitro* sobre plántulas de semilla de cornicabra (*P. terebinthus*). Con este método se obtuvo un porcentaje de éxito de injerto del 100%, aunque el número de injertos fue bajo.
- 3) Miniinjerto con yemas miniaturizadas sobre plántulas de semilla de cornicabra. Las púas de la variedad Ashoury procedían de brotes micropropagados y aclimatados. Con este procedimiento se obtuvo una media del 60% (oscilando entre el 50%-100%) de brotación tras los primeros días después del injerto.

El cultivo *in vitro* ha introducido nuevos métodos de obtención de planta de pistacho de una manera rápida y eficaz. Además, la posibilidad de injertar pequeñas plantas añade una gran flexibilidad para la producción y el transporte favoreciendo, asimismo, el éxito del injerto.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-I00 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

ENRAIZAMIENTO *IN VITRO* DE BROTES DERIVADOS DE ÁRBOLES ADULTOS DE *QUERCUS SUBER*

NIEVES VIDAL¹, PURIFICACIÓN COVELO¹, JESÚS M. VIELBA¹, SALETA RICO¹, RICARDO CASTRO¹, CONCHI SÁNCHEZ¹

¹DEPARTAMENTO DE FISOLOGÍA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA. CSIC. AVDA. DE VIGO S/N.15705. SANTIAGO DE COMPOSTELA

conchi@iiaag.csic.es

El alcornoque, *Quercus suber*, es una especie ampliamente distribuida a lo largo de la región Mediterránea occidental, siendo una de las frondosas más características de la Península Ibérica. Además de su gran importancia económica, debido a la producción de corcho, posee también un alto valor ecológico y paisajístico. Su distribución presenta un decaimiento debido a cambios demográficos, a la presencia del patógeno *Phytophthora cinnamomi* y al aumento de aridez que conlleva un incremento de estrés hídrico, el cual se prevé se intensifique debido al cambio climático. Como consecuencia, es necesario poder propagar vegetativamente genotipos seleccionados con características específicas para asegurar la producción futura y prevenir los efectos negativos del cambio climático y factores bióticos.

Aunque en *Q. suber* existe abundante información relacionada con los procesos de embriogénesis somática (Hernández et al., 2003; Vidal et al., 2010), hay pocos trabajos en relación a su micropropagación mediante yemas axilares. El objetivo de este trabajo ha sido analizar el enraizamiento *in vitro* de material establecido a partir de genotipos adultos seleccionados de alcornoque para definir protocolos de producción clonal mediante la propagación de yemas axilares.

Se utilizaron brotes axilares establecidos *in vitro* a partir de brotes epicórmicos y de ramas bajas de la copa de dos árboles adultos, QS3 y QS1 respectivamente, y de una línea obtenida mediante la germinación de embriones somáticos iniciada a partir de hojas procedentes del genotipo QS3 (QS3-E). Estas líneas han sido mantenidas en proliferación desde hace más de 10 años en medio MS con nitratos a la mitad. La inducción de raíces adventicias se llevó a cabo mediante diferentes tratamientos con ácido indol-3-butírico (AIB) en medio GD con macronutrientes reducidos a la tercera parte (GD 1/3). Se probaron los siguientes tratamientos: a) 125 µM AIB IBA durante 24 horas b) 25 µM IBA durante 5 días c) 25 µM IBA durante 7 días. Al final del periodo de enraizamiento se evaluó el porcentaje de enraizamiento, sistema radicular y calidad de los brotes enraizados en función de los brotes que presentaron sequía apical y/o reemprendimiento de crecimiento.

Los resultados obtenidos una capacidad media-alta de enraizamiento, con una mejor respuesta en los tratamientos con una menor concentración de AIB durante periodos más largos de tiempo.

Hernández et al. (2003). Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Rep* (2003) 21:759–764

Vidal et al. (2010). Establishment of cryopreserved gene banks of European chestnut and cork oak. *Eur. J. For. Res.* (129): 635–643

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante los proyectos IN607A y el Contrato Programa 2019-2020.

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS* L.) A PARTIR DE SEMILLAS GERMINADAS *IN VITRO*

GUSTAVO CÁCERES-CEVALLOS¹, CRISTINA MARTÍNEZ-CONESA¹, PASCUAL ROMERO-ESPINAR¹ MARÍA QUÍLEZ-SIMÓN,¹ INMACULADA GARCÍA-ALEDO¹ Y MARÍA JOSÉ JORDÁN¹.

¹DEPARTAMENTO DE DESARROLLO RURAL, ENOLOGÍA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE, INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDA), MURCIA, ESPAÑA.

gustavoj.caceres@carm.es, mariaj.jordan@carm.es

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) es un arbusto perenne espontáneo que se encuentra en todos los países mediterráneos. En la región de Murcia (sudeste de España) se encuentra en zonas áridas y semiáridas, desde el nivel del mar (msnm) hasta unos 1500 msnm adaptándose a zonas frías y de secano (1). En los últimos años la demanda del aceite esencial de romero ha crecido gracias a sus propiedades medicinales, culinarias y ornamentales (2); lo cual ha intensificado la producción en la zona y la búsqueda de ecotipos con alto rendimiento agronómico y alta actividad biológica.

Sin embargo, debido a la poca tasa de germinación, crecimiento vegetativo lento y escaso porcentaje de estaquillado de esta especie (entre el 15% al 22% de los ensayos realizados en IMIDA), resulta necesario un protocolo de micropropagación con el cual se aceleren los tiempos y maximice la obtención de clones con interés comercial para su adecuación y siembra en el campo.

Para el establecimiento del protocolo de micropropagación colocaron semillas de romero en medio MS enriquecido con vitaminas para su germinación. Las semillas fueron lavadas previamente durante 10 minutos en lejía comercial al 70% (5% de NaClO activo).

Todos los explantes obtenidos de la germinación de las semillas fueron sometidos a diferentes tratamientos hormonales para aumentar la producción de brotes y segmentos nodales, teniendo a los 30 días la mayor tasa de multiplicación (74,4% de explantes multiplicados) con el medio MS reducido a la mitad sus sales (MS½) y enriquecido con 6-bencilaminopurina (0,2 ppm).

Para la etapa de enraizamiento, se colocaron los explantes provenientes de la fase de multiplicación en diferentes medios enriquecidos con auxinas. A los 30 días se observó el porcentaje de enraizamiento de cada tratamiento, siendo mejor el medio MS½ enriquecido ácido indolbutírico (0,5 ppm), alcanzando un 60,71% de brotes enraizados. Todos los explantes enraizados fueron aclimatados en macetas con sustrato y fibra de coco, alcanzando un 85% de plantas aclimatadas con éxito.

Estos resultados permiten asegurar la generación de un protocolo de micropropagación adecuado para la multiplicación clonal de romero a partir de explantes de plántulas germinadas; lo que supone incrementar el conocimiento del cultivo de esta planta y buscar su modificación para el establecimiento de un protocolo a partir de segmentos nodales de plantas de provenientes de campo.

Este trabajo fue realizado con el apoyo del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) por el proyecto RTA2017-00031-C04-04, y el programa operativo regional FEDER para Murcia 2014-2020 del proyecto FEDER 14-20-23.

REFERENCIA:

Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Influence of the bioclimatic area on the polyphenolic composition, and antioxidant and bacteriostatic activities of *Rosmarinus officinalis*. *Nat Prod Commun.* 2013;8(6):817–22.

Hernández MD, Sotomayor JA, Hernández Á, Jordán MJ. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oils [Internet]. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.* Elsevier Inc.; 2016. 677–688 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00077-8>

ACLIMATACIÓN DEL PORTAINJERTO DE AVELLANO 'DUNDEE' MICROPROPAGADO

ELENA GARCÍA, JUAN ANTONIO MARÍN, ARANCHA ARBELOA

POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 50059 ZARAGOZA

egarcia@eead.csic.es

'Dundee', un patrón de avellano de gran interés, obtenido por polinización libre de *Corylus colurna* L. y seleccionado por sus buenas características como la ausencia de rebrotes de raíz, la resistencia a los estreses abióticos y su vigor, hacen que su uso como portainjerto se haya extendido por las diferentes zonas de cultivo. Además, su micropropagación ha sido puesta a punto y facilita su disponibilidad, pero en los viveros presenta un cuello de botella durante su aclimatación. Aquí evaluamos diferentes estrategias para lograr altos porcentajes de supervivencia de plantas de gran calidad.

En este trabajo se han estudiado los procesos de enraizamiento y aclimatación de 'Dundee' siguiendo tres métodos diferentes 1) enraizamiento *in vitro* y posterior aclimatación, 2) inducción de raíces *in vitro* y posterior crecimiento y aclimatación de raíces en invernadero y 3) enraizamiento y aclimatación *ex vitro*. Se tomaron datos de enraizamiento y aclimatación al final del proceso.

En el primer tratamiento la inducción y el crecimiento de las raíces *in vitro* fue del 100%, sin embargo, durante la aclimatación murieron todos los brotes. En el segundo tratamiento, la inducción de raíces *in vitro* mediante un medio sólido fue seguida por el crecimiento de raíces *ex vitro* y posterior aclimatación y resultó en un 68% de las plantas aclimatadas. Finalmente, el tratamiento de brotes por inmersión de las bases en IBA, seguido de su enraizamiento *ex vitro* y aclimatación logró un 100% de supervivencia de las plantas.

La elección del método de enraizamiento y aclimatación ha sido decisiva para el éxito de la aclimatación de las plantas de Dundee, aumentando de 0 a 100% los porcentajes de aclimatación.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-100 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE *BOLETUS SP.* A PARTIR DE CARPÓFOROS

MAURO RIVAS-FERREIRO*, LAURA IGLESIAS-BERNABÉ*, M. ESTHER BARREAL, M. LUISA CERCEDA, PEDRO P. GALLEGO

PLANT BIOLOGY AND SOIL SCIENCE DEPARTMENT. FACULTY OF BIOLOGY. UNIVERSITY OF VIGO. SPAIN.

pgallego@uvigo.es

El complejo *Boletus gr. edulis* está constituido por cuatro especies (*B. edulis* Bull:Fr. *sensu stricto*, *B. aureus* Bull: Fr., *B. pinophilus* Pilat et Dermek y *B. reticulatus* Schaeff) con una gran demanda comercial [1], siendo una excelente fuente de vitaminas, proteínas, carbohidratos, ácidos grasos [2], pero también de fitoquímicos con actividades antioxidantes, muy demandados por la industria cosmeceútica, nutracéutica y farmacéutica [3]. Sin embargo, su carácter ectomicorrícico, hace que hasta el momento no se haya podido cultivar *in vitro* de forma eficiente [4]. Además, no hay micelio viable disponible en colecciones de cultivo internacionales.

En este trabajo los objetivos han sido: 1) identificar carpóforos y aislar el micelio; 2) evaluar el efecto de la temperatura de incubación, del cocultivo con semillas de *Brassica rapa*, de la concentración de nutrientes en el medio y del origen del carpóforo sobre el crecimiento en medio sólido de *B. edulis* y *B. reticulatus*. Los resultados indican que tanto la temperatura (mayor de 20°C) como el genotipo (carpóforo) causaron un efecto significativo sobre el crecimiento, en cambio ni la presencia de exudados de germinados de Brassicaceae ni la composición de los medios empleados mostraron diferencias. En esta ponencia se discutirán estos resultados y se plantearán futuros estudios para lograr un cultivo *in vitro* eficiente de micelio de *Boletus gr. edulis*.

References

1. Gelardi, M. Diversity, Biogeographic Distribution, Ecology, and Ectomycorrhizal Relationships of the Edible Porcini Mushrooms (*Boletus sp. str.*, Boletaceae) Worldwide: State of the Art and an Annotated Checklist. Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World: Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences, 2020, 223 pages.
2. Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C. & Ferreira, I. C. Targeted metabolites analysis in wild *Boletus* species. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44, 1343-1348.
3. Zhang, A., Xiao, N., He, P. & Sun, P. Chemical analysis and antioxidant activity in vitro of polysaccharides extracted from *Boletus edulis*. Int. J. Biol. Macromol., 2011, 49, 1092-1095.
4. Mediavilla, O., Olaizola, J., Santos-del-Blanco, L., Oria-de-Rueda, J. A., & Martín-Pinto, P. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. Mycorrhiza, 2016, 26, 161-168.

DISEÑO DE UN PROTOCOLO DE CULTIVO *IN VITRO* DE *BOLETUS EDULIS* Y *BOLETUS RETICULATUS*

LAURA IGLESIAS-BERNABÉ, GLORIA ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, M. ESTHER BARREAL, PEDRO P. GALLEGO

PLANT BIOLOGY AND SOIL SCIENCE DEPARTMENT. FACULTY OF BIOLOGY. UNIVERSITY OF VIGO. SPAIN.

pgallego@uvigo.es

Los hongos ectomicorrícicos presentan un elevado interés gastronómico y por tanto comercial, particularmente dos especies: *Boletus edulis* y *B. reticulatus* [1]. A pesar de todos los intentos realizados aún no se han conseguido cultivar estos hongos de forma comercialmente eficaz [2].

El objetivo general de este trabajo ha sido diseñar un protocolo de cultivo *in vitro* empleando para ello dos medios comúnmente usado en el cultivo de hongos denominados MMN [3] (en dos combinaciones: 1) empleando sacarosa como carbohidrato y 2) glucosa) y el medio BAF [4]. Además, se empleó el medio MS [5] por ser el más utilizado en el cultivo de plantas.

El diseño experimental incluyó el estudio del efecto del genotipo (2 especies), del carbohidrato (sacarosa versus glucosa), de la temperatura (20 y 25 °C) y del tiempo del cultivo (2, 4, 6 y 8 semanas).

Los resultados sugieren que tres de los factores: genotipo, carbohidrato y el tiempo de cultivo causaron un efecto significativo en el cultivo de los micelios, lográndose un mayor crecimiento cuando se empleó *Boletus edulis*, el medio BAF y largos periodos de crecimiento (8 semanas).

References

1. Gelardi, M. Diversity, Biogeographic Distribution, Ecology, and Ectomycorrhizal Relationships of the Edible Porcini Mushrooms (*Boletus* sp. str., Boletaceae) Worldwide: State of the Art and an Annotated Checklist. Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World: Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences, 2020, 223 pages.
2. Mediavilla, O., Olaizola, J., Santos-del-Blanco, L., Oria-de-Rueda, J. A., & Martín-Pinto, P. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. Mycorrhiza, 2016, 26, 161-168.
3. Marx, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 1969, 59:153-163.
4. Moser, M. Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe): Hauptwerk./Mit Beitr. von Knud Christensen ua sowie aus d. Nachlass von Julius Schäffer. Klinkhardt, 1960, 58-62.
5. Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 1962, 15, 473-497.

EL SANEAMIENTO DE LA CHUFA: UNA HERRAMIENTA IDÓNEA PARA MEJORAR RENDIMIENTOS Y FRENAR EL AVANCE DE LA MANCHA NEGRA

MAGDALENA CERVERA OCAÑA¹, MONTSERRAT PLOMER SÁEZ¹, ROSA MARÍA BELMONTE¹, ALBERTO CORONADO¹, ANNA CRESPO-SEMPERE¹, CONSUELO PENELLA CASAÑ¹, MARÍA R. ALBIACH-MARTÍ¹

¹ VALGENETICS S.L., PARC CIENTÍFIC UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, PATERNA, VALENCIA.

La chufa (*Cyperus esculentus L. var. sativus Boeck*) es uno de los cultivos más emblemáticos en la provincia de Valencia. Sus tubérculos se consumen directamente o pueden usarse para la producción de la tradicional horchata valenciana. Este cultivo está prácticamente concentrado en la comarca de l'Horta Nord, donde tiene un enorme impacto económico, por la superficie cultivada, social, por los numerosos agricultores y empresas implicadas, y paisajístico, por ser emblemático de la huerta valenciana. Además, la chufa posee grandes posibilidades comerciales, ya que está catalogada como un superalimento y posee cualidades que la habilitan para su uso tanto en la industria alimentaria como en la cosmética y medicinal.

Sin embargo, este cultivo está amenazado por varios frentes. Por un lado, se observa un incremento de enfermedades, sobre todo fúngicas, como la de la mancha negra, que están generando elevadas pérdidas, convirtiéndose en un grave problema para la continuidad del cultivo, y, por otro lado, las importaciones de otros tipos de chufa que adulteran la calidad organoléptica de la auténtica chufa valenciana.

En este tipo de cultivos, no solo es necesario el diagnóstico y control de los patógenos, sino que además es fundamental generar chufa sana empleando un método de saneamiento mediante cultivo in vitro de ápices meristemáticos, seguido de micropropagación de planta sana, para abastecer la demanda del agricultor. Esta multiplicación se ha de realizar en condiciones controladas y de cuarentena. Con la plantación de chufa sana, se conseguirá frenar los ciclos de infección de patógenos de una cosecha a la siguiente.

Para solucionar esta problemática, se han puesto a punto técnicas y medios de cultivo para el saneamiento in vitro de la chufa, tras forzar la brotación a partir de tubérculos de distintas localizaciones dentro del área de la *DO Xufa de València*, representativas de la variabilidad genética de este cultivo. Igualmente, se han desarrollado protocolos para la micropropagación de planta saneada, obteniéndose ratios de multiplicación de al menos 8. Para la aclimatación de planta in vitro en invernadero, se han establecido condiciones de temperatura y composición de suelos para lograr incrementar las ratios de aclimatación.

Las plantas saneadas se analizaron para la presencia de patógenos fúngicos diagnosticados en trabajos previos y relacionados con la enfermedad de la mancha negra. Posteriores experimentos realizados en un invernadero de seguridad biológica de malla antitrips, empleando planta saneada y controles de planta no saneada, han demostrado que las plantas saneadas dieron lugar a tubérculos sanos, un incremento significativo del tamaño de la planta y un rendimiento de al menos un 12% mayor en comparación con el tamaño y rendimiento de las chufas infectadas con la enfermedad de la mancha negra de las plantas control. Además, las plantas de chufa previamente saneada no generaron ningún tubérculo afectado por la mancha negra, contra el 9% de chufas negras obtenidas en las plantas control no saneadas.

En conclusión, el saneamiento de la chufa se postula como una de las técnicas más eficaces para solucionar el problema de la mancha negra, ya que además de mejorar los rendimientos, se evita la producción de tubérculos afectados. Por tanto, sería una estrategia idónea para frenar el aumento de esta enfermedad en uno de los cultivos más tradicionales y emblemáticos de la Comunidad Valenciana.



SESIÓN III

Micropropagación 2

IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE RESPUESTA A ESTRÉS SALINO EN RAÍCES DE *PRUNUS* CULTIVADAS *IN VITRO*

EMMA SEVILLA MIGUEL², ARANCHA ARBELOA MATUTE¹, PILAR ANDREU PUYAL¹, JUAN MARÍN VELÁZQUEZ¹, MARÍA LUISA PELEATO SANCHEZ²

¹ POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI-CSIC, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 5059 ZARAGOZA

² DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA, PEDRO CERBUNA 12. 50009-ZARAGOZA

mpeleato@unizar.es

La selección de patrones adecuados frente a los distintos estreses ambientales constituye un importante reto en el que el tiempo juega un papel relevante. La salinidad es uno de los factores que están limitando la productividad, y esta salinidad se está incrementando de forma alarmante a nivel mundial, con porcentajes muy altos de salinización sobre todo en tierras de regadío. Las raíces son los primeros órganos de la planta en percibir la alta concentración de iones en la rizosfera, y pueden verse afectadas en la absorción de agua y nutrientes minerales y con ello el crecimiento de la planta. Aquí hemos utilizado el modelo de cultivo de raíces aisladas, que hemos desarrollado previamente, para la selección de genotipos que puedan articular mecanismos de respuesta adecuados frente a la salinidad.

Utilizando raíces aisladas del patrón de cerezo ‘Masto de Montañana’ (*Prunus cerasus*), sensible a la salinidad, cultivadas *in vitro* en distintas concentraciones de NaCl (0, 20, 60 y 180 mM), se concluyó que a 60 mM se aplicaba un estrés moderado, por lo que se escogió como valor para el estudio posterior. El crecimiento a esta concentración de sal era menor que en el control, y estudios previos indicaban un considerable aumento de prolina, así como la acumulación de almidón en los tejidos.

Las raíces obtenidas se procesaron para obtener un extracto de proteínas solubles totales, y se llevó a cabo un estudio con electroforesis 2D, y posterior identificación de las manchas correspondientes a las proteínas y sus isoformas mediante MALDI TOF/TOF MS. Estos estudios de proteómica permitieron identificar 18 proteínas diferencialmente expresadas en presencia de 60 mM de NaCl, (considerando cambios a partir de 1.5 veces de cambio relativo en la expresión). Entre los cambios más interesantes se encuentran los experimentados por la isoenzima fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa citosólica, que aumenta considerablemente como consecuencia del estrés salino, mientras que la suma del conjunto de las isoformas permanece a niveles análogos en las dos condiciones, control y 60 mM de NaCl. Así mismo, la D-3-fosfoglicerato dehidrogenasa plastidial, la formato dehidrogenasa mitocondrial, la isoenzima de raíz de la ferredoxina-NADP reductasa, (de localización plastidial), la 70 kDa protein 2-like, la S-adenosilmetionina sintasa 5 y la actina incrementan su expresión en presencia del estrés salino. Por otra parte, la (R)-mandelonitrilo liasa 3, la subunidad B1 de V-type proton ATPasa, entre otras proteínas, ven disminuida su expresión.

Estos resultados son congruentes con otros datos obtenidos a partir de plantas completas disponibles en la bibliografía, e indican que las raíces cultivadas *in vitro* pueden ser un buen modelo experimental para estudio de respuestas fisiológicas, así como para llevar a cabo una selección precoz.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-I00 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

EFFECTO DE LAS FUENTES DE ILUMINACIÓN FLUORESCENTE Y LED SOBRE LA TEMPERATURA EN LOS CULTIVOS *IN VITRO*

ARACELI BARCELÓ MUÑOZ¹, MARTA BARCELÓ MUÑOZ¹, ALFONSO GAGO CALDERÓN²

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, ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, C/ DR. ORTIZ RAMOS S/N C.P. 29071 MÁLAGA, ESPAÑA.

araceli.barcelo@juntadeandalucia.es

La sustitución de lámparas fluorescentes por iluminación LED permite un mayor control sobre el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, ya que es posible ajustar el espectro de luz a los diferentes procesos biológicos de las plantas, reduciendo además los costes energéticos de explotación. Sin embargo, nos queda mucho por conocer tanto acerca de su potencial como de los parámetros que se ven afectados y, por tanto, se deben considerar.

Uno de los factores que se ve afectado de forma diferencial según la fuente de iluminación utilizada es la temperatura. Esta variable, generalmente, se mantiene en las cámaras de cultivo alrededor de los 25°C, pero es necesario considerar también la temperatura del microambiente de los contenedores de cultivo y la diferencia que existe entre ambas. De ello dependerá en gran medida el crecimiento y desarrollo de los cultivos, y la aparición de desórdenes tales como la vitrificación o la necrosis apical.

En este trabajo se presentan los primeros resultados del efecto diferencial sobre la temperatura, de la iluminación artificial alimentada con lámparas fluorescentes modelo “Grolux” (Fabricante: Sylvania) frente a una combinación de lámparas LED rojas (660 nm), verdes (530 nm) y azules (450 nm) calibradas para ofrecer una emisión espectral similar a la que generan las lámparas de descarga anteriores.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AVA2019-008.

Nuestro agradecimiento al Dr. Alfonso Gago Bohorquez, sin él hubiese sido imposible iniciar esta línea de investigación, y a Amalia Cabeza y Marta Carrera por su trabajo en las labores de micropropagación.

MICROPROPAGACIÓN Y OBTENCIÓN DE NUEVOS CULTIVARES EN *DIONAEA MUSCIPULA* ELLIS

ALBERTO CORONADO, MARYBEL JÁQUEZ-GUTIÉRREZ, CONSTANZA MARTÍN-VÁSQUEZ, VICENTE MORENO, ALEJANDRO ATARÉS

CULTIVO IN VITRO Y MEJORA VEGETAL, INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DE PLANTAS (IBMCP; UPV-CSIC). 46022 VALENCIA, SPAIN.

Dionaea muscipula es la única especie del género *Dionaea* y probablemente, la planta carnívora más conocida y cultivada en todo el mundo. Es originaria de zonas pantanosas y humedales de Carolina del Norte y Carolina del Sur, y presenta el movimiento más rápido del reino vegetal, siendo capaz de cerrar los lóbulos de su hoja en menos de una décima de segundo. Suele presentar un crecimiento en roseta con unas 4 a 8 hojas que emergen de un rizoma subterráneo de aspecto bulboso. Sus hojas, que no alcanzan más de 10 cm, están formadas por dos partes: un pecíolo plano y largo, de forma acorazonada y un par de lóbulos unidos a nivel del pecíolo. Cada uno de estos lóbulos presenta en su superficie tres pelos accionadores. Cuando un insecto se posa sobre la planta y acciona dos de estos pelos con un lapso de hasta 20 segundos, la trampa se cierra automáticamente. Si este animal es muy pequeño, escapará por las aberturas de la trampa, y esta se abrirá en pocas horas. Si tiene un tamaño mayor, la hoja se cerrará herméticamente, asfixiando al insecto hasta la muerte. Es entonces cuando empieza la digestión por un cóctel enzimático de peptidasas que secreta la propia hoja. Se cree que este mecanismo de selección de la presa permite a la planta hacer un balance entre el beneficio que obtiene de ella y el coste de su digestión.

El desarrollo de técnicas de micropropagación sobre estas especies ha permitido escalar e industrializar su producción para aumentar su potencial como planta ornamental, pudiéndose encontrar a la venta de forma atemporal en casi cualquier vivero del mundo.

En nuestro grupo hemos puesto a punto nuevas metodologías no descritas antes en bibliografía. Hemos desarrollado técnicas para la implantación de material *in vitro* a partir de semilla y también de material vegetal *in vivo*. Gracias a esta última técnica, podemos reintroducir y multiplicar *in vitro* cultivares y variedades de interés ornamental con el fin de conseguir plantas “True-to-Type”. También hemos desarrollado nuevas metodologías para la micropropagación de *Dionaea muscipula*, mediante propagación clonal y regeneración adventicia, basadas en la brotación axilar y en la regeneración adventicia de explantes y microexplantes de hoja.

Estas metodologías de regeneración nos han permitido identificar un variante somaclonal con altas posibilidades de convertirse en un nuevo cultivar. Este mutante es estable y presenta *in vitro* el borde del pecíolo en forma de sierra, a diferencia del borde liso de la variedad silvestre; una disminución en el número de dientes, dando la sensación de que estos se han fusionado entre ellos; y una coloración clorótica en comparación con la especie silvestre.

Con estos resultados queremos remarcar el potencial uso de las técnicas de cultivo *in vitro* para la obtención de nuevas variedades y cultivares que puedan tener importancia económica en el futuro, desarrollando coloraciones, patrones de variegación o formas novedosas que incrementen el valor de esta especie ornamental tan popular en la actualidad.

LA MICROPROPAGACIÓN: UNA HERRAMIENTA EFICAZ EN UN PROYECTO DE MEJORA DE CEREZO

ELENA GARCÍA¹, ANA WUNSCH², JUAN ANTONIO MARÍN¹, ARANCHA ARBELOA¹

¹POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 50059 ZARAGOZA

²UNIDAD DE HORTOFRUTICULTURA, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA DE ARAGÓN. AVDA. MONTAÑANA 930, 50059 ZARAGOZA.

arbeloa@eead.csic.es

Un programa de mejora de patrones de cerezo, basado en genotipos de *Prunus avium* L. de poco vigor, se está desarrollando conjuntamente entre el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria y la Estación Experimental de Aula Dei en Aragón. Tradicionalmente el material de *Prunus avium* L. ha sido infrautilizado en estos programas por su gran vigor, arquitectura, falta de precocidad y otros caracteres no deseables que podrían estar asociados a su propagación habitual por semillas. En este trabajo el cultivo in vitro, como herramienta para la propagación de material preseleccionado, permite clonar esta especie difícil de propagar por estaquillado tradicional, así como caracterizar el comportamiento de estas selecciones para su micropropagación, acortando y mejorando los procesos de selección de dicho programa.

Establecimiento: Doce genotipos preseleccionados por su adecuado crecimiento y arquitectura, su comportamiento en vivero o su precocidad, entre otros caracteres, se establecieron in vitro a partir de árboles adultos. Yemas nodales de brotes en crecimiento activo se sembraron en primavera en dos medios de cultivo: MS y DKW y se estudiaron los porcentajes de brotación y supervivencia. El medio DKW dio los mejores resultados en brotación aunque se observó una gran dependencia del genotipo. Nueve genotipos se establecieron in vitro.

Multiplicación. Se probaron tres medios de cultivo diferentes para determinar el más adecuado para la propagación de los clones. En estos clones el principal reto fue establecer una buena tasa de multiplicación con un adecuado alargamiento de entrenudos, ya que en los medios habituales en frutales de leñosas (MS) se observaron brotes con entrenudos extremadamente cortos. El medio DKW mostró una elevada tasa de multiplicación para la mayoría de los clones estudiados, aunque la determinación del medio más adecuado fue genotipo dependiente.

Enraizamiento y aclimatación. Se estudió el enraizamiento de los clones in vitro y ex vitro y su posterior aclimatación. El enraizamiento in vitro se produjo en un 50-100% de los brotes dependiendo del genotipo. Sin embargo, la aclimatación posterior de los brotes fue nula. Cuando las plantas se enraizaron *ex vitro* con un tratamiento con IBA, ya sea en un medio de inducción sólido durante una semana o por inmersión de la base del brote, el enraizamiento/aclimatación alcanzó un porcentaje medio del 70% de los brotes, mostrando igualmente diferencias entre genotipos.

Mediante la puesta a punto y la aplicación de protocolos de micropropagación, 6 meses después de la introducción in vitro del material, se consiguió un elevado número de plantas de cada clon, creciendo en maceta, con las que poder acometer el proceso de selección, acortando los plazos de los procesos de multiplicación dentro de los programas de mejora.

Por otra parte, se ha determinado el comportamiento frente a la micropropagación de dichos clones encontrándose diferencias entre ellos que podrían ser determinantes dentro del proceso de selección.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-I00 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

MICROPROPAGACIÓN DE ALCORNOQUES JUVENILES TOLERANTES A *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* MEDIANTE CULTIVO DE YEMAS AXILARES: PROGRAMA NACIONAL DE MEJORA Y CONSERVACIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS DE LA ENCINA Y EL ALCORNOQUE FRENTE AL SÍNDROME DE LA SECA

ANA QUEVEDO DÍAZ¹, LOURDES GONZÁLEZ SIMÓN², BEATRIZ CUENCA VALERA²

¹ DEPARTAMENTO CIENCIA AGROFORESTALES. UNIVERSIDAD DE HUELVA. CAMPUS LA RÁBIDA. 21819 PALOS DE LA FRONTERA (HUELVA)

² VIVERO DE MACEDA. TRAGSA. CRTA. MACEDA- BALDREI, KM. 2. 32700 MACEDA. (OURENSE)

bcuenca@tragsa.es

En 2019, la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación, del Ministerio de Transición Ecológica y Reto Demográfico (MITERD), inició el Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la seca, en el marco del Programa Nacional de Desarrollo Rural (submedida 15.2) con financiación FEADER al 75%.

En ese contexto, la empresa TRAGSA ha abordado la clonación de 40 brinzales de alcornoque de la colección RESSECA, que habían superado la inoculación con *P. cinnamomi* y el estrés hídrico producido alternando períodos de sequía e inundación, durante dos campañas sucesivas. Cada una de las líneas de cultivo se estableció en la primavera de 2020 a partir de un único brinzal superviviente de 4 savias, en medio GD adicionado con BA 0,2 mg/L (Vieitez y col., 2009). De los 40 genotipos establecidos, 28 se cultivan regularmente y de forma estable en la actualidad, 9 continúan en fase de estabilización y 3 han tenido que ser establecidos de nuevo en cultivo en la primavera de 2021 por la pérdida del cultivo debida a contaminación por endófitos.

Con los genotipos estables, se ha ensayado el efecto de los macronutrientes de GD, en combinación con micronutrientes y vitaminas de esa formulación, o específicos para *Quercus*, y el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. El objetivo era maximizar la elongación de los brotes que permitiera su enraizamiento. Con los brotes elongados obtenidos, se han ensayado diferentes sistemas de enraizamiento tanto *in vitro*, como *ex vitro* y en condiciones fotoautotróficas *in vitro*.

La mayor cantidad de brotes elongados se ha conseguido realizando un cultivo en dos fases, una fase de multiplicación empleando un medio que combina macronutrientes de GD, micronutrientes y vitaminas específicos para *Quercus* y BAP 0,2 mg/L, y una fase de elongación empleando un medio MS con la concentración de nitratos reducida a la mitad y BAP 0,1 mg/L.

Los brotes enraizados de más calidad, se obtuvieron mediante inmersión basal de los brotes en AIB 0,5 g/L y posterior disposición en medio GD sin regulares de crecimiento y con la sacarosa reducida al 2%, en oscuridad durante una semana (Romano y Martins, 2003). Los brotes enraizados *in vitro* con este sistema, que presentan re-empredimiento del crecimiento apical, se comportan tras su paso a tierra mejor que los explantos dispuestos a enraizar directamente *ex vitro*. Las tasas concretas de aclimatación las conoceremos a la conclusión de los ensayos, aún en curso.

Romano, A. y Martins-Loução, M.A. (2003). Strategies to improve rooting and acclimatization of cork oak. Proc 1st IS on Accl. & Estb. Microprop. Plants. Acta Hort, 616. ISHS 2003

Vieitez, A.M., Corredoira, E., Ballester, A., Muñoz, F., Durán, J. e Ibarra, M. (2009). *In vitro* regeneration of the important North American oak species *Quercus alba*, *Quercus bicolor* and *Quercus rubra*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 98: 135-145.

ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE MICROPROPAGACIÓN DE DOS ECOTIPOS DE ESPLIEGO (*LAVANDULA LATIFOLIA MEDIK.*) DE INTERÉS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

GUSTAVO CÁCERES-CEVALLOS¹, CRISTINA MARTÍNEZ-CONESA¹, PASCUAL ROMERO-ESPINAR¹ MARÍA QUÍLEZ-SIMÓN,¹ INMACULADA GARCÍA-ALEDO¹ Y MARÍA JOSÉ JORDÁN¹.

¹DEPARTAMENTO DE DESARROLLO RURAL, ENOLOGÍA Y AGRICULTURA SOSTENIBLE, INSTITUTO MURCIANO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO Y ALIMENTARIO (IMIDA), MURCIA, ESPAÑA.

gustavoj.caceres@carm.es, mariaj.jordan@carm.es

El espliego es una planta aromático-medicinal nativa de la región mediterránea que se cultiva principalmente para la producción de aceites esenciales, siendo España uno de los mayores productores con aproximadamente 150 a 200 toneladas de producción por año (Lesage-Meessen et al., 2015). Asimismo, sus requerimientos mínimos de agua le confieren una importancia socio-económica por su posible uso para la revalorización de suelos no urbanos, permitiendo así un reasentamiento de las zonas rurales. Sin embargo, el espliego al ser una planta de secano tiene un crecimiento vegetativo lento y una tasa de propagación por estaquillado baja, que alcanza un 25% (ensayos realizados en el centro de investigación IMIDA), por lo que resulta necesario establecer un protocolo de micropropagación *in vitro* para la obtención de clones a partir de segmentos nodales. En base a esto, la optimización del protocolo de micropropagación a partir de dos ecotipos de espliego provenientes de una parcela experimental del IMIDA constituye el principal objetivo del presente trabajo de investigación. Estos ecotipos fueron caracterizados por el equipo de investigación por su alto interés y aplicabilidad en la industria alimentaria.

Para la desinfección de los segmentos nodales se evaluaron diferentes tratamientos, siendo efectivo el lavado en alcohol al 70% seguido de un lavado en solución con un agente oxidante (Dicloroisocianurato de sodio = NaDCC) a una concentración de 2 g/l, alcanzando una desinfección del 67,6%.

Por otra parte, también se probaron diferentes medios para el establecimiento de los explantes siendo mejor el medio Woody Plant Medium (WPM) enriquecido con carbón activado (1 g/l) con un 64,52% de explantes establecidos sin oxidación y/o necrosis.

Los explantes establecidos fueron testados durante 30 días en diferentes medios de cultivo con hormonas para la fase de multiplicación, obteniendo el mayor porcentaje de brotación (75,6%), así como, mayor número de segmentos nodales por explante (2,98) con el medio MS adicionado con 6-bencilaminopurina y ácido giberelico, ambos a una concentración de 0,5 ppm.

Para la etapa de enraizamiento, se colocaron los explantes provenientes de la fase de multiplicación en diferentes medios enriquecidos con auxinas. A los 30 días se observó el porcentaje de enraizamiento de cada tratamiento, siendo mejor el medio WPM enriquecido con carbón activado (1 g/l) y ácido indolacético (0,5 ppm), alcanzando un 58,93% de brotes enraizados.

Todos los explantes enraizados fueron aclimatados en macetas con sustrato y fibra de coco, alcanzando un 90% de plantas aclimatadas con éxito.

Estos resultados permiten asegurar la generación de un protocolo de micropropagación adecuado para la multiplicación clonal de espliego, lo que supone incrementar el conocimiento del cultivo de esta planta y la posibilidad de obtener cultivos homogéneos y de calidad.

Este trabajo fue realizado con el apoyo del INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) por el proyecto RTA2017-00031-C04-04, y el programa operativo regional FEDER para Murcia 2014-2020 del proyecto FEDER 14-20-23.

REFERENCIA:

Lesage-Meessen, L.; Bou, M.; Sigoillot, J.C.; Faulds, C.B.; Lomascolo, A. Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: A review of current use and potential application in white biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015, 99, 3375–3385. [CrossRef] [PubMed]

RECUPERACIÓN DEL GERMOPLASMA DE UN EJEMPLAR ADULTO DE *QUERCUS ROBUR*: ENRAIZAMIENTO Y ACLIMATACIÓN DEL “CARBALLO DAS MENTIRAS”

NIEVES VIDAL¹, PURIFICACIÓN COVELO¹, JESÚS MARÍA VIELBA¹, JULIA SERRANO¹, ANXELA ALDREY¹, CONCHI SÁNCHEZ¹

¹ DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CSIC, AVDA DE VIGO S/N, 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA.

conchi@iag.csic.es

El roble común (*Quercus robur* L.) forma parte del paisaje y de la cultura de gran parte de la Península ibérica, aunque la superficie que ocupan sus bosques se encuentra en regresión en gran parte de su territorio. Los programas de mejora genética tradicional para esta especie son todavía muy escasos, y su capacidad de propagación vegetativa convencional muy limitada, sobre todo según avanza la edad del árbol. En lo que respecta a su propagación *in vitro*, las etapas de establecimiento, enraizamiento y aclimatación siguen siendo un reto, especialmente cuando se trata de individuos de edad avanzada (Vieitez et al. 2012).

El objetivo de este trabajo ha sido la recuperación del germoplasma de un ejemplar de roble de algo más de 200 años, situado en la localidad gallega de San Miguel de Sarandón, que se encuentra en un proceso de declive irreversible debido al asfaltado del terreno donde se asienta. Su nombre, “Carballo das Mentiras”, hace referencia a que tradicionalmente era el lugar de reunión dominical donde se compartían los chismes de la localidad y aldeas circundantes (Neira 2019).

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron yemas recién brotadas, que se recogieron a principios de primavera en la parte alta del tronco, entre la conjunción de las ramas principales. Se establecieron 15 líneas, que se propagaron por el sistema de yemas axilares durante aproximadamente un año antes de comenzar los experimentos de enraizamiento y aclimatación. Para la inducción del enraizamiento se utilizaron brotes de más de 20 mm con ápice en crecimiento activo procedentes de explantos cultivados en posición vertical u horizontal. Los brotes se trataron con ácido indol-3-butírico (AIB) durante 24 horas, seguido por la transferencia a medio sin auxina (Sánchez et al. 1996). La expresión del enraizamiento tuvo lugar en jarras con medio semisólido o en cubos de lana de roca impregnados en medio líquido y situados biorreactores con ventilación forzada.

Tras 6-8 semanas del tratamiento de AIB los brotes con raíces y cuyo ápice había reemprendido el crecimiento se transfirieron a una mezcla de turba y perlita para su aclimatación en un fitotrón. Para evitar la desecación, se colocaron dentro de cajas de plástico cuyas tapas se fueron abriendo gradualmente durante 4-6 semanas. Las plantas supervivientes continuaron la aclimatación en invernadero durante 4-6 meses adicionales. Aproximadamente 60 plantas pasaron a maceta durante la primavera y se encuentran en proceso de aclimatación a condiciones de campo.

Neira (2019) No medio de San Miguel hai un carballo das mentiras. A ESTRADA Miscelánea histórica e cultural 22:137-145 ISSN 1139-921X.

Sánchez et al. (1996) Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiol* 16:673–680.

Vieitez et al. (2012) Application of biotechnological tools to *Quercus* improvement. *Eur J Forest Res* 131:519–539.

Los autores agradecen a José García su colaboración en la recogida del material vegetal. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia mediante los proyectos IN607A y el Contrato Programa 2019-2020.

MICROPROPAGACIÓN DE UNA VARIEDAD DE ROSA CULTIVADA ANTIGUA CON INTERÉS PARA LA INDUSTRIA DEL PERFUME

NIEVES VIDAL¹, MARÍA-CARMEN MARTÍNEZ², JOSÉ-LUIS SANTIAGO², SUSANA BOSO², PILAR GAGO², PURIFICACIÓN COVELO¹, ANA LÓPEZ¹, SALETA RICO¹, ANXELA ALDREY¹, CONCHI SÁNCHEZ¹

¹ DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA VEGETAL, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROBIOLÓGICAS DE GALICIA, CSIC, AVDA DE VIGO S/N, 15705 SANTIAGO DE COMPOSTELA.

² GRUPO VIOR (VITICULTURA OLIVO Y ROSA), MISIÓN BIOLÓGICA DE GALICIA, CSIC, CARBALLEIRA 8, SALCEDO 36143 PONTEVEDRA.

conchi@iiag.csic.es

La variedad de rosa antigua denominada Rosa Narcea ha sido descrita recientemente a partir de plantas descubiertas en un jardín privado de Asturias (Martínez et al. 2020). Por su pertenencia al grupo de “rosas antiguas” y su perfil de compuestos volátiles y polifenoles puede ser de interés para la industria del perfume, la cosmética e incluso la farmacología o la alimentación.

El objetivo de este trabajo ha sido establecer un protocolo de micropropagación para la producción a gran escala de esta variedad. Durante las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación se compararon diferentes métodos con el objetivo de combinar una elevada producción con protocolos sencillos y versátiles fácilmente adaptables al sector industrial.

Se utilizaron estaquillas con yemas en crecimiento activo recogidas en primavera. Tras la esterilización superficial con lejía comercial, las yemas se inocularon en medio MS con diferentes concentraciones de 6-benciladenina (BA), según protocolos descritos en Pati et al. (2010). En la fase de multiplicación se estudiaron parámetros como el aporte de BA, el tipo de iluminación, la duración del subcultivo y el sistema de cultivo (medio semisólido y líquido). Los brotes con aspecto saludable y de longitud superior a 20 mm se destinaron a experimentos de enraizamiento inducido con ácido indol-3-butírico (AIB). Durante este proceso se tuvo en cuenta la concentración de BA del medio de multiplicación y se compararon distintos métodos de inducción (concentración de AIB, duración de la exposición a la auxina, fase de oscuridad) y de expresión (*in vitro* en medio sin reguladores de crecimiento solidificado con agar o impregnado en sustratos inertes, *ex vitro* en mezcla de turba:perlita). Las plantas se aclimataron en cajas de plástico en fitotrón antes de pasar a invernadero en macetas, a exterior en macetas y posteriormente a campo.

Los parámetros estudiados durante la fase de proliferación se evaluaron según la capacidad de multiplicación y el tamaño de brotes y hojas, así como del número de brotes válidos para el enraizamiento. Durante el enraizamiento y la aclimatación se determinó el número y longitud de las raíces, la altura de los brotes y el desarrollo de las hojas, así como la supervivencia y el crecimiento de las plantas durante las etapas de fitotrón e invernadero. Los resultados indican que el cultivo *in vitro* es una herramienta útil para la propagación de Rosa Narcea. En este estudio se ha obtenido planta aclimatada, y el siguiente reto consiste en afinar los procedimientos para que sean aplicables a nivel industrial y comprobar que una vez pasadas a campo las plantas mantienen sus características varietales y comienzan a producir rosas en corto periodo de tiempo.

Martínez et al. (2020) Hort. Res 7:44 doi:10.1038/s41438-020-0266-8

Pati et al. (2010). In Vitro Propagation of Rose. En: Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants, Methods in Molecular Biology vol 589. doi 10.1007/978-1-60327-114-1_16

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Xunta de Galicia (proyectos IN607A y Contrato Programa 2019-2020) y se enmarca dentro de las actividades promovidas por la Plataforma Temática Interdisciplinar del CSIC, PTI-ALCINDER".

EFFECTO DE LA ILUMINACIÓN LED SOBRE LA MICROPROPAGACIÓN DE PORTAINJERTOS DE ESPECIES FRUTALES

ELENA GARCÍA, JUAN ANTONIO MARÍN, ARANCHA ARBELOA

POMOLOGÍA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL DE AULA DEI, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, AVENIDA MONTAÑANA 1005, 50059 ZARAGOZA

jmarin@eead.csic.es

La iluminación LED permite ahorrar costes y energía durante el cultivo in vitro, pero también ofrece la oportunidad de estudiar la influencia de las características espectrales de la luz en la micropropagación de las plantas.

Hasta ahora, la iluminación con tubos fluorescentes "cool white" se ha considerado el estándar y, en nuestro caso, los resultados han sido satisfactorios. Con el fin de obtener protocolos de propagación masiva eficientes y prácticos para varios portainjertos de especies frutales, se estudió el efecto de diferentes tipos de iluminación LED. 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 $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Como control se han utilizado tubos fluorescentes "cool white" a la misma intensidad.

Se han utilizado brotes de portainjertos de diferentes géneros: los portainjertos de pistacho *Pistacia atlantica* y UCBI (*Pistacia atlantica x Pistacia integerrima*); el patrón de cerezo 'Masto de Montañana' (*Prunus cerasus*) y el patrón de avellano 'Dundee' (*Corylus colurna*). Los brotes se cultivaron in vitro siguiendo protocolos previamente establecidos en medios de cultivo solidificados con agar Difco-Bacto al 0,7% y subcultivados cada 3 semanas bajo los cuatro tipos de iluminación descritos anteriormente (tratamientos). Los cultivos se iniciaron con veinte ápices de brotes (5 ápices/frasco y 4 frascos/tratamiento) y todos los brotes obtenidos se mantuvieron en cada subcultivo, eliminando únicamente los brotes con ápices necróticos. Al final del subcultivo 3 se registró el número de brotes, el número de brotes con ápices necróticos y el número de brotes ≥ 25 mm (aptos para enraizamiento).

Resultados

UCBI: La luz blanca fría ha aumentado la tasa de multiplicación y ha disminuido la necrosis apical, proporcionando un mayor número de brotes útiles con un elevado porcentaje de enraizamiento.

P. atlantica: Aunque la tasa de multiplicación no ha sido afectada por el tipo de iluminación, la luz blanca fría tuvo un efecto positivo en la longitud de los brotes con una baja necrosis apical, proporcionando mayor número de brotes útiles.

'Masto de Montañana': El tipo de iluminación solo tuvo un efecto significativo en la necrosis apical, siendo el control con tubos fluorescentes "cool white" la iluminación que mostró un efecto menor, por lo que proporcionó un mayor número de brotes útiles.

'Dundee': El tipo de iluminación no tuvo efecto significativo ni en la multiplicación, ni en el alargamiento de los brotes, aunque la tasa de multiplicación fue algo mayor en la luz blanca neutra. No presentó necrosis apical en ningún tratamiento.

Los resultados mostraron que la temperatura de color de los distintos LED blancos influyó en la tasa de multiplicación y en la calidad de los brotes y estos resultados dependieron del genotipo, variando entre las diferentes especies.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA - PID2019-103985RR-I00 y por el Grupo de Investigación de Referencia A12_17R del Gobierno de Aragón

MICROPROPAGATION PROTOCOL FOR ADULT *MYRICA GALE*

ANA COUSO VIANA¹, JUAN LUIS FERNÁNDEZ-LORENZO¹

¹ DEPARTMENT OF CROP PRODUCTION AND ENGINEERING PROJECTS, HIGHER POLYTECHNIC SCHOOL OF ENGINEERING OF LUGO, SANTIAGO DE COMPOSTELA UNIVERSITY, BENIGNO LEDO STR., 27002 LUGO, SPAIN.

ana.couso.viana@usc.es

We have established an efficient protocol for the establishment, multiplication, rooting and acclimation of adult *Myrica gale* using axillary shoots as explant source. Multiple factors were analysed regarding adult *Myrica gale* micropropagation: media formulation (MS, WPM), 6-benzylaminopurine (BAP) concentration (0, 0.44, 0.88, 2.22, 4.44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), medium pH (5.0, 5.3, 5.5, 5.8, 6.1) and light source (fluorescent light 6500 K, white LED 4000 K, white LED 5500 K).

The best results as regards multiplication rate and shoot length were obtained on WPM medium supplemented with 0.88 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BAP, pH adjusted to 5-5.3, under white LED light 4000 K. Explants were easily rooted in 1/3 Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ indole-3-butyric acid (IBA). Rooted shoots were successfully acclimatized in peat: perlite (1:1) substrate, following a two-step acclimatization.

MICROPROPAGATION OF AXILLARY SHOOTS OF *ILEX X KOEHNEANA* 'CHESTNUT LEAF'

ANA COUSO VIANA¹, DAMIAN DASILVA MARTÍNEZ¹, JUAN LUIS FERNÁNDEZ-LORENZO¹

¹ DEPARTMENT OF CROP PRODUCTION AND ENGINEERING PROJECTS, HIGHER POLYTECHNIC SCHOOL OF ENGINEERING OF LUGO, SANTIAGO DE COMPOSTELA UNIVERSITY, BENIGNO LEDO STR., 27002 LUGO, SPAIN.

ana.couso.viana@usc.es

This research develops an efficient protocol for the micropropagation of *Ilex x koehneana* 'Chestnut Leaf'. Different assays for in vitro establishment, multiplication, rooting and acclimatization have been performed. The influence of several factors on multiplication parameters was tested: i) Concentration of 6-benzyl-aminopurine (BAP), alone (0.0, 0.44, 2.22, 4.44, 8.88 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or combined with indole-3-acetic acid (IAA) (4.44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA + 0.06, or 0.6 or 1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA); ii) Light sources (white LED-strips -4000K; 5500K-, red LED-strips, blue LED-strips, red/blue LED-strips, white fluorescent light -4000 K and 6500 K- and white fluorescent-LED light -6500 k-; iii) length of subculture interval (35 d, 45 d). Rooting assays were performed by dipping (1 or 2 min) nodal or apical explants in an indole-3-butyric acid (IBA) solution (5 mM), followed by culture in expression-medium ($\frac{1}{2}$ MS or $\frac{1}{2}$ WPM).

The best results for multiplication were obtained on WPM medium supplemented with 4.44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BA, placing the cultures under 6500 K white fluorescent-LED light. The 45-day interval was the most cost-efficient subculture interval. Regarding rooting, a two-minute dipping of apical explants followed by culture on $\frac{1}{2}$ MS was the best treatment. Rooted microshoots were established in a peat:perlite (1:1) substrate, with a survival percentage of 100% after 4 months.

OPTIMIZACIÓN DE LA FASE DE ENRAIZAMIENTO DE UN CLON DE “GARNEM” (*PRUNUS AMYGDALUS* × *PRUNUS PERSICA*) PARA LA OBTENCIÓN DE PLANTAS ACLIMATADAS DE MAYOR CALIDAD

MARÍA TERESA ÁLVAREZ MARÍN⁽¹⁾, ANA BELÉN SABATER-JARA⁽¹⁾, JOSEFA FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ⁽²⁾

¹ DPTO BIOLOGÍA VEGETAL, FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE MURCIA

² INVISA BIOTECNOLOGÍA VEGETAL SL, CARAVACA DE LA CRUZ, MURCIA, SPAIN

invisa-bio@gmail.com

La formación de raíces adventicias en el periodo inductivo junto con la aclimatación de las plántulas *in vitro* constituye un paso crítico en la micropropagación comercial de especies de *Prunus*. Este proyecto está basado en la mejora de la capacidad de enraizamiento de 'Garnem', un híbrido clonal (*Prunus amygdalus* × *Prunus persica*) resistente a nemátodos. Para ello se utilizaron explantos individualizados del clon “Garnem” que fueron testados previamente por hibridación molecular en Invisa Biotecnología Vegetal S.L. para confirmar que el material estaba libre de virus.

Estos explantos elongados en una fase previa, se cultivaron durante 7 días en medio ½ MS con diferentes concentraciones de auxinas naturales y sintéticas: ANA (0.1, 0.5 mg / L), AIA (1.0, 2.0 mg / L), IBA (1.0, 2.0 mg / L) además del tratamiento control, suplementado con 20 g/L de sacarosa y 20 g/L de floroglucinol. Los vástagos de cada tratamiento hormonal se incubaron en una cámara de cultivo a 25 ± 2 ° C con dos tipos de luz: luz blanca (PAR 79 μmol m⁻² s⁻¹) y una combinación de luz roja y azul (PAR 98 μmol m⁻² s⁻¹) durante diferentes tiempos de exposición: 7 días de luz, 2 días de oscuridad/5 días de luz y 4 días de oscuridad/3 días de luz. Así, tras el periodo inductivo, los resultados más significativos, en cuanto al nº de botones radiculares, se alcanzaron en presencia de ANA 0.5 mg/L y una exposición de 4 días oscuridad /3 días luz obteniendo 4.29 y 5.16 botones radiculares por planta en presencia luz roja-azul y luz blanca, respectivamente. Asimismo, respecto al nº de raíces funcionales tras 21 días de aclimatación, los resultados mostraron que el tratamiento con ANA 0.5 mg/L tras 2 días oscuridad /5 días luz roja-azul permitió desarrollar el mayor nº de raíces, hasta 2.33 raíces por planta. Respecto a la viabilidad de las plántulas se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 21 días de aclimatación, obteniendo el 90% de plántulas en los tratamientos con ANA (0.1mg/L), AIA (1mg/l) e IBA (1mg/L) ; en 2 días oscuridad / 5 días luz blanca , en 7 días luz blanca y 2 días oscuridad / 5 días luz roja-azul, respectivamente.

INFLUENCE OF LIGHT SOURCE AND PGRS ON THE MICROPROPAGATION OF THE ENDANGERED SPECIES *CENTAUREA ULTREIAE* SILVA-PANDO

ANA COUSO VIANA¹, JUAN LUIS FERNÁNDEZ-LORENZO¹, FRANCISCO JAVIER SILVA-PANDO², ANTONIO RIGUEIRO-RODRIGUEZ¹

¹ DEPARTMENT OF CROP PRODUCTION AND ENGINEERING PROJECTS, HIGHER POLYTECHNIC SCHOOL OF ENGINEERING OF LUGO, SANTIAGO DE COMPOSTELA UNIVERSITY, BENIGNO LEDO STR., 27002 LUGO, SPAIN.

² DEPARTMENT OF FOREST ECOSYSTEMS, LOURIZÁN FORESTRY RESEARCH CENTRE, DIRECCIÓN XERAL DE MONTES, XUNTA DE GALICIA, APARTADO 127. 36080 - PONTEVEDRA (ESPAÑA).

ana.couso.viana@usc.es

Centaurea ulreiae is an endangered and endemic plant occupying a small area in NW Galicia (Spain). Leaves of mature plants or seeds were used as explant source for in vitro establishment. Five mature clones (MC) from different sub-populations were successfully established by adventitious shoot formation on leaves in Murashige and Skoog medium (MS) + 0.2 mg·L⁻¹ 6-Benzylaminopurine (BAP). Two other clones were established from seeds germinated in vitro (SC). After several rounds of axillary-shoot multiplication on the same medium, leaves from the in vitro cultures were used for a second set of assays. BAP (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 and 4 mg·L⁻¹); and Thidiazuron (TDZ) (0.1, 0.3, 0.6 and 1.2 mg·L⁻¹) were tested for induction of adventitious shoots.

In BAP treatments, SC revealed more reactive to induction than MC, showing adventitious shoot formation in all concentrations tested, with the highest induction rates in medium with 2 mg·L⁻¹ BAP. In contrast, leaves from adult material (MC) produced more shoots on medium with 0.2 mg·L⁻¹ BAP. TDZ treatments were only performed on leaves from SC, and the highest rate of adventitious-shoot production was on media with 0.3 and 0.6 mg·L⁻¹ TDZ. In a subsequent experiment, cultures were grown under different light sources -Cold white (6500 K) fluorescent light; white LED 4000 K, 5500 K or 6500 K, blue LED, red LED and blue + red LED-, to test their influence on multiplication rate, with no apparent significant differences after the first results. As regards to rooting, the best results are obtained by dipping in indol-butyric acid 2 mg·L⁻¹ for 45 s, resulting in 70% rooting rate overall.

CANNABIS TISSUE CULTURE: WHAT WE KNOW AND HOW TO IMPROVE IT?

VERÓNICA CODESIDO SAMPEDRO¹, JOSÉ LUIS VALENCIA CASTELLANO¹, ANTONIO SANCHO LÓPEZ¹

¹ MIFCO BIOSCIENCES, CARRETERA A-343, KM 0, 29200, ANTEQUERA, SPAIN

v.codesido@mifcobs.com

Rising demand for legal cannabis products is expected to push the global cannabis market up to \$41 billion by 2025, growing at 26% CAGR. This expanding global market favored by the legalization of medical and recreational uses in many countries, involves the necessity of cannabis cultivators to look for more advanced grow methods with the ability to produce high volumes of clones while maintaining genetic continuity and preventing against disease.

The important secondary metabolites that give value to this species (mainly cannabinoids and terpenes) are highly produced on the trichomes of the female flowers. This is the main reason why commercial cultivation of *Cannabis* is dependent on vegetative propagation, generally from mother plants that require considerable production space and do not avoid the risk of infection of these mother plants as well as their subsequent propagules by pests, disease, and viruses. Moreover, there is a limited number of pesticides registered in the *Cannabis* industry, furthermore clean starting material is vital for commercial production. To avoid many of these risks, micropropagation is suggested as an alternative for vegetative propagation. With an effective *in vitro* protocol, many genotypes can be maintained with little risk of pest or disease using significantly less space while providing a consistent supply of clean plants. However, there are not many studies about this technique in the literature mainly for two reasons: no previous legalizations and restrictive laws to use this species and the secrecy of the companies of the sector in order not to reveal their *know how*.

An efficient micropropagation method must be developed to scale up the production and to be an important supply chain component essential for the success and future growth of cannabis industry. *De novo* introduction of a new species on *in vitro* culture is always complicated, moreover the lack of information and the recalcitrancy of *Cannabis* make difficult the development of this technique. The formulation of new growing media, new rooting and hardening systems, as well as the scale up of these techniques are completely mandatory. Moreover, the study of the light supplementation: quantity and quality of this light (eg. different spectrum) during the different tissue culture steps could greatly improve the success of the technique.

In addition, biotechnological tools as *in vitro* techniques, are the fastest way to introduce new cultivars, to promote the conservation of germplasm in safe conditions and to provide greater facilities for the international exchange of plant material.

As conclusion, to supply cannabis (medical and recreational) to global consumers, a stable supply chain of quality production and value-added product development still needs to be established.

DESCRIPCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA ILUMINACIÓN LED PARA SU UTILIZACIÓN EN EL CULTIVO *IN VITRO* DE PLANTAS

ALFONSO GAGO CALDERÓN¹, MARTA BARCELÓ MUÑOZ², ARACELI BARCELÓ MUÑOZ²

¹ DPTO. EXPRESIÓN GRÁFICA, DISEÑO Y PROYECTOS, ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, C/ DR. ORTIZ RAMOS S/N C.P. 29.071 - MÁLAGA (SPAIN).

² LAB. CULTIVO DE TEJIDOS Y BIOTECNOLOGÍA. IFAPA CENTRO DE MÁLAGA, CORTIJO DE CRUZ S/N 29140 MÁLAGA, ESPAÑA

agago@uma.es

Los sistemas basados en tubos fluorescentes de tipo Grolux tienen una capacidad de configuración muy escasa aparte de la mera selección del número de lámparas, su potencia eléctrica y la distancia de separación con las plantas para conseguir los niveles de radiación que se desean obtener. Contrariamente, las lámparas y luminarias LEDs, ofrecen un amplio abanico de parámetros que deben ser caracterizados para poder homogeneizar, estandarizar y contextualizar adecuadamente los experimentos y procesos desarrollados en estas instalaciones.

En este trabajo se describen y analizan los parámetros de diseño más relevantes a tener en cuenta en instalaciones de iluminación artificial LED para su uso en cultivo *in vitro* de plantas:

- Cantidad de energía radiada incidente en las plantas.
- Caracterización del espectro de emisión generado.
- Identificación de emisión lumínica de flujo constante o pulsante.
- Uniformidad de las condiciones de radiación en las superficies de trabajo.
- Calor generado por el equipo de iluminación, en el ambiente de cultivo.



Conferencia

EL SALTO DE LA ILUMINACIÓN FLUORESCENTE A LA FLEXIBILIDAD DE LA TECNOLOGÍA LED

ALFONSO GAGO CALDERÓN¹

¹ DPTO. EXPRESIÓN GRÁFICA, DISEÑO Y PROYECTOS, ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES, UNIVERSIDAD DE MÁLAGA, C/ DR. ORTIZ RAMOS S/N C.P. 29.071 - MÁLAGA (SPAIN).

La luz tanto en cantidad como en calidad está involucrada en múltiples procesos de las plantas como la fotosíntesis, la fotomorfogénesis o el fototropismo. Por este motivo, las lámparas fluorescentes han sido una herramienta fundamental en las diversas ramas del cultivo de plantas en general y, en particular, en el cultivo *in vitro*. En la actualidad estas fuentes de luz están siendo sustituidas por otras basadas en tecnología LED.

Los motivos de esta transición tecnológica son múltiples. Los que más se mencionan tanto por la literatura científica como por la documentación técnica de fabricantes de equipos para esta aplicación son, recurrentemente, su elevada durabilidad, una mayor eficiencia energética que el resto de tecnologías y una baja generación térmica. Pero junto a éstas, otro aspecto diferencial fundamental es que, frente a la rigidez de los sistemas que se pueden montar con lámparas fluorescentes, donde escasamente se pueden establecer la distancia de los tubos con las lámparas y escoger entre unas pocas configuraciones de emisión (siendo la más extendida la patentada Gro-lux), las lámparas LED permiten una flexibilidad enorme de configuración en muchos parámetros luminotécnicos, ofreciendo ventajas muy significativas de cara a la optimización para cada proceso.

Con la tecnología LED, se tiene la capacidad de seleccionar, con una precisión muy elevada, frecuencias de emisión monocromáticas, combinaciones de éstas o emisiones de espectro continuo para optimizar los procesos fotobiológicos de cada especie concreta de planta. Además, las emisiones se pueden reconducir espacialmente con lentes sencillas para concentrarlas en las superficies de trabajo minimizando pérdidas energéticas, maximizando la uniformidad de la llegada de fotones a toda la superficie de trabajo o incluso eliminando la contaminación lumínica entre diferentes puestos de cultivo; aquí el comportamiento de los LEDs está en el extremo opuesto al de las emisiones omnidireccionales de los tubos fluorescentes. Igualmente, frente a las fluctuaciones existentes de los fluorescentes generadas por la alternancia de la electricidad de la red, la naturaleza electrónica de estos nuevos emisores facilita la capacidad de configurar diferentes niveles de densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) tanto continuos y constantes, como pulsantes con frecuencia e intensidad variables, con mucha precisión y de manera sencilla.

De este modo, se detallará en profundidad cada uno de estos aspectos significativos de diseño para una instalación que integre luminarias LED, desde las más generales y comunes para todos los casos hasta las más específicas con las que se trabaja en la actualidad, y se analizará como distintos fabricantes de estos equipos presentan, dentro de este amplio rango de posibilidades, las especificaciones concretas de sus productos y cómo podemos comparar entre ellos para seleccionar el equipo más adecuada para cada propósito o instalación particular.



SESIÓN IV

Empresa



Ramiro  Arnedo
semillas

75 años dedicados a la venta,
producción y mejora de
semillas de especies hortícolas
mediterráneas.

A tu lado, con los pies en la
tierra.

www.ramiroarnedo.com



Organiza:



web: secivtv2021.es