



# SECIVTV 2023

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

6, 7 Y 8 DE SEPTIEMBRE  
DE 2023 - LLEIDA

**SEDE**

Auditorio CCCT – Campus Cappont  
Universitat de Lleida  
C/ Jaume II, 67 25001 Lleida

**SECRETARÍA TÉCNICA**

Fundació Universitat de Lleida  
Campus Cappont  
C/ Jaume II, 67 25001 Lleida  
973 00 35 57  
fundacio@udl.cat



Universitat de Lleida

**IRTA**<sup>®</sup>



SECIVTV

[secivtv2023lleida.es](http://secivtv2023lleida.es)

© Edicions i Publicacions de la Universitat de Lleida, 2023  
© XV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de  
Tejidos Vegetales SECIVTV 2023  
© del texto: autores de cada contribución  
© de imágenes, tablas y figuras: autores de cada contribución

Editores: Ramon Dolcet-Sanjuan y Ana M. Pelacho

ISBN 978-84-9144-454-1

LIBRO DE RESÚMENES

# SECIVTV 2023

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

6, 7 Y 8 DE SEPTIEMBRE  
DE 2023 - LLEIDA



IRTA<sup>®</sup>





## CONTENIDO

Presentación .....	13
Comité organizador y comité científico .....	14
Programa resumido .....	15
Programa completo.....	16
Resúmenes .....	25
<b>Conferencia Plenaria Inaugural</b>	
<b>From single transgenes to pathway engineering and genome editing: A personal account of plant tissue culture and genetic engineering from 1980 to 2023 and beyond.</b> <i>Paul Christou</i> .....	26
<b>Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática</b>	
<b>Presentaciones orales de pósteres</b>	
<b>Application of in vitro culture to plant regeneration in natural areas.</b> <i>Carlos Sobrino Alonso, Lucía Saborido Sónora, David García Romero, Conchi Sánchez Fernández, Anxela Aldrey Villar, Bruce Christie, Nieves Vidal González</i> .....	28
<b>Development of methods for the micropropagation of tropical agricultural crops and trees.</b> <i>Jaime Morante Carriel, Nicolás Cruz Rosero, Mercedes Carranza Patiño, Roque Bru Martínez</i> .....	30
<b>Transcriptomic analysis of auxin and paclobutrazol treatments during the induction of adventitious roots in chestnut.</b> <i>Ricardo Castro-Camba, Conchi Sánchez Fernández, Saleta Rico Santos, Nieves Vidal González, Purificación Covelo Abeleira, M<sup>a</sup> José Cernadas Cernadas, Anxela Aldrey Villar, Jesús M. Vielba Villegas</i> .....	32
<b>Cannabis sativa: ¿Micropropagamos?</b> <i>Nicolás García-Caparrós, Antonio Romero Arjona, Verónica Codesido Sampedro</i> .....	34
<b>In vitro protocols development of Cannabis sativa L. for germplasm preservation and maintenance.</b> <i>Jordi Petit Pedró, Piotr Marcin Bilski, Elena Del Blanco Rodríguez, Jason Argyris, Amparo Monfort</i> .....	36
<b>Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación in vitro del portainjertos Garnem.</b> <i>José Ángel Medina Espallardo, Josefa Fernández Fernández, Alejandro Galindo Egea</i> .....	38
<b>Cultivo de tejidos: alternativa para la producción de planta forestal élite en el presente contexto de estrés biótico y abiótico.</b> <i>Alejandra Rojas-Vargas, Paloma Moncaleán, Itziar A. Montalbán</i> .....	40

**Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática****Presentaciones orales de pósteres**

- La embriogénesis somática como herramienta biotecnológica en la obtención de plantas a partir de quimeras periclinales con diferentes perfiles genotípicos.** Yolanda Ferradás, Carolina Royo, Pablo Carbone-Il-Bejerano, Elisa Baroja, Manuel Rey, José Miguel Martínez-Zapater..... 42
- Optimización de la embriogénesis somática de pino radiata y primeros avances hacia su escalado en biorreactores.** Ander Castander-Olarieta, Kim-Cuong Le, Sofie Johansson, Ulrika Egertsdotter, Paloma Moncaleán, Itziar A. Montalbán..... 44
- Effects of long-term cultured *Pinus radiata* on maturation ability and plant conversion: Using FT-IR spectroscopy to determine biomarkers of embryogenic tissue aging.** Yenny Lineros, Macarena Rojas-Rioseco, Martha Hernández de la Torre, Darcy Ríos Leal, Ximena Muñoz, Rodrigo Hasbún..... 46
- La aplicación de diferentes temperaturas durante la fase de maduración de embriones somáticos de pino marítimo (*Pinus pinaster*) induce cambios transcriptómicos y plantas mejor adaptadas al calor.** María Amparo Pérez-Oliver, Javier Montero-Pau, Alex Alborch, Miguel Ángel Sánchez, Isabel Arrillaga, Ester Sales..... 48
- Efecto de la aplicación de ABA exógeno sobre la expresión de genes del metabolismo de ABA y poliaminas en embriones somáticos de vid 'Mencia' sometidos a estrés osmótico.** Óscar Martínez, Manuel Rey, M<sup>a</sup> Victoria González..... 50
- Aplicación de luces LED en el cultivo in vitro del alcornoque.** Inmaculada Hernández, Carolina Kremer, Eva Friero, María Contreras, Celina Villarreal, María de la Cruz Amorós, Mar Ruíz-Galea ..... 52
- Efecto de la adaptación de las cámaras de cultivo in vitro a la iluminación LED, sobre las condiciones ambientales y microambientales de temperatura y humedad de los cultivos.** Alfonso Gago-Calderón, José R. Andres-Díaz, Marta Barceló Muñoz, Araceli Barceló Muñoz..... 54
- Protocolo para la propagación in vitro de ejemplares saneados de *Cynara scolymus* cv. "Blanca de Tudela".** Josefa Fernández Fernández ..... 56
- Desarrollo de protocolos in vitro para la obtención de plantas de *Vitis vinífera* libres de virus.** Ander Castander-Olarieta, Ana Herrán, Itziar A. Montalbán, Alexey Pestryakov, Nina Bogdanchikova, Miguel Barbarin, Carlos Lucea, Paloma Moncaleán..... 58
- Combinación de tratamientos para la eliminación de patógenos en plantas de albaricoquero micropropagadas.** Cristian Pérez-Caselles, Elena Yelo, Lorenzo Burgos, Marina Martín-Valmaseda, Nuria Alburquerque..... 60
- Olivos tetraploides: una nueva estrategia en la mejora.** Laia Ribalta Campos, José Ángel Mercado Carmona, Fernando Pliego-Alfaro, Elena Palomo-Ríos..... 62

<b>Caracterización de variantes somaclonales de olivo obtenidos tras la exposición al filtrado crudo del hongo <i>Rosellinia necatrix</i>.</b> Clara Pliego, Isabel Narváez, Ana Moreno-Pérez, José Ángel Mercado, Fernando Pliego-Alfaro, Elena Palomo-Ríos.....	64
<b>Análisis funcional de genes relacionados con mecanismos de tolerancia a <i>Phytophthora cinnamomi</i> en alcornoque.</b> Laura López Candales, Saleta Rico Santos, Beatriz Cuenca Valera, Jesús M. Vielba Villegas, Nieves Vidal González, M <sup>a</sup> José Cernadas Cernadas, Purificación Covelo Abeleira, Conchi Sánchez Fernández.....	66
<b>Conferencia Plenaria</b>	
<b>Efecto de la temperatura durante la embriogénesis somática en el establecimiento de una memoria epigenética a largo plazo en <i>Picea abies</i>.</b> Marcos Viejo .....	68
<b>Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones</b>	
<b>Ponencias orales</b>	
<b>Doubled haploids, a game changer in potato breeding.</b> Nuria Alegret-Badia .....	70
<b>In vitro Prunus spp. immature embryo rescue: protocol, cost reduction, and efficiency improvements.</b> María Casanovas.....	72
<b>Presentaciones orales de pósteres</b>	
<b>Primeros pasos en el desarrollo de un protocolo de dobles haploides en calabacín (<i>Cucurbita pepo</i>): determinación del desarrollo de las microsporas con respecto a la morfología floral.</b> Ana García-Pérez, Malén Escáñez García, Edgar García Fortea.....	74
<b>Opposite auxin dynamics determine the gametophytic and embryogenic fates of the microspore.</b> Yolanda Pérez Pérez, María Teresa Solís, Alfonso Albacete, Pilar S. Testillano.....	76
<b>Aplicación de una estrategia de “priming” en semillas para aumentar la eficiencia de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero.</b> Ana María Castillo Alonso, Begoña Echávarri Razquín, Aimar Navarro Arguedas, Patricia Fustero Abad, Asunción Costar Castán, María Pilar Vallés Braú.....	78
<b>Novel small molecule antioxidants improve stress-induced cell reprogramming while decrease autophagy and cell death in rapeseed: a physiology and transcriptomics study.</b> Cristina Rueda-Varela, Elena Carneros, Yolanda Pérez-Pérez, Elena Caro, Carmen Gil, Ana Martínez, Pilar S. Testillano .....	80
<b>Obtención de líneas doble haploides para la producción de líneas comerciales.</b> Mariona Jordana García, Laura Martínez Plantón .....	82
<b>Comparative transcriptome analyses of microspore reprogramming to embryogenesis in <i>Brassica napus</i> L.</b> Elena Carneros, Natalia García-Sánchez, Cristina Rueda-Varela, Yolanda Pérez-Pérez, Elena Caro, Pilar S. Testillano .....	84

<b>Análisis de RNA-seq durante la inducción de la embriogénesis de la microspora y la primera etapa del desarrollo embriogénico en trigo panadero.</b> <i>Isabel Valero-Rubira, Sergio Gálvez, Ana María Castillo, Begoña Echávarri, Patricia Fustero, Asunción Costar, Pilar Hernández, María Pilar Vallés.....</i>	86
<b>Utilización del rescate y cultivo de embriones in vitro para la obtención de híbridos poliploides que permitan estudiar el modelo de segregación cromosómica de parentales tetraploides utilizados en programas de mejora genética de cítricos.</b> <i>Ana Cristina Benedict, Andrés Garcia Lor, Pablo Aleza .....</i>	88
<b>Herramientas para la Automatización de Procesos en los Cultivos In Vitro</b>	
<b>Ponencias orales</b>	
<b>GreenTray®, a new TIS bioreactor for micropropagation and in vitro biotic and abiotic assays.</b> <i>Ramon Dolcet-Sanjuan .....</i>	90
<b>Fitobot: Un nuevo sistema para el fenotipado masivo vegetal de precisión.</b> <i>Ana García-Pérez .....</i>	92
<b>Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión</b>	
<b>Ponencia oral</b>	
<b>Generation of plant cell cultures for their industrial application.</b> <i>Tarik Ruiz Medina .....</i>	94
<b>Presentaciones orales de pósteres</b>	
<b>Machine learning tools unveil the potential of <i>Bryophyllum</i> spp. as an in vitro biofactory of polyphenols.</b> <i>Eva Lozano-Milo, Pedro Pablo Gallego, Pascual García-Pérez.....</i>	96
<b>La metabolómica no dirigida como técnica para determinar el efecto del medio de cultivo in vitro sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos.</b> <i>Tomás A. Arteta, Pascual García-Pérez, Leilei Zhang, Luigi Lucini, Pedro P. Gallego, M. Esther Barreal.....</i>	98
<b>Análisis del metabolismo redox en cultivos celulares de vid elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo.</b> <i>Eduardo Gómez-Copoví, Ana Belén Sabater-Jara, Lorena Almagro, María Ángeles Pedreño.....</i>	100
<b>Aplicación de la ingeniería metabólica para potenciar la producción biotecnológica de paclitaxel en cultivos celulares de <i>Taxus baccata</i>.</b> <i>Edgar Perez-Matas, Diego Hidalgo, Miguel Angel Alcalde, Mercedes Bonfill, Javier Palazon .....</i>	102
<b>Insights into Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase (PPCK) role in stilbene production in grapevine (<i>Vitis vinifera</i>) cell cultures through gain and loss of function.</b> <i>Elías Hurtado Gaitán, Jaime Morante Carriel, Ascensión Martínez Marquez, María José Martínez Estesó, Susana Sellés Marchart, Antonio Samper Herrero, Roque Bru Martínez.....</i>	104



<b>Ingeniería metabólica de triterpenos en raíces transformadas de <i>Centella asiática</i> mediante la sobreexpresión de escualeno sintasa y el factor de transcripción (TSAR2).</b> Miguel Angel Alcalde, Edgar Perez-Matas, Javier Palazon, Mercedes Bonfill, Diego Hidalgo.....	106
<b>Evaluating in vitro conditions for selecting melon germplasm with tolerance to drought and salt stresses.</b> Miguel Ezquerro, Sara Mares, María-Luisa Gómez-Guillamón, Belén Icó, Ana María Pérez De Castro, Carmi-na Gisbert .....	108
<b>Tolerant epitypes of elicited holm oak somatic embryos are revealed by challenge in dual culture with <i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands.</b> María del Mar Ruiz-Galea, Carolina Kremer Morales, Eva Frierio Molano, Inmaculada Hernández.....	110
<b>Últimos avances en métodos alternativos de conservación durante el proceso de embriogénesis somática en <i>pino radiata</i>.</b> Itziar A. Montalbán, Ander Castander-Olarieta, Paloma Moncaleán.....	112
<b>Physiological responses of <i>Ocimum basilicum</i> callus culture to titanium dioxide nanoparticles: insights into growth, antioxidant activity, and stress tolerance.</b> Sanaz Feizi, Morteza Kosari-Nasab, Mojtaba Amini, Ali Movafeghi, Pedro Pablo Gallego, M. Esther Barreal.....	114
<b>Obtención de híbridos de mandarino mediante fusión de protoplastos.</b> Laura Prósper, Andrés García Lor, María Hernández, Pablo Aleza.....	116
<b>Conferencia Plenaria</b>	
<b>Plant cells for cosmetics and food applications.</b> Amir Akhgari.....	118
<b>Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes</b>	
<b>Ponencia oral</b>	
<b>Genome editing to develop resistance of Spanish Bomba rice to blast disease. Ponencia oral.</b> Andrea Saba Mayoral .....	120
<b>Presentaciones orales de pósteres</b>	
<b>Activation of the native PHYTOENE SYNTHASE 1 promoter by modifying near-miss cis acting elements induces carotenoid biosynthesis in embryogenic rice callus.</b> Guillermo Sobrino-Mengual, Dery Alvarez, Richard M. Twyman, Christopher Gerrish, Paul D. Fraser, Teresa Capell, Paul Christou.....	122
<b>Understanding and improving starch biosynthesis in rice using CRISPR/Cas9 genome editing of Waxy/GBSSI.</b> Erika Soto Chavarro, Lucía Pérez Alvarez, Gemma Farré, Ludovic Bassie, Gemma Villorbina Noguera, Teresa Capell Capell, Paul Christou .....	124
<b>Edición genética mediante CRISPR/Cas9 de embriones somáticos de castaño.</b> M <sup>a</sup> Teresa Martínez, Vera Pavese, Andrea Moglia, Pablo Piñeiro, Daniela Torello Marinoni, Roberto Botta, Elena Corredoira .....	126

<b>Knocking out strigolactone biosynthetic genes in maize and its impact on metabolism and phenotype.</b> <i>Xin Huang, Andreas Schiermeyer, Teresa Capell, Stefan Schillerg, Paul Christou</i> .....	128
<b>Plantas de tomate editadas en un gen implicado en la síntesis de melatonina mediante CRISPR-Cas9.</b> <i>Daniel Luna, Sara E. Martínez-Lorente, Rosa M. Rivero, Nuria Alburquesque</i> .....	130
<b>Transcriptional regulation of particular MEP and MVA pathway genes in rice seed.</b> <i>Xin Huang, Teresa Capell, Paul Christou</i> .....	132
<b>Functional expression of two major nitrogenase components in transgenic rice.</b> <i>Wenshu He, Can Baysal, Stefan Burén, Xi Jiang, Teresa Capell, Luis Rubio, Paul Christou</i> .....	134
<b>Expression of algal limiting CO2 inducible protein B (LCIB) in rice enhances photosynthetic efficiency and productivity.</b> <i>Ashwin Vargheese, Wenshu He, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou</i> ...	136
<b>Micropropagación y transformación genética de la planta carnívora <i>Byblis liniflora</i> Salisb., la planta arcoíris.</b> <i>Alberto Coronado, Marybel Jáquez, Constanza Martín-Vásquez, Abdellatif Bahaji, Vicente Moreno, Alejandro Atarés</i> .....	138
<b>Desarrollo de un protocolo para la regeneración y transformación genética de brócoli (<i>Brassica oleracea var. italica</i>).</b> <i>Alberto Coronado, Carmina Gisbert, Rosa Porcel, Lynne Yenush, JM Mulet</i> .....	140
<b>Caracterización fenotípica y genética de un mutante de tomate afectado en la coloración de sus hojas.</b> <i>Alberto Aguiar, Marybel Jáquez, Benito Pineda, Fernando J. Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno, Alejandro Atarés</i> .....	142
<b>Eliminación de virus en plantas de albaricoquero micropropagadas mediante tratamiento con nanopartículas de plata.</b> <i>Marina Martín-Valmaseda, Cristian Pérez-Caselles, Lorenzo Burgos, Nuria Alburquerque</i> .....	144
<b>Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa</b>	
<b>Ponencias orales</b>	
<b>Biotechnología vegetal aplicada a la mejora genética en especies hortícolas dentro de una empresa de semillas.</b> <i>José Luís Couselo</i> .....	146
<b>Agromillora, la micropropagación 'is in our nature'.</b> <i>Silvia Valladares</i> .....	148
<b>Pósteres. Sesión Temática I Micropropagación y Embriogénesis Somática</b>	
<b>Control de la estabilidad genética en <i>Mentha aquatica</i> conservada in vitro: efecto del medio de cultivo y la iluminación.</b> <i>Carmen Martín, Miguel Ibáñez, M. Elena González-Benito</i> .....	150
<b>Analysis of global H3K9 methylation and H4 acetylation dynamics during somatic embryogenesis in cork oak.</b> <i>Natalia Elena Expósito de la Paz, Carneros, Pilar S. Testillano</i> .....	152

<b>Micropropagación de encinas seleccionadas por su tolerancia a <i>Phytophthora cinnamomi</i>.</b> M <sup>a</sup> Teresa Martínez, Fátima Mosteiro, Beatriz Cuenca, Sol Campañó, Felipe Pérez, Elena Corredoira.....	154
<b>Micropropagación de material juvenil de argán.</b> Pablo Piñeiro, Fátima Mosteiro, Sol Campañó, Elena Corredoira, M <sup>a</sup> Teresa Martínez.....	156
<b>Optimización del medio basal para la micropropagación del cannabis medicinal (<i>Cannabis sativa</i> L.).</b> José Garrido Gala, Carlos Ferreiro-Vera, Juan José Martínez-Quesada .....	158
<b>Desarrollo de un protocolo de multiplicación para nuevos materiales de pitahaya.</b> Magdalena Escánez García, Ana García Pérez, Edgar García Fortea.....	160
<b>Establishment and use of a <i>Vitis</i> germplasm collection of in vitro plants.</b> Carmina Gisbert, Sara Mares, Antonio Olmos, Rosa Peiró.....	162
<b>Cultivo tisular verde de Cannabis: salto hacia el orgánico.</b> Antonio Romero Arjona, Nicolás García-Caparrós, Verónica Codesido Sampedro.....	164
<b>Towards tomato drought improvement by colchicine-mediated generation of polyploids.</b> Pedro Cerdá-Bennasser, Jeroni Galmés, Miquel Àngel Conesa .....	166
<b>Uso del activador de nanovibraciones, o generador de nanopartículas, NeuG7 en bioreactores GreenTray® para la micropropagación de arándano variedad Biloxi (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.).</b> Carlos R. Mendoza, Mayra L. Orellana, Shushi Nomura, Ramon Dolcet-Sanjuan, Omara Terrones	168
<b>Pósteres. Sesión Temática IV. Modificación Genética y Tecnologías Emergentes</b>	
<b>Identificación de mutantes de tomate afectados en respuesta necrótica.</b> Marybel Jáquez-Gutierrez, Alberto Aguiar, Constanza Martín-Vásquez, Benito Pineda, Fernando J. Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno, Alejandro Atarés .....	170
<b>Recapitulación del mutante Arlequín sin secuencias de DNA foráneo mediante edición CRISPR y posterior segregación del vector molecular.</b> Benito Pineda, Begoña García-Sogo, José Luis Contreras, Ignacio Moreno, Alejandro Atarés, Abraham S. Quevedo-Colmena, Fernando Juan Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno.....	172
<b>Stable expression of SARS-CoV-2 Spike and Receptor-Binding Domain proteins in Bomba rice.</b> Andrea Saba-Mayoral, Guillermo Sobrino-Mengual, Ludovic Bassie, Paul Christou, Teresa Capell.....	174
<b>Engineering an <i>E. coli</i> glycolate catabolic pathway into rice to enhance photosynthetic efficiency and productivity.</b> Ashwin Vargheese, Wenshu He, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou .....	176
<b>Engineering a novel ectopic oxygen scavenging pathway into rice chloroplasts en route to enhance photosynthetic efficiency.</b> Wenshu He, Ashwin Vargheese, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou.....	178



## PRESENTACIÓN

La **Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales (SECIVTV)** tiene el placer de invitar a participar a los miembros de la Sociedad, y a todos aquellos interesados en esta temática, a su XV Reunión, a celebrar del 6 al 8 de septiembre de 2023 en Lleida, organizada conjuntamente en esta edición por la Universidad de Lleida (UdL) y el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA).

El objetivo de la **XV Reunión de la SECIVTV** es constituir un entorno dinámico de encuentro interactivo en el que dar a conocer y compartir los avances en las áreas en que participa el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. La reunión constará de Conferencias Plenarias, Sesiones Orales, Presentaciones de Posters, y foros de discusión en las temáticas propias del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales: micropropagación, saneamiento, embriogénesis somática, rescate de embriones, obtención de doble-haploides, transformación y edición genética, cultivo de órganos y células en suspensión, etc., incluyendo la participación activa de investigadores consolidados, de jóvenes investigadores de instituciones públicas y privadas, y de las empresas del sector. La reunión tiene su centro en el lema "**Plantas *In Vitro* para un Mundo Mejor**".

Como Comité Organizador, en nombre de la SECIVTV, animamos y agradecemos la participación activa de todos los asistentes; todas las aportaciones contribuirán a construir el entorno que promueva el progreso el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en el marco científico, empresarial y también social. Esperamos recibiros. **Bienvenidos a la XV Reunión de la SECIVTV.**

**El Comité Organizador**

## COMITÉ ORGANIZADOR

**Ana M. Pelacho** (Universitat de Lleida), Presidenta

**Ramon Dolcet-Sanjuan** (IRTA Fruitcentre)

**Lluís Martín-Closas** (Universitat de Lleida)

**Gemma Puigarnau** (Universitat de Lleida)

**Manuel Rey** (Universidade de Vigo)

**Erika Soto** (Universitat de Lleida)

## COMITÉ CIENTÍFICO

**Alejandro Atarés Huerta** (Universitat Politècnica de Valencia – Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas)

**Jorge Canhoto** (Universidade de Coimbra. Coimbra, Portugal)

**Ana Castillo Alonso** (Estación Experimental de Aula Dei, CSIC Zaragoza)

**Elena Corredoira Castro** (Misión Biológica de Galicia, CSIC Santiago de Compostela)

**Carmen Martín Fernández** (Universidad Politécnica de Madrid)

**Javier Palazón Barandela** (Universitat de Barcelona)

**Ana M. Pelacho** (Universitat de Lleida)

**Manuel Rey** (Universidade de Vigo)

## PROGRAMA RESUMIDO

**MIÉRCOLES, 6 DE SEPTIEMBRE DE 2023**

A partir de las 12.00	<b>Apertura de la sede del Congreso</b>
15.30 – 16.00	<b>Inauguración y Bienvenida</b>
16.00 – 17.00	<b>Conferencia Plenaria Inaugural</b>
17.00 – 17.40	<b>Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática. Presentación y Discusión de Pósteres</b>
17.40 – 18.30	<b>Pausa café y visita pósteres</b>
18.30 – 20.00	<b>Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática. Presentación y Discusión de Pósteres (cont.)</b>
20.00 – 21.00	<b>Cóctel de Bienvenida</b>

**JUEVES, 7 DE SEPTIEMBRE DE 2023**

9.00 – 10.00	<b>Conferencia Plenaria</b>
10.00 – 10.45	<b>Pausa café y visita Pósteres</b>
10.45 – 11.45	<b>Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones. Ponencias orales</b>
11.45 – 12.30	<b>Sesión Temática II - Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones. Presentación y Discusión de Pósteres</b>
12.30 – 13.30	<b>Herramientas para la Automatización de Procesos en los Cultivos In Vitro</b>
13.30 – 15.00	<b>Comida</b>
15.00 – 15.30	<b>Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión. Ponencias orales</b>
15.30 – 16.30	<b>Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión. Presentación y Discusión de Pósteres</b>
16.30 – 17.00	<b>Pausa café y visita pósteres</b>
17.00 – 18.00	<b>Asamblea Ordinaria SECIVTV</b>
18.00 – 18.30	<b>Asamblea Extraordinaria SECIVTV – Elección de nueva Junta Directiva</b>
18.30	<b>Salida desde la sede de la reunión hacia la Seu Vella</b>
19.30 – 20.30	<b>Visita Guiada Seu Vella</b>
21.00	<b>Cena del Congreso (Restaurante "La Masia" – C/ Democràcia, 16, Lleida)</b>

**VIERNES, 8 DE SEPTIEMBRE DE 2023**

9.00 – 10.00	<b>Conferencia Plenaria</b>
10.00 – 10.30	<b>Pausa café y visita pósteres</b>
10.30 – 10.50	<b>Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes. Ponencias orales</b>
10.50 – 12.00	<b>Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes. Presentación y Discusión de Pósteres</b>
12.00 – 13.00	<b>Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa. Ponencias orales</b>
13.00 – 14.00	<b>Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa. Mesa Redonda Cultivos In Vitro en la Empresa - Retos y oportunidades</b>
14.00 – 14.15	<b>Clausura</b>
14.15	<b>Cóctel de despedida</b>

## PROGRAMA COMPLETO

### MIÉRCOLES, 6 DE SEPTIEMBRE DE 2023

---

**A partir de las 12.00** Apertura de la sede del Congreso, recepción de asistentes, entrega de credenciales y documentación, instalación de pósteres

**15.30 – 16.00** **Inauguración y Bienvenida**

**16.00 – 17.00** **Conferencia Plenaria Inaugural**

From single transgenes to pathway engineering and genome editing: A personal account of plant tissue culture and genetic engineering from 1980 to 2023 and beyond

*Paul Christou (Universidad de Lleida – Agrotecnio – CERCA)*

**17.00 – 17.40** **Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática.** Moderan: Elena Corredoira y Vanesa Cano

#### **Presentación y Discusión de Pósteres**

**I.1 - Application of in vitro culture to plant regeneration in natural areas** (*Carlos Sobrino Alonso, Lucía Saborido Sónora, David García Romero, Conchi Sánchez Fernández, Anxela Aldrey Villar, Bruce Christie, Nieves Vidal González*)

**I.2 - Development of methods for the micropropagation of tropical agricultural crops and trees** (*Jaime Morante Carriel, Nicolás Cruz Rosero, Mercedes Carranza Patiño, Roque Bru Martínez*)

**I.3 - Transcriptomic analysis of auxin and paclobutrazol treatments during the induction of adventitious roots in chestnut** (*Ricardo Castro-Camba, Conchi Sánchez Fernández, Saleta Rico Santos, Nieves Vidal González, Purificación Covelo Abeleira, M<sup>a</sup> José Cernadas Cernadas, Anxela Aldrey Villar, Jesús M. Vielba Villegas*)

**I.4 - Cannabis sativa: ¿Micropropagamos?** (*Nicolás García-Caparrós, Antonio Romero Arjona, Verónica Codesido Sampedro*)

**I.5 - In vitro protocols development of Cannabis sativa L. for germplasm preservation and maintenance** (*Jordi Petit Pedró, Piotr Marcin Bilski, Elena Del Blanco Rodríguez, Jason Argyris, Amparo Monfort*)

**I.6 - Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación in vitro del portainjertos Garnem.** (*José Ángel Medina Espallardo, Josefa Fernández Fernández, Alejandro Galindo Egea*)

**I.7 - Cultivo de tejidos: alternativa para la producción de planta forestal élite en el presente contexto de estrés biótico y abiótico** (*Alejandra Rojas-Vargas, Paloma Moncaleán, Itziar A. Montalbán*)



17.40 – 18.30

**Pausa café y visita pósteres**

18.30 – 20.00

**Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática.** Moderan: Elena Corredoira y Vanesa Cano

**Presentación y Discusión de Pósteres (cont.)**

**I.8 - La embriogénesis somática como herramienta biotecnológica en la obtención de plantas a partir de quimeras periclinales con diferentes perfiles genotípicos** (Yolanda Ferradás, Carolina Royo, Pablo Carbonell-Bejerano, Elisa Baroja, Manuel Rey, José Miguel Martínez-Zapater)

**I.9 - Optimización de la embriogénesis somática de pino radiata y primeros avances hacia su escalado en biorreactores** (Ander Castander-Olarieta, Kim-Cuong Le, Sofie Johansson, Ulrika Egertsdotter, Paloma Moncaleán, Itziar A. Montalbán)

**I.10 - Effects of long-term cultured *Pinus radiata* on maturation ability and plant conversion: Using FT-IR spectroscopy to determine biomarkers of embryogenic tissue aging** (Yenny Lineros, Macarena Rojas-Rioseco, Martha Hernández de la Torre, Darcy Ríos Leal, Ximena Muñoz, Rodrigo Hasbún)

**I.11 - La aplicación de diferentes temperaturas durante la fase de maduración de embriones somáticos de pino marítimo (*Pinus pinaster*) induce cambios transcripómicos y plantas mejor adaptadas al calor** (María Amparo Pérez-Oliver, Javier Montero-Pau, Alex Alborch, Miguel Ángel Sánchez, Isabel Arrillaga, Ester Sales)

**I.12 - Efecto de la aplicación de ABA exógeno sobre la expresión de genes del metabolismo de ABA y poliaminas en embriones somáticos de vid 'Mencía' sometidos a estrés osmótico** (Óscar Martínez, Manuel Rey, M<sup>a</sup> Victoria González)

**I.13 - Aplicación de luces LED en el cultivo in vitro del alcornoque** (Inmaculada Hernández, Carolina Kremer, Eva Frierio, María Contreras, Celina Villarreal, María de la Cruz Amorós, Mar Ruíz-Galea)

**I.14 - Efecto de la adaptación de las cámaras de cultivo in vitro a la iluminación LED, sobre las condiciones ambientales y microambientales de temperatura y humedad de los cultivos** (Alfonso Gago-Calderón, José R. Andres-Díaz, Marta Barceló Muñoz, Araceli Barceló Muñoz)

**I.15 - Protocolo para la propagación in vitro de ejemplares saneados de *Cynara scolymus* cv. "Blanca de Tudela"** (Josefa Fernández Fernández)

**I.16 - Desarrollo de protocolos in vitro para la obtención de plantas de *Vitis vinifera* libres de virus** (Ander Castander-Olarieta, Ana Herrán, Itziar A. Montalbán, Alexey Pestryakov, Nina Bogdanchikova, Miguel Barbarin, Carlos Lucea, Paloma Moncaleán)

**I.17 - Combinación de tratamientos para la eliminación de patógenos en plantas de albaricoquero micropropagadas** (Cristian Pérez-Caselles, Elena Yelo, Lorenzo Burgos, Marina Martín-Valmaseda, Nuria Alburquerque)

**I.18 - Olivos tetraploides: una nueva estrategia en la mejora** (Laila Ribalta Campos, José Ángel Mercado Carmona, Fernando Pliego-Alfaro, Elena Palomo-Ríos)

**I.19 - Caracterización de variantes somaclonales de olivo obtenidos tras la exposición al filtrado crudo del hongo *Rosellinia necatrix*** (Clara Pliego, Isabel Narváez, Ana Moreno-Pérez, José Ángel Mercado, Fernando Pliego-Alfaro, Elena Palomo-Ríos)

**I.20 - Análisis funcional de genes relacionados con mecanismos de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en alcornoque** (Laura López Candales, Saleta Rico Santos, Beatriz Cuenca Valera, Jesús M. Vielba Villegas, Nieves Vidal González, M<sup>a</sup> José Cernadas Cernadas, Purificación Covelo Abeleira, Conchi Sánchez Fernández)

**20.00 – 21.00**                    **Cóctel de Bienvenida**

---

**JUEVES, 7 DE SEPTIEMBRE DE 2023**

---

**9.00 – 10.00**            **Conferencia Plenaria**  
Efecto de la temperatura durante la embriogénesis somática en el establecimiento de una memoria epigenética a largo plazo en *Picea abies*.

*Marcos Viejo (Universidad de Santiago de Compostela)*

**10.00 – 10.45**        **Pausa café y visita Pósteres**

**10.45 – 13.00**        **Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones.** Moderan: Ana María Castillo y Elena Carneros

**10.45 – 11.15**        **Doubled haploids, a game changer in potato breeding**  
*Nuria Alegret-Badia (HZPC Research B. V., The Netherlands)*

**11.15 – 11.45**        **In vitro *Prunus spp.* immature embryo rescue: protocol, cost reduction, and efficiency improvements**  
*María Casanovas (IRTA Fruitcentre, Lleida)*

**11.45 – 12.30**        **Sesión Temática II - Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones.** Moderan: Ana María Castillo y Elena Carneros  
**Presentación y Discusión de Pósteres**

**II.1 - Primeros pasos en el desarrollo de un protocolo de dobles haploides en calabacín (*Cucurbita pepo*): determinación del desarrollo de las microsporas con respecto a la morfología floral** (Ana García-Pérez, Malén Escánez García, Edgar García Fortea)

**II.2 - Opposite auxin dynamics determine the gametophytic and embryogenic fates of the microspore** (Yolanda Pérez Pérez, María Teresa Solís, Alfonso Albacete, Pilar S. Testillano)

**II.3 - Aplicación de una estrategia de "priming" en semillas para aumentar la eficiencia de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero** (Ana María Castillo Alonso, Begoña Echávarri Razquín, Aimar Navarro Arguedas, Patricia Fustero Abad, Asunción Costar Castán, María Pilar Vallés Braú)

**II.4 - Novel small molecule antioxidants improve stress-induced cell reprogramming while decrease autophagy and cell death in rapeseed: a physiology and transcriptomics study** (Cristina Rueda-Varela, Elena Carneros, Yolanda Pérez-Pérez, Elena Caro, Carmen Gil, Ana Martínez, Pilar S. Testillano)

**II.5 - Obtención de líneas doble haploides para la producción de líneas comerciales** (Mariona Jordana García, Laura Martínez Plantón)

**II.6 - Comparative transcriptome analyses of microspore reprogramming to embryogenesis in *Brassica napus* L.** (Elena Carneros, Natalia García-Sánchez, Cristina Rueda-Varela, Yolanda Pérez-Pérez, Elena Caro, Pilar S. Testillano)

**II.7 - Análisis de RNA-seq durante la inducción de la embriogénesis de la microspora y la primera etapa del desarrollo embriogénico en trigo panadero** (Isabel Valero-Rubira, Sergio Gálvez, Ana María Castillo, Begoña Echávarri, Patricia Fustero, Asunción Costar, Pilar Hernández, María Pilar Vallés)

**II.8 - Utilización del rescate y cultivo de embriones in vitro para la obtención de híbridos poliploides que permitan estudiar el modelo de segregación cromosómica de parentales tetraploides utilizados en programas de mejora genética de cítricos** (Ana Cristina Benedict, Andrés Garcia Lor, Pablo Aleza)

**12.30 – 13.30 Herramientas para la Automatización de Procesos en los Cultivos In Vitro.** Moderan: Carmen Martin y Erika Soto

**12.30 – 13.00 GreenTray®, a new TIS bioreactor for micropropagation and in vitro biotic and abiotic assays**

*Ramon Dolcet-Sanjuan (IRTA Fruitcentre, Lleida)*

**13.00 – 13.30 Fitobot: Un nuevo sistema para el fenotipado masivo vegetal de precisión.**

*Ana García-Pérez (Beyond Seeds & Universidad de Almería, Almería)*

**13.30 – 15.00 Comida**

**15.00 – 17.00 Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión.** Moderan: Diego Hidalgo y Jaime Morante

**15.00 – 15.30 Generation of plant cell cultures for their industrial application**

*Tarik Ruiz Medina (CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB, Barcelona)*

**15.30 – 16.30 Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión.** Moderan: Diego Hidalgo y Jaime Morante

**Presentación y Discusión de Pósteres**

**III.1 - Machine learning tools unveil the potential of *Bryophyllum spp.* as an in vitro biofactory of polyphenols** (Eva Lozano-Milo, Pedro Pablo Gallego, Pascual García-Pérez)

**III.2 - La metabolómica no dirigida como técnica para determinar el efecto del medio de cultivo in vitro sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos** (Tomás A. Arteta, Pascual García-Pérez, Leilei Zhang, Luigi Lucini, Pedro P. Gallego, M. Esther Barreal)

**III.3 - Análisis del metabolismo redox en cultivos celulares de vid elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo** (Eduardo Gómez-Copoví, Ana Belén Sabater-Jara, Lorena Almagro, María Ángeles Pedreño)

**III.4 - Aplicación de la ingeniería metabólica para potenciar la producción biotecnológica de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus baccata*** (Edgar Perez-Matas, Diego Hidalgo, Miguel Angel Alcalde, Mercedes Bonfill, Javier Palazon)

**III.5 - Insights into Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase (PPCK) role in stilbene production in grapevine (*Vitis vinifera*) cell cultures through gain and loss of function** (Elías Hurtado Gaitán, Jaime Morante Carriel, Ascensión Martínez Marquez, María José Martínez Estes, Susana Sellés Marchart, Antonio Samper Herrero, Roque Bru Martínez)

**III.6 - Ingeniería metabólica de triterpenos en raíces transformadas de *Centella asiática* mediante la sobreexpresión de escualeno sintasa y el factor de transcripción (TSAR2)** (Miguel Angel Alcalde, Edgar Perez-Matas, Javier Palazon, Mercedes Bonfill, Diego Hidalgo)

**III.7 - Evaluating in vitro conditions for selecting melon germplasm with tolerance to drought and salt stresses** (Miguel Ezquerro, Sara Mares, María-Luisa Gómez-Guillamón, Belén Icó, Ana María Pérez De Castro, Carmina Gisbert)

**III.8 - Tolerant epitypes of elicited holm oak somatic embryos are revealed by challenge in dual culture with *Phytophthora cinnamomi*** Rands (María del Mar Ruiz-Galea, Carolina Kremer Morales, Eva Frierio Molano, Inmaculada Hernández)

**III.9 - Últimos avances en métodos alternativos de conservación durante el proceso de embriogénesis somática en *pino radiata*** (Itziar A. Montalbán, Ander Castander-Olarieta, Paloma Moncaleán)

**III. 10 - Physiological responses of *Ocimum basilicum* callus culture to titanium dioxide nanoparticles: insights into growth, antioxidant activity, and stress tolerance** (Sanaz Feizi, Morteza Kosari-Nasab, Mojtaba Amini, Ali Movafeghi, Pedro Pablo Gallego, M. Esther Barreal)

**III.11 - Obtención de cíbridos de mandarina mediante fusión de protoplastos** (Laura Prósper, Andrés García Lor, María Hernández, Pablo Aleza)

**16.30 – 17.00** Pausa café y visita pósteres

**17.00 – 18.00** Asamblea Ordinaria SECIVTV

**18.00 – 18.30** Asamblea Extraordinaria SECIVTV – Elección de nueva Junta Directiva

**18.30** Salida desde la sede de la reunión hacia la Seu Vella

- 19.30 – 20.30**                    **Visita Guiada Seu Vella**
- 21.00**                                **Cena del Congreso**  
(Restaurante "La Masia" – C/ Democràcia, 16, Lleida)

## **VIERNES, 8 DE SEPTIEMBRE DE 2023**

---

- 9.00 – 10.00**            **Conferencia Plenaria**  
Plant cells for cosmetics and food applications  
*Amir Akhgari (VTT Technical Research Centre of Finland Ltd.)*
- 10.00 – 10.30**        **Pausa café y visita pósteres**
- 10.30 – 12.00**        **Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes.** Moderan: José Angel Mercado y Alberto Coronado
- 10.30 – 10.50**        **Genome editing to develop resistance of Spanish Bomba rice to blast disease**  
*Andrea Saba Mayoral (Universidad de Lleida, Lleida)*
- 10.50 – 12.00**        **Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes.** Moderan: José Angel Mercado y Alberto Coronado
- Presentación y Discusión de Pósteres**
- IV.1 - Activation of the native PHYTOENE SYNTHASE 1 promoter by modifying near-miss cis acting elements induces carotenoid biosynthesis in embryogenic rice callus** (*Guillermo Sobrino-Mengual, Derry Alvarez, Richard M. Twyman, Christopher Gerrish, Paul D. Fraser, Teresa Capell, Paul Christou*)
- IV.2 - Understanding and improving starch biosynthesis in rice using CRISPR/Cas9 genome editing of Waxy/GBSSI** (*Erika Soto Chavarro, Lucía Pérez Alvarez, Gemma Farré, Ludovic Bassie, Gemma Villorbina Noguera, Teresa Capell Capell, Paul Christou*)
- IV.3 - Edición genética mediante CRISPR/Cas9 de embriones somáticos de castaño** (*M<sup>a</sup> Teresa Martínez, Vera Pavese, Andrea Moglia, Pablo Piñeiro, Daniela Torello Marinoni, Roberto Botta, Elena Corredoira*)
- IV.4 - Knocking out strigolactone biosynthetic genes in maize and its impact on metabolism and phenotype** (*Xin Huang, Andreas Schiermeyer, Teresa Capell, Stefan Schillerg, Paul Christou*)
- IV.5 - Plantas de tomate editadas en un gen implicado en la síntesis de melatonina mediante CRISPR-Cas9** (*Daniel Luna, Sara E. Martínez-Lorente, Rosa M. Rivero y Nuria Alburquerque*)
- IV.6 - Transcriptional regulation of particular MEP and MVA pathway genes in rice seed** (*Xin Huang, Teresa Capell, Paul Christou*)

**IV.7 - Functional expression of two major nitrogenase components in transgenic rice** (*Wenshu He, Can Baysal, Stefan Burén, Xi Jiang, Teresa Capell, Luis Rubio, Paul Christou*)

**IV.8 - Expression of algal limiting CO<sub>2</sub> inducible protein B (LCIB) in rice enhances photosynthetic efficiency and productivity** (*Ashwin Vargheese, Wenshu He, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou*)

**IV.9 - Micropropagación y transformación genética de la planta carnívora *Byblis liniflora* Salisb., la planta arcoiris** (*Alberto Coronado, Marybel Jáquez, Constanza Martín-Vásquez, Abdellatif Bahaji, Vicente Moreno, Alejandro Atarés*)

**IV.10 - Desarrollo de un protocolo para la regeneración y transformación genética de brócoli** (*Brassica oleracea var. italica*) (*Alberto Coronado, Carmina Gisbert, Rosa Porcel, Lynne Yenush, JM Mulet*)

**IV.11 - Caracterización fenotípica y genética de un mutante de tomate afectado en la coloración de sus hojas** (*Alberto Aguiar, Marybel Jáquez, Benito Pineda, Fernando J. Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno, Alejandro Atarés*)

**IV.12 - Eliminación de virus en plantas de albaricoquero micropropagadas mediante tratamiento con nanopartículas de plata** (*Marina Martín-Valmaseda, Cristian Pérez-Caselles, Lorenzo Burgos y Nuria Alburquerque*)

**12.00 – 14.00 Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa.** Moderan: Ramon Dolcet y Gemma Puigarnau

**12.00 – 12.30** Biotecnología vegetal aplicada a la mejora genética en especies hortícolas dentro de una empresa de semillas

*José Luís Couselo (Semillas Fitó, Barcelona)*

**12.30 – 13.00** Agromillora, la micropropagación 'is in our nature'

*Silvia Valladares (Agromillora Iberia, Barcelona)*

**13.00 – 14.00** Mesa Redonda Cultivos In Vitro en la Empresa - Retos y oportunidades. Moderan: Ramon Dolcet y Gemma Puigarnau

**14.00 – 14.15 Clausura**

**14.15 Cóctel de despedida**

## SESIÓN TEMÁTICA I

### MICROPROPAGACIÓN Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

**PI.1 - Control de la estabilidad genética en *Mentha aquatica* conservada in vitro: efecto del medio de cultivo y la iluminación** (Carmen Martín, Miguel Ibáñez, M. Elena González-Benito)

**PI.2 - Analysis of global H3K9 methylation and H4 acetylation dynamics during somatic embryogenesis in cork oak** (Natalia Elena Expósito de la Paz, Elena Carneros, Pilar S. Testillano)

**PI.3 - Micropropagación de encinas seleccionadas por su tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*** (M<sup>a</sup> Teresa Martínez, Fátima Mosteiro, Beatriz Cuenca, Sol Campañó, Felipe Pérez, Elena Corredoira)

**PI.4 - Micropropagación de material juvenil de argán** (Pablo Piñeiro, Fátima Mosteiro, Sol Campañó, Elena Corredoira, M<sup>a</sup> Teresa Martínez)

**PI.5 - Optimización del medio basal para la micropropagación del cannabis medicinal (*Cannabis sativa* L.)** (José Garrido Gala, Carlos Ferreiro-Vera, Juan José Martínez-Quesada)

**PI.6 - Desarrollo de un protocolo de multiplicación para nuevos materiales de pitahaya** (Magdalena Escánez García, Ana García Pérez, Edgar García Fortea)

**PI.7 - Establishment and use of a *Vitis* germplasm collection of in vitro plants** (Carmina Gisbert, Sara Mares, Antonio Olmos, Rosa Peiró)

**PI.8 - Cultivo tisular verde de Cannabis: salto hacia el orgánico** (Antonio Romero Arjona, Nicolás García-Caparrós, Verónica Codesido Sampedro)

**PI.9 - Towards tomato drought improvement by colchicine-mediated generation of polyploids** (Pedro Cerdá-Bennasser, Jeroni Galmés, Miquel Àngel Conesa)

**PI.10 - Uso del activador de nanovibraciones, o generador de nanopartículas, NeuG7 en bioreactores GreenTray® para la micropropagación de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.)** (Carlos R. Mendoza, Mayra L. Orellana, Shushi Nomura, Ramon Dolcet-Sanjuan, Omara Terrones)

## **SESIÓN TEMÁTICA IV MODIFICACIÓN GENÉTICA Y TECNOLOGÍAS EMERGENTES**

**PIV.1 - Identificación de mutantes de tomate afectados en respuesta necrótica** (*Marybel Jáquez-Gutierrez, Alberto Aguiar, Constanza Martin-Vásquez, Benito Pineda, Fernando J. Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno, Alejandro Atarés*)

**PIV.2 - Recapitulación del mutante Arlequín sin secuencias de DNA foráneo mediante edición CRISPR y posterior segregación del vector molecular** (*Benito Pineda, Begoña García-Sogo, José Luis Contreras, Ignacio Moreno, Alejandro Atarés, Abraham S. Quevedo-Colmena, Fernando Juan Yuste-Lisbona, Rafael Lozano, Vicente Moreno*)

**PIV.3 - Stable expression of SARS-CoV-2 spike and receptor-binding domain proteins in Bomba rice** (*Andrea Saba-Mayoral, Guillermo Sobrino-Mengual, Ludovic Bassie, Paul Christou, Teresa Capell*)

**PIV.4 - Engineering an E. coli glycolate catabolic pathway into rice to enhance photosynthetic efficiency and productivity** (*Ashwin Vargheese, Wenshu He, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou*)

**PIV.5 - Engineering a novel ectopic oxygen scavenging pathway into rice chloroplasts en route to enhance photosynthetic efficiency** (*Wenshu He, Ashwin Vargheese, Greta Nölke, Stefan Schillberg, Teresa Capell, Paul Christou*)



# RESÚMENES

## **From single transgenes to pathway engineering and genome editing: A personal account of plant tissue culture and genetic engineering from 1980 to 2023 and beyond**

Paul Christou

*Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering, University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.*

*ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain.*

The presentation will give a historical account of the development of GMOs, from a personal perspective, focusing on my own experiences first in industry in The USA in the early to mid-80s, working for one of the first plant biotechnology companies, Agracetus Inc., then in academia in the UK, Germany and Spain. I will highlight key events in my own research career and link these to the development of engineered plants with value-added traits and reconstructed multi-gene metabolic and biosynthetic pathways, also looking at the future, in particular advances in synthetic biology and genome editing as applied to plants. The presentation will highlight the use of novel *in vitro* culture systems which have led to the development of genotype-independent transformation systems for soybean and rice, in my own research. I will also discuss the latest trends which strive to minimize and/or eliminate conventional *in vitro* culture steps from the transformation process, en route to genotype-independent transformation for many major crops, including maize. I will give particular emphasis on remaining bottlenecks and limitations in advancing crop transformation in the era of genome editing and give an update on the regulatory and commercial status of genome edited crops, worldwide. I will conclude with an example of how current and future engineering projects might be designed to generate crops simultaneously tolerant to multiple biotic and abiotic stresses for food security in developing countries, sponsored by philanthropic organizations and contrast with commercial programs in the industrialized world in the private sector.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Application of *in vitro* culture to plant regeneration in natural areas**

Carlos Sobrino Alonso<sup>1</sup>, Lucía Saborido Sónora<sup>2</sup>, David García Romero<sup>3</sup>, Conchi Sánchez Fernández<sup>1</sup>, Anxela Aldrey Villar<sup>1</sup>, **Bruce Christie**<sup>4</sup>, Nieves Vidal González<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, Misión Biológica de Galicia sede Santiago de Compostela, CSIC, Avda. de Vigo, s/n, 15705 Santiago de Compostela, Spain.

<sup>2</sup> Comunidad de Montes de Araño, Rianxo, A Coruña, Spain.

<sup>3</sup> Departamento de Pedagogía e Didáctica, Facultade de Ciencias da Educación de la Universidad de Santiago de Compostela, Rúa Prof. Vicente Fráiz Andón, s/n, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

<sup>4</sup> The Greenplant Company, Palmerston North 4410, New Zealand.

Email de contacto: [brucechristie101@gmail.com](mailto:brucechristie101@gmail.com)

*In vitro* culture is a useful tool for ex situ conservation of biodiversity, as it enables the re-introduction of plant material in degraded areas. The initial objective of this study was to use native trees cultured *in vitro* for the regeneration of a riparian forest located in the "Comunidade de Montes do Araño, Rianxo, A Coruña", that had been affected by a fire some years before and as a consequence was colonized by invasive introduced species, mainly *Acacia melanoxylon* and *Eucalyptus globulus*.

The plant material to be used in the project belonged to: i) the germplasm collection of the Biotechnology of Woody Plants of the Misión Biológica de Galicia sede Santiago de Compostela, ii) seeds from the native trees growing in the degraded area that had survived the fire and the colonization by the invasive plants.

All the activities in the natural area, including the collection of plant material were carried out in the frame of a Service Learning project ([www.arredordorural.org](http://www.arredordorural.org)) in collaboration with the University of Santiago de Compostela, with the direct involvement of the "Comunidade de Montes do Araño", who wrote the project and organized the network of collaborations with institutions and associations as CRA de Rianxo, IES Félix Muriel, AAVV Araño, Concello de Rianxo, Asociación Avoar and Consellería Medio Rural (Xunta de Galicia), which provided other plants and participated in the plantations.

The planting of native trees was carried out in April 2022 and March 2023. We used micropropagated plantlets of *Quercus robur*, *Q. suber*, *Betula pubescens*, *Salix viminalis*, *Pyrus cordata*, *Corylus avellana*, *Prunus avium* and *P. domestica* that had been collected in the same region of the degraded area and established *in vitro* some years before; they were proliferated and acclimated for the project. In addition, we used *Q. robur* seedlings germinated from acorns collected in the same place as the fire. To preserve this germplasm and enable future re-introductions, some buds of these seedlings were used as explants for *in vitro* establishment.

The results indicate that it is feasible to use micropropagated plant material for revegetation in areas that have a lower level of technical care than experimental or plant production plots. The main obstacle for the project was the long time needed for permits for the removal of exotic species, which was partially solved by modifying the plantation area. Other aspects to improve include the quality of plant labels, which weren't legible after some months in outdoor conditions, as well as the planning of watering and weed elimination sessions during summer months.

The authors acknowledge the cooperation of COST Action COPYTREE (European Network for Innovative Woody Plant Cloning) CA21157, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology).



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Development of methods for the micropropagation of tropical agricultural crops and trees**Jaime Morante Carriel<sup>1,2</sup>, Nicolás Cruz Rosero<sup>2</sup>, Mercedes Carranza Patiño<sup>2</sup> Roque Bru Martínez<sup>1</sup><sup>1</sup> *Plant Proteomics and Functional Genomics Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Soil Science and Agricultural Chemistry, Faculty of Science and IMEM, University of Alicante, Alicante, Spain.*<sup>2</sup> *Department of Plant Biotechnology, Faculty of Forestry and Agricultural Sciences, Quevedo State Technical University, Quevedo, Ecuador.*

Email de contacto: jaime.morante@ua.es

Micropropagation is the clonal propagation of plants in closed vessels under aseptic conditions. Inside the vessels, the plants are grown on culture media that contain nutrients and growth regulators. During *in vitro* multiplication, several problems can occur, such as basal calluses, vitrification, tissue necrosis, and phenol accumulation. Alternatively, adding supplements to the basal medium, like polyvinylpyrrolidone or ascorbic acid, improves the tropical plant *in vitro* culture by control of phenolics and tissue necrosis, respectively [1]. The optimization of methods for micropropagation of plants is key to obtain sterile and eco-friendly plant material for different biochemical and molecular studies [2]. Here, we detail different protocols for *in vitro* propagation of tropical agricultural species [*Ananas comosus* (pineapple), *Xantomonas sagittifolium* (cocoyam), *Musa balbisiana* AAB (platain maqueño), *Musa paradisiaca* (banana), *Musa acuminata* AA (orito banana)] and tree species [*Tectona grandis* (teak), *Cedrela odorata* (cedar), *Swietenia macrophylla* (caoba)], focusing on aseptic conditions, culture medium concentration and, the concentrations of growth regulators. We also highlight the improvement strategies implemented to overcome the problems of *ex vitro* acclimatization to obtain a high percentage of plant survival.

## References

- [1] Meyad, C., Henkrar, F., Bouhaddou, N. et al. Micropropagation of *Quercus* spp., complications and solutions—an overview. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* (2023). <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10354-4>.
- [2] Cruz, N., Morante, J., Carranza, M. (2021) *Biotecnología de plantas. Aplicaciones en Ecuador*. Grupo Compás. ISBN 978-9942-33-402-2.

## Acknowledgements

Spanish Ministry of Science and Innovation, MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033, ERDF A way of making Europe and European Union NextGenerationEU/PRTR grants PID2020-113438RB-I00 and TED2021-129617B-I00, Valencian Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència y Societat Digital grant CIAICO/2021/167 and "María Zambrano" grant to JMC from the Spanish Ministry of Universities, NextGenerationEU/PRTR, and University of Alicante.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Transcriptomic analysis of auxin and paclobutrazol treatments during the induction of adventitious roots in chestnut**

Ricardo Castro-Camba<sup>1</sup>, Conchi Sánchez Fernández<sup>1</sup>, Saleta Rico Santos<sup>1</sup>, Nieves Vidal González<sup>1</sup>, Purificación Covelo Abeleira<sup>1</sup>, M<sup>º</sup> José Cernadas Cernadas<sup>1</sup>, Anxela Aldrey Villar<sup>1</sup>, Jesús M. Vielba Villegas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Producción Vegetal, Misión Biológica de Galicia, Sede Santiago de Compostela, CSIC, Avda de Vigo s/n, 15705, Santiago de Compostela, Spain*

Adventitious rooting is a post-embryogenic process through which new roots are formed in non-rooting tissues. The successful development of adventitious roots is necessary for the clonal mass propagation of plants, particularly in forest species. Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is a relevant tree with key ecological and socio-economical roles. Auxin is the main hormone involved in adventitious root formation, and it is exogenously applied to induce adventitious roots in chestnut. However, other hormones, such as gibberellins, are related to the adventitious rooting process by influencing both rooting rate and root growth, although their role is not clearly defined.

In this study, experiments were carried out to determine the effects of auxin and gibberellins on the initiation of adventitious roots. The analysis was performed in juvenile-like *in vitro* shoots established from basal shoots of an adult chestnut tree. The effect of the gibberellin biosynthesis inhibitor paclobutrazol (PBZ) was analysed to determine the impact of this group of hormones on the adventitious rooting process.

Our results indicate that PBZ-induced gibberellin inhibition stimulates root formation even in the absence of exogenous auxin. In light of these results, a transcriptomics analysis was carried out to understand the genetic basis underlying the responses of chestnut microshoots to auxin and PBZ treatments. For this purpose, we used long-read sequencing technology (Oxford Nanopore Technologies) and obtained a total yield of 19.9 Gbases from the 21 samples used, with an average sequence length of 600 bp. The files were mapped with Minimap2 against the *Quercus suber* draft genome with an 80% of the reads successfully mapped. Files were assembled using Stringtie2, and differential expression analysis was developed with DESeq2.

We detected around 900 Differentially Expressed Genes (DEGs) between auxin treated microshoots and untreated plants, with a dominant role for the auxin signalling pathway, as expected. On the other hand, 550 transcripts with significant differential expression between PBZ-treated microshoots and untreated plants were detected. In this case, the biosynthesis of secondary metabolites and the ethylene signalling pathway appeared as the most relevant categories. These findings suggest a negative role of gibberellins in the induction of adventitious roots, an undefined role for ethylene in this process. Besides, they provide a deeper understanding of the genetic basis of adventitious rooting regulation in chestnut.





## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

***Cannabis sativa*: ¿Micropropagamos?**Nicolás García-Caparrós<sup>1</sup>, Antonio Romero Arjona<sup>1</sup>, Verónica Codesido Sampedro<sup>1</sup><sup>1</sup> MIFCO BIOSCIENCES, Carretera A-343, Km 0, 29200, Antequera, Spain.

Email de contacto: v.codesido@mifcobs.com

El escalado industrial del cultivo *in vitro* de *Cannabis* con la finalidad de proveer de plántulas libres de patógenos a potenciales clientes, ha llevado a MIFCO a la necesidad de mejorar las condiciones de micropropagación tras la fase de instauración exitosa mediante cultivo de meristemos. Para ello, se han buscado las condiciones óptimas que aporten un mayor ratio de propagación entre subcultivos, sin comprometer la sanidad ni arquitectura de la planta. Con esta finalidad, se han probado distintas densidades, entendidas como número de plantas por recipiente, distintos recipientes, distintos sustratos y medios de cultivo. Tras determinar el conjunto óptimo de los factores anteriores, se estudió el efecto de distintas hormonas en la fase de micropropagación: Metatopolina (MT), Giberelina A3 (GA<sub>3</sub>), Tiazurón (TDZ), Ácido β-naftalacético (ANA) y una conjugación de algunas de ellas como la adición simultánea de MT + GA<sub>3</sub>, siendo esta última la que presentaba una conformación de planta más adecuada para el proceso bajo estudio. Se midió semanalmente la altura de la planta, el número de nuevas hojas/brotes, la presencia/ausencia de raíces, la coloración de la hoja y el porcentaje de supervivencia. Tras cada subcultivo, se calculó el ratio de propagación para cada uno de los factores estudiados. Debido a la elevada interacción Genotipo x Ambiente habitual de la planta de cannabis, todos los ensayos fueron realizados con dos variedades de alto contenido en Δ9-THC, con diferentes respuestas a su introducción *in vitro*. Cabe destacar, que uno de los procesos de reversión a machos de las plantas de cannabis femeninas utilizada habitualmente por los mejoradores genéticos de la especie, es la aplicación foliar de GA<sub>3</sub> durante las tres primeras semanas de floración de la planta, de manera que, el uso de GA<sub>3</sub> en cultivo *in vitro* de *Cannabis*, no es recomendable o, al menos, posteriores estudios sobre la concentración crítica que produce la reversión deberán llevarse a cabo.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**In vitro protocols development of *Cannabis sativa* L.  
for germplasm preservation and maintenance**

Jordi Petit Pedró<sup>1,2</sup>, Piotr Marcin Bilski<sup>1</sup>, Elena Del Blanco Rodríguez<sup>1,2</sup>, Jason Argyris<sup>1</sup>, Amparo Monfort<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG) CSIC-IRTA-UAB-UB, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona, Spain

Email de contacto: [jordi.petit@irta.cat](mailto:jordi.petit@irta.cat)

*Cannabis sativa* L. is a multipurpose sustainable crop that can help guarantee the production of specialized non-food commodities, such as bio-composites and cannabinoids. Despite the surging interest in cannabis cultivation, it is relatively poorly studied and efficient standard In vitro protocols are currently unavailable. Consequently, there is a large limitation to micropropagate, maintain and conserve cannabis genetics. This gap also hinders development of efficient transformation protocols of cannabis, which is still highly recalcitrant to plant transformation and regeneration. In this study, we are developing standardized protocols to induce callogenesis from different tissues (hypocotyl, leaves, petioles, adult stem and meristems), multiply calli and induce organogenesis from calli, including regeneration of shoots and roots. Combination of different type of phytohormones and concentrations along environmental conditions, including temperature, light photoperiod and light quality are under study to develop the protocols. The study is being tested in different cannabis genotypes to avoid developing genotype-specific protocols but efficient, standardized and universal methods for the species. Additionally, we are also developing a method to preserve the In vitro explants at low temperature (4°C) slowing down their metabolism to the minimum, which avoids constant refreshing of mediums. Phytohormones under study include different type of auxins, cytokinin and gibberellin acids. Two different types of mediums are under research for organogenesis, DKW (Driver and Kuniyuki Walnut) and MS (Murashige and Skoog). Activated charcoal is also studied as medium supplementation to enhance the development of roots and to keep contaminations under control. Different temperatures and light intensities are being tested to allow callus development and avoid flowering and leaf vitrification. These protocols will provide tools to boost the research and breeding of this species and will be critical in protecting elite breeding lines in the future.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación *in vitro* del portainjertos Garnem**José Ángel Medina Espallardo<sup>1</sup>, Josefa Fernandez Fernandez<sup>2</sup>, Alejandro Galindo Egea<sup>3</sup><sup>1</sup> *Viveros Nurfruits SL, Caravaca de la Cruz, Murcia, Spain*<sup>2</sup> *Invisa Biotecnología Vegetal SL, Caravaca de la Cruz, Murcia, Spain*<sup>3</sup> *Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental, La Alberca, Murcia, Spain*Email de contacto: [jamedina@nurfruits.com](mailto:jamedina@nurfruits.com)

En el presente estudio se pretende analizar el efecto de nanotubos de carbono sobre diferentes combinaciones de citoquininas en la proliferación de planta *in vitro* del patrón de almendro Garnem (GxN-15). Las citoquininas seleccionadas para este estudio son: 6-BAP, 2IP y Meta-Topolina y sus concentraciones 0,5, 0,45 y 0,54 mg/L, respectivamente. Se realizan combinaciones pareadas, creando inicialmente 3 combinaciones (6-BAP + 2-IP; 6-BAP + Meta-Topolina; 2IP + Meta-Topolina). De estas combinaciones surgen dos variantes: una que incluye nanotubos de carbono (MWCNTs) a una concentración de 10 mg/L y otra que no, creando finalmente 6 tratamientos diferentes. Cada una de estas combinaciones es añadida a un medio de cultivo, compuesto por los macronutrientes del medio original QL y los micronutrientes y vitaminas del medio original DKW.

Posteriormente, se cultivan los explantos en cada uno de estos medios de cultivo y se mantienen en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 25 ±2 °C durante 3 semanas. Transcurrido el periodo de cultivo, se procede al análisis de los resultados, donde se tiene en cuenta el número de brotes por explanto y la longitud de los brotes. A continuación, se lleva a cabo un segundo ciclo de cultivo de 3 semanas en las mismas condiciones que el primero para, a su fin, medir de nuevo las mismas variables que antes.

Los resultados de ambos ciclos se usan para evaluar la efectividad de cada uno de los tratamientos, definiendo cuál es el mejor de ellos a la hora de la proliferación de nuevos brotes de Garnem y si existe mayor absorción de citoquininas (traducida en mayor proliferación) en explantos cultivados en medios de cultivo con MWCNTs.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Cultivo de tejidos: alternativa para la producción de planta forestal élite en el presente contexto de estrés biótico y abiótico**Alejandra Rojas-Vargas<sup>1,2</sup>, Paloma Moncaleán<sup>2</sup>, Itziar A. Montalbán<sup>2\*</sup><sup>1</sup> Instituto de Investigación y Servicios Forestales, Universidad Nacional, Heredia 86-3000, Costa Rica<sup>2</sup> Dpto. Ciencias Forestales, Neiker-BRTA, Centro de Arkaute, N-104 km. 355; 01192 Arkaute (Álava).

\*Email de contacto: imontalban@neiker.eus

Los efectos derivados del cambio climático, entre otros el aumento de la población, han provocado una fuerte demanda de productos madereros y no madereros. En el País Vasco, el *Pinus radiata* es la especie forestal de mayor relevancia y su importancia en el sector madera es muy relevante. Desafortunadamente, en los últimos años el pino radiata en el País Vasco se ha visto afectado por varias enfermedades causadas principalmente por hongos: Chancro resinoso del pino, causado por *Fusarium circinatum*; banda roja causada por *Dothistroma septosporum* and *Dothistroma pini* y banda marrón causado por *Lecanosticta acicula*. Esta última enfermedad ha ocasionado ya la pérdida de 3.300 ha en Gipuzkoa (País Vasco). Además, las plantaciones de *P. radiata* en Euskadi han disminuido de 123.921 ha (2016) a 102.488 ha (2022); disminución que coincide con un brote histórico de la enfermedad (bandas) durante los años 2018-2019. Por este motivo, tanto el sector privado como las administraciones han solicitado el desarrollo de una serie de acciones que puedan solucionar este problema. Una de ellas es la búsqueda de especies que puedan ser utilizadas como alternativas para el establecimiento de plantaciones en nuestras condiciones edafoclimáticas y sean válidas para el sector industrial.

Uno de los problemas que tienen las especies forestales es que cuando las plantas han mostrado las características deseadas (altura, forma, tolerancia a estreses, etc.), ya han cambiado de fase y por lo tanto han perdido la capacidad de ser propagadas por técnicas tradicionales (estaquillado, injerto, etc.). Por ese motivo, el objetivo de nuestro trabajo fue el desarrollo de métodos de cultivo in vitro de individuos élite de especies forestales alternativas para el país vasco. Así, además de desarrollar protocolos optimizados de organogénesis de *Sequoia sempervirens*, *Pinus ponderosa* y *Cryptomeria japonica*, hemos estudiado el efecto de varios aspectos físico-químicos en el éxito del proceso.

Agradecimientos: Departamento de Junta de Becas y a la Universidad Nacional de Costa Rica por la beca de Alejandra Rojas. Gobierno Vasco por la financiación del proyecto BASOAES. Este estudio es parte del proyecto de I+D+i / PID2020-112627RB-C3, financiado/a por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ además de haber sido realizado gracias a BIOALICYTED (P117RT0522) y al proyecto MULTIFOREVER, apoyado por ERA-NET Cofinanciado ForestValue por ANR (FR), FNR (DE), MINECO-AR (AR), MINECO-AEI (ES), MMM (FI) y VINNOVA (SE). ForestValue ha recibido financiación de la Unión Europea Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020, subvención no. 773324.





## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**La embriogénesis somática como herramienta biotecnológica en la obtención de plantas a partir de quimeras periclinales con diferentes perfiles genotípicos**Yolanda Ferradás<sup>1,2</sup>, Carolina Royo<sup>1</sup>, Pablo Carbonell-Bejerrano<sup>1</sup>, Elisa Baroja<sup>1</sup>, Manuel Rey<sup>3</sup>, José Miguel Martínez-Zapater<sup>1</sup><sup>1</sup> Departamento de Viticultura, Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Logroño, España.<sup>2</sup> Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.<sup>3</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, Vigo, España.

Email de contacto: Yolanda Ferradás (yolanda.ferradas.rial@usc.es)

La embriogénesis somática es una potente herramienta biotecnológica en la regeneración de plantas leñosas, con múltiples usos como la mejora de genotipos, la edición genética o la obtención de plantas libres de virus. En este sentido, este estudio se centró en la embriogénesis somática como una herramienta para obtener genotipos de interés a partir de quimeras de *Vitis vinifera* L., basándose en el origen unicelular de los embriones somáticos. La vid presenta un meristemo con dos líneas celulares distintas (L1 y L2), donde los tejidos epidérmicos derivan de las capas celulares meristemáticas L1 y los tejidos internos de la piel de las capas celulares meristemáticas L2. Además, estas líneas celulares pueden tener genotipos diferentes, dando lugar a tejidos y órganos quiméricos. Para este trabajo se utilizó Tempranillo Gris, una variante quimérica de Tempranillo, que produce bayas de color gris debido a la presencia de delecciones que conducen a la ausencia de genes *VviMybA* funcionales en la capa de células meristemáticas L2. Los genes que codifican para los factores de transcripción *VviMYBA* son responsables de la regulación de la biosíntesis de antocianinas y la pigmentación de la piel de la baya. En este sentido, los embriones generados a partir de células procedentes de la capa L1 del meristemo darían lugar a plantas que generarían bayas tintas (locus *VviMybA* funcional), mientras que los embriones generados a partir de la capa L2 del meristemo formarían plantas productoras de bayas blancas (locus *VviMybA* no funcional). En el estudio se obtuvieron un total de 52 plántulas derivadas de embriones somáticos y se genotiparon mediante un ensayo basado en la variante de un solo nucleótido (SNV), que discrimina la funcionalidad del locus *VviMybA*. Todos los somaclones obtenidos procedían de embriones somáticos originados a partir de células meristemáticas de origen L1. Estos resultados indicaron que, para este ensayo con Tempranillo Gris, solo las células derivadas de las capas celulares L1 fueron competentes para formar embriones somáticos, mientras que las células derivadas de las capas celulares L2 no lo fueron. Los resultados muestran que la embriogénesis somática directa podría considerarse una poderosa herramienta para la mejora biotecnológica de la vid al rescatar genotipos de interés presentes en las células meristemáticas L1.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Optimización de la embriogénesis somática de pino radiata y primeros avances hacia su escalado en biorreactores**Ander Castander-Olarieta<sup>1</sup>, Kim-Cuong Le<sup>2</sup>, Sofie Johansson<sup>2</sup>, Ulrika Egertsdotter<sup>2,3</sup>, Paloma Moncaleán<sup>1</sup>, Itziar A. Montalbán<sup>1,2</sup><sup>1</sup> Depto. Ciencias Forestales, Neiker-BRTA, Centro de Arkaute, N-104 km. 355; 01192 Arkaute (Álava).<sup>2</sup> Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umeå Plant Science Center (UPSC), Swedish University of Agricultural Science (SLU), SE 901 83 Umeå, Sweden.<sup>3</sup> G.W. Woodruff School of Mechanical Engineering, Georgia Institute of Technology, 500 Tenth Street NW, 30332-0620 Atlanta, GA, USA

\*Email de contacto: imontalban@neiker.eus

La embriogénesis somática en coníferas es una herramienta biotecnológica con múltiples aplicaciones, siendo una de las más importantes la implementación de la silvicultura multivarietal (Park, 2002). Sin embargo, esta técnica requiere la optimización de sus diferentes fases, así como la reducción de costes asociados a mano de obra para llegar a ser un proceso rentable. Con este fin, hemos tratado de optimizar las etapas de maduración y germinación de la embriogénesis somática de pino radiata en medio de cultivo semisólido, para posteriormente dar los primeros pasos hacia la automatización del proceso probando su viabilidad en biorreactores de inmersión temporal (biorreactores BSI) con medio de cultivo líquido.

Para la optimización en medio semisólido, se probaron diferentes condiciones de cultivo antes y durante la maduración y en la etapa de germinación; además se analizaron las implicaciones de estos cambios en la germinación y aclimatación *ex vitro* (Castander-Olarieta et al., 2023). Como resultados, se determinó que un precultivo de 14 días en un medio sin reguladores de crecimiento es beneficioso para la conversión a planta somática; durante la etapa de germinación, agregar glutamina al medio de cultivo y reducir el contenido de sacarosa a la mitad tuvo un efecto positivo en la germinación, duplicándose el porcentaje de plantas aptas para la aclimatación *ex vitro*. Por último, se determinó que la luz fluorescente usada habitualmente en el proceso favorece la formación de raíces, mientras que los explantos germinados bajo luz LED azul mostraron una altura mayor.

En cuanto al cultivo en biorreactores BSI, se realizaron diversos ensayos en las etapas de proliferación y maduración, en los que se testó la cantidad de tejido inicial, el método de dispersión de tejido más apropiado y las frecuencias de inmersión y ventilación. En este sentido, se observó que se requiere al menos 1,5 g de tejido inicial resuspendido en 40 ml para que éste crezca de forma exitosa y uniforme a lo largo de toda la superficie del biorreactor, tanto en la fase de proliferación como de maduración. En el caso de la proliferación, una alta frecuencia de inmersión favorece el crecimiento del tejido, pero el cambio directo de etapa de proliferación a etapa maduración (sin medio de cultivo de transición) tiene un efecto adverso en la producción de embriones somáticos. En la etapa de maduración, por el contrario, la frecuencia de inmersión no tiene un papel tan relevante como en la etapa de proliferación, así como tampoco se vieron diferencias cuando los biorreactores fueron sometidos a pulsos de ventilación. Los mejores resultados de maduración, similares a los obtenidos en medio de cultivo semisólido, se obtuvieron al usar 2 g de tejido inicial y una inmersión de 20 segundos cada tres días. Por lo tanto, podemos asegurar que es posible la embriogénesis de pino radiata en biorreactores de inmersión temporal, pero aún se necesita seguir investigando para optimizar las condiciones de cultivo y así poder dar el salto hacia una producción automatizada de planta.

## Referencias:

Castander-Olarieta et al. (2023) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 153:173–190.  
Park, Y.S. (2002) *Ann For Sci* 59:651–656

Agradecimientos: Este estudio es parte del proyecto de I+D+i / PID2020-112627RB-C3, financiado/a por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ a y del proyecto MULTIFOREVER, ERA-NET Cofinanciado ForestValue (financiación de la UE, H2020, subvención no. 773324). BIOALI-CYTED (P117RT0522).



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Effects of long-term cultured *Pinus radiata* on maturation ability and plant conversion: Using FT-IR spectroscopy to determine biomarkers of embryogenic tissue aging**

Yenny Lineros <sup>1,4,5</sup>, Macarena Rojas-Rioseco <sup>2,3</sup>, Martha Hernández De La Torre <sup>4</sup>, Darcy Ríos Leal <sup>4</sup>, Ximena Muñoz <sup>1</sup>, Rodrigo Hasbún <sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Investigaciones Forestales Bioforest S.A., Unidad de Biotecnología, Concepción, Chile

<sup>2</sup> Laboratorio de Bioespectroscopia y Quimiometría, Universidad de Concepción, Chile

<sup>3</sup> Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Chile

<sup>4</sup> Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Chile

<sup>5</sup> Laboratorio de Epigenética Vegetal, Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile

Correspondence: Yenny.Lineros@arauco.com (Y.L)

The forestry industry has integrated somatic embryogenesis into its clonal programs due to the generation of a high number of plants from selected genotypes at low cost. Somatic embryos are generated in a stressful environment after multiplication of the proembryogenic masses; thus, it is critical to determine the degree of stability of the embryogenic cultures and their potential for mass propagation. Maturation ability in cultures of different ages was evaluated in conjunction with the integrity of the proembryogenic masses, germination rate, hypocotyl, and root length, plant conversion, and ex vitro survival. To identify differences in embryogenic tissue of different ages, their DNA was analyzed using FT-IR spectroscopy. A positive effect of cryopreservation on the maturation ability in embryogenic tissue was observed between 7 and 12 weeks of accumulated subculture. After 12 weeks, a significant decrease in the production of somatic embryos was detected, where some lines even stopped producing embryos. Germination rate, hypocotyl length, and plant conversion were negatively affected by age, while root length and ex vitro survival were not significantly affected. Using FT-IR spectroscopy, it was possible to identify the discriminating bands for young and aged embryogenic tissue associated mainly with vibrations of the nitrogenous base bonds.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**La aplicación de diferentes temperaturas durante la fase de maduración de embriones somáticos de pino marítimo (*Pinus pinaster*) induce cambios transcriptómicos y plantas mejor adaptadas al calor**

María Amparo Pérez-Oliver<sup>1</sup>, Javier Montero-Pau<sup>2</sup>, Alex Alborch<sup>1</sup>, Miguel Ángel Sánchez<sup>1</sup>, Isabel Arrillaga<sup>1</sup>, Ester Sales<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instituto BIOTEC/MED, Departamento de Biología Vegetal, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España

<sup>2</sup> Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universitat de València, Calle del Catedrático José Beltrán Martínez 2, 46098 Paterna, Valencia, España.

<sup>3</sup> Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universidad de Zaragoza, Escuela Politécnica Superior, Ctra Cuarte s/n, 22197 Huesca, España.

Email de contacto: isabel.arrillaga@uv.es

En el contexto del cambio climático, se necesitan estudios sobre la respuesta adaptativa de las plantas a la variación de la temperatura, particularmente en especies longevas como las forestales. Nuestro objetivo es demostrar si la aplicación de diferentes temperaturas durante la fase de maduración de embriones somáticos (ES) de pino marítimo modifica los perfiles de expresión de genes que inducen marcas epigenéticas y si esos cambios se reflejan en plantas mejor adaptadas a un posterior estrés por calor. Para ello, se maduraron durante 8 semanas tres líneas embriogénicas de *Pinus pinaster* a temperaturas más frías (18 °C) o más cálidas (28 °C) en comparación con las condiciones control (23 °C). Tras la fase de maduración se aisló el ARN de las líneas embriogénicas, y se prepararon y secuenciaron 9 librerías. El análisis de los datos permitió identificar genes expresados diferencialmente. Finalmente, un conjunto de 10 genes relacionados con marcadores epigenéticos que mostraron evidencia de expresión diferencial entre tratamientos fueron validados por PCR cuantitativa. Las plantas derivadas de esas líneas se sometieron a estrés por calor (50 °C) durante un corto periodo de tiempo y se midieron parámetros fisiológicos como el ajuste osmótico, la actividad fotosintética, y el contenido en pigmentos fotosintéticos y azúcares solubles. Se observó que la temperatura afectó la expresión génica, ya que se indujeron tendencias opuestas cuando las líneas embriogénicas maduraron a 18 o 28 °C. En cuanto a los genes implicados en las modificaciones epigenéticas, se encontraron niveles más altos de transcritos en las líneas embriogénicas maduras a 18 °C, particularmente cuando se comparan con las de 28 °C. Se observaron niveles de expresión diferencial para genes que codifican histonas (*H1/5*, *H2A*), histonas deacetilasas (*HDA2C* y *HDA9*), variante en metilación 1 (*VIM1*), Argonauta (*AGO7*), una histona-lisina metil-transferasa (*HKMT*) y una proteína tipo Dicer 1 (*DCL1*). Estos genes regulan la expresión tanto a nivel transcripcional como postranscripcional, y median los procesos de desarrollo de las plantas y las respuestas al estrés. La maduración a 18 °C dio como resultado plantas mejor adaptadas cuando se sometieron a un estrés posterior por altas temperaturas, ya que mostraron un mayor incremento de prolina, menores incrementos en los niveles de ABA, ninguna reducción en las citoquininas activas y una mejor recuperación neta de la tasa de fotosíntesis después del estrés.

Agradecimientos: A la UE, Gobierno de España (proyecto PID2020-112627RB-C3), Generalitat Valenciana (AICO /2021/300) por la financiación y a la Universitat de València por el contrato predoctoral con MAPO (Atracció de Talent 404).





## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Efecto de la aplicación de ABA exógeno sobre la expresión de genes del metabolismo de ABA y poliaminas en embriones somáticos de vid 'Mencía' sometidos a estrés osmótico**Óscar Martínez<sup>2</sup>, Manuel Rey<sup>2</sup>, M<sup>a</sup> Victoria González<sup>2</sup><sup>1</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ciencia del Suelo, Universidade de Vigo, 36310 Vigo (Pontevedra)<sup>2</sup> Departamento de Biología Funcional, Universidade de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela (A Coruña).

Email de contacto: mrey@uvigo.gal; mvictoria.gonzalez@usc.es

La embriogénesis somática es una herramienta muy útil para aplicaciones biotecnológicas en la vid, así como para estudios fisiológicos. En trabajos previos se observó que el estrés hídrico aplicado a embriones somáticos de vid 'Mencía' alteraba los niveles endógenos de ácido abscísico (ABA) y poliaminas (Acanda et al. 2020; Domínguez et al. 2023). Además, también se observaron cambios en la expresión de genes implicados en el metabolismo de dichas moléculas. Esta información nos ha llevado a estudiar el efecto a corto plazo del ABA exógeno sobre la expresión de genes de los metabolismos de ABA y poliaminas en embriones somáticos de vid 'Mencía' bajo condiciones de estrés hídrico impuestas por PEG.

Con este objetivo, masas de embriones somáticos mantenidos en medio de inducción (Acanda et al. 2013) se transfirieron a medio suplementado con 6% PEG donde se cultivaron durante 48 horas. A continuación, los embriones se pasaron al mismo medio sin PEG. Al inicio del experimento, la mitad de los cultivos se trataron con 50 µL de una solución de ABA 20 µM, y la otra mitad fueron tratados con agua destilada como control. Cada 24 h se cuantificó en muestras de estos cultivos el contenido hídrico de los embriones somáticos, y los niveles de expresión relativa de genes del metabolismo de ABA (*VvNCED1*, *VvHyd2*, *VvUGT* y *VvBG2*) y de la biosíntesis de poliaminas (*VvADC* y *VvSAMDC*).

Los resultados mostraron que el ABA exógeno alteró el patrón de expresión de todos los genes analizados, pero especialmente de aquellos implicados en la biosíntesis de ABA (*VvNCED1* y *VvBG2*) y poliaminas (*VvADC* y *VvSAMDC*). Los resultados indicaron la existencia de una interacción y regulación compleja entre los metabolismos de ABA y poliaminas. En esta interacción el ABA parece dirigir la respuesta relacionada con estrés hídrico regulando tanto sus propios niveles como los de las poliaminas.

## Referencias

Acanda Y, Martínez Ó, Prado MJ, González MV, Rey M (2020) Changes in abscisic acid metabolism in relation to the maturation of grapevine (*Vitis vinifera* L., cv. Mencía) somatic embryos. *BMC Plant Biology* 20: 487.

Acanda Y, Prado MJ, González MV, Rey M (2013) Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 49: 276-284.

Domínguez C, Martínez Ó, Nieto Ó, Ferradás Y, González MV, Rey M (2023) Involvement of polyamines in the maturation of grapevine (*Vitis vinifera* L. 'Mencía') somatic embryos over a semipermeable membrane. *Sci. Hortic.* 308: 111537.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Aplicación de luces LED en el cultivo *in vitro* de alcornoque**

Inmaculada Hernández, Carolina Kremer, Eva Friero, María Contreras, Celina Villarreal, María De La Cruz Amorós, Mar Ruíz-Galea

*Departamento Investigación Agroambiental, Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA), Finca El Encín, Autovía A2, km. 38,2. 28805 Alcalá de Henares, Madrid.*

Email de contacto: inmaher.sanchez@madrid.org

En los últimos años ha ido en aumento el uso de sistemas de iluminación por diodo emisor de luz (LED) para la producción de plantas mediante cultivo *in vitro*. Resulta una fuente de luz más versátil, eficiente y adaptable a los cultivos, ofreciendo la posibilidad de mejorar la producción y calidad de las plantas. Las luces LED permiten la emisión de luz a determinadas longitudes de onda, facilitando la elección del espectro específico más adecuado para cada fase del desarrollo de las plantas (Barceló-Muñoz et al 2022).

El IMIDRA en este trabajo estudia el efecto de la iluminación LED en cada fase del protocolo de regeneración de alcornoques selectos vía embriogénesis somática (Hernández et al, 2022), con el objetivo de mejorar su productividad y rentabilidad, lo que permitiría la transferencia de los conocimientos adquiridos a las empresas y profesionales del sector.

Se utilizaron tubos LED OSRAM SubstiTUBE®; cool daylight 16,4W (B) y tubos LED BLUELed; especial horticultura 18W (R). Se estudió el efecto del uso de cuatro combinaciones de tres tubos LED (BBB, RRR, BRB y RBR) sobre las fases de proliferación y germinación de los embriones y aclimatación de las plantas somáticas de líneas embriogénicas procedentes de alcornoques adultos. Como control se utilizó la iluminación habitual con 4 fluorescentes (combinación alterna de Sylvania Gro-Lux® y Philips cool-white). Los datos se obtuvieron tanto de embriones aislados a partir de líneas embriogénicas que habían proliferado con luces fluorescentes y resto de las fases bajo luces LED, como de embriones en los que se aplicó la iluminación LED durante todo el proceso. El tipo de iluminación influyó en la producción de embriones somáticos aislados durante la proliferación de los cultivos embriogénicos, obteniendo los mejores resultados con las combinaciones BBB, BRB y RBR según genotipo. La iluminación y el genotipo también influyeron significativamente en la germinación de los embriones y en la aclimatación de las plantas somáticas cuando las líneas embriogénicas habían proliferado bajo luces LEDs. Las combinaciones BRB y RBR mejoraron la supervivencia en la mayoría de los genotipos estudiados.

Los resultados demuestran que es posible usar la iluminación LED en la clonación de alcornoques adultos mediante embriogénesis somática, pudiéndose mejorar la producción de la planta somática obtenida.

## Referencias:

Barceló-Muñoz et al 2022. Effect of LED lighting on physical environment and microenvironment on *in vitro* plant growth and morphogenesis: the need to standardize lighting conditions and their description. *Plants* 11, 60.  
Hernández et al 2022. Guía para la micropropagación de alcornoques seleccionados. En: Guía para la micropropagación, selección y evaluación de alcornoques resistentes a *Phytophthora cinnamomi*, pp.33-49. ISBN:978-84-17884-29-1.

Agradecimientos: Proyecto FP21-LED financiado por IMIDRA. M. Contreras es beneficiaria de una ayuda de formación del IMIDRA.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Efecto de la adaptación de las cámaras de cultivo *in vitro* a la iluminación LED, sobre las condiciones ambientales y microambientales de temperatura y humedad de los cultivos**

Alfonso Gago-Calderon<sup>1</sup>, Jose R. Andres-Díaz<sup>1</sup>, Marta Barceló-Muñoz<sup>2</sup>, Araceli Barceló-Muñoz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Expresión Gráfica, Diseño y Proyectos, Escuela de Ingenierías Industriales, Universidad de Málaga, C/ Arquitecto Francisco Peñalosa n°6, 29061 Málaga, España.

<sup>2</sup> Mejora de plantas y Biotecnología, IFAPA Centro de Málaga, Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Málaga, España.

Email de contacto: [araceli.barcelo@juntadeandalucia.es](mailto:araceli.barcelo@juntadeandalucia.es); [agago@uma.es](mailto:agago@uma.es)

Desde principios del siglo XXI, las lámparas fluorescentes de las cámaras de cultivo comienzan a ser sustituidas por lámparas LEDs que ofrecen la posibilidad de seleccionar longitudes de onda específicas para cada proceso o especie. La utilización de LEDs ha hecho que la luz pase de ser un factor determinante, pero con poca capacidad de manipulación, a un componente que puede ser configurado específicamente para controlar y manipular el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*.

Barceló et al. (2022) señalaron cómo debían ser descritas las condiciones de iluminación cuando se utiliza tecnología LED y qué factores ambientales se veían afectados al hacerlo, siendo la temperatura uno de los principales.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al comparar las condiciones de temperatura de los cultivos en un sistema experimental con iluminación fluorescente GROLUX frente a iluminación LED con un espectro equivalente al anterior. Ambos suministraban el mismo PPF, 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Barceló et al., 2022).

La cámara de cultivo contaba con una unidad de aire acondicionado programada para conseguir una temperatura de 25°C (+/-2°C), la renovación forzada del aire se producía dos veces al día y el fotoperíodo era de 16 horas.

Se tomaron medidas experimentales de temperatura en el interior y exterior de tres tipos de contenedores comúnmente utilizados en cultivo *in vitro*, frascos Magenta (350 ml), placas Petri (94 mm Ø x 15 mm) y tubos de ensayo de vidrio (25 x 150 mm). Las medidas se realizaron cada 120 s durante un tiempo mínimo de 2'5 días con un registrador de 4 canales de sondas termopares utilizando sensores tipo K.

Los resultados mostraron grandes diferencias entre las medidas de temperatura y la condensación entre los dos sistemas de iluminación.

## Referencias:

Barceló-Muñoz, A.; Barceló-Muñoz, M.; Gago-Calderon, A. Effect of LED Lighting on Physical Environment and Microenvironment on In Vitro Plant Growth and Morphogenesis: The Need to Standardize Lighting Conditions and Their Description. *Plants* 2022, 11, 60. <https://doi.org/10.3390/plants11010060>

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AVA2019-008 y PID2021-127464OR-I00.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Protocolo para la propagación in vitro de ejemplares saneados de *Cynara scolymus* cv. “Blanca de Tudela”**José Ángel Medina Espallardo<sup>1</sup>, Josefa Fernández Fernández<sup>2</sup><sup>1</sup> Viveros Nurfruits SL, Caravaca de la Cruz, Murcia, Spain<sup>2</sup> Invisa Biotecnología Vegetal SL, Caravaca de la Cruz, Murcia, Spain

Email de contacto: pfernandez@invisa-bio.com

La importancia del cultivo de alcachofa en España e Italia y su tradicional forma de propagación vegetativa a través de un propágulo obtenido de plantas envejecidas de los mismos terrenos agrícolas sin tener en cuenta una selección clonal de la misma variedad, está ocasionando en el sector dos problemas interrelacionados: Una bajada de rendimiento productivo de la plantación y una difusión sin control de enfermedades, como pueden ser las virosis y hongos. Debido a ello, comenzó en Invisa Biotecnología Vegetal un proyecto de saneamiento y propagación en escala de la variedad de alcachofa Blanca de Tudela.

Inicialmente, se llevó a cabo introducción de material a través de tejido meristemático de plantas adultas de una finca comercial, el cual se fue cultivando en un medio estándar con MS y citoquininas en ciclos de 21 días de duración hasta su posterior brotación y proliferación; donde fue transferido a medios con base nutricional DKW y una relación hormonal 0.7mg/L BAP / 0.1mg/L IBA. Una vez conseguida la proliferación, se diseñó una fase intermedia con el fin de que la planta amortiguara el cambio de unas citoquininas elevadas a la alta concentración de auxina para el enraizamiento. Se consiguió que los explantos en esta fase disminuyeran considerablemente la vitrificación que podían desarrollar durante su proliferación.

Por último, se evaluaron diferentes medios de enraizamiento con diferentes auxinas y concentraciones, además de la variación en el tiempo de cultivo. Tras estos ensayos, se determinó que el mejor medio de cultivo para esta fase consistía en un MS con concentraciones de IBA entre 4-6 mg/L y carbón activo, obteniendo tasas de enraizamiento de hasta el 74%.

En este proyecto se trabajaron 9 líneas clonales in vitro, de las que posteriormente fueron seleccionados 3 clones para llevar a cabo el proceso productivo. El más numeroso de ellos, se analizó mediante RT-PCR para detectar la presencia de *Potyvirus* (TSWV y CMV) y mediante qPCR, para detectar la presencia de *Fusarium spp*, *Phytophthora spp* y *Verticilium spp*, obteniendo la ausencia de cada uno de estos patógenos.

Tras la puesta a punto del protocolo de micropropagación, diseñamos un sistema de trabajo para abordar un potencial de crecimiento en escala tras el segundo año de proyecto de hasta 30.000 plantas por temporada provenientes de un único clon seleccionado como nuestro material élite.





## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Desarrollo de protocolos *in vitro* para la obtención de plantas de *Vitis vinífera* libres de virus**

Ander Castander-Olarieta<sup>1</sup>, Ana Herrán<sup>1</sup>, Itziar A. Montalbán<sup>1</sup>, Alexey Pestryakov<sup>2</sup>, Nina Bogdanchikova<sup>3</sup>, Miguel Barbarin<sup>4</sup>, Carlos Lucea<sup>4</sup>, Paloma Moncaleán<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Dpto. Ciencias Forestales, Neiker-BRTA, Centro de Arkaute, N-104 km. 355; 01192 Arkaute (Álava).

<sup>2</sup> Dpto. of Technology of Organic Substances and Polymer Materials, Tomsk Polytechnic University, Tomsk, 634003, Russian Federation.

<sup>3</sup> Center for Nanosciences and Nanotechnology, National Autonomous University of Mexico, Ensenada, 82763, Mexico.

<sup>4</sup> Viveros Villanueva. C/Vista Alegre s/n. 31251 Larraga (Navarra).

\* Email de contacto: pmoncalean@neiker.eus

La vid (*Vitis vinífera*) representa uno de los cultivos más importantes de España, solo por detrás del cereal y el olivo. Con cerca de 1.000 millones de hectáreas, las plantaciones de vid no solo están destinadas a uva de mesa, sino que son también la base de un sector de gran relevancia socio-económica para el país, como es el sector vitivinícola. Dentro de este mercado, España es puntero en términos de producción, consumo y exportación.

Además de las adversidades derivadas del cambio climático, como los largos periodos de sequía o el aumento en la frecuencia de anomalías térmicas, las cuales están afectando ya a día de hoy a la productividad de las plantaciones de vid, el estado sanitario de los viñedos puede ser un factor determinante para el éxito del sector. En concreto, se sabe que los virus de la vid afectan de forma directa a la producción y calidad de la uva, y alteran el ciclo vegetativo de la planta. Además, los virus tienen un efecto debilitante, lo que convierte a las plantas en más susceptibles a todo tipo de estreses, y, por tanto, acentúan los efectos negativos del cambio climático. A esto hay que sumarle que a día de hoy no se dispone de tratamientos específicos para estos patógenos. Por todo ello, resulta de gran importancia tanto la obtención de vides libres de virus, como garantizar la sanidad de las plantas que se producen y comercializan, ya que éstas se suelen conseguir mediante multiplicación vegetativa. A este respecto, desde 2005 la legislación española solo permite la comercialización de plantas de vid certificadas como libres de virus, y en los últimos años cada vez se está ejerciendo más presión desde Europa para asegurar dichos estándares sanitarios. En este sentido, el cultivo *in vitro* ofrece un amplio abanico de soluciones que ya se han demostrado ser efectivas en más o menos grado: cultivo de meristemos, termoterapia, crioterapia, aplicación de agentes viricidas, embriogénesis somática, etc.

Desde Neiker, respondiendo a la creciente demanda del sector que se encarga de la producción y comercialización de plantas de vid, y basándonos en nuestra experiencia previa en diferentes técnicas de micropropagación, hemos puesto en marcha un proyecto para el desarrollo de protocolos de saneamiento de vid *in vitro*, probando y combinando técnicas ya descritas, con nuevas metodologías. Nuestros resultados indican que mediante el cultivo de ápices de vid en medio de cultivo líquido con diferentes formulaciones de nanopartículas de plata se pueden obtener tasas relativamente altas de saneamiento (50%), al igual que con altas concentraciones de ribavirina (50 mg l<sup>-1</sup>). Sin embargo, para conseguir estos valores, se requieren de largos periodos de exposición (4-5 semanas), lo que ralentiza el proceso y debilita las plantas, que requieren de una larga fase de recuperación, en el mejor de los casos. Por el contrario, mediante el uso combinado de nanopartículas de plata y dosis más bajas de ribavirina se pueden acortar tiempos, reducir la tasa de mortalidad y conseguir hasta un 60% de plantas libres de virus.

Agradecimientos: A Viveros Villanueva por la financiación de este trabajo.



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Combinación de tratamientos para la eliminación de patógenos en plantas de albaricoquero micropropagadas**Cristian Pérez-Caselles<sup>1</sup>, Elena Yelo<sup>1</sup>, Lorenzo Burgos<sup>1</sup>, Marina Martín-Valmaseda<sup>1</sup>, Nuria Alburquerque<sup>1</sup><sup>1</sup> Grupo de Biotecnología de Frutales, Departamento de Mejora Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, Edificio N°25, 30100 Murcia.

Email de contacto: cperez@cebas.csic.es

El albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.) es uno de los principales cultivos de la Región de Murcia. En las plantaciones de este frutal es frecuente la incidencia de enfermedades como la Sharka (*Plum pox virus*, PPV) y *Hop stunt viroid* (HSVd). La técnica que se ha usado tradicionalmente para la limpieza del material vegetal es el rescate de meristemos. Sin embargo, algunos virus y viroides son capaces de infectar la región meristemática y es necesario la aplicación de un tratamiento que evite la rápida expansión de los patógenos. La termoterapia consiste en someter a las plantas a temperaturas elevadas y la elección de un régimen de rango de temperaturas y tiempo de aplicación es primordial para conseguir una alta supervivencia de plantas y, al mismo tiempo, la inactivación o ralentización del patógeno. Por otra parte, el cultivo de plantas en oscuridad favorece una rápida elongación de los tallos estimulada por la falta de luz, por lo que es más difícil para el patógeno alcanzar el meristemo. El objetivo de este trabajo es la producción de plantas de albaricoquero libres de virus y viroides mediante la aplicación de termoterapia, cultivo en oscuridad o ambos, combinado con un rescate de meristemos.

El experimento de termoterapia consistió en cultivar brotes de las variedades 'Canino', infectados con PPV, y 'Mirlo Rojo', infectados con HSVd, con un régimen de altas temperaturas que se alternaban entre 32 °C y 38 °C cada 4 horas durante 30, 35, 40 y 45 días. El experimento de oscuridad consistió en cultivar brotes de ambas variedades en total ausencia de luz durante 8 semanas en una cámara de cultivo a 23 ± 1 °C. Además, se comprobó la efectividad del tratamiento de oscuridad combinado con 45 días de termoterapia. Al finalizar los tiempos de exposición de cada tratamiento se realizó un rescate de meristemos. A las 12 semanas se tomaron hojas de los brotes supervivientes para realizar un análisis por RT-PCR y evaluar la presencia o ausencia de PPV o HSVd, en cada caso. Tras 12 semanas adicionales, se volvió a realizar un análisis por RT-PCR a aquellos brotes libres de patógeno para confirmar los resultados.

El tratamiento de termoterapia consiguió eliminar el HSVd de 'Mirlo Rojo' tras 40 y 45 días de exposición, mientras que se encontraron plantas de 'Canino' libres de PPV en todos los tratamientos. El tratamiento de oscuridad permitió la producción de plantas libres de HSVd y PPV con bajas eficiencias (7% y 28%, respectivamente). La supervivencia de los meristemos en el tratamiento combinado fue muy baja, pero tuvo una gran eficiencia respecto a la eliminación de los patógenos tanto en 'Mirlo Rojo' como en 'Canino' (28% y 75%, respectivamente). Aquellos brotes libres de virus y viroide se enraizarán y aclimatarán para una última evaluación *ex vitro*.

Palabras clave: termoterapia, etiología, oscuridad, rescate de meristemos.

Agradecimientos: C. Pérez-Caselles cuenta con una Beca de Formación del Personal Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU19/03767) y M. Martín-Valmaseda con una beca JAE-Intro (JAEINT\_22\_00399). Este estudio forma parte del Programa AGROALNEXT que ha sido financiado por MCIN con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17.11) y por la Fundación Séneca con fondos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM).



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Olivos tetraploides: una nueva estrategia en la mejora**

Laia Ribalta Campos, José Ángel Mercado Carmona, Fernando Pliego-Alfaro, Elena Palomero-Ríos

*Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (IHSM-UMA-CSIC), Departamento de Botánica y Fisiología Vegetal, Universidad de Málaga, 29071 Málaga, España.*

Email de contacto: ribalta@uma.es

En la última década, los sistemas de cultivo del olivar han experimentado modificaciones significativas, con cambios progresivos del sistema tradicional al intensivo. Esta transición supone un aspecto crucial para la rentabilidad del cultivo. Las investigaciones más recientes se han enfocado en la obtención de plantas con porte reducido, y capacidad de adaptación frente a condiciones de estrés biótico y abiótico. Con este objetivo se abordó la obtención de plantas tetraploides en olivo a partir de cultivos embriogénicos de la línea P1, derivada de la radícula de un embrión zigótico maduro del cultivar Picual (Ribalta et al. 2021, *XIV Reunión de la SECIVTV*, p. 82, Almería). Se obtuvieron tres líneas independientes (32, 33 y 44) tras la exposición del callo embriogénico a 0,1% de colchicina durante 2 días. El análisis de ploidía mediante citómetro de flujo (PA-II Ploidy Analyzer; Partec) se realizó en el callo embriogénico y, posteriormente, en hojas de plantas regeneradas. Actualmente, se está realizando el conteo del número de cromosomas en células de ápices de raíz de plántulas *in vitro* siguiendo la metodología de Rugini et al. 1996 (*Plant Breeding* 115, 23–27), para confirmar su tetraploidía. Estas plantas se enraizaron y aclimataron junto con el control, sin encontrar diferencias en la capacidad de enraizamiento, que fue del 100%, aunque sí se observó un mayor engrosamiento en las raíces de las plantas tetraploides. Transcurridos 4 meses tras su aclimatación en invernadero, se fenotiparon las plantas teniendo en cuenta variables morfológicas y anatómicas. El área foliar de las plantas tetraploides fue significativamente mayor en las líneas 33 y 44 en comparación al control. La longitud del tallo fue significativamente menor en las tres líneas tetraploides, verificando el porte reducido característico de los poliploides, así como una mayor longitud de entrenudos para la línea 32, debido a que las tetraploides presentaron un número significativamente menor de nudos que la línea control P1. No se observaron diferencias significativas en el diámetro del tallo entre las tetraploides y el control. Como característica anatómica se estimó la densidad estomática, que resultó ser significativamente menor en las tetraploides. Finalmente, se utilizó un fluorímetro de pulso de amplitud modulada (JUNIOR-PAM; Walz) para caracterizar el aparato fotosintético. Los resultados obtenidos indican que la línea 32 tenía afectado el funcionamiento del fotosistema II, mostrando una disminución de la ratio Fv/Fm y valores menores en todos los parámetros de las curvas de ETR vs luz. El resto de las líneas tetraploides mostraron valores de actividad del fotosistema II similares al control.

Los resultados de este trabajo confirman la obtención de plantas tetraploides en olivo, aunque deben realizarse estudios adicionales a nivel fisiológico para una caracterización más completa.

Proyectos AGL2017-83368-C2-1-R, P18-RT-1933, UMA18-FEDERJA-096



## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Caracterización de variantes somaclonales de olivo  
obtenidos tras la exposición al filtrado crudo del hongo  
*Rosellinia necatrix***Clara Pliego<sup>1</sup>, Isabel Narváez<sup>2</sup>, Ana Moreno-Pérez<sup>1</sup>, José Ángel Mercado<sup>2</sup>, Fernando Pliego-Alfaro<sup>2</sup>, Elena Palomo-Ríos<sup>2</sup><sup>1</sup> Dpto. de Genómica y Biotecnología (IFAPA), Fruticultura Subtropical y Mediterránea Unidad Asociada de I + D + i al CSIC, 29140 Málaga.<sup>2</sup> Dpto. de Botánica y Fisiología Vegetal, Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora", IHSM -UMA- CSIC. Av. Louis Pasteur, 49, 29010 Málaga.

Email de contacto: epalomorios@uma.es

Líneas embriogénicas de olivo tolerantes al filtrado crudo (FC) del hongo *Rosellinia necatrix*, un patógeno muy extendido por el sur de España y que afecta al aguacate y al olivo, fueron previamente obtenidas (Palomo-Ríos et al. 2017). Para ello, se expuso durante 3 semanas una fracción fina de callo embriogénico de olivo (<2 mm), derivado de un embrión zigótico de la variedad Picual, a diferentes concentraciones (v/v) de FC de *R. necatrix*. Como resultado, se recuperaron varias líneas de callo embriogénico que mostraron tolerancia de forma reiterada a la exposición al filtrado. Dos de estas líneas fueron seleccionadas para la regeneración de plantas, R2-L3 y R2-L4, ambas tolerantes al 60% (v/v) del FC del hongo. En este trabajo se ha llevado a cabo una caracterización del crecimiento de estas plantas y de su comportamiento tras la inoculación con *R. necatrix*.

Las líneas seleccionadas mostraron la misma tasa de multiplicación *in vitro* que el control P1 (plantas obtenidas a partir de callo embriogénico no expuesto al FC del hongo), aunque la longitud de los brotes formados por la línea R2-L4 fue significativamente menor que el control, mientras que no se observaron diferencias en la capacidad de enraizamiento entre las distintas líneas. Estas plantas fueron aclimatadas y mantenidas en el invernadero para su inoculación con *R. necatrix*, donde siguieron mostrando ciertas diferencias en la longitud de los tallos, siendo R2-L3 la de mayor longitud seguida del control P1 y por último R2-L4; esta última presentó un mayor número de ramas laterales. Se inocularon con *R. necatrix* 17 plantas de cada genotipo y se evaluó la progresión de la enfermedad. A los 40 días tras la inoculación, la línea R2-L3 mostró un desarrollo de síntomas del 50%, significativamente menor al observado en el control P1 y en la línea R2-L4. Se realizaron perfiles de expresión mediante RNAseq en plantas de esta línea tras la infección con *R. necatrix* en comparación con plantas no infectadas, encontrándose la expresión diferencial de 6.186 genes. Entre los genes inducidos tras la infección con el hongo se encontraron algunos previamente relacionados con la defensa de aguacate frente a la Podredumbre blanca de raíz (causada por el hongo *Rosellinia necatrix*) (Moreno-Pérez et al. 2023), algunos de estos genes fueron proteínas PR, factores de transcripción tipo NAC, inhibidores de proteínasa y un factor de transcripción de respuesta a etileno, entre otros.

Proyecto AGL2017-83368-C2-1-R

## Referencias:

Moreno-Pérez, A., Zumaquero, A., Martínez-Ferri, E., López-Herrera, C., Pliego-Alfaro, F., Palomo-Ríos, E., Pliego, C. (2023) A Comparative Transcriptome Analysis of Avocado Embryogenic Lines Susceptible or Resistant to *Rosellinia necatrix* Exudate. *Agronomy* 13, 1354.Palomo-Ríos, E., Peláez, A., Cerezo, S., Khayreddine, T., López-Herrera, C., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. (2017) Evaluación del efecto del filtrado crudo del hongo *Rosellinia necatrix* en el crecimiento de brotes y cultivos embriogénicos de olivo. XII Reunión SECIVTV, 13-15 Septiembre 2017, Poster 30, Madrid.





## Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Análisis funcional de genes relacionados con mecanismos de tolerancia a *Phytophthora cinnamomi* en alcornoque**

Laura López Candales<sup>1</sup>, Saleta Rico Santos<sup>1</sup>, Beatriz Cuenca Valera<sup>2</sup>, Jesús Vielba Villegas<sup>1</sup>, Nieves Vidal González<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> José Cernadas Cernadas<sup>1</sup>, Purificación Covelo Abeleira<sup>1</sup>, Conchi Sánchez Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Vegetal, MBG Sede Santiago de Compostela, CSIC, Avda de Vigo s/n 15705 Santiago de Compostela (A Coruña).

<sup>2</sup> TRAGSA. Vivero de Ourense. Ctra Maceda-Valdrey Km 2. 32700 Maceda. Orense.

Email de contacto: nieves@mbg.csic.es

*Quercus suber* es un árbol de hoja perenne de gran importancia ambiental y económica en la península ibérica, especialmente por la explotación de su corteza de la que se obtiene el corcho. En las últimas décadas, las poblaciones de alcornoques han sufrido un fuerte descenso asociado a la enfermedad de la seca, producida por el oomiceto patógeno *Phytophthora cinnamomi*.

Los árboles muestran diferentes niveles de susceptibilidad a la infección por *P. cinnamomi*, lo que parece indicar un control genético en la tolerancia a la infección, aunque aún no están claros los mecanismos involucrados en este proceso. Como hipótesis de partida de este trabajo se postula que la resistencia a *P. cinnamomi* tiene una base genética y que la respuesta a la infección desencadena una serie de modulaciones de genes clave para luchar contra el oomiceto.

Con el objetivo de estudiar el posible papel de los genes en los mecanismos de defensa de alcornoque a la enfermedad de la seca, comparamos la respuesta fisiológica *in vitro* de una línea caracterizada como tolerante (QS-T), una línea de brotes obtenida a partir de embriones somáticos de un árbol adulto de alcornoque (QS3-W) y dos líneas QS3 transformadas con los genes *Scarecrow-like 1* (QS3-SCL-1) y *Crown preferentially expressed* (QS3-CPE), respectivamente. Las plántulas enraizadas se inocularon *in vitro* con fragmentos de micelio de *P. cinnamomi*, y se evaluaron diferentes parámetros morfológicos relacionados con la aparición de síntomas tras la inoculación. Además, se analizó la expresión génica de los genes de estudio mediante RT-qPCR en raíces de las diferentes líneas de brotes inoculados y no inoculados a diferentes tiempos tras la inoculación.

Los resultados muestran un retraso en la aparición de síntomas en las plantas transformadas y en la línea resistente. Los análisis de qPCR muestran una inducción del gen *SCL-1* en todas las líneas, mostrando una correlación positiva entre la sobreexpresión del gen y el grado de tolerancia. El gen *CPE* se sobreexpresa en la línea tolerante. Los resultados indican que la inoculación provoca un cambio en el patrón de expresión génica de los brotes y esta activación transcripcional está asociada un mayor nivel de resistencia del clon. Este trabajo contribuye a la ampliación del conocimiento existente sobre los mecanismos de respuesta del alcornoque a la infección por *P. cinnamomi*.



## Efecto de la temperatura durante la embriogénesis somática en el establecimiento de una memoria epigenética a largo plazo en *Picea abies*

Marcos Viejo Somoano<sup>1,2</sup>, Igor Yakovlev<sup>2</sup>, Torstein Tengs<sup>2,3</sup>, Jorunn E. Olsen<sup>2</sup>, Carl Gunnar Fossdal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Funcional, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Rúa Lópe Gómez de Marzoa, 15, 15705, Santiago de Compostela.

<sup>2</sup> Department of Molecular Plant Biology, Norwegian Institute of Bioeconomy Research, 1433 Ås, Norway.

<sup>3</sup> Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research (NOFIMA), 1433 Ås, Norway.

Email de contacto: marcos.viejo@usc.es

Parte de la capacidad de adaptación climática del abeto noruego (*Picea abies* Karst.) reside en una memoria epigenética que los individuos desarrollan durante su etapa embriogénica en función de la suma de temperatura durante ese periodo. En esta especie, de gran longevidad, esa memoria tiene un efecto en el tiempo en que tienen lugar dos caracteres ligados a la supervivencia: la fenología de las yemas (tiempo de brotación en primavera) y la tolerancia al frío (pérdida de la tolerancia durante la salida de dormición).

Para imitar el efecto de la temperatura y eliminar la variabilidad genética, se generaron individuos clónicos *in vitro* a partir de embriones somáticos. Estos embriones se desarrollaron a 18 y 28 grados, y los árboles resultantes, llamados epitipos, han crecido en una parcela común durante 18 años. El efecto de la memoria epigenética en los árboles pertenecientes a los epitipos se ha caracterizado fenotípicamente y a nivel transcriptómico, y los resultados obtenidos apoyan la existencia de esa memoria epigenética.

Con el objetivo de conocer dónde reside y se establece la memoria epigenética, se analizó la metilación del ADN de embriones somáticos maduros generados a 18 y 28 °C. Debido a la complejidad y baja calidad de la anotación del genoma del abeto noruego, se utilizó una técnica gen-específica que permitió analizar los patrones de metilación en 2744 genes relacionados, entre otros procesos, con la fenología, los ritmos circadianos y la maquinaria epigenética. El 68% de los genes analizados mostraron patrones diferenciales de metilación en al menos uno de los contextos de metilación propios de plantas (CG, CHG, CHH). En varios genes relacionados con la maquinaria epigenética (e.g. Metiltransferasas de ADN, ARGONAUTE) y el control de la fenología de las yemas (genes FTL) se observaron diferencias en su metilación entre epitipos y diferentes partes del embrión.

Por tanto, las condiciones de temperatura en las que se generan los epitipos inducen una memoria epigenética que está implicada en patrones de metilación del ADN específicos en embriones somáticos de abeto noruego. El impacto de esta conformación epigenética de los embriones somáticos de los epitipos en la fenología de las plantas a lo largo de los años demuestra la participación de la metilación del ADN no sólo en la memoria epigenética sino que también pone de manifiesto su importancia para modelar respuestas adaptativas rápidas a los cambios sostenidos de temperatura en el ambiente.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Doubled haploids, a game changer in potato breeding**Núria Alegret-Badia

HZPC Research B. V., The Netherlands.

Email de contacto: nuria.alegretbadia@hzpc.com

Potato is the third most consumed crop worldwide. Moreover, it is an autotetraploid species with a highly heterogeneous genome that displays a great genetic complexity for breeding. Potato has been traditionally bred by clonal breeding; a slow, non-accumulative process, which end result are true seed potatoes. A more promising approach is arising with the development of breeding on the diploid level, supported by the use of doubled haploids. Diploid hybrids can speed up the breeding program, can facilitate the stacking of several interesting traits and their end product is a seed, which is easier to transport and has little disease pressure.

A diploid hybrid potato is a combination of two inbred parentals that create a uniform product, and by definition it has an enhanced performance by means of exploiting the heterosis effect. The parental inbred lines can be obtained through several mechanisms such as crosses with an haploid inducer followed by routine inbreeding, androgenesis and gynogenesis.

Microspore culture is an androgenic technique in which the male sexual gametes are cultivated under several stresses. These stresses induce the arrest of the pollen development and induce the so-called androgenic switch, in which the microspore follows the embryogenic developmental pathway to form a plant without need of fertilization. The resulting plants contains exactly the same genetic information as the initial microspore. Therefore, they have half of the ploidy of the parental lines. Doubling a haploid plant will result in a doubled haploid plant with two copies of the exact same genome and thus, a perfectly homozygous inbred line.

Several factors have been reported as relevant for the microspore culture process to occur. The optimal growth of the donor plants, selecting the correct stage of the microspores, an adequate induction stress and an adequate media and culture conditions are all key parameters. However, the anther culture technology in potato still faces some challenges and limitations in its responsiveness. Microscope observations show the arrest of viable microspores after the pretreatment, sometimes accompanied by cell bursting or cell death shortly after. Besides, it is claimed that obtained doubled haploid plants show often male sterility, being a burden for the hybrid production. Further research on the formerly mentioned hot topics in anther culture will pave the way to achieving doubled haploid production, which would mean a big step forward in potato breeding.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

***In vitro* Prunus spp. immature embryo rescue: protocol, cost reduction, and efficiency improvements**

Maria Casanovas<sup>1</sup>; Daniel Cantabella<sup>3</sup>, Cristina Solsona<sup>2</sup>, Neus Teixidó<sup>2</sup>, Ramon Dolcet-Sanjuan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Fruticulture Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.*

<sup>2</sup> *Postharvest Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.*

<sup>3</sup> *Environmental Technologies Unit, BETA, UVic-UCC, Campus Can Baumann, 08500 Vic, Spain.*

Contact Email: ramon.dolcet@irta.cat

*In vitro* immature embryo rescue from *Prunus* spp., early ripening varieties, is a common and reliable technique, sometimes the only one, to provide new plant material to breeding programs oriented to produce diverse new early ripening commercial varieties.

The IRTA's Plant in Vitro Culture Laboratory at Fruitcentre, has continuously worked on developing an efficient, cost reduced and reliable protocol, for the embryo rescue of early ripening peaches and nectarines. During eight consecutive seasons (2014-2021), some modifications have been added to the *Prunus* spp. immature embryo rescue process in order to improve its efficiency and inputs needed. The rescue of almost 28000 embryos included 3 peach types (yellow peach, white peach and pavia), 2 nectarine types (yellow and white flesh nectarine); and 3 flat fruit types, including yellow and white flesh flat peach and white flesh flat nectarine.

Fruits derived from controlled pollinated crosses on an experimental collection plot located at the IRTA Experimental Station (Gimenells, Lleida, Northeast Spain) were collected, opened and the whole seeds were extracted, disinfected, and cultured in different media. The medium composition was adapted to the embryo size, which is one of the main factors affecting embryo germination. Embryos smaller than 5mm were cultured in a semisolid medium with 5µM BAP and 1µM GA<sub>3</sub>, while embryos bigger or equal to 5mm were cultured in semisolid medium without hormones. After *in vitro* cold stratification at 4°C, contaminated embryos were removed, germination ratio was determined and temperature was increased up to 14°C, at a 16/8h photoperiod, for the initial plantlet growth for 1 month. Later, the temperature was increased up to 24°C, for further plant development. When plantlets showed a visible root and stem, more than 4-cm-long, were planted in trays with a peat moss:vermiculite mix substrate (2:1, v/v) and acclimated in tunnels with controlled humidity, temperature and light. The addition of vermiculite to the culture medium in bigger peach and nectarine embryos was tested. Although the use of medium with vermiculite had no significant effect on the germination of bigger embryos, of neither of the fruit types, it improved plantlets development, both in the aerial and non-aerial parts. This medium permitted to extend *in vitro* culture for the necessary time, with the addition of liquid medium, before the acclimatization, making it more flexible. To reduce material costs, a glass container from the food industry with a plastic layer as a closure system was tested with bigger embryos, employing the medium with vermiculite. The use of this glass container reduced a 96% the material cost compared with the use of laboratory glass test tubes. Moreover, no differences between them were observed during both embryo germination and plant development. Considering the overall process, embryos from nectarine, peach, and flat fruits developed into viable plants, ready to be transplanted to the field, in a 53%, 42% and 21% respectively of the uncontaminated cultured embryos.

The bacterium *Pseudomonas oryzaehabitans* PGP01, was initially isolated from *Prunus* spp. *in vitro* rescued embryos, cultured in vermiculite medium, whose plantlets showed a better growth than non-contaminated cultures. It was identified and cultured, and it was applied later to some immature embryos, cultured *in vitro* under the same conditions. The presence of the PGP01 bacterium modified root system architecture of the plants, increasing root volume and thickness, which in consequence enhanced the acclimatization efficiency to soil.





## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Primeros pasos en el desarrollo de un protocolo de dobles haploides en calabacín (*Cucurbita pepo*): determinación del desarrollo de las microsporas con respecto a la morfología floral**Ana García-Pérez<sup>1</sup>, Malén Escánez García<sup>1</sup>, Edgar García-Fortea<sup>1</sup><sup>1</sup> *Scientific Area, Grupo Beyond, Campus de la Universidad de Almería (UAL), Edificio PITA, Ctra. Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano, 04120 (Almería).*

Email de contacto: ana.garcia@seeds4i.com

JUEVES

Uno de los objetivos clave desde para las empresas del sector de las semillas es el desarrollo de protocolos de obtención de doble haploides eficientes, que les permitan acelerar el proceso de obtención de líneas puras. El cruce de dos líneas puras permite obtener descendientes híbridos heterocigotos para todos sus caracteres. Este tipo de organismos tiene características agronómicas de alto valor, como el vigor híbrido, una mayor resistencia a diferentes tipos de estrés bióticos y abióticos, así como una alta homogeneidad en la cosecha. Tradicionalmente, se han necesitado varios ciclos de autofecundación para poder obtener líneas puras para un determinado cultivo. Este es un proceso largo para el que se necesitan destinar recursos materiales, humanos y económicos. Hoy en día podemos utilizar herramientas biotecnológicas para acortar el tiempo que se necesita para obtener una línea pura. La obtención de dobles haploides es una metodología de cultivo *in vitro* que consiste en obtener plantas homocigotas para todos su *loci* a partir del cultivo de los precursores de los gametofitos masculinos (androgénesis) o femeninos (ginogénesis). Dentro de la vía androgénica, las células más susceptibles a ser inducidas son las microsporas vacuoladas, por lo que tener identificado este estadio de forma clara es esencial para tener éxito en el proceso.

En este trabajo presentamos los primeros pasos en el desarrollo de un protocolo en calabacín mediante la ruta androgénica. Para ello, se ha realizado una caracterización exhaustiva de la morfología de las yemas florales masculinas, así como de las anteras en dos variedades diferentes de calabacín con el fin de encontrar una correlación con el estadio de desarrollo de las microsporas. La mayoría de los estadios del desarrollo del polen han sido identificados gracias a observaciones mediante microscopía óptica y de fluorescencia. Sin embargo, el grosor de la capa de exina es muy elevado en esta especie lo que dificulta identificar estadios avanzados como el de polen joven y polen maduro. Además, la autofluorescencia emitida por la capa de exina imposibilitan observar los núcleos teñidos con DAPI mediante microscopía de fluorescencia. Aun así, en base a diferentes características visuales (opacidad, presencia de espículas, diámetro) hemos sido capaces de establecer una serie de categorías en las que clasificar las microsporas observadas. Para estas variedades vegetales, se ha determinado que el estadio correspondiente a microsporas vacuoladas estará dentro de un rango de 20 a 30  $\mu$ m de longitud de yema floral y entre 5 a 6  $\mu$ m de longitud de antera.

Estos resultados son de gran utilidad para la selección de las ventanas de inducción necesarias para tener éxito en las distintas aproximaciones *in vitro* que se desarrollarán en etapas posteriores de este proyecto.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Opposite auxin dynamics determine the gametophytic and embryogenic fates of the microspore**Yolanda Pérez-Pérez<sup>1</sup>, María Teresa Solís<sup>2</sup>, Alfonso Albacete<sup>3,4</sup>, Pilar S. Testillano<sup>1,\*</sup><sup>1</sup> Pollen Biotechnology of Crop Plants Group, Biological Research Center Margarita Salas, CIB-CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.<sup>2</sup> Department of Genetics, Microbiology and Physiology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.<sup>3</sup> Department of Plant Nutrition, Campus Universitario de Espinardo, 30100 Murcia, Spain.<sup>4</sup> Current address: Institute for Agroenvironmental Research and Development of Murcia (IMIDA), c/ Mayor s/n, 30150 Murcia, Spain.

Email de contacto: testillano@cib.csic.es

During *in vivo* anther development, microspores develop and follow the gametophytic pathway to produce pollen grains. *In vitro*, isolated microspores can be reprogrammed by stress treatments, becoming totipotent cells that follow the embryogenic program, producing doubled-haploid embryos and plants. Limited information is available regarding the dynamics of endogenous auxin during these two microspore pathways. In the present study we analysed, in *Brassica napus*, auxin concentration and cellular accumulation, expression of *TAA1* auxin biosynthesis gene and *PIN1-like* efflux carrier gene, as well as the effects in microspore embryogenesis of kynurenine, an inhibitor of auxin biosynthesis. During the gametophytic pathway, auxin levels, *TAA1* and *PIN1-like* expression were high at early stages, in tetrads and tapetum, while they progressively decreased during gametogenesis in both pollen and tapetum cells. In contrast, after stress-induced microspore reprogramming to embryogenesis, *TAA1* and *PIN1-like* genes were up-regulated, auxin concentration increased and accumulated in embryo cells from the first embryogenic divisions. Kynurenine treatment decreased both embryogenesis induction efficiency and embryo production, indicating that auxin biosynthesis is required for microspore embryogenesis initiation and progression. The findings indicate that auxin shows two opposite profiles during the two microspore developmental pathways that would determine the different cell fates of the microspore.

## References

Pérez-Pérez, Y.; Solís, M.T.; Albacete, A.; Testillano P.S. Opposite auxin dynamics determine the gametophytic and embryogenic fates of the microspore. *International Journal of Molecular Sciences* (2023). Submitted.

## Acknowledgements

Supported by Projects PID2020-113018RB-I00 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), TED2021-129633B-I00 and CPP2021-008750 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and NextGenerationEU/PRTR).



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Aplicación de una estrategia de “priming” en semillas para aumentar la eficiencia de la embriogénesis de la microspora en trigo panadero**

Ana María Castillo Alonso, Begoña Echávarri Razquín, Aimar Navarro Arguedas, Patricia Fustero Abad, Asunción Costar Castán, María Pilar Vallés Braú

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

Email de contacto: amcast@eead.csic.es

JUEVES

La aplicación de tratamientos de estrés recurrentes puede inducir “memoria” celular, permitiendo que la respuesta a un estrés posterior sea más rápida y fuerte. Esta memoria celular es conocida como cebado o “priming” (Sako et al. 2020). En la inducción de la embriogénesis de la microspora es imprescindible la aplicación de un tratamiento de estrés. Solamente aquellas microsporas que sobreviven a ese tratamiento son capaces de cambiar su patrón de desarrollo para dar lugar a un embrión. En este estudio, se evalúa por primera vez la posibilidad de utilizar una estrategia de “priming” para aumentar la eficiencia de la embriogénesis de la microspora en trigo. Para ello, se ha hecho un cribado de distintos compuestos con capacidad de inducir un efecto de “priming”. Las semillas de trigo de las plantas donadoras de anteras se trataron, por separado, con agua,  $\text{CaCl}_2$ , prolina, PEG y ácido acético durante 16 horas en oscuridad, a 20°C y en agitación continua. Posteriormente, se secaron en estufa (35°C) hasta recuperar el peso original de las semillas. El cultivo de anteras se realizó siguiendo los protocolos descritos por Castillo et al. (2021). La aplicación de PEG inhibió la formación de embriones, el agua y la prolina aumentaron la producción de plantas albinas, mientras que el  $\text{CaCl}_2$  y el ácido acético aumentaron el número de plantas verdes. Estos resultados indican que la aplicación de  $\text{CaCl}_2$  y/o ácido acético como tratamiento de “priming” en semillas permitiría aumentar la eficiencia en la producción de plantas verdes doblehaploides de trigo.

## Referencias:

Castillo AM, Valero I, Allué S, Costar A, Vallés MP (2021). Bread wheat doubled haploid production by anther culture. En: Seguí-Simarro JM (Ed) Doubled haploid Technology. Methods in Molecular Biology, 2287, Springer Science+Business Media, LCC, Vol 1, pp,227-244. doi: 10.1007/978-1-0716-1315-3-11.

Sako K, Nguyen HM, Sek, M (2020). Advances in chemical priming to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Physiol*, 61, 1995-2003, doi:10.1093/pcp/pcaa119.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por PID2020-119540RB-I00. Aimar Navarro es beneficiaria del Contrato Predoctoral PRE2021-099847.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Novel small molecule antioxidants improve stress-induced cell reprogramming while decrease autophagy and cell death in rapeseed: a physiology and transcriptomics study**

Cristina Rueda-Varela<sup>1</sup>, Elena Carneros<sup>1</sup>, Yolanda Pérez-Pérez<sup>1</sup>, Elena Caro<sup>2</sup>, Carmen Gil<sup>3</sup>, Ana Martínez<sup>3</sup>, Pilar S. Testillano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pollen Biotechnology of Crop Plants group, Biological Research Centre Margarita Salas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid.

<sup>2</sup> Centre for Plant Biotechnology and Genomics (UPM-INIA-CSIC), Parque Científico y Tecnológico de la UPM, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid.

<sup>3</sup> Translational Medicinal and Biological Chemistry group, Biological Research Centre Margarita Salas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040, Madrid.

E-mail de contacto: testillano@cib.csic.es

JUEVES

Plant *in vitro* regeneration systems are essential in modern crop breeding, they are based in the induction of plant cell reprogramming. In many crop species the process is highly inefficient, being increased cell death a major event that impairs the reprogramming process at initial steps leading to decreased proliferation and embryo formation rate. Stress-induced microspore embryogenesis is an *in vitro* biotechnological process to rapidly obtain doubled-haploid plants to accelerate breeding, as well as a good model system to analyze the physiological and molecular bases of stress-induced plant cell reprogramming. By application of stress conditions, the microspore, precursor cell of the pollen grain, is reprogrammed to produce an embryo that regenerates a plant.

In this work, we have analyzed autophagy and oxidative stress, and their involvement in cell death during microspore embryogenesis induction in the model crop species *Brassica napus*, where cell reprogramming is induced by a treatment of 32°C in cell suspension cultures of isolated microspores. After stress, autophagy genes *BnATG5* and *BnATG8* were upregulated, and NBR1 degraded and accumulated upon E-64 inhibition, indicating autophagy activation. RNAseq-transcriptomics analyses showed sets of autophagy and oxidative stress-related genes differentially expressed after embryogenesis induction, out of which we selected those coding for essential oxidative-related enzymes for further expression analysis. Autophagy inhibition by E-64 reduced cell death, while the autophagy inducer AZD8055 increased death, suggesting an autophagy-dependent cell death. Treatment with novel small molecule antioxidants reduced cell death and promoted embryogenesis initiation, while they lead to *BnATG5* and *BnATG8* downregulation. Additionally, fluorometric detection assays were performed to monitor ROS production after stress induction and under small molecule antioxidants treatments. Results indicate that oxidative stress and autophagy contribute to cell death during stress-induced microspore reprogramming, and that novel small molecule antioxidants can be a new tool to suppress autophagy-dependent cell death, improving *in vitro* embryogenesis efficiency for crop breeding.

Supported by Projects PID2020-113018RB-I00 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), TED2021-129633B-I00 and CPP2021-008750 (funded by MCIN/AEI /10.13039/501100011033 and NextGenerationEU/ PRTR).





## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Obtención de líneas doble haploides para la producción de líneas comerciales**

Mariona Jordana García, Laura Martínez Plantón.

*Laboratorio de cultivo in vitro y mejora vegetal, Departamento I+D, Semillas Batlle S.A.*

mariona.jordana@semillasbatlle.com

Utilizamos la técnica de los doble haploides para reducir el tiempo necesario para la producción y comercialización de líneas comerciales en cebada, trigo blando, melón y leguminosas. Algunos de estos trabajos se realizan en colaboración con el IRTA Fruitcentre para desarrollar la técnica en leguminosas.

En el caso de cebada, hemos llegado a producir 153 líneas doble haploides (LDH) fijadas en semilla mediante el cultivo de anteras y están siendo evaluadas en campo con la finalidad de en un futuro producir líneas comerciales, para la mejora de caracteres agronómicos, producción y resistencias. En el caso del trigo blando, los resultados son esperanzadores, necesitando mejorar la eficiencia de la técnica. En ambas especies necesitamos reducir el porcentaje de plantas albinas.

En el caso del melón la producción de LDH es por rescate de embriones partenogénicos inducidos mediante polinización con polen irradiado con rayos gamma. Las semillas son cultivadas durante una semana en medio líquido para favorecer la identificación de las que tienen embrión. Se ha llegado a producir 63 líneas de las que se han obtenido semillas y están siendo evaluadas en campo para en un futuro producir híbridos piel de sapo, orientadas a la mejora en grados brix, crocantez, caracteres agronómicos, producción y resistencias. Es necesario aumentar el porcentaje de diploides sin la necesidad de utilizar la colchicina, ya que es un riesgo para la salud humana.

En el caso de las leguminosas hasta ahora se ha llegado a inducir callos de los que se ha regenerado solo raíces a partir del cultivo de anteras.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Comparative transcriptome analyses of microspore reprogramming to embryogenesis in *Brassica napus* L.**

Elena Carneros<sup>1</sup>, Natalia García-Sánchez<sup>2</sup>, Cristina Rueda-Varela<sup>1</sup>, Yolanda Pérez-Pérez<sup>1</sup>, Elena Caro<sup>2</sup>, Pilar S. Testillano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pollen Biotechnology of Crop Plants Group, Center of Biological Research Margarita Salas (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

<sup>2</sup> Center for Plant Biotechnology and Genomics (CBGP), UPM-INIA-CSIC, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain.

Corresponding authors: elena.caro@upm.es ; testillano@cib.csic.es

*In planta*, microspores follow the gametophytic program to produce pollen grains for fertilization. *In vitro*, by stress treatment, microspores can be reprogrammed towards embryogenesis. Microspore embryogenesis is a biotechnological process that allows to rapidly obtain doubled haploid (DH) plants to accelerate breeding programs. However, its application is limited in many crop species due to its low efficiency. Stress-induced microspore reprogramming to embryogenesis involves complex regulatory mechanisms, among them epigenetic reprogramming plays a crucial role (Solís et al. 2012; Berenguer et al. 2017). However, and despite the knowledge gained in recent years, this process is still largely unknown.

In this work, we carried out two different comparative transcriptome analyses in microspore cultures of *Brassica napus*, model system for this process. First, we performed RNAseq analysis of gene expression for isolated microspores cultures, prior to embryogenesis induction, and for cultures early after induction, at proembryo stage, first morphological sign of embryogenesis initiation. Bioinformatic analyses comparing the two time points revealed 37781 differentially expressed genes (DEGs), from which around 20852 were upregulated in proembryos and 16929 were downregulated. Gene ontology analyses showed that the transition from microspores to proembryos was marked by DEGs involved in ribosome biogenesis and function, RNA processing and metabolism, carbohydrate metabolism, cell wall enzymes and regulators, and several families of transcription factors, among other pathways. Previous experiments in our lab have revealed that SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), an inhibitor of histone deacetylase, enhances microspore embryogenesis induction. Thus, a second RNAseq-transcriptomic analysis comparing SAHA-treated cultures vs untreated ones was performed. Results indicated that a 60% of the DEGs were upregulated in treated-proembryos, suggesting that SAHA promotes histone acetylation and therefore, leads to gene transcription activation. Gene ontology enrichment analysis after SAHA treatment showed DEGs related to epigenetic and hormonal control of the process.

Further analyses are in progress. Results will shed light on transcriptional changes accompanying microspore reprogramming and embryogenesis initiation, information that can provide useful insights to broaden our knowledge on the molecular mechanisms governing microspore embryogenesis and its application to improve DH production in crop breeding.

## References:

Solís et al. 2012 *Front. Plant Sci.* 6:472 doi: 10.3389/fpls.2015.00472  
Berenguer et al. 2017 *Front. Plant Sci.* 8:1161 doi: 10.3389/fpls.2017.01161

## Acknowledgements:

Work supported by projects PID2020-113018RB-I00 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), TED2021-129633B-I00 and CPP2021-008750 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and NextGenerationEU/PRTR).



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Análisis de RNA-seq durante la inducción de la embriogénesis de la microspora y la primera etapa del desarrollo embriogénico en trigo panadero**

Isabel Valero-Rubira<sup>1</sup>, Sergio Gálvez<sup>2</sup>, Ana María Castillo<sup>1</sup>, Begoña Echávarri<sup>1</sup>, Patricia Fustero<sup>1</sup>, Asunción Costar<sup>1</sup>, Pilar Hernández<sup>3</sup>, María Pilar Vallés<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>. Departamento de Lenguajes y Ciencias de la Computación, ETSI Informática, Universidad de Málaga-Campus de Teatinos, 29071 Málaga.

<sup>3</sup>. Departamento de Agronomía, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS)- CSIC, Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba.

Email de contacto: valles@eed.csic.es

En la embriogénesis de la microspora (EM) las células precursoras de los granos de polen, microsporas, son capaces de cambiar su patrón de desarrollo gametofítico a esporofítico en respuesta a un tratamiento de estrés. La EM es un proceso muy complejo en el que intervienen numerosos factores. La identificación de los genes que se expresan en cada etapa, y su dinámica a lo largo del proceso es clave para entender el cambio en el patrón de desarrollo de las microsporas. Sin embargo, los estudios de transcriptómica durante la EM en trigo presentan ciertos obstáculos debido a la complejidad del propio genoma del trigo y la dificultad en la obtención de las muestras. En este estudio se ha realizado un análisis de RNA-Seq en microsporas aisladas del cultivar de alta respuesta "Pavon" antes del tratamiento inductor con 0,7 M manitol (0dT), tras 3 y 5 días de tratamiento (3dT-MAN, 5dT-MAN), y, tras 3 días de cultivo (3dC-MAN). Microsporas que continuaron el desarrollo gametofítico (GD) se utilizaron como control. Para identificar los genes expresados diferencialmente (DEGs) entre los puntos de estudio, se realizaron comparaciones secuenciales del transcriptoma por pares: 3dT-MAN vs 0dT, 5dT-MAN vs 3dT-MAN, y 3dC vs 5dT-MAN. Los genes cuyo valor de Log<sub>2</sub>FC (Log<sub>2</sub> Fold-Change) era superior o inferior a 2, y cuyo p-valor de ajuste (p-adj) inferior a 0,05 se consideraron como DEGs significativos. En conjunto, se identificaron un total de 20309 DEGs, observándose los mayores cambios de expresión como consecuencia de la aplicación del tratamiento de estrés durante 3 días (3dT-MAN vs 0dT), seguido del cambio a las condiciones de cultivo (3dC-MAN vs 5dT-MAN), quedando en último lugar los cambios producidos por la prolongación del tratamiento de estrés hasta los 5 días (5dT-MAN vs 3dT-MAN). Para identificar patrones de expresión similares entre los DEGs, se realizó un análisis de agrupación en clúster usando los valores de expresión en 0dT, 3dT-MAN, 5dT-MAN y 3dC-MAN. Se identificaron diez clústeres de expresión, cuya caracterización funcional se realizó mediante un análisis GO (*Gene Ontology*) enriquecido en Procesos Biológicos.



## Sesión Temática II – Obtención de Doble Haploides y Rescate de Embriones

**Utilización del rescate y cultivo de embriones *in vitro* para la obtención de híbridos poliploides que permitan estudiar el modelo de segregación cromosómica de parentales tetraploides utilizados en programas de mejora genética de cítricos**Ana Cristina Benedict<sup>1</sup>, Andrés García-Lor<sup>1</sup>, Pablo Aleza<sup>1</sup>.<sup>1</sup> Centro de Citricultura y Producción Vegetal, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera CV-315 Km. 10,5 (46115), Moncada València.

Email de contacto: aleza\_pab@gva.es

JUEVES

La obtención de plantas poliploides, triploides ( $2n=3x=27$ ) y tetraploides ( $2n=4x=36$ ), es de gran utilidad para la mejora genética de cítricos. Por un lado, los híbridos  $3x$  son interesantes para la obtención de variedades sin semillas mientras que las plantas  $4x$  se pueden utilizar tanto como parentales para la obtención de híbridos  $3x$  y también como portainjertos, ya que presentan en algunos casos una mejor adaptación a estreses bióticos y abióticos. Una estrategia que permite la obtención de híbridos poliploides es mediante hibridaciones sexuales  $2x \times 4x$ . En este tipo de hibridaciones se producen semillas abortadas que contienen embriones poco desarrollados y es necesario la técnica de rescate y cultivo de embriones *in vitro* para la regeneración de elevadas poblaciones de híbridos poliploides.

Las plantas  $4x$  que surgen de hibridaciones interespecíficas o intergenéricas directas son híbridos alotetraploides, mientras que las que se obtienen a partir de una única especie son plantas autotetraploides. Cuando se utilizan parentales alo o autotetraploides, la restitución de la heterocigosidad parental depende del grado de emparejamiento preferencial de los cromosomas. Los alo y autotetraploides, con herencia disómica y tetrasómica respectivamente, son dos modelos extremos, aunque en cítricos, cuando los parentales son divergentes, pero conservan suficiente homología para evitar un apareamiento cromosómico exclusivo, se pueden esperar modelos de herencia intermedia entre di y tetrasómico. En este trabajo se ha estudiado el modo de herencia de dos genotipos  $4x$  completamente diferentes a nivel genético, pummelo 'Chandler' que contiene un genoma único de pummelo (*Citrus maxima*) y el citrange 'Carrizo', originado a partir de una hibridación intergenérica entre *Citrus* y *Poncirus* (género de interés como portainjerto por su resistencia a factores bióticos y abióticos). La planta  $4x$  de pummelo se obtuvo a partir del tratamiento de ápices microinjertados *in vitro* y tratados con colchicina mientras que la planta  $4x$  de citrange se identificó a partir de la duplicación espontánea de los cromosomas. Mediante el rescate y cultivo de embriones *in vitro*, se regeneraron dos poblaciones de híbridos  $3x$  que se analizaron con marcadores SNPs y SSRs. Los resultados obtenidos muestran claramente el impacto de la estructura filogenómica en el modelo de segregación y en la estructura genética de la población. El pummelo 'Chandler' presentó un modelo claro de herencia tetrasómica para todos los grupos de ligamiento (GL) mientras que el citrange 'Carrizo' presentó herencia disómica en los GL 6 y 8, herencia intermedia con una fuerte tendencia disómica en los GL 1, 2, 3, 4, 5 y 9, y una clara herencia intermedia en el GL 7. Estos nuevos resultados sobre los modelos de herencia serán de gran utilidad para definir futuras estrategias de cruzamientos en los programas de mejora genética dirigidos a la obtención de nuevas variedades sin semillas y para la obtención de nuevos portainjertos con mayor tolerancia a estreses bióticos y abióticos.





Herramientas para la Automatización de Procesos en los Cultivos *In Vitro***GreenTray®**, a new TIS bioreactor for micropropagation and *in vitro* biotic and abiotic assays

Ramon Dolcet-Sanjuan<sup>1</sup>, Daniel Cantabella<sup>5</sup>, Francisca Carrasco-Cuello<sup>1,3</sup>, Carlos R. Mendoza<sup>4</sup>, Maria Casanovas<sup>1</sup>, Sandra Franquesa<sup>1</sup>, Eva Alsina<sup>1</sup>, Cristina Solsona<sup>2</sup>, Estanis Torres<sup>1</sup>, Josep Rufat<sup>3</sup>, Neus Teixidó<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fruticulture Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Postharvest Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.

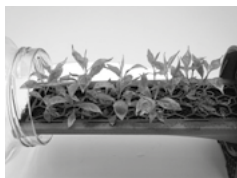
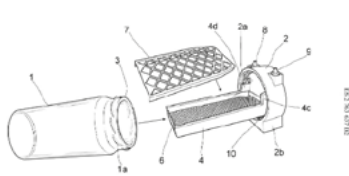
<sup>3</sup> Efficient Use of Water in Agriculture Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.

<sup>4</sup> Madre Tierra Puebla S de RL de CV, 72190 Puebla, México.

<sup>5</sup> Environmental Technologies Unit, BETA, UVic-UCC, Campus Can Baumann, 08500 Vic, Spain.

Contact Email: ramon.dolcet@irta.cat

The temporary immersion system (TIS) bioreactor GreenTray® presents advantages over the existing ones. TIS bioreactors have been developed during the last decades to favor *in vitro* shoot and plantlet development. The most common commercial bioreactors, RITA®, Matis® SETIS™ and Plantform, or others TIS models developed by plant *in vitro* culture laboratories, share three common limitations which have been overcome with the GreenTray® design, and consequently enhance its functionality. Firstly, the former TIS require forceps to introduce or extract explants from the culture recipient. Using GreenTray®, there is no need to use forceps to move shoots or plantlets in or out of the culture recipient. Forceps are no longer needed to extract the grown explants, or to introduce them in another GreenTray® container. Secondly, as a common practice in all *in vitro* propagation protocols, a supporting sterile surface is needed to divide, with the help of forceps and scalpel, the grown explants into smaller pieces. Instead, as it will be described in this presentation, with GreenTray® there is no need to use forceps and scalpel to divide shoots in smaller explants, since the grown-out part can be rapidly cut with scissors instead of using a scalpel. Finally, the basis of the shoot remains in the GreenTray® and can sprout again in several cycles of growth, depending on the plant material and culture medium. The presentation will focus on the micropropagation process of some commercial *Prunus*



rootstocks, providing images and data of interest. Consequently, the GreenTray® design significantly reduces the labor input required for micropropagation, and opens the possibility for further automated manipulations.

Taking advantage of the shoots or plantlets disposition, easiness of culture medium sampling, and aeration possibilities of culture recipient, GreenTray® has been demonstrated to be a useful tool for research on: (I) *in vitro* plant - plant growth-promoting microorganisms (PGPMs) interactions, characterizing plant morphological and physiological responses and microorganisms dynamics; (II) interaction between PGPMs and endophytes, determining main culture factors to control their overgrowth when they constitute a serious problem for *in vitro* plant performance; (III) atmospheric changes, such as CO<sub>2</sub> enrichment, on plant growth; (IV) autotrophic *in vitro* plantlet growth, with periodic atmospheric renewal and no sugars added to the culture medium; (V) differential plant material capacities on nutrient uptake and transport under different culture conditions, e.g. Ca<sup>2+</sup> nutrition affected by leaf transpiration; and (VI) phenotyping for plant resistance to pathogens after convenient *in vitro* inoculation of plantlet leaves. Hence, considering its versatility, easy explant or plantlet manipulation and space saving, GreenTray® *in vitro* plant growth system is also expected to be a useful tool for plant research.



Herramientas para la Automatización de Procesos en los Cultivos *In Vitro***Fitobot: Un nuevo sistema para el fenotipado masivo vegetal de precisión**

Edgar García-Fortea<sup>1</sup>, Miguel Ángel Ruiz<sup>2</sup>, Javier Valero<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Carmen Tamayo<sup>1</sup>, Jose Ángel Moro<sup>1</sup>, Malen Escáñez<sup>1</sup>, Ana García-Pérez<sup>1</sup>, Alfredo Sanchez<sup>4</sup>, Saray Manzano<sup>1</sup>, Ángeles Rosa<sup>1</sup>, Francisco Bermudez<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Scientific Area, Beyond Seeds, Campus Universidad de Almería, Edificio PITA, La cañada 04120, España.

<sup>2</sup> Engeneering Area, Beyond Seeds, Campus Universidad de Almería, Edificio PITA, La cañada 04120, España.

<sup>3</sup> IT Area, Beyond Seeds, Campus Universidad de Almería, Edificio PITA, La cañada 04120, España.

<sup>4</sup> Marketing and Product Development Area, Beyond Seeds, Campus Universidad de Almería, Edificio PITA, La cañada 04120, España.

<sup>5</sup> Managament Area, Beyond Seeds, Campus Universidad de Almería, Edificio PITA, La cañada 04120, España.

Email de contacto: edgar.garcia@beyond-seeds.com

Fitobot es una plataforma robotizada que valora las características fenotípicas de plantas en los primeros estadios de desarrollo. El objetivo de esta nueva tecnología es solucionar el obstáculo que suponen los trabajos de fenotipado y cribado tanto de variedades vegetales como de condiciones de cultivo en el segmento de la investigación pública y privada enfocado en la biotecnología vegetal. El fenotipado es el proceso de evaluación del comportamiento de las plantas en determinadas condiciones ambientales, midiendo su respuesta a condiciones de cultivo, resistencia a enfermedades o su tolerancia al estrés. El sistema Fitobot permite registrar y analizar las características fenotípicas de las variedades desde una edad temprana, de forma objetiva, automática y masiva obteniendo a través de su software de visión artificial una enorme cantidad de datos con los que poder analizar el desarrollo de la parte aérea y radicular. Para ello las semillas se germinan en un medio agarizado que contine los componentes a evaluar, preparado en los soportes de crecimiento denominados Fitotiras, los cuales permiten un crecimiento de la raíz en dos dimensiones para una evaluación correcta mediante imagen. En el presente seminario se pretende mostrar el potencial del Fitobot para su uso en investigación, así como algunos ejemplos de experimentos en los que se evalúa tanto el estrés hídrico como salino en lechuga empleado este sistema. En los ensayos desarrollados actualmente en términos de estrés salino se han determinado tres concentraciones clave como modelo de evaluación en *Lactuca sativa*, empleado como control 1/2 de MS y como tratamientos de estrés 0,15 M y 0,30 M de NaCl. El medio control permite el desarrollo normal de las plantas de lechuga en un periodo de tiempo de una semana hasta la aparición de las primeras hojas verdaderas. En el caso del tratamiento con 0,15 M de NaCl el crecimiento se reduce a la mitad y finalmente en el tratamiento con 0,30 M de NaCl se llega a una dosis casi letal que ralentiza el crecimiento permitiendo solo la emergencia de la radícula y la aparición de los cotiledones antes de observarse efectos necróticos en el plazo de una semana. Por otra parte, en lo referente a los experimentos para simular estrés osmótico, se ha empleado el manitol como tratamiento eligiendo al igual que en el caso del estrés salino dos concentraciones una subóptima (1%) y otra letal (2%) observándose resultados análogos a los obtenidos en el experimento de estrés salino. Fitobot supone una metodología que combina la posibilidad de controlar las condiciones y la composición del medio que tiene el cultivo *in vitro* y la posibilidad de cultivar las plantas en un formato mucho más cercano a las condiciones de cultivo real *ex vitro*, esto lo convierte en un sistema rápido de evaluación y cribado que puede reducir los costes de evaluación en el sector de la mejora genética, la agricultura y los agroquímicos minimizando el impacto ambiental que estos ensayos agronómicos implican.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

## Generation of plant cell cultures for their industrial application

Tarik Ruiz Medina<sup>1,2</sup>, Ana Gallego Palacios<sup>1</sup>, Òscar Expósito Tarrés<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Vytrus Biotech S.A., 08221, Terrassa, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup> Center for Research in Agricultural Genomics (CRAG, CSIC-IRTA-UAB-UB), 08193, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

Different industries have exploited plants as sustainable sources of cosmetic ingredients, therapeutic compounds, agrochemicals, nutritional molecules, among others. However, industrial supply chains based on plant-derived entities are at risk due to different environmental factors, including global climate change and water scarcity, as well as by new legal regulations and different society trends such as urbanization. This new scenario makes necessary the implementation of technological approaches that guarantee the stable, sustainable, and long-term supply of plant derived entities. Plant cell culture technology has the potential to become the alternative to the traditional plant production, being able to address most of the challenges faced by the industries and consumers. This technology offers a dramatic reduction in the consumption of water during industrial production, a reduction in land use, a better control of bioprocess parameters, a stable and modulable production of molecular titers and the elimination of the need of herbicides and pesticides. Further, the plant cell culture technology allows to produce molecular entities from species which would not be possible due to their legal status, endangered, or complex due to their growing requirements. The main aim of this presentation is to show the process behind the generation of different ingredients based on plant cell culture in the industrial context of a biotech company, review the benefits in term of sustainability of the technology if compared with traditional production strategies, the consumer-friendly declarations compatible with the technology, the different product platforms that can be generated using this technology, and the activities displayed by plant cell culture-derived ingredients on in vitro models and clinical trials. Further, an example of successful biotech company based on plant cell cultures will be reviewed during the presentation, showing its evolution from spin-off to industrial biotechnology company. Future prospects and existing challenges of the commercialization of ingredients based of this technology in different markets will be also commented, aiming to encourage scientists from public and private organizations, enterprises and policymakers to work together towards make plant cell culture technology the future of phytoactives production.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Machine learning tools unveil the potential of *Bryophyllum* spp. as an *in vitro* biofactory of polyphenols**Eva Lozano-Milo<sup>1</sup>, Pedro Pablo Gallego<sup>1,\*</sup>, Pascual García-Pérez<sup>1,2</sup><sup>1</sup> *Agrobiotech for Health, Plant Biology and Soil Science Dpto., Faculty of Biology, University of Vigo. 36310. Vigo, Spain.*<sup>2</sup> *Sustainable Food Process Department, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza, Italy.*

Email de contacto\*: pgallego@uvigo.es

The subgenus *Bryophyllum* (genus *Kalanchoe*) is composed of over 125 species used in traditional medicine in Africa, Asia, and South America. Their beneficial effects are a result of the biosynthesis of phytochemical compounds, among which polyphenols stand out as the most common antioxidant compounds. These phytoconstituents are synthesized by the secondary metabolism of plants in response to environmental conditions. The study of compounds of interest in *Bryophyllum* spp. through traditional cultivation methods is conditioned by various factors, such as the limited concentration of secondary metabolites and their restricted synthesis in specific organs, seasonal and geographical variation, as well as their high invasiveness and toxicity. In contrast, *in vitro* cultivation allows for the control of environmental conditions and nutritional requirements. However, there are many factors that can influence plant development and the production of secondary metabolites. The application of machine learning (ML) tools enables the characterization of critical factors. This identification sheds light on hidden patterns and potential interactions among the factors to be studied in the optimization of *in vitro* culture of *Bryophyllum* spp. and its potential exploitation as a biofactory for phytochemical compounds of interest.

The most relevant results obtained from three different studies are presented below:

- 1) Neurofuzzy Logic machine learning tool was able to identify the two key factors (genotype and ammonium concentration) in the micropropagation of the medicinal plant *Bryophyllum* spp., specifically influencing its vegetative growth and asexual multiplication (Lozano-Milo et al., 2022).
- 2) The combined use of Neurofuzzy Logic and untargeted metabolomics tools has allowed for the identification of genotype type and organ (aerial and root organs) as the two critical factors in the biosynthesis of phenolic compounds during *Bryophyllum* spp. micropropagation. Particularly, the reduction of macro- and micronutrient concentrations in the culture medium promotes the production of flavonols and anthocyanins. While sulfate enhances the biosynthesis of tyrosol and lignans, copper facilitates the production of phenolic acids, calcium stimulates stilbene production, and magnesium contributes to flavanols synthesis (García-Pérez et al., 2021).
- 3) The combined use of Neurofuzzy Logic and untargeted metabolomics tools has enabled the characterization of phenolic compound biosynthesis in cell suspensions of *Bryophyllum* spp. through the interaction of methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) as elicitors (García-Pérez et al., 2022).

## References:

García-Pérez P, Zhang L, Miras-Moreno B, Lozano-Milo E, Landin M, Lucini L & Gallego PP. 2021. *Plants* 10, 2430. DOI: 10.3390/plants10112430.

García-Pérez P, Lozano-Milo E, Zhang L, Miras-Moreno B, Landin M, Lucini L & Gallego PP. 2022. *Frontiers in Plant Sciences*, 13:991557. Doi: 10.3389/fpls.2022.991557.

Lozano-Milo E, Landin M, Gallego PP, García-Pérez P. 2022. *Horticulturae*, 8(11):987. DOI: 10.3390/horticulturae8110987.





## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

## La metabolómica no dirigida como técnica para determinar el efecto del medio de cultivo *in vitro* sobre la biosíntesis de compuestos fenólicos

Tomás A. Arteta<sup>1,2</sup>, Pascual García-Pérez<sup>3</sup>, Leilei Zhang<sup>3</sup>, Luigi Lucini<sup>3</sup>, Pedro P. Gallego<sup>1,2</sup>, M. Esther Barreal<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> AgroBiotech for Health, Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología, Vigo Campus, Universidade de Vigo, 36310, Vigo, España.

<sup>2</sup> Instituto de Agroecología y Alimentación, Universidade de Vigo, 32004, Ourense, España.

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari per Una Filiera Agro-Alimentare Sostenibile (DiSTAS), Università Cattolica del Sacro Cuore, 29122, Piacenza, Italia.

La metabolómica no dirigida es una técnica analítica que permite la detección e identificación simultánea de una amplia gama de metabolitos, incluyendo compuestos fenólicos, cuya aplicación no requiere de conocimiento previo sobre la matriz analizada. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas, y su biosíntesis se ve influenciada por varios factores, incluyendo la nutrición mineral. El objetivo principal de este estudio fue determinar el efecto de la composición de los medios de cultivo *in vitro* en la biosíntesis de compuestos fenólicos de *Actinidia arguta* (kiwiño), empleando metabolómica no dirigida. Se cultivaron segmentos nodales de *A. arguta* en siete medios de cultivo diferentes: Murashige y Skoog (MS), Gamborg (B5), Harada (Ha), Standardi (St), Kh y un medio de cultivo *in vitro* optimizado para kiwiño, diseñado por nuestro grupo (R). Los perfiles fenólicos de los medios Ch, MS, Kh y Ha mostraron amplias similitudes, mientras que los medios R, St y B5 exhibieron perfiles fenólicos exclusivos, agrupándose en tres clústeres altamente diferenciados entre sí. Específicamente, los medios B5 y St produjeron un mayor contenido de antocianinas en comparación con los otros medios estudiados. Además, se observó que las plántulas de *A. arguta* cultivadas en medio B5 presentaron una mayor acumulación de flavanoles en comparación con las cultivadas en el medio St, aunque la acumulación de flavonoles y estilbenos se vio reducida significativamente. En conclusión, la metabolómica no dirigida ha proporcionado información valiosa sobre el efecto de los medios de cultivo en la biosíntesis de compuestos fenólicos.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Análisis del metabolismo redox en cultivos celulares de vid elicitados con ciclodextrinas y jasmonato de metilo**

Eduardo Gómez-Copoví, Ana Belén Sabater-Jara, Lorena Almagro, María Ángeles Pedreño

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

Email de contacto: ej.gomezcopovi@um.es

JUEVES

Estudios recientes indican que existe una relación directa entre la elicitación de suspensiones celulares vegetales y un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Asimismo, el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) también altera el estado redox de las células vegetales y actúa como punto clave en la coordinación de las vías de señalización intracelular en respuesta al estrés. Este trabajo se centra en el estudio del mecanismo de elicitación, teniendo como objetivo principal comprobar si la elicitación de suspensiones celulares de *Vitis vinifera* con ciclodextrinas (CD) y/o jasmonato de metilo (MJ) induce cambios en la homeostasis redox celular (poniendo especial atención en la producción de ROS, RNS y  $H_2S$ ).

Para ello, se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia los niveles de  $H_2O_2$ , peroxinitrito, óxido nítrico y  $H_2S$  en cultivos celulares de vid bajo cuatro condiciones: control, CD, MJ y la combinación de ambos (CDMJ). El análisis de las bioimágenes obtenidas permitió valorar en qué medida el proceso de elicitación modificó el metabolismo redox y los niveles de  $H_2S$  en el interior de las células. De este modo, se observó un aumento en los niveles de  $H_2S$  y peroxinitrito en todos los cultivos celulares elicitados. En el caso del  $H_2O_2$ , los niveles aumentaron significativamente en los cultivos elicitados con CD y CDMJ, pero no con MJ, los cuales no mostraron ninguna diferencia con respecto al control. Además, los niveles de óxido nítrico incrementaron únicamente en presencia de MJ o CD individualmente. Estos datos indican que la presencia de CD y/o MJ desencadenan una respuesta en las células de vid que conduce a la modificación de los niveles de ROS, RNS y  $H_2S$ .

Por lo tanto, los resultados obtenidos permiten mejorar los conocimientos sobre el mecanismo de elicitación de suspensiones celulares de vid tratadas con CD y/o MJ, principalmente las alteraciones que sufren estas células en el metabolismo redox como consecuencia de la presencia de factores de estrés.

**Agradecimientos**

Esta investigación fue subvencionada por el proyecto PID2020-113438RB-I00 financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCIN/AEI/10.13039/501100011033 "Una forma de hacer Europa") de España y por el proyecto financiado por la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia a través de la convocatoria de Ayudas a proyectos para el desarrollo de investigación científica y técnica por grupos competitivos, incluida en el Programa Regional de Fomento de la Investigación Científica y Técnica (Plan de Actuación 2022) de la Fundación Séneca-Agencia de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia".



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Aplicación de la ingeniería metabólica para potenciar la producción biotecnológica de paclitaxel en cultivos celulares de *Taxus baccata***Edgar Perez-Matas<sup>1</sup>, Diego Hidalgo<sup>1</sup>, Miguel Angel Alcalde<sup>1</sup>, Mercedes Bonfill<sup>1</sup>, Javier Palazon<sup>1</sup><sup>1</sup> *Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia y Ciències de l'Alimentació. Universitat de Barcelona. Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona.*

Email de contacto: javierpalazon@ub.edu

JUEVES

El paclitaxel es uno de los fármacos anticancerígenos más efectivos utilizados actualmente, el cual se produce en las plantas en muy pequeñas cantidades, a partir del isopentenil difosfato, mediante una compleja ruta biosintética. Aunque el mejor sistema para la producción biosostenible de paclitaxel lo proporcionan los cultivos de celulares de *Taxus* spp., su rendimiento está controlado por las enzimas flujo-limitantes de la ruta biosintética de los taxanos: bacatina-aminofenilpropanoil-13-O-transferasa (BAPT) y 3'-N-debenzoiltaxol N-benzoiltransferasa (DBTNBT). Con el objetivo de mejorar la producción de paclitaxel superando estos cuellos de botella, en el presente estudio obtuvimos cultivos *in vitro* de *Taxus baccata* que sobreexpresan los dos genes limitantes del flujo metabólico de taxanos, BAPT y DBTNBT, ambos genes bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S. Para su obtención, se utilizó el sistema de transformación genética mediada por *Rhizobium rhizogenes* A4. Debido a la lenta tasa de crecimiento de las raíces transgénicas de *Taxus* obtenidas, estas se desdiferenciaron para obtener líneas de callos y establecer sus respectivas suspensiones celulares. Las células transgénicas se cultivaron en un sistema de dos etapas y en la segunda, las líneas celulares se estimularon para la producción de taxanos mediante un tratamiento de elicitación dual con coronatina 1  $\mu\text{M}$  y 50 mM de  $\beta$ -ciclodextrinas metiladas al azar. Se observó una alta sobreexpresión de los genes BAPT y DBTNBT en los respectivos cultivos de células transgénicas, en condiciones control (sin elicitar), así como una producción significativamente incrementada de taxanos. En comparación con la línea de tipo salvaje (71,01 mg/L), la producción de paclitaxel fue más de cuatro veces superior en la línea que sobreexpresa DBTNBT (310 mg/L) y casi del doble en la línea que sobreexpresa BAPT (135 mg/L). El perfil transcripcional de los genes biosintéticos de taxanos reveló que los genes GGPPS (geranilgeranil difosfato sintasa), DBAT (deacetilbacatina acetiltransferasa) y TXS (taxadieno sintasa) eran los más reactivos a la sobreexpresión de DBTNBT y al tratamiento de elicitación dual, y su expresión aumentó significativamente a lo largo del periodo de cultivo estudiado. Probablemente, como consecuencia de ello, se produjo un significativo incremento de la producción de taxanos en todas las líneas, y en especial en condiciones de elicitación. Los resultados demuestran que la ingeniería metabólica y en concreto la sobreexpresión de enzimas flujo-limitantes constituye una potente herramienta para el diseño de nuevas líneas transgénicas de *Taxus* con capacidades mejoradas para la producción de paclitaxel, y muy especialmente cuando se combinan con técnicas convencionales de elicitación.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Insights into Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase (PPCK) role in stilbene production in grapevine (*Vitis vinifera*) cell cultures through gain and loss of function**

Elías Hurtado Gaitán<sup>1</sup>, Jaime Morante Carriel<sup>1,2</sup>, Ascensión Martínez Marquez<sup>1</sup>, María José Martínez Estesó<sup>1</sup>, Susana Sellés Marchart<sup>1,3</sup>, Antonio Samper Herrero<sup>1</sup>, Roque Bru Martínez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Plant Proteomics and Functional Genomics Research Group, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Soil Science and Agricultural Chemistry, Faculty of Science and IMEM, University of Alicante, Alicante, Spain.

<sup>2</sup> Department of Plant Biotechnology, Faculty of Forestry and Agricultural Sciences, Quevedo State Technical University, Quevedo, Ecuador.

<sup>3</sup> Research Technical Services (SSTTI) of the University of Alicante, Spain.

Email de contacto: Roque.Bru@ua.es

Grapevine phosphoenolpyruvate carboxylase kinase (VvPPCK) may hypothetically play a yet undisclosed role in tR (trans-Resveratrol) synthesis in grapevine. An elicitation treatment in grapevine cell cultures has shown that the two VvPPCK paralogues are down-regulated while grapevine cells produce large amounts of the stilbene tR [1], but elicitation does not significantly affect the transcripts level of its substrate, enzyme Phosphoenolpyruvate Carboxylase (PEPC). The role proposed for PEPC and its regulatory protein kinase PPCK in the defense response that leads to tR biosynthesis in grapevine points out that PPCK is a potential regulator located in a crucial crossroad between primary and secondary metabolism [2]. Therefore, we hypothesize that PPCK is a key regulator of stilbene biosynthesis in response to elicitors by modulating carbon partitioning between primary and secondary metabolism, when the destination of incoming carbon must be balanced between core cellular requirements and the plant dynamic response to changing environmental conditions. To assess this hypothesis, a functional analysis through both the stable overexpression and silencing of PPCK in grapevine cells was carried out. The functional analysis of target genes was successfully carried out in grapevine cultures through the generation of stable transgenic lines for the overexpression of either fully functional or amiRNA knock-down constructs of both target paralogue genes under the control of the CaMV 35S promoter. The overexpressing lines displayed higher PEPC activity and, upon elicitation, a lower production of tR as compared to wild type cells, whilst knocked-down lines displayed the opposite phenotype. These results fully support our hypothesis and thus a new role for PPCK as a key regulator for the production of stilbenes in grapevine cell cultures.

## References

- [1] Almagro L, Carbonell-Bejerano P, Belchí-Navarro S, Bru R, Martínez-Zapater JM, Lijavetzky D, Pedreño MA. Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells. *PLoS One*. 2014 Oct 14;9(10):e109777. doi: 10.1371/journal.pone.0109777.
- [2] Kotakis C, Vrettos N, Kotsis D, Tsagris M, Kotzabasis K, Kalantidis K. Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Plant Biol*. 2010 Oct 12;10:220. doi: 10.1186/1471-2229-10-220. PMID: 20939918; PMCID: PMC3017829.

## Acknowledgements

Spanish Ministry of Science and Innovation, MCIN/AEI/ 10.13039/501100011033, ERDF A way of making Europe and European Union NextGenerationEU/PRTR grants PID2020-113438RB-I00 and TED2021-129617B-I00, Valencian Conselleria d'Innovació, Universitats, Ciència y Societat Digital grant CIAICO/2021/167 and "María Zambrano" grant to JMC from the Spanish Ministry of Universities, NextGenerationEU/PRTR, and University of Alicante.





## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Ingeniería metabólica de triterpenos en raíces transformadas de *Centella asiatica* mediante la sobreexpresión de escualeno sintasa y el factor de transcripción (TSAR2)**Miguel Angel Alcalde<sup>1</sup>, Edgar Perez-Matas<sup>1</sup>, Javier Palazon<sup>1</sup>, Mercedes Bonfill<sup>1</sup>, Diego Hidalgo<sup>1</sup><sup>1</sup> *Biología, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia y Ciències de l'Alimentació. Universitat de Barcelona. Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028 Barcelona.*

Email de contacto: dhidalgo@ub.edu

JUEVES

Los centellosidos son compuestos bioactivos presentes en *Centella asiatica*, reconocidos por sus propiedades terapéuticas. Genes como el de la escualeno sintasa (SQS) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HGMR) desempeñan un papel clave en la vía metabólica de centelósidos. La SQS sintetiza escualeno, un precursor importante en la biosíntesis de triterpenos, mientras que el HGMR es una enzima reguladora de la vía metabólica del mevalonato, precursor del escualeno. Siendo este último gen influenciado por un factor de transcripción denominado "TRITERPENE SAPONIN BIOSYNTHESIS ACTIVATING REGULATOR2" (TSAR2), estudiado en *Medicago truncatula*.

Nuestra aproximación para el estudio de estos genes en la ruta de biosíntesis de triterpenos fue mediante el cultivo de raíces transformadas. Cuatro grupos de líneas fueron obtenidas mediante la infección con *Rhizobium rhizogenes* nativo o transformado: 1) Control, 2) SQS, 3) TSAR2 y 4) SQS-TSAR2. Después de la fase de selección con antibiótico y comprobación de la integración del transgén, determinamos los niveles de expresión, producción de centellosidos, contenido de escualeno, así como parámetros morfológicos cuyos valores han resultado altamente correlacionados con los niveles de producción de centelósidos en previos estudios.

Los resultados mostraron que las líneas que sobre expresaban la SQS produjeron significativamente mayor cantidad de centelósidos por gramo de peso seco ( $6,32 \pm 0,25$  mg/g), seguidas de las líneas transgénicas del grupo TSAR2 y finalmente, las líneas SQS-TSAR2. Las líneas con mayor contenido de escualeno fueron las SQS, produciendo al menos un 20% más que las líneas control. La evidencia anterior demuestra claramente que el aumento del precursor escualeno tiene un efecto positivo en la producción de centelósidos. En contraste, el factor de transcripción parece afectar negativamente los niveles de consumo de escualeno dirigidos a la biosíntesis de los centelósidos, posiblemente debido a la activación de enzimas de rutas alternativas que comparten al escualeno como precursor.

Otro aspecto importante en nuestro estudio fueron, los parámetros morfológicos como la tasa de enraizamiento, tasa de crecimiento y productividad de la biomasa. Los valores más altos en todos los parámetros se observaron en la línea control, seguida por las líneas transformadas con SQS o TSAR2. Lo anterior sugiere el detrimento morfológico debido a la activación del metabolismo secundario enfocado a la producción de compuestos como los centellosidos. Adicionalmente, se pudo observar que la sobreexpresión del gen SQS tiene un efecto de potenciación en los genes involucrados en los pasos finales de la ruta metabólica de los centelósidos, particularmente con el gen que expresa la enzima Uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UGT). Estos hallazgos proporcionan información valiosa para comprender mejor la regulación genética y metabólica en esta planta medicinal, lo que podría tener implicaciones directas en la mejora de la producción de sus compuestos bioactivos.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Evaluating *in vitro* conditions for selecting melon germplasm with tolerance to drought and salt stresses**

Miguel Ezquerro<sup>1</sup>, Sara Mares<sup>1</sup>, María-Luisa Gómez-Guillamón<sup>1</sup>, Belén Picó<sup>1</sup>, Ana María Pérez De Castro<sup>1</sup>, Carmina Gisbert<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain.

Email de contacto: miezur@upvnet.upv.es

JUEVES

Water scarcity and soil salinity limit the productivity of crop plants. Both stressing conditions are common in the current scenario of climate change. Salinity is also exacerbated in drought conditions, because of salt accumulation in soils irrigated with poor quality water. Therefore, it is pivotal to develop and select varieties adapted to these stresses. The African melon accession TGR-1551 (*C. melo* ssp *agrestis*), that shows tolerance to drought and salt stress, was used as parental to develop a set of recombinant inbred lines (RILs) in the genetic background of the 'Amarillo' type melon 'Bola de Oro' (*C. melo* ssp. *melo*). The objective of the present work was to test *in vitro* culture conditions to evaluate melon germplasm under salt and osmotic stress conditions. The parental lines of the developed RILs as well as their F1 hybrid were used. Micropropagated melon internodes (each with a bud) were obtained from these plants and grown in media supplemented with polyethylene glycol (PEG), which causes osmotic stress and simulates water deficit or sodium chloride (NaCl), for salt stress. Concentrations of PEG ranged from 0% to 2.5%, and those of NaCl from 0 mM to 200 mM.

The results after 45 days of cultivation showed that the parental line TGR-155 had a higher percentage of rooted plants and more developed roots in both, osmotic and salt stress conditions. This behavior agrees with the drought and salt tolerance described for this germplasm. Osmotic tolerance was also observed in the F1 hybrid which in culture medium containing 0.5% PEG, had even greater growth in comparison to F1 plants growing in the control medium. A large reduction of weight, shoot size, and root length was observed in all genotypes at the highest concentrations of PEG and NaCl. However sprouting was only inhibited in all genotypes at 150 and 200 mM salt concentrations. This methodology will be next used for selecting TGR-1551-derived RILs tolerant to drought and salt stresses that will be after tested in field conditions. The selection of tolerant lines will yield economic benefits *per se* and will identify genomic regions that provide tolerance to abiotic stresses.

This research was supported by grants PID2020-116055RB, C21 and C22, funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and grant AGROALNEXT/2022/25, funded by the "Plan complementario de I+D+i en Agroalimentación. Componente 17 «Reforma institucional y fortalecimiento de las capacidades del sistema nacional de ciencia, tecnología e innovación». Plan de recuperación, transformación y resiliencia (PRTR)". M.E. was acknowledged with the grant within the framework of the "Programa Investigo" (Generalitat Valenciana, Plan de Recuperación, Transformación y Resiliencia – financed by the European Union – NextGenerationEU).



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Tolerant epitypes of elicited holm oak somatic embryos are revealed by challenge in dual culture with *Phytophthora cinnamomi* Rands**

Mar Ruiz-Galea\*, Carolina Kremer, Eva Friero, Inmaculada Hernández.

Email de contacto: mdelmar.ruiz@madrid.org

Department of Agroenvironmental Research. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA). Alcalá de Henares, 28805. Madrid. Spain.

\*Correspondence: mdelmar.ruiz@madrid.org

The holm oaks (*Quercus ilex* L.) can suffer severe infection by the oomycete *Phytophthora cinnamomi* Rands. so it is necessary the production of tolerant plants to the infection. Somatic embryogenesis can be considered an efficient alternative for the large-scale production of holm oak trees. This technique produced embryos and plants with all the genetic potential of selected trees but embryo formation is also a key period in the establishment of epigenetic memory. In this assays, somatic embryogenic lines from three holm oak genotypes (Q8, E00, E2) were elicited with either methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA),  $\beta$ -aminobutyric acid (BABA) or benzothiadiazole (BTH) or 10% or 30% dilutions of a filtrate of *P. cinnamomi* (FILT10 and FILT30). All elicitors were used at 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M, either over 3 days or 60 days.

The production and viability of embryos produced under all conditions was recorder. The short elicitation application reduced the embryo production of E2 line, except those elicited with MeJA. Long elicitation with BTH caused the complete necrosis of all genotypes. There was no significant differences for 50  $\mu$ M or 100  $\mu$ M. The best conversion rate was obtained with long elicitation SA, BABA and MeJA (Q8 conversion rates ranged from 31% BABA to 45% SA, E2 conversion rates ranged from 19% MeJA to 32% BABA and E00 conversion rates ranged from 0% SA to 11% BABA).

Some elicited embryos were exposed to *P. cinnamomi* mycelium in dual culture assays. Differential mycelial growth (DGM, i.e., growth towards the embryo compared to growth away from it) and the progression of necrosis (visual scale on days 0, 24 and 48 h after the mycelium made contact with the tissue) were daily measured. Further dual culture assays were also performed involving the roots of the germinated somatic embryos elicited via each treatment. DGM values were lower compared to non-treated embryos (control) when the roots came from elicited embryos (except for those subjected to long elicitation with MeJA and FILT30). Long elicitation with BABA returned DGM results even lower than when the mycelium was grown in the absence of root material. Short-term elicitation with SA and MeJA also notably reduced DGM values compared to controls.

Significant differences were also seen in the progress of necrosis between elicitors at 0h ( $p < 0.001$ ), 24h ( $p = 0.038$ ) and 48h ( $p = 0.003$ ). Short elicitation with BABA, SA and FILT30 reduced the advance at 24 h compared to non-treated controls.

Within genotypes, significant differences were among the elicitation treatments but we proved that some elicitors induced changes in the somatic embryos that persisted in their derived roots. The 3-day BABA (50 $\mu$ M) and 60-day FILT10 treatments induced the greatest inhibition both mycelium and necrosis in embryos and roots. This inhibition might be a defence response maintained after embryo germination, thus increasing the likelihood of tolerance to infection. Somatic embryogenesis could therefore be used to propagate trees and priming their somatic embryos with immune memory.

Funding: EU, MINECO and IMIDRA (AGL2013-47400-C4-1-R) and AMORIM FLORESTAL (Project CORK2WINE 2021-2023) funded this research.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Últimos avances en métodos alternativos de conservación durante el proceso de embriogénesis somática en pino radiata**Itziar A. Montalbán<sup>1\*</sup>, Ander Castander-Olarieta<sup>1</sup>, Paloma Moncaleán<sup>1</sup><sup>1</sup> Dpto. Ciencias Forestales, Neiker-BRTA, Centro de Arkaute, N-104 km. 355; 01192 Arkaute (Álava).

Email de contacto: imontalban@neiker.eus

La crioconservación de tejidos embriogénicos es un requisito indispensable para mantener la competencia de las líneas celulares embriogénicas y obtener plantas a partir de ellas años después. Este método de conservación junto con la optimización de la embriogénesis somática ha permitido la implementación de la silvicultura multivarietal (Park 2002). Sin embargo, la crioconservación puede no ser una opción para pequeños grupos de investigación o países en vías de desarrollo debido al coste del nitrógeno líquido. Por ello, hemos buscado alternativas de conservación en frío para las distintas etapas del proceso de embriogénesis somática en *Pinus radiata*.

En este sentido, hemos demostrado que es posible almacenar conos verdes a 4°C hasta 4 meses sin detrimento en las tasas de inducción de tejido embriogénico. A esta misma temperatura hemos mantenido también embriones somáticos a 4°C en diferentes medios durante 3, 6 y 9 meses, tras lo cual se ha completado con éxito el proceso de germinación y aclimatación *ex vitro*.

Como alternativa a la crioconservación de líneas celulares embriogénicas, hemos desarrollado un protocolo para conservarlas a -80°C. Mediante esta técnica se han obtenido porcentajes de regeneración superiores al 60% en líneas celulares almacenadas 5 años y se ha logrado regenerar plantas a partir de líneas en -80°C durante 7 años. Actualmente, estamos estudiando la conservación de embriones somáticos a -80°C combinando protocolos de embriogénesis somática y organogénesis para regenerar estos materiales y aumentar la eficiencia del proceso de propagación.

## Referencias:

Park, Y.S. (2002) *Ann For Sci* 59:651–656

Agradecimientos: Este estudio es parte del proyecto de I+D+i / PID2020-112627RB-C3, financiado/a por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033/ además de haber sido realizado gracias a BIOALI-CYTED (P117RT0522) y al proyecto MULTIFOREVER, apoyado por ERA-NET Cofinanciado ForestValue por ANR (FR), FNR (DE), MINCYT (AR), MINECO-AEI (ES), MMM (FI) y VINNOVA (SE). ForestValue ha recibido financiación de la Unión Europea Programa de Investigación e Innovación Horizonte 2020, subvención no. 773324.





## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Physiological responses of *Ocimum basilicum* callus culture to titanium dioxide nanoparticles: Insights into growth, antioxidant activity, and stress tolerance**

Sanaz Feizi<sup>1,2</sup>, Morteza Kosari-Nasab<sup>2</sup>, Mojtaba Amini<sup>2</sup>, Ali Movafeghi<sup>2,\*</sup>, Pedro Pablo Gallego<sup>1,\*</sup>, M. Esther Barreal<sup>1</sup>

<sup>1</sup> University of Vigo, Vigo, España.

<sup>2</sup> University of Tabriz, Tabriz, Iran

Email de contacto: ppgallego@uvigo.es; movafeghi@tabrizu.ac.ir

The rapid advances in nanotechnology have introduced engineered nanoparticles with diverse biotechnological applications. However, concerns arise regarding the interaction of nanoparticles with plants and their associated toxicity effects. Callus-based *in vitro* studies provide a controlled and simple system, offering valuable insights into the effects of nanoparticles on plant growth, development, and stress tolerance. This study focuses on investigating the physiological responses of *Ocimum basilicum* *in vitro* callus culture to titanium dioxide nanoparticles. The basil is well-known for its strong antioxidant properties.

Callus cultures of *O. basilicum* were treated with various concentrations of titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>), ranging from 5 to 200 mg L<sup>-1</sup>, enabling a comparison of dose-dependent effects. Biomass (fresh and dry weight), total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity were evaluated in the callus extracts.

The results revealed that TiO<sub>2</sub> nanoparticles improve callus cell growth at mid concentrations (20-30 mg L<sup>-1</sup>) and increase TPC, TFC and antioxidant activity compared to control and low concentrations (5-10 mg L<sup>-1</sup>). From 40 mg L<sup>-1</sup> onwards the biomass and antioxidant parameters (TPC, TFC and AA) decreased steadily. These findings provide valuable insights into the effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on *Ocimum basilicum* callus culture, elucidating their dose-dependent responses and shedding light on their potential impacts on plant stress tolerance.



## Sesión Temática III - Cultivo de Órganos y Células en Suspensión

**Obtención de cíbridos de mandarino  
mediante fusión de protoplastos**Laura Prosper<sup>1</sup>, Andrés García-Lor<sup>1</sup>, María Hernández<sup>1</sup>, Pablo Aleza<sup>1</sup><sup>1</sup> *Centro de Citricultura y Producción Vegetal, Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera CV-315 Km. 10,5 (46115), Moncada València.*

Email de contacto: aleza\_pab@gva.es

JUEVES

Una de las estrategias más utilizadas para la mejora genética de mandarinos es la hibridación sexual. No obstante, la biología reproductiva de los cítricos es compleja debido a diferentes particularidades como la incompatibilidad sexual, apomixis y esterilidad femenina y masculina de algunos genotipos, lo que dificulta en gran medida la obtención de nuevas variedades. Una metodología que permite superar esta problemática es la hibridación somática mediante fusión de protoplastos. Los cíbridos son plantas que combinan el genoma nuclear de un parental con el genoma mitocondrial y/o cloroplástico del otro, y se obtienen como un subproducto de los trabajos de hibridación somática. Este tipo de plantas pueden tener un potencial interés como nuevas variedades ya que en los cíbridos de cítricos se han observado cambios en aspectos relacionados con el contenido en ácidos totales, azúcares, época de maduración y reducción en el número de semillas (Guo et al 2013). Por ello, la obtención de cíbridos puede ser una estrategia adecuada para mejorar las características de determinadas variedades de interés.

En el presente trabajo se realizó la fusión de protoplastos aislados de callo embriogénico de mandarino 'Común' con protoplastos de mesófilo de hoja de mandarino 'Nadorcott' y de un híbrido de interés de mandarino 'Wilking' (WK). La fusión eléctrica de los protoplastos se realizó utilizando un voltaje de 20 V durante un tiempo de 30 segundos de corriente alterna, dos pulsos de corriente continua a 180 V con una duración de 35  $\mu$ s y repetido dos veces en cada ciclo. Las plantas regeneradas se analizaron mediante citometría de flujo y con ocho marcadores nucleares de tipo microsatélite y con cuatro marcadores mitocondriales y cuatro citoplasmáticos.

Se regeneraron un total de 17 plántulas diploides ( $2n=2x=18$ ), de las cuales 16 presentaron el genoma nuclear de 'Nadorcott' y una del híbrido 'WK'. No se observó polimorfismo en los marcadores mitocondriales y cloroplásticos ya que el origen materno de los parentales utilizados es de tipo mandarino. No obstante, únicamente los protoplastos aislados a partir de callo embriogénico presentan capacidad embriogénica mientras que hasta el momento no es posible regenerar plantas completas de cítricos a partir de protoplastos aislados de mesófilo de hoja. Los cíbridos regenerados de mandarino 'Común' + 'Nadorcott' (callo + hoja) y mandarino 'Común' + 'WK' se han injertado en parcelas experimentales para su posterior evaluación agronómica en campo.

## Referencias:

Guo WW, Xiao SX and Deng XX (2013) Somatic cybrid production via protoplast fusion for citrus improvement. *Scientia Horticulturae* 163, 20–26



## Plant cells for cosmetics and food applications

Amir Akhgari

VTT Technical Research Centre of Finland Ltd.

Tietotie 2, FI-02150 Espoo, Finland.

amir.akhgari@vtt.fi

Plants synthesize a diverse range of bioactive, low-molecular-weight constituents described as secondary metabolites or natural products, which possess many beneficial and health promoting properties offering enormous potential in pharmaceutical, cosmeceutical, and nutraceutical industries. However, such commercially important metabolites are generally present at low abundance and only occur in specific plant organs. Therefore, plant cell cultures offer alternative platforms to produce specific metabolites. The production and isolation of pharmaceuticals or their intermediate compounds, cosmetic ingredients, and food additives which are derived from plant cell and tissue cultures have already been exploited. The growing use of manufacturing cosmetics and food products in a natural and sustainable manner has brought a new wave in plant cell culture technology over the past 10 years. In analogy to the radical invention of “cultured meat”, but to an even greater extent, cellular agriculture could be exploited as an entirely new food biomass for human consumption. In this presentation, the power of biotechnology and plant cell cultures will be demonstrated by three case studies we have performed at VTT.

Over three decades VTT has developed cell cultures from various plant species including berries. We have demonstrated that berry cell cultures possess unusual phenolic profile with strong antimicrobial activity as well as fatty acid composition which make them a unique and interesting alternative for cosmetic industry. From the nutritional quality point of view, the cell cultures have higher contents of valuable lipids, dietary fiber, sugar, protein and amino acid composition, when compared to berry fruits. For example, cloudberry contains rare polymeric tannins, ellagitannins, possessing strong antimicrobial properties against MRSA bacteria, the discovery which might find new possibilities in wound healing and fighting against antibiotic resistance. Lingonberry cells also contain anthocyanins, campesterol,  $\beta$ -sitosterol and oleanolic acid concentrations orders of magnitude higher than the values recorded from fruits.

*Capsicum* sp. fruits possess characteristic and unique class of alkaloids, namely capsaicinoids (e.g. capsaicin) and capsinoids (e.g. capsiate), that exhibit health-promoting properties such as antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, anticancer and antiobesity. Capsinoids are less irritant compounds and therefore, more interesting as cosmetic ingredients, food supplements and functional foods in which non- or low-pungent properties are preferred. In the frame of VTT-coordinated EU *InnCoCells* project, we established suspension cultures from various *Capsicum* sp., and their extracts were subjected to target and non-target metabolite profiling. Overall, characteristic compounds, e.g. capsaicinoids and capsinoids, as well as hydroxycinnamic acid, carboxylic acids, amino acids, polyamines, fatty acids and their derivatives were most abundant compounds in *Capsicum* sp. cell cultures. Acyclic diterpenes, e.g. capsianosides, have been revealed rarely in nature. Interestingly, in our targeted analyses capsianosides were also detected. These compounds possess antihypertensive and antibacterial properties. VTT antimicrobial assays also revealed that our extracts inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*.

With increasing demand and numerous sustainability challenges concerning traditional coffee agriculture, there is a pressing need for alternative ways of producing coffee. Due to the high demand of coffee, more acreage is required to produce enough coffee beans, leading to deforestation – particularly in sensitive rainforest areas. We have demonstrated that coffee cells can be produced in a bioreactor. The first batches produced in our laboratory have the same sensory properties as conventional coffee. The innovation can open entirely different avenues for diverse applications for cellular agriculture.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

## Genome editing to develop resistance of Spanish Bomba rice to blast disease

Andrea Saba-Mayoral<sup>1</sup>, Ludovic Bassie<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,2</sup>, Teresa Capell<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Applied Plant Biotechnology Group, Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

andrea.saba@udl.cat

Bomba is an elite Spanish commercial rice variety highly susceptible to blast disease caused by the fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. Rice blast epidemics are very prevalent in all rice growing areas in Spain and internationally, causing substantial yield losses every year. In 2017, the EU banned the most effective chemicals used to control rice blast and the few remaining chemicals effective against the disease are currently being phased out as a result of more stringent environmental regulations. This means that farmers are being placed in an extremely difficult and precarious position. There is a very urgent unmet need for the development of sustainable, non-chemical means to control the disease. Firstly, we developed and published an efficient and reproducible genetic transformation system for Bomba. We then used the transformation system in genome editing experiments to knock out particular rice endogenous susceptibility genes which facilitate infection by *M. oryzae*. We report recovery of KO mutant lines for a number of different blast susceptibility genes. We also report an in depth characterization of the KO mutant plants prior to embarking on biological testing to verify resistance to the pathogen in the greenhouse and subsequently in field trials.





## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Activation of the native PHYTOENE SYNTHASE 1 promoter by modifying near-miss *cis*-acting elements induces carotenoid biosynthesis in embryogenic rice callus**

Guillermo Sobrino-Mengual<sup>1,†</sup>, Derry Alvarez<sup>1,‡,§</sup>, Richard M. Twyman<sup>2</sup>, Christopher Gerrish<sup>4</sup>, Paul D. Fraser<sup>4</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Applied Plant Biotechnology Group, Department of Plant Production and Forestry Science, University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> TRM Ltd, PO Box 493, Scarborough, YO11 9FJ, United Kingdom.

<sup>3</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

<sup>4</sup> Royal Holloway University of London, Department of Biological Sciences, Egham Hill, Egham, Surrey, TW20 0EX. UK.

\* Current affiliation: Division of Biological and Environmental Sciences and Engineering, Center for Desert Agriculture, BioActives Lab, King Abdullah University of Science and Technology (KAUST), Thuwal, Saudi Arabia.

† These authors contributed equally to the work.

\* Author for correspondence: email paul.christou@udl.cat orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6358-7396>

Carotenoids are tetraterpenoids which in plants are synthesized in plastids. Their biosynthesis involves the condensation of isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) to generate the C<sub>20</sub> intermediate geranylgeranyl diphosphate<sup>1</sup>. Modulation of carotenoid biosynthesis is a major target for the improvement of staple crops due to the multiple nutritional and other health benefits of a number of such molecules for humans and animals<sup>2,3</sup>.

Metabolic engineering in plants typically involves the introduction of transgenes and/or the mutation or silencing of endogenous genes. An alternative approach is promoter modification to switch genes on or off in particular tissues. To activate silent genes in rice endosperm, we explored an approach based on the screening of promoters for near-miss *cis*-acting elements that can be converted into functional endosperm-specific regulatory motifs by editing 1–4 nucleotides. Such minimal interventions would awaken “silent latent endosperm-enabled promoters” (SLEEPERS). To test this hypothesis, we used the rice PHYTOENE SYNTHASE-1 (*PSY1*) gene in proof of concept experiments because the product of this gene is responsible for the first committed step in the carotenoid biosynthesis pathway, and is not expressed in rice endosperm. Sequence analysis of the promoter region identified six motifs within a 120-bp region ~300 bp upstream of the transcriptional start site that differed from endosperm-specific *cis*-acting elements by up to four nucleotides, and “corrected” them to match functional elements. Functional analysis was then used to compared the “corrected” and “uncorrected” promoters driving *PSY1* expression in transgenic rice callus also expressing PHYTOENE DESATURASE (*PDS*), the subsequent step in the pathway. Callus transformed with the corrected *PSY1* construct and the *PDS* transgene accumulated carotenoids and exhibited a color phenotype, whereas callus transformed with the uncorrected *PSY1* construct and *PDS* lacked carotenoids and remained white. Our results confirm that the SLEEPER strategy may be used for the activation of non-expressed native plant genes<sup>4,5</sup>.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Understanding and improving starch biosynthesis in rice using CRISPR/Cas9 genome editing of Waxy/GBSSI**

Erika Soto Chavarro<sup>1</sup>, Lucía Pérez Alvarez<sup>2</sup>, Gemma Farré<sup>2</sup>, Ludovic Bassie<sup>2</sup>, Gemma Villorbina Noguera<sup>1</sup>, Teresa Capell Capell<sup>2</sup>, Paul Christou<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, Physics, Environmental and Soil Sciences. School of Agrifood, Veterinary, Forestry Science and Engineering (ETSEAFIV). University of Lleida-Agrotecnic Center, Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Department of Forestry and Agricultural Science and Engineering. School of Agrifood, Veterinary, Forestry Science and Engineering (ETSEAFIV). University of Lleida-Agrotecnic Center, Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, Spain.

Correspondence email: erika.soto@udl.cat

Starch is the major component of rice endosperm and comprises a mixture of the polysaccharides amylose and amylopectin. The mutation of genes in the starch biosynthesis pathway has a profound effect on starch quality and quantity and is an important target for plant breeders. Mutations in endosperm starch biosynthetic genes may impact starch metabolism in vegetative tissues such as leaves in unexpected ways due to the complex feedback mechanisms regulating the pathway. Surprisingly this aspect of global starch metabolism has received little attention.

We used the genome editing tool, CRISPR/Cas9, to introduce mutations affecting the *Waxy* (*Wx*) gene locus encoding granule-bound starch synthase I (GBSSI) in rice endosperm. Our objective was to develop a mechanistic understanding of how the endogenous starch biosynthetic machinery might be affected at the transcriptional level following the targeted knock out of GBSSI in the endosperm.

We found that the mutations reduced but did not abolish GBSS activity in seeds due to partial compensation caused by the upregulation of GBSSII. The GBSS activity in the mutants was 61-71% of wild-type levels, similarly to two irradiation mutants, but the amylose content declined to 8-12% in heterozygous seeds and to as low as 5% in homozygous seeds, accompanied by abnormal cellular organization in the aleurone layer and amorphous starch grain structures. Expression of many other starch biosynthetic genes was modulated in seeds and leaves. This modulation of gene expression resulted in changes in AGPase and sucrose synthase activity that explained the corresponding levels of starch and soluble sugars. These findings are important for rice quality improvement programs and in studies of starch biosynthesis and metabolism.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Edición genética mediante CRISPR/Cas9 de embriones somáticos de castaño**

M<sup>a</sup> Teresa Martínez<sup>1\*</sup>, Vera Pavese<sup>2\*</sup>, Andrea Moglia<sup>2</sup>, Pablo Piñeiro<sup>1</sup>, Daniela Torello Marinoni<sup>2</sup>, Roberto Botta<sup>2</sup>, Elena Corredoira<sup>1</sup>

\*MT Martínez y V Pavese han colaborado por igual en esta comunicación.

<sup>1</sup> Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC), Sede de Santiago de Compostela, Avd. Vigo s/n 15705, Santiago de Compostela, La Coruña.

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias Agrarias, Forestales y Alimentarias-DISAFSA, Universidad de Turín, Largo Paolo Braccini 2, Grugliasco, 10095 Turín, Italia.

Email de contacto: elenac@mbg.csic.es

El castaño europeo (*Castanea sativa* L.) es una especie muy polivalente en cuanto a su aprovechamiento y de gran relevancia ecológica, económica y cultural en la península ibérica. Esta especie está severamente afectada por las enfermedades de la tinta y el chancro, causadas respectivamente por *Phytophthora cinnamomi* (Pc) y *Cryphonectria parasitica* y cuyos efectos se han acrecentado en los últimos años como consecuencia del cambio climático. Los programas de mejora genética convencionales para la obtención de genotipos resistentes a enfermedades en especies forestales como el castaño se enfrentan a dos problemas: la elevada heterocigosis y el largo tiempo de generación. En los últimos años, CRISPR/Cas9 se ha revelado como la herramienta más importante para la mejora mediante ingeniería genética debido a su simplicidad, flexibilidad en el diseño y alta eficiencia. Esta tecnología permite inducir mutaciones puntuales en una o varias secuencias diana simultáneamente, así como introducir nuevas variantes genéticas por recombinación dirigida por homología. Sin embargo, a pesar de su enorme potencial, esta herramienta apenas se ha utilizado en especies forestales. En el presente trabajo se presentan los primeros resultados de la aplicación de la edición genética con CRISPR/Cas9 en castaño.

En una primera aproximación se ha definido un protocolo para la edición genética de embriones somáticos de castaño con CRISPR/Cas 9 utilizando como marcador de evaluación la edición del gen fitoeno desaturasa (*pds*). Como este gen está relacionado con la biosíntesis de clorofila se espera un fenotipo albino de los embriones somáticos, lo que permitiría discriminar más fácilmente los embriones mutados. Para la edición, los embriones somáticos fueron transformados con *Agrobacterium tumefaciens* que portaba una construcción CRISPR/Cas9 dirigida a dos regiones genéticas conservadas del gen *pds* siguiendo el protocolo de transformación previamente descrito por nuestro grupo (Corredoira et al. 2012). Después de ocho semanas en medio con kanamicina se obtuvo un 6,6% de explantos resistentes a kanamicina y que además mostraban un fenotipo albino. El genotipado de las líneas mediante secuenciación confirmó la edición del gen.

Con el objetivo de inducir tolerancia Pc, en una segunda aproximación se ha investigado la inactivación mediante CRISPR/Cas9 del gen de susceptibilidad *pmr4* que codifica para una calosa sintasa. Aplicando el protocolo previamente definido para el gen *pds*, se han obtenido 7 líneas resistentes a kanamicina y en 4 de ellas se ha confirmado la edición del gen *pmr4*.

## Referencias

Corredoira et al. 2012. *Tree Physiol.* 32:1389-1402

Pavese et al. 2021. *Front. Plant Sci.* 12:728516

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MICINN a través del proyecto PID2020-112627RB-C33.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

## Knocking out strigolactone biosynthetic genes in maize and its impact on metabolism and phenotype

Xin Huang<sup>1</sup>, Andreas Schiermeyer<sup>2</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Stefan Schillerg<sup>2</sup>, Paul Christou<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Aachen, Germany.

<sup>3</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

Email: paul.christou@udl.cat

Strigolactones (SL) are hormones that promote seed germination of parasitic weeds, modulate root architecture, promote tillering, increase drought stress tolerance, and support the proliferation of symbiotic Arbuscular Mycorrhiza (AM) fungi, which help the plant in developing an extended root system to improve water and nutrient acquisition. In maize, SL are produced via the carotenoid biosynthetic pathway involving the two enzymes Carotenoid Cleavage Dioxygenase 7 (*ZmCCD7*) and Carotenoid Cleavage Dioxygenase 8 (*ZmCCD8*), which catalyze the cleavage of 9-cis- $\beta$ -carotene and 9-cis- $\beta$ -apo-10'-carotene, respectively. Precise genome editing using CRISPR/Cas9 technology provides the opportunity to create novel maize varieties with higher productivity while simultaneously minimizing environmental impact. We used CRISPR/Cas9 gene editing to modulate the expression of *ZmCCD7* and *ZmCCD8* in order to assess their function in maize. We confirmed the presence of all input transgenes in maize plants and detected mutations in two independent plant lines in the coding region of *ZmCCD8*. Experiments to generate *ZmCCD7* are also ongoing. In-depth analysis of the *ZmCCD8* mutants will contribute toward a better understanding of the molecular basis controlling structural traits in maize. Future genome sequencing of subsequent generations as well as metabolomic analysis will help to assess fully the impact of these mutations.





## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Plantas de tomate editadas en un gen implicado en la síntesis de melatonina mediante CRISPR-Cas9**Daniel Luna<sup>1</sup>, Sara E. Martínez-Lorente<sup>2</sup>, Rosa M. Rivero<sup>2</sup>, Nuria Alburquerque<sup>1</sup><sup>1</sup> Grupo de Biotecnología de Frutales. Departamento de Mejora Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus de Espinardo, 30100. Murcia.<sup>2</sup> Departamento de Nutrición Vegetal. Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC). Campus de Espinardo, 30100. Murcia.

Email de contacto: nalbur@cebas.csic.es

La melatonina es una molécula pleiotrópica que regula diferentes procesos implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, estando además implicada en la inducción de tolerancia a diferentes estreses abióticos y bióticos en plantas. Sin embargo, los procesos de señalización celular inducidos por esta molécula en dichos procesos son desconocidos. La generación de plantas deficientes en melatonina mediante ingeniería genética puede ayudar a comprender la función de la melatonina frente a los estreses provocados por factores como salinidad, altas temperaturas, escasez de agua, etc.

En este trabajo se han obtenido plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) deficientes en melatonina mediante la inactivación de la serotonina N-acetiltransferasa de tomate (SISNAT), enzima clave de la ruta de síntesis de la melatonina empleando la tecnología CRISPR-Cas9.

Se ha diseñado dos construcciones moleculares para la generar mutaciones de forma específica en el gen *SISNAT* que causen la pérdida de función del gen. Los componentes del sistema CRISPR-Cas9 se han incorporado transformando hojas cotiledonares de la variedad de tomate 'Micro-Tom' con *Agrobacterium tumefaciens*.

La evaluación molecular confirmó la obtención de 16 líneas transformadas (T0) con las construcciones moleculares ensayadas. La eficiencia de edición por el sistema CRISPR-Cas9 de dichas líneas fue del 56,25%. Se encontraron diferencias fenotípicas destacables en las plantas transformadas con mutaciones en el gen *SISNAT* en comparación con las plantas silvestres.

Se seleccionaron 3 de las líneas transformadas (dsRedSISNAT3, SISNAT3 y SISNAT5) de las que se germinaron semillas (T1). Se analizó en ADN de plantas de estas líneas para comprobar que habían sido editadas; además, se comprobó que la expresión del gen *SISNAT* estaba reprimida en las líneas editadas y la concentración de melatonina endógena no se detectó en las mismas.

En este trabajo se ha conseguido con éxito la producción de plantas de tomate editadas genéticamente, defectivas en la síntesis de melatonina para estudiar la función de dicha molécula frente a estreses abióticos en trabajos futuros. Actualmente se están seleccionando otras líneas que sobreexpresan el gen *SISNAT* y así se podrán establecer estudios sobre la relación entre la síntesis de melatonina y la producción de metabolitos secundarios cuando se sometan las plantas de tomate a estreses abióticos.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*, estreses abióticos, RT-PCR, transformación genética.

Agradecimientos: Sara E. Martínez-Lorente cuenta con una Beca de Formación del Personal Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU21/01593).



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Transcriptional regulation of particular MEP and MVA pathway genes in rice seed**Xin Huang<sup>1</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,3</sup><sup>1</sup> Department of Agricultural and Forest Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.<sup>2</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

Email: paul.christou@udl.cat

Isoprenoids are natural products with essential functions in plant growth and human health. They are derived from isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP). In plants, these precursors can be synthesized via two alternative pathways: the mevalonate (MVA) pathway and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway. However, the regulation of these pathways and the function of the corresponding genes are not fully understood. The transcription factor *OsBZ8* has previously been shown to bind to G-box and G-box-like sequences which are associated with the regulation of the isoprenoid-derived phytohormone ABA. We analyzed the promoter region of five genes (*AACT3*, *HMGS1*, *HMGR1*, *DXS2*, *IPPI1*) which encode rate-limiting steps in the rice MEP and MVA pathways. The promoter region of the genes contains a G-box or a hybrid G/C-box. *OsBZ8* and the five genes exhibited similar expression patterns in rice endosperm and embryo. Moreover, Y1H analysis confirmed that *OsBZ8* specifically binds to the G-box or hybrid G/C-box in *HMGR1*, *DXS2*, and *IPPI1*. These findings point towards important aspects of the regulatory mechanism of the genes and provide new insights into rice seed quality breeding using genetic engineering.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

## Functional expression of two major nitrogenase components in transgenic rice

Wenshu He<sup>1</sup>, Can Baysal<sup>2</sup>, Stefan Burén<sup>3</sup>, Xi Jiang<sup>3</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Luis Rubio<sup>3,4</sup>, Paul Christou<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Forest Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota, Minnesota, USA.

<sup>3</sup> Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas, Universidad Politécnica de Madrid, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid, Spain.

<sup>4</sup> Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain.

<sup>5</sup> Catalan Institute for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona, Spain.

Email: lm.rubio@upm.es; paul.christou@udl.cat

Biological nitrogen fixation (BNF) is the reduction of N<sub>2</sub> gas to ammonia by the enzyme nitrogenase. Incorporation of BNF into cereal crops has been a long-term goal of plant biotechnology that will allow the direct use of atmospheric nitrogen, rather than synthetic or natural fertilizers. The engineering of BNF in plants requires the assembly of an active prokaryotic nitrogenase complex, which is yet to be achieved. Here, we generated transgenic rice plants expressing two key components of nitrogenase, nitrogenase cofactor maturase NifB and Fe protein NifH, separately. NifB catalyzes the first committed step in the biosynthesis of FeMo-co (the active-site cofactor of nitrogenase) and Fe protein is the reductase of nitrogenase. The recombinant proteins were formed as soluble proteins *in planta* and correctly targeted and processed in rice mitochondria. The purified NifB protein was functional in the *in vitro* FeMo-co synthesis assay. The purified NifH protein was able to carry out the fundamental roles of the Fe protein, including electron transfer to the nitrogenase component iron-molybdenum protein and the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-co. The stable expression of these two key biologically active nitrogenase components in a major cereal represents the first step toward the engineering of BNF in plants.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Expression of algal limiting CO<sub>2</sub> inducible protein B (LCIB) in rice enhances photosynthetic efficiency and productivity**

Ashwin Vargheese<sup>1</sup>, Wenshu He<sup>1</sup>, Greta Nölke<sup>2</sup>, Stefan Schillberg<sup>2</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering, University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, 52074 Aachen, Germany.

<sup>3</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain.

Email: paul.christou@udl.cat

Increasing in population growth, decreasing agricultural land, and depletion of natural resources require substantial increases in crop productivity, in particular in developing countries. Considerable efforts have been made towards enhancing the photosynthetic efficiency of staple crops to achieve higher yields through conventional breeding. However, progress has been modest, in part due to limited genetic variation in photosynthetic efficiency within the breeding germplasm. The photosynthetic efficiency of C<sub>3</sub> plants is far from its theoretical maximum compared to C<sub>4</sub> crops. *Chlamydomonas reinhardtii* has evolved a carbon concentration mechanism (CCM) to increase the CO<sub>2</sub> concentration in the vicinity of Rubisco. LCIB, structurally characterized as carbonic anhydrase, plays a critical role in the CCM of *Chlamydomonas* by actively capturing and converting CO<sub>2</sub> into bicarbonate in the chloroplast stroma. In concert with other carbonic anhydrases and bicarbonate transporters in the chloroplast, LCIB increases CO<sub>2</sub> concentration in the vicinity of Rubisco. This effectively suppresses the Rubisco oxygenation activity leading to enhanced carboxylation and photosynthetic efficiency. We present an in depth analysis of the biochemical and physiological impact of overexpressing LCIB in engineered rice plants.





## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Micropropagación y transformación genética de la planta carnívora *Byblis liniflora* Salisb., la planta arcoiris**

Alberto Coronado<sup>1</sup>, Marybel Jáquez<sup>1</sup>, Constanza Martin-Vásquez<sup>1</sup>, Abdellatif Bahaji<sup>2</sup>, Vicente Moreno<sup>1</sup>, **Alejandro Atarés<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n 46022, València.

<sup>2</sup> Instituto de Agrobiotecnología IdAB - CSIC. Avenida Pamplona 123, 31192 Mutilva, Navarra.

Email de contacto: aatares@ibmcp.upv.es

En la sociedad actual la novedad y lo diferente es lo que se busca en muchos mercados, entre ellos, el de las plantas ornamentales. Se buscan variedades únicas y exclusivas, aunque sus características dificulten su cultivo. Un ejemplo son algunos mutantes variegados que rozan el albinismo y que presentan grandes dificultades para realizar la fotosíntesis. Otro ejemplo son las carnívoras que tienen necesidades especiales en cuanto al riego, nutrición y condiciones ambientales. La ventaja de trabajar con este tipo de plantas es que su valor en el mercado suele ser muy elevado alcanzando valores de decenas o centenares de euros por una planta.

En nuestra particular búsqueda de lo visualmente atractivo y de la novedad, llevamos algunos años desarrollando métodos para la micropropagación y mejora genética de algunos géneros de plantas carnívoras. En este trabajo se presentan algunos resultados obtenidos en *Byblis liniflora*. En primer lugar, hemos desarrollado un protocolo para su propagación clonal a partir del cultivo tanto en medio sólido como en líquido. El medio líquido presentó ventajas sobre el medio sólido durante el proceso de aclimatación, ya que evitó problemas de pudrición de las raíces. También se realizaron ensayos para la regeneración adventicia a partir de tres tipos de explantes sin meristemos preexistentes (raíz, tallo y hoja) en medios con distintas combinaciones de sales MS, sacarosa y zeatina. Se consiguió un 95, 88 y 20% de eficacia de regeneración adventicia en explantes de raíz, tallo y hoja, respectivamente. En nuestros ensayos más recientes, usamos un vector que porta los genes *NPTII* y *GFP* para transformar esta planta. En primer lugar, se ajustó la concentración de kanamicina que inhibe la regeneración y el crecimiento de los explantes. Además, el uso de *GFP* como gen delator facilitó la identificación de zonas potencialmente transgénicas bajo el microscopio de fluorescencia. Se han conseguido eficacias de transformación -porcentaje de explantes con, al menos, un evento de transformación- del 25.5% en explantes de tallo, 7.7% de hoja y 5,8% de raíz. En la mayoría de explantes se identificó más de un evento de transformación independiente e individualizable. Por último, se ha confirmado mediante PCR la presencia del gen *GFP* en 16 eventos de transformación independientes que presentaron fluorescencia. Por tanto, se puede concluir que hemos conseguido poner a punto por primera vez un protocolo para la transformación genética estable de *Byblis liniflora*.

Además del avance puramente científico, estas técnicas que hemos desarrollado abren nuevas alternativas tanto para la propagación como para la mejora genética de este tipo de plantas con un elevado valor en el mercado de plantas ornamentales.

## Agradecimientos

Constanza Martin-Vásquez agradece a la Generalitat Valenciana la concesión de una beca Santiago Grisolia.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Desarrollo de un protocolo para la regeneración  
y transformación genética de brócoli  
(*Brassica oleracea var. italica*)**Alberto Coronado<sup>1</sup>, Carmina Gisbert<sup>2</sup>, Rosa Porcel<sup>1</sup>, Lynne Yenush<sup>1</sup>, JM Mulet<sup>1</sup><sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n 46022, València.<sup>2</sup> Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera, s/n 46022, València.

Email de contacto: jmmulet@ibmcp.upv.es

El 2022 se presentó como el año más cálido en España desde que existen registros. El aumento de la temperatura promedio de la Tierra conlleva multitud de efectos sobre el medio ambiente, incluyendo alteraciones en los patrones habituales de salinidad y sequía. Estos dos estreses abióticos están interrelacionados y tienen impactos negativos en la agricultura, tales como pérdidas en el rendimiento y desplazamiento geográfico de cultivos.

España es el tercer productor mundial de brócoli, cultivándose principalmente en el sureste de la Península Ibérica (Región de Murcia, Andalucía y Comunidad Valenciana). Es una hortaliza de gran valor nutricional debido a su alto contenido en vitaminas, fibra y otros metabolitos secundarios como flavonoides y glucosinolatos, con propiedades antioxidantes y anticancerígenas. La baja disponibilidad de agua y la salinidad en sus zonas de cultivo hacen necesario el desarrollo de nuevas variedades de brócoli tolerantes a estas condiciones.

Actualmente estamos optimizando metodologías para desarrollar nuevos cultivares de brócoli modificado por CRISPR con una mayor capacidad de adaptación ante escenarios de salinidad y sequía. Antes de abordar la transformación genética es importante disponer de protocolos de regeneración eficientes. Para ello, se ha realizado un ensayo para comparar tres cultivares de brócoli (10, X6 y M), dos tipos de explantes (cotiledón e hipocotilo) y 8 medios de cultivo que difieren en las combinaciones y/o concentraciones de los reguladores de crecimiento. En concreto, se ha añadido al medio base la citoquinina 6-bencil-adenina o la zeatina ribósido (a 1 y 1.5 mgL<sup>-1</sup>) combinadas o no con el ácido indolacético (0.5 mgL<sup>-1</sup>). En los medios evaluados se ha observado organogénesis indirecta con formación de callo, raíces y yemas adventicias, pero también necrosis. Se han tomado datos a los 15 y 30 días de cultivo, cuando ya se pueden aislar brotes para su elongación en algunos genotipos y medios de cultivo. El mayor porcentaje de explantes con yemas se ha obtenido en hipocótilos del genotipo 10 que también ha mostrado el menor porcentaje de necrosis. En los tres cultivares los hipocótilos presentaron mejores tasas de regeneración respecto de los cotiledones, con un 87% en el cultivar 10 en los medios 2 y 7, un 42% en el cultivar X6 en el medio 2 y un 25% en los medios 1 y 5 para el cultivar M.

Por otra parte, se determinó la concentración de kanamicina que inhibe el crecimiento y regeneración de estos explantes, ya que en las construcciones que se van a utilizar en los ensayos de transformación genética, el gen de selección es el *nptII*. Se ha evaluado la regeneración en medio de inducción de la regeneración sin antibiótico (control) y en este medio con 15, 30 y 60 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina. No se ha obtenido regeneración en ninguno de los tres medios con presión selectiva, por lo que la concentración de 15 mgL<sup>-1</sup> es suficiente para la selección.

Aunque se van a realizar ensayos para optimizar la regeneración, se han iniciado los primeros ensayos para la transformación de brócoli. Se han obtenido tres eventos de regeneración independientes en medio con presión selectiva que se están analizando para confirmar la inserción del tDNA.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Caracterización fenotípica y genética de un mutante de tomate afectado en la coloración de sus hojas**

Alberto Aguiar<sup>1</sup>, Marybel Jáquez<sup>1</sup>, Benito Pineda<sup>1</sup>, Fernando J. Yuste-Lisbona<sup>2</sup>, Rafael Lozano<sup>2</sup>, Vicente Moreno<sup>1</sup>, Alejandro Atarés<sup>1</sup>

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

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

Email de contacto: alagdo@hotmail.com

Se ha identificado un mutante recesivo, *40gusmm*, obtenido a partir de una colección de líneas T-DNA de la variedad Money Maker de tomate. En el escrutinio de esta colección se vio que el mutante estaba afectado en la coloración de sus hojas. En los estadios iniciales las plántulas mutantes presentan un menor desarrollo comparado con las WT y los cotiledones ya tienen una coloración verde menos intensa. La diferencia de las plantas mutantes es más clara cuando aparecen las primeras hojas verdaderas con un patrón de coloración alterado, similar a una clorosis internervial. Además, los folíolos también tienen alterada su morfología, menos aserrada, y su capacidad de desarrollo, sobre todo, cuando las plantas crecen en el invernadero. El desarrollo vegetativo del mutante es menor que el de las plantas WT y no llegan a desarrollar flores ni frutos.

Existente una diferencia significativa en el contenido de clorofila A y B entre el mutante y el WT. Se han llevado a cabo diferentes experimentos para ver la influencia de aportes adicionales de sacarosa o de hierro en el desarrollo del mutante pero no se ha observado ninguna reversión del fenotipo mutante. Con el fin de ver la influencia de la parte radicular sobre el fenotipo observado en la parte aérea se han realizado injertos combinando ambos genotipos. Se observa que al injertarse parte aérea mutante sobre raíz WT el mutante se desarrolla como una planta normal (ausencia de clorosis y alteraciones en la morfología de las hojas) llegando a producir flores y frutos con semillas viables.

El análisis genético de esta línea indicó que el fenotipo se debe a una mutación de carácter monogénico recesivo. Además, mediante el estudio de la resistencia a la kanamicina en las plantas TG2, se determinó que esta línea es portadora de un inserto con el gen *nptII* funcional y que éste no es el causante del fenotipo mutante. Al no existir cosegregación, se ha procedido a obtener una generación F2 tras cruzar la planta mutante con *Solanum pimpinellifolium* y, a partir de ese material, se va a proceder a la identificación del gen candidato mediante mapeo por secuenciación. En el futuro pretendemos conocer cuál es el gen responsable de este fenotipo mediante el empleo de técnicas de edición génica que permiten anular o modificar la expresión de dicho gen.

## Agradecimientos

Proyectos de I+D+i PID2019-110833RB-C31 y PID2019-110833RB-C32 financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Alberto Aguiar agradece a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo otorgado mediante el programa de Formación de Doctores Jóvenes.



## Sesión Temática IV - Modificación Genética y Tecnologías Emergentes

**Eliminación de virus en plantas de albaricoquero micropropagadas mediante tratamiento con nanopartículas de plata**Marina Martín-Valmaseda<sup>1</sup>, Cristian Pérez-Caselles<sup>1</sup>, Lorenzo Burgos<sup>1</sup>, Nuria Alburquerque<sup>1</sup><sup>1</sup> Grupo de Biotecnología de Frutales, Departamento de Mejora Vegetal, CEBAS-CSIC. Campus de Espinardo, Edificio N°25, 30100 Murcia.

Email de contacto: marinavalmaseda@hotmail.es

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han demostrado tener propiedades antimicrobianas y son efectivas contra una amplia gama de microorganismos. Sin embargo, es necesario encontrar la concentración de AgNPs óptima para maximizar el efecto antimicrobiano sin que se produzca un efecto tóxico en las plantas.

En trabajos anteriores observamos que la adicción de AgNPs al medio de cultivo de las variedades de albaricoquero 'Canino' y 'Mirlo Rojo' micropropagadas en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) tenía un efecto positivo sobre la micropropagación de ambas variedades mejorando la proliferación e incrementando la biomasa.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la concentración de AgNPs sobre la eliminación de patógenos. Para ello se cultivaron brotes de 'Canino' infectadas por Plum pox virus (PPV) y 'Mirlo Rojo' infectados por Hop stunt viroid (HSVd) en SIT añadiendo al medio AgNPs (0, 25, 50, 75 y 100 mg/L). Tras 4 semanas de tratamiento, se realizó el cultivo de meristemos extraídos a partir de estos brotes. Se ha analizado la viabilidad de los meristemos como porcentaje de brotes establecidos tras 12 semanas desde el rescate respecto al número de meristemos rescatados. Una vez los meristemos crecieron hasta dar lugar a un nuevo brote se analizó la presencia o ausencia de los patógenos mediante extracción de ARN y RT-PCR.

En la variedad 'Canino' la mayor viabilidad (aproximadamente el 50 %) se observó en los meristemos obtenidos a partir de los brotes cultivados con 75 mg/L de AgNPs. En el caso de la variedad 'Mirlo Rojo' no se observan diferencias significativas en la viabilidad de los meristemos extraídos de los distintos tratamientos de AgNPs.

En cuanto a la detección del PPV, se obtuvieron brotes de 'Canino' libres del virus en todos los tratamientos y, aunque no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes observados en las distintas concentraciones de AgNPs, el número de brotes libres del virus fue ligeramente superior a 75 mg/L (85,7% de los brotes). Sin embargo, no se consiguió eliminar HSVd con ninguno de los tratamientos en la variedad 'Mirlo Rojo'.

Las tasas de eliminación del virus alcanzadas en este trabajo permiten afirmar que esta técnica es útil para la producción de plantas de albaricoquero libres del virus PPV.

Palabras clave: nanobiotecnología; proliferación; Sistemas de Inmersión Temporal, virus, viroide.

Agradecimientos: C. Pérez-Caselles cuenta con una Beca de Formación del Personal Universitario del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (FPU19/03767) y M. Martín-Valmaseda con una beca JAE-Intro (JAEINT\_22\_00399). Este estudio forma parte del Programa AGROALNEXT que ha sido financiado por MCIN con fondos NextGenerationEU (PRTR-C17. I1) y por la Fundación Séneca con fondos de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM).





Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa

## **Biotecnología vegetal aplicada a la mejora genética en especies hortícolas dentro de una empresa de semillas**

José Luis Couselo Bandín*Semillas Fitó. Departamento de I+D*

jlcouselo@semillasfito.com

Semillas Fitó es una empresa española independiente y de propiedad familiar, fundada en 1880 en Barcelona. En 143 años, ha pasado de ser una pequeña empresa de semillas a convertirse en una de las líderes en el sector de la mejora genética, producción y distribución de semillas de especies hortícolas y extensivas. Actualmente está presente en más de 70 países. Una de las claves de este crecimiento ha sido su apuesta por la I+D+I, que recibe una inversión anual aproximada del 20% de la facturación. Una parte importante de esa inversión se dirige actualmente al campo de la biotecnología vegetal.

La utilización de técnicas de biotecnología vegetal ha tenido un impacto muy significativo en Semillas Fitó y en el resto de las empresas de semillas que desarrollan sus propias variedades híbridas. Estas empresas hemos ido adoptando de forma creciente diferentes técnicas para dar apoyo y acelerar la mejora de las características genéticas de los diferentes cultivos. Esto ha sido más evidente sobre todo en los últimos 30 años debido a los grandes avances tecnológicos en el campo de la genética.

Las tres áreas de conocimiento en las que la utilización de técnicas biotecnológicas tiene de mayor importancia en las empresas de semillas son la genómica, la patología y la biología celular.

En el área de la genómica una de las principales actividades ha sido la identificación y caracterización de QTLs y genes causales de características fenotípicas interesantes para los cultivos. Esto ha permitido disponer numerosos marcadores moleculares relacionados con el color, sabor, maduración, resistencia a patógenos, etc. Estos marcadores se utilizan rutinariamente para guiar los cruces de la mejora vegetal de forma más rápida y eficiente.

En el área de patología la principal actividad ha sido la puesta a punto de bioensayos que permitan por un lado evaluar el comportamiento de diferentes poblaciones frente a plagas y patógenos. Esto permite poder asociar características fenotípicas con perfiles genotípicos concretos. Por otro lado, los bioensayos permiten también estudiar las interacciones entre las plantas y los patógenos. Esto puede ser también de mucha utilidad para la identificación de genes clave en la interacción.

En el área de la biología celular las principales actividades son la multiplicación clonal *in vitro*, el rescate de embriones *in vitro*, la alteración de la ploidía, la producción de líneas doble haploides o la puesta a punto de herramientas de edición genómica en los diferentes cultivos de interés.

Muchos de los proyectos biotecnológicos necesarios en las empresas de semillas tienen un enfoque multidisciplinar que combina tanto la genómica, la patología y la biología celular. Un ejemplo sería el desarrollo de poblaciones recombinantes mediante la obtención de líneas doble haploides con las que poder realizar bioensayos de patología con fenotipados precisos que puedan ser utilizados luego para mapeos genéticos también precisos y así identificar genes implicados en resistencia a un patógeno.

Aprovechando la invitación del Comité Organizador de la XV Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales, desde Semillas Fitó daremos una visión detallada de como se utilizan diferentes herramientas biotecnológicas en el contexto de los proyectos de mejora genética de una empresa de semillas, centrándonos sobre todo en el área de biología celular en el que las técnicas de cultivo *in vitro* son una de las bases de los proyectos.



## Espacio Ciencia-Tecnología-Empresa

**Agromillora, la micropropagación 'is in our nature'**

Silvia Valladares, Mireia Bordas

Agromillora Iberia. C/ El Rebato, s/n Subirats 08739 Barcelona. Svalladares@agromillora.com

Agromillora fue fundada en 1986 en Subirats (Barcelona), siendo su actividad principal la producción y comercialización de plántones de frutales propagados *in vitro*, y de plántones de olivo. La empresa es inventora e impulsora de la implantación de sistemas de cultivo eficientes y sostenibles en alta densidad, primero del olivo y posteriormente de otras especies como el almendro y los cítricos. Asimismo, es proveedora de servicios a los obtentores y editores para la multiplicación y difusión de material genético por todo el mundo (Plataforma de Material Vegetal).

En la actualidad, Agromillora se ha convertido en la plataforma de multiplicación y comercialización de plantas más grande del mundo, con altos estándares de calidad genética y fitosanitaria. Agromillora Group, cuenta con 628.000 m<sup>2</sup> de invernaderos y más de 1500 empleados, y está presente en 25 países a través de 12 filiales (España, EEUU, Australia, Chile, Brasil, Turquía, Túnez, Marruecos, Perú, México) y 10 laboratorios de multiplicación *in vitro*. Durante el año 2022, la compañía hizo entrega de más de 92 millones de plantas, de los cuales 63 millones fueron producidos por micropropagación.

**Agro-producción**

El grupo es líder mundial en la producción de árboles frutales y otras especies leñosas y semi-leñosas (*Prunus*, olivos, cítricos, manzanos, pequeños frutos, avellanos, pistachos, nogales y variedades ornamentales, etc.). Este liderazgo es fruto de las soluciones que Agromillora ha aportado a la modernización e industrialización de la agricultura, entre las que se encuentran: i) aplicación a gran escala de la técnica de multiplicación clonal *in vitro*; ii) desarrollo de técnicas de cultivo en súper alta densidad totalmente mecanizadas para aumentar la eficiencia de producción; iii) innovación en la producción viverística industrial y en los estándares de calidad.

En los últimos 35 años, Agromillora ha producido a través del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales unos 500 millones de plantas de más de 100 especies diferentes con más de 350 variedades distintas. Agromillora es un claro ejemplo de éxito comercial a través del empleo de las técnicas de micropropagación por cultivo *in vitro* que representan la mejor alternativa actual para la clonación rápida. El empleo de las técnicas biotecnológicas en la producción vegetal, así como el control genético y fitosanitario a través de técnicas de biología molecular, conjuntamente con herramientas informáticas de control operativo de trazabilidad y rendimiento, permiten alcanzar un alto nivel de eficiencia productiva, de calidad de producto y de servicio al cliente.

**Agro-innovación y desarrollo**

El crecimiento de Agromillora ha ido paralelo a una intensa actividad de investigación, desarrollo e innovación. La empresa participa en proyectos de I+D+i en colaboración con Centros Públicos de Investigación, Universidades, y otras empresas privadas, así como en proyectos multi-disciplinares Internacionales. Entre las actividades principales destacan la participación en programas de mejora genética de variedades de olivo, y portainjertos de *Prunus* y de cítricos, evaluación multi-localidad de nuevos materiales genéticos (variedades resistentes de viña, portainjertos de manzano Geneva®, portainjertos de cerezo Corette®, portainjertos de cítricos de la UF y USDA, etc.), desarrollo de modelos agronómicos sostenibles, y desarrollo de protocolos de micropropagación para nuevas especies.



## Control de la estabilidad genética en *Mentha aquatica* conservada *in vitro*: efecto del medio de cultivo y la iluminación

Carmen Martín<sup>1</sup>, Miguel Ibáñez<sup>2</sup>, M. Elena González-Benito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S.Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Av. Puerta de Hierro, nº 2 – 4, 28040 Madrid.

<sup>2</sup> Departamento de Economía Agraria, Estadística y Gestión de Empresas, E.T.S.Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid, Av. Puerta de Hierro, nº 2 – 4, 28040 Madrid. Email de contacto: mariacarmen.martin@upm.es

Optimizar la eficiencia de los tratamientos de conservación *in vitro* requiere de modificaciones como la adición de sustancias para retardar el crecimiento, reducción de la temperatura y/o la intensidad lumínica. Los tratamientos más efectivos pueden alargar con éxito los periodos entre subcultivos, pero estas modificaciones suponen en muchos casos condiciones de estrés adicionales a las habituales en el cultivo *in vitro* de plantas. El resultado ideal de un protocolo de crecimiento lento para conservación debe, por tanto, alargar el tiempo de cultivo garantizando un nivel alto de recuperación del material tras la conservación, al mismo tiempo que no compromete la estabilidad genética de las plantas.

En este trabajo hemos estudiado la respuesta de vástagos de *Mentha aquatica* L. bajo distintos tratamientos de conservación *in vitro*, en los que se han probado dos intensidades lumínicas (80 y 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y medios de cultivo modificados ( $\frac{1}{2}$  MS, o la adición de 1% manitol), frente al medio de cultivo control (MS + 3% sacarosa). Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 5° C y 16 h de fotoperiodo durante 6, 12 o 19 meses. Al final de ese tiempo se tomaron muestras de hoja que fueron congeladas a -80° C hasta el momento de la extracción de ácidos nucleicos. Al mismo tiempo, los vástagos fueron transferidos a un medio MS suplementado con un 3% sacarosa y cultivados a 25° C y 16 h de fotoperiodo ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) durante 1 mes. Al final de ese periodo se evaluó la tasa de regeneración y crecimiento en los distintos tratamientos y condiciones lumínicas.

La evaluación de la estabilidad genética se llevó a cabo, tras la extracción de DNA de las muestras congeladas, mediante marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y SSR (Simple Sequence Repeat). También se llevó a cabo una extracción de RNA de las muestras congeladas a partir del cual se realizaron qPCRs de genes involucrados en estrés oxidativo (SOD) y en la ruta de la biosíntesis de monoterpenos, los cuales podrían ser indicadores de estrés oxidativo. Para poder evaluar el efecto de los tratamientos ensayados sobre las condiciones finales de los vástagos conservados *in vitro* se ha llevado a cabo un análisis de asociación entre los caracteres morfológicos medidos y los marcadores genéticos de estabilidad y de expresión génica.

Los análisis realizados revelan una alta estabilidad genética entre las muestras obtenidas después de la conservación bajo las distintas condiciones, pero sí se observan diferencias significativas en la expresión de algunos de los genes estudiados.



## Analysis of global H3K9 methylation and H4 acetylation dynamics during somatic embryogenesis in cork oak

Natalia E. De La Paz, Elena Carneros, 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 (SE) is a powerful *in vitro* regeneration process with many biotechnological applications in breeding, propagation and conservation programs. Cork oak (*Quercus suber* L.) is one of the most characteristic woody species of the Mediterranean ecosystem with a great ecological and economic value. Despite the great potential of SE in regeneration of forest species, its efficiency is low in many cases, being the regulating mechanisms of the process largely unknown. Increasing evidence indicates that epigenetic reprogramming plays a key role during induction and progression of SE, through DNA methylation, but less is known about the involvement of histone modifications.

In this study we have analysed the dynamics and possible role in cork oak SE of two relevant histone post-transcriptional modifications, the H3K9 methylation and the H4 acetylation. Changes in global levels of these epigenetic marks and expression patterns of some of their regulating enzymes were characterized. Furthermore, effects of the inhibitors of H3K9 methyltransferases (BIX-01294) and histone deacetylases (SAHA) on SE were evaluated. Results showed that the initiation of SE involves H3K9 hypermethylation which correlated with the expression profile of the histone methyltransferase *QsSURV4-like*, upregulated at early stages of SE. On the other hand, results indicated that embryo development is associated with H4 acetylation, correlating with the upregulation of the histone acetyltransferase *QsHAC1* in developing embryos, whereas the histone deacetylase *QsHDA2* was repressed at this stage of development. Treatments with BIX-01294 and SAHA revealed changes in the bulked levels of these histone modifications and affected the SE process, inducing expression of embryogenesis genes, as *QsSERK1-like*, and increasing the embryo production. These results provide new insights into the role of histone epigenetic marks in SE of forest trees, where scarce information is available, and open the door for new epigenetic strategies to improve *in vitro* regeneration for reforestation programs.

### References:

- Berenguer et al. (2017) *Front Plant Sci.* 8:1161. doi: 10.3389/fpls.2017.01161.  
Carneros et al. (2023) *Plants* 12(7):1542. doi: 10.3390/plants12071542.

### Acknowledgements:

Work supported by projects PID2020-113018RB-I00 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033), TED2021-129633B-I00 and CPP2021-008750 (funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and NextGenerationEU/PRTR). NdIP is recipient of a predoctoral grant (PRE2021-097697) funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and "ESF Investing in your future".





## PÓSTERES. Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Micropropagación de encinas seleccionadas  
por su tolerancia a *Phytophthora cinnamomi***M<sup>a</sup> Teresa Martínez<sup>1</sup>, Fátima Mosteiro<sup>1</sup>, Beatriz Cuenca<sup>2</sup>, Sol Campaño<sup>1</sup>, Felipe Pérez<sup>3</sup>, Elena Corredoira<sup>1</sup><sup>1</sup> Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC), Sede de Santiago de Compostela, Avd. Vigo s/n 15705, Santiago de Compostela, La Coruña.<sup>2</sup> Grupo TRAGSA, Viveros Maceda, Carretera Maceda-Balderei, - Km 2 - 32700 Maceda, Orense.<sup>3</sup> Dirección General de Biodiversidad, Bosques y Desertificación, Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO), Avenida Gran Vía de San Francisco 4 – 6, 28005, Madrid. Email de contacto: temar@mbg.csic.es

La encina (*Quercus ilex* L.) es la especie forestal más representativa del bosque mediterráneo. En España ocupa el 25% de su superficie forestal y aparece formando parte de encinares y dehesas. La dehesa es el sistema agroforestal por excelencia de la Península Ibérica. Se trata de un ecosistema de aprovechamiento múltiple de gran importancia económica, ecológica y social. En las últimas décadas la dehesa ha experimentado un grave deterioro por la muerte de miles de árboles afectados por el síndrome de la seca. La seca es una enfermedad compleja, resultado interacción entre brotes de patógenos transmitidos por el suelo, principalmente *Phytophthora cinnamomi*, eventos climáticos extremos relacionados con el cambio climático y una gestión inadecuada. En este contexto, la Subdirección General de Política Forestal y Lucha contra la Desertificación del Ministerio para la Transición Ecológica y Reto Demográfico (MITECO) aprobó en 2019 el Programa Nacional de Mejora y Conservación de Recursos Genéticos de la encina y el alcornoque frente al síndrome de la seca, con la participación de TRAGSA, como coordinador del programa. El propósito de nuestro grupo dentro del programa fue la micropropagación, vía proliferación de yemas axilares, de 24 plantas de encina (4-12 años) seleccionadas en proyectos previos por ser tolerantes al stress hídrico y a *P. cinnamomi*, con el objetivo de obtener material mejorado suficiente para establecer parcelas de ensayo y poblaciones de mejora. Para iniciar el establecimiento *in vitro*, se forzó la brotación de las plantas en una cámara climática en condiciones controladas de humedad y temperatura a fin de reducir la contaminación y obtener brotes más vigorosos. Entre 2-4 semanas después, dependiendo del genotipo/planta, los nuevos brotes se aislaron, esterilizaron y cultivaron en medio WPM (Lloyd y McCown 1980) suplementado con sacarosa 3%, benciladenina 0,2 mg/L y agar sigma 0,7%. Todos los genotipos respondieron formando nuevos brotes *in vitro*, pero la estabilización de los cultivos se alcanzó en 18 de los 24 genotipos (75%). Los cultivos estabilizados se multiplicaron en ciclos de 4-6 semanas en medio WPM suplementado con diferentes tipos y concentraciones de citoquininas para determinar su capacidad de proliferación, comprobándose que esta etapa está significativamente afectada por el genotipo. Para el enraizamiento de los brotes, se evaluó el efecto de 2 medios minerales: 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962) y 1/3 GD (Gresshoff y Doy 1972), ambos suplementados con ácido indol-3-butírico 25 mg/L durante 48h. En la mayoría de los genotipos evaluados, los mejores porcentajes de enraizamiento se alcanzaron con el medio 1/2 MS, aunque esta fase, al igual que las anteriores, también resultó afectada por el genotipo.

## Referencias

Gresshoff &amp; Doy (1972) Planta 107:161-170

Lloyd &amp; McCown (1980) Comb Proc Int Plant Prop Soc 30:421-427

Murashige &amp; Skoog (1962) Physiol Plant 15:473-497

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el MICINN a través del proyecto PID2020-112627RB-C33 y por un contrato del MITECO cofinanciado en un 75% por el Programa Nacional de Desarrollo Rural 2014-2020 a través del Fondo Europeo Agrario de Desarrollo Rural (FEADER), submedida 15.2 "Apoyo a la conservación y promoción de los recursos genéticos forestales". La proyección anterior fue financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (RTA2014-00063-C04-04).



## PÓSTERES. Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Micropropagación de material juvenil de argán**Pablo Piñeiro, Fátima Mosteiro, Sol Campañó, Elena Corredoira, M<sup>a</sup> Teresa Martínez*Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC), Sede de Santiago de Compostela, Avd. Vigo s/n 15705, Santiago de Compostela, La Coruña.*

Email de contacto: temar@mbg.csic.es

El argán (*Argania spinosa* (L.) Skeels) es una especie arbórea endémica de Marruecos y Argelia muy bien adaptada a los climas áridos y semiáridos mediterráneos, que presenta un elevado interés económico y agronómico. De sus semillas se extrae un valioso aceite con múltiples aplicaciones en cocina, cosmética y medicina; además, el argán contribuye al desarrollo sostenible de las poblaciones locales y a la mitigación de los efectos del cambio climático en sus países de origen. Recientemente en España, se han puesto en marcha varias iniciativas para la caracterización y selección de material de argán que pueda ser utilizado para la producción comercial y la recuperación de suelos áridos [1]. El éxito de las futuras plantaciones pasa por la puesta punto de un sistema de propagación que permita la regeneración del material previamente seleccionado. Sin embargo, la propagación del argán mediante métodos convencionales (ya sea semillas o estaquillado) es complicada. La aplicación de herramientas biotecnológicas como el cultivo *in vitro* puede ser de gran ayuda, aunque, por ahora la micropropagación de esta especie ha sido poco investigada y los resultados obtenidos poco concluyentes. En este contexto, el objetivo de este trabajo ha sido definir un protocolo eficiente para la micropropagación vía proliferación de yemas axilares de material de origen juvenil como paso previo a la clonación de material adulto.

Para el establecimiento *in vitro* se utilizaron plantas de 2 años de dos genotipos (AG1 y AG3) que fueron forzadas a brotar en una cámara climática. Los nuevos brotes se esterilizaron durante 2,5 o 5 minutos en hipoclorito sódico al 0,2% de cloro libre, seguido de 2 lavados de 10 minutos en agua estéril. Segmentos nodales y apicales (0,5 cm) se cultivaron en medio MS [2] suplementado con 3% sacarosa, 0,65% agar sigma, y 1 mg/l 6-benziladenina (BA). Los porcentajes de contaminación obtenidos indican que es necesario aplicar el hipoclorito durante 5 min. La respuesta *in vitro* fue elevada en ambos genotipos (45-88%) y no estuvo afectada por el tiempo de exposición al agente desinfectante. Para optimizar la etapa de proliferación se ensayaron diferentes composiciones del medio de proliferación donde se evaluó el efecto: i) del medio mineral (MS, MS con macronutrientes a la mitad (½MS), MS con los nitratos a la mitad, WPM [3] y GD [4]), ii) del tipo de citoquinina (BA, zeatina y meta-topolina (MET)), iii) del tipo de auxina (ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido indol-3-acético (AIA)). Los mejores resultados se obtuvieron cultivando los brotes en medio WPM suplementado con 2 mg/l de MET y 1 mg/l de AIA. Para el enraizamiento, brotes de 1,5-2 cm se transfirieron a medio ½MS suplementado con AIB 25 mg/l durante 24 o 48 horas antes de ser transferidos a un medio ½MS desprovisto de AIB y suplementado con 20 µM de tiosulfato de plata. En ambos genotipos, las mejores tasas de enraizamiento se obtuvieron con 24 h en AIB, aunque el genotipo AG1 es el que obtiene los valores más elevados de enraizamiento (56% AG1 versus 30% AG3).

## Referencias

1. Martínez-Gómez et al. (2020) *Fruticultura* 76:66-77
2. Murashige T, Skoog F (1962) *Physiol Plant* 15:473-497
3. Lloyd G, McCown B (1980) *Comb Proc Int Plant Prop Soc* 30:421-427
4. Gresshoff PM, Doy CH (1972) *Planta* 107:161-170

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el MICINN a través del proyecto PID2020-112627RB-C33.



## Optimización del medio basal para la micropropagación del cannabis medicinal (*Cannabis sativa* L.)

José Garrido Gala, Carlos Ferreiro-Vera, Juan José Martínez-Quesada

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.

Email de contacto: j.garrido@phytoPlant.es

El cannabis (*Cannabis sativa* L.) es una especie recalcitrante a las técnicas de multiplicación mediante cultivo *in vitro* [1]. Las causas parecen centrarse en la falta de un medio de cultivo adecuado. Además, los escasos protocolos disponibles no resultan adecuados para todos los genotipos testados. Los trabajos publicados sobre micropropagación de cannabis han hecho un uso extenso del medio de cultivo MS, aunque más recientemente se ha propuesto el uso del medio DKW u otros [2,3] como mejores alternativas para ciertos genotipos. Con todo, son frecuentes problemas tales como tasas de crecimiento y multiplicación bajas, hiperhidricidad y signos de deficiencias nutricionales, como las clorosis foliares. Por tanto, la optimización de la nutrición, proporcionada por el medio basal de cultivo, es el punto de partida para la solución a estos problemas.

Aquí presentamos la aproximación que hemos adoptado, basada en la cuantificación directa de las cantidades residuales de los principales macro- y microelementos en medios de cultivo agotados, frente a otras estrategias tradicionales basadas en el ajuste de la composición del medio el análisis comparativo de los nutrientes tomados por las plántulas desarrolladas *in vitro* [4], o en ensayos factoriales usando diversos medios y modificaciones. Así, se determinaron las cantidades residuales de nutrientes en dos medios de cultivo diferentes (sales MS y DKW, vitaminas B5 y 3% sacarosa), tras soportar el crecimiento de nuestra variedad "Moniek" (CPVO: 20160114) durante 12 semanas. Los elementos cuantificados y las técnicas analíticas usadas fueron: N, S (combustión-CHNS/O); P, K, Mg, Ca, Mn, B, Cu, Fe (ICP-MS); y sacarosa (HPLC).

Las plántulas crecidas en ambos medios arrojaron resultados similares de crecimiento, si bien aquellas crecidas en el medio DKW tuvieron un mejor desarrollo en general y no se observaron signos de deficiencias ni de hiperhidricidad. En cuanto al consumo de nutrientes, este fue entre 2-3 veces superior para P, Mg, Ca y Mn y 8 veces superior para el S en el medio DKW, respecto a MS, aunque sólo el N, P, S, Fe y Cu fueron consumidos en cantidades próximas al 100%. En cuanto a la sacarosa, ésta se encontró completamente hidrolizada a glucosa y fructosa, las cuales se encontraron en cantidades aproximadamente equimolares. El consumo de sacarosa fue más elevado en el medio DKW que en MS, encontrándose cantidades residuales de 23% y 47.5%, respectivamente.

Esta metodología nos ha facilitado el poder encontrar las modificaciones necesarias del medio DKW original, obteniendo así un medio óptimo para la micropropagación de múltiples genotipos de cannabis medicinal.

### Referencias.

1. Adhikary, D.; Kulkarni, M.; El-Mezawy, A.; Mobini, S.; Elhiti, M.; Gjuric, R.; Ray, A.; Polowick, P.; Slaski, J.J.; Jones, M.P.; et al. Medical Cannabis and Industrial Hemp Tissue Culture: Present Status and Future Potential. *Front. Plant Sci.* 2021, 12.
2. Driver, J.; Kuniyuki, A. *In Vitro* Propagation of Paradox Walnut Rootstock. *HortScience* 1984, 19, 507–509.
3. Stephen, C.; Zayas, V.A.; Galic, A.; Bridgen, M.P. Micropropagation of Hemp (*Cannabis Sativa* L.). *HortScience* 2023, 58, 307–316, doi:10.21273/HORTSCI116969-22.
4. Gonçalves, S.; Correia, P.J.; Martins-Loução, M.A.; Romano, A. A New Medium Formulation for *in Vitro* Rooting of Carob Tree Based on Leaf Macronutrients Concentrations. *Biol. Plant.* 2005, 49, 277–280, doi:10.1007/s10535-005-7280-4.



## PÓSTERES. Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática

**Desarrollo de un protocolo de multiplicación para nuevos materiales de pitahaya**

Magdalena Escáñez García<sup>1</sup>, Ana García Pérez<sup>1</sup>, Edgar García Fortea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Seeds for Innovation S.L., Campus de la Universidad de Almería (UAL), Edificio PITA, Ctra. Sacramento s/n. La Cañada de San Urbano, 04120 (Almería).

Email de contacto: malen.escanez@beyond-seeds.com

En especies vegetales como las del género *Hylocereus* (pitahaya), de las cuales no se poseen muchas herramientas genéticas para el mejoramiento, se hace necesario el desarrollo de protocolos que nos permitan mantener y propagar genotipos élite. Sin embargo, los métodos actuales son ineficientes o están diseñados para una escala pequeña no apta para la actividad industrial. Para Seeds for Innovation, como empresa de premejoramiento, es estratégico poder contar con metodologías eficientes de multiplicación de plantas y, en concreto, de cactáceas como estas, cuyo cultivo se está expandiendo por Europa. Asimismo, estas especies con creciente interés en múltiples mercados suponen una alternativa para aquellos ecosistemas con precipitaciones limitadas y suelos áridos o semiáridos, como los que encontramos algunas zonas de la cuenca del Mediterráneo, como en Almería y Murcia. La introducción de cultivos más respetuosos con el medio y más adecuados a las condiciones edáficas y climáticas de la zona es esencial para alcanzar una agricultura más sostenible, reduciendo el impacto medioambiental del sector agrícola y garantizando la soberanía alimentaria. En este aspecto, la Pitahaya es un buen cultivo candidato, pues además de estar perfectamente adaptado a zonas áridas, su fruto posee interesantes propiedades nutricionales, dado su contenido en compuestos antioxidantes y proteínas de interés, como la bromelina (una enzima que favorece la hidrólisis de otras proteínas). La introducción y comercialización de nuevas variedades de pitahaya, por tanto, requiere de la puesta a punto de metodologías eficientes para multiplicación vegetativa que permitan obtener clones a un ritmo elevado y garantizando la sanidad vegetal. Por tanto, el objetivo del proyecto es la optimización de protocolos de micropropagación adaptados a la micropropagación de múltiples especies y genotipos de pitahaya con la finalidad de introducir las en el catálogo de la compañía, ofreciendo una mayor variedad de cultivos a los agricultores que desarrollan su actividad en zonas áridas del país. Para ello, enmarcado en un programa de mejora genética de pitahaya, se ha comenzado con la puesta a punto de la esterilización y el diseño de los medios de cultivo. En esta primera etapa, se ha evaluado la tasa de contaminación tras la introducción desde campo en materiales de diferentes tamaños (cladodios desde 0,5 cm hasta 20 cm) seccionados de múltiples formas, observando tasas de contaminación bastante altas (80%) distribuidas desigualmente en función del tamaño del cladodio. De esta forma, se ha logrado determinar el rango de tamaños más fáciles de gestionar que presentan menores tasas de contaminación: materiales de un tamaño medio que permitan una esterilización intensa sin mermar el rendimiento de respuesta, pero con un tamaño lo suficientemente pequeño como para no tener una carga demasiado elevada de microorganismos. Asimismo, se han evaluado cuatro medios de cultivo, observando diferentes respuestas. Entre los medios de cultivo testados, se ha seleccionado el que mayor respuesta ha obtenido en cuanto a activación de yemas y aspecto de brotes, con el objetivo de pasar a la siguiente fase de multiplicación: escalado de la producción en biorreactores de inmersión temporal. Paralelamente, se han ido haciendo pruebas de aclimatación, consiguiendo la supervivencia y el desarrollo del 100% de las plantas extraídas de medio de cultivo sólido. Por tanto, los resultados obtenidos son prometedores y nos permiten sentar las bases de un protocolo de propagación de pitahaya que sea escalable con el fin de aumentar la producción.





## Establishment and use of a *Vitis* germplasm collection of *in vitro* plants

Carmina Gisbert<sup>1\*</sup>, Sara Mares<sup>1</sup>, Antonio Olmos<sup>2</sup>, Rosa Peiró<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), Universitat Politècnica de València (UPV), Camí de Vera s/n, Ed8E-escJ, 46022 València, Spain.

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

Email de contacto: cgisbert@btc.upv.es

*In vitro* culture includes several techniques useful for plant micropropagation (especially suitable in vegetative propagated plants, and crops with recalcitrant seeds), breeding (e. g. regeneration of transgenic plants, pure lines, or new hybrids), and germplasm preservation (under standard culture conditions, or by cryopreservation).

Among the species that our research team is working on, there is grapevine (*Vitis vinifera* L.). This crop has great economic value worldwide and, specially, for the Mediterranean countries where it is mainly grown as a grafted plant since the arrival to the phylloxera to Europe. Common rootstocks are interspecific hybrids (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* x *V. rupestris*, etc.) with resistance to this aphid, although they can also confer other characteristics or tolerances to the grafted variety. In the last years, we have started the establishment and micropropagation of some varieties and rootstocks to be used with different purposes that include, among others, micropropagation (San Pedro et al. 2017, Electronic Journal of Biotechnology 27: 80-83); induction of embryogenesis and virus sanitation (San Pedro et al. 2017, BMC Plant Biology 17: 226) or the evaluation of rootstocks in culture media with osmotic stressing agents (Peiró et al. 2020, Scientia Horticulturae 226: 109283). As virus infection is common in grapevine, the analyses of Grapevine fanleaf virus (GFLV), Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), and Grapevine fleck virus (GFkV) is carried out by real-time RT-PCR previously to micropropagation to discard the presence of these viruses, commonly found in grapevine, or after sanitation procedures.

Projects related to the rescue of grapevine minor varieties in the Valencian Community, which was a rich area in grapevine cultivars, have resulted in the location of grapevine varieties in risk of disappearance as well as in the identification of new SSR profiles, synonymies, and homonymies (Gisbert et al. 2018, Intechopen 71133; Jiménez et al. 2019, *Vitis* 58: 59-60; García et al. 2020, *Vitis* 59: 101-103; Peiró et al. 2023, *Vitis in press*). These plants are being introduced *in vitro* to increase our grapevine collection that have at this moment around 80 genotypes which includes varieties and rootstocks. Plants were maintained, by duplicated, in MW medium (Peiró et al. 2015, Spanish Journal of Agricultural Research 13, e1005) supplemented with 0.1 mgL<sup>-1</sup> IBA in two culture chambers under standard growing conditions (25 °C, 70 % humidity, and 16/8 h light/dark) and through periodic subcultures. The establishment of plants from neglected vineyards to *in vitro* conditions (by immersion in bleach solutions and washing with sterile water) is the most difficult step due to the high contamination present in the explants. Also, endogenous bacteria are commonly found after establishment. The grant PAID-11-21 from Vicerectorat d'Investigació-UPV which contribute to the maintenance of this collection is acknowledged. Prospections and virus sanitation of minor endangered varieties are funded by Generalitat Valenciana through Conselleria d'Agricultura, Desenvolupament Rural, Emergència Climàtica i Transició Ecològica (S8788000). In this context, we are in process of sanitize the variety Morsí that is only found in one location of Alicante, and it its virus infected with GFkV, GLRaV-3, and GLRaV-1. The procedure that is being used is meristem extraction from *in vitro* micropropagated plants and micrografting in cut grapevine plantlets.



**PÓSTERES. Sesión Temática I – Micropropagación y Embriogénesis Somática****Cultivo tisular verde de *Cannabis*: salto hacia el orgánico**Antonio Romero Arjona<sup>1</sup>, Nicolás García-Caparrós<sup>1</sup>, Verónica Codesido Sampedro<sup>1</sup><sup>1</sup> MIFCO BIOSCIENCES, Carretera A-343, Km 0, 29200, Antequera, Spain.

Email de contacto: v.codesido@mifcobs.com

La demanda de *Cannabis sativa* ha experimentado un crecimiento exponencial en los últimos años debido a la legalización en numerosos países para su utilización tanto medicinal como recreacional, dado el gran número de metabolitos secundarios presentes, principalmente, en las flores femeninas de esta especie. Dentro de este mercado, la utilización de variedades seleccionadas en las que se mantenga mediante procesos de propagación asexual las características fenotípicas y quimiotípicas es prioritario. Por ello, la micropropagación se presenta como una herramienta biotecnológica eficaz para obtener un gran número de plantas élite idénticas, libres de patógenos; así como para mantener la genética a lo largo del tiempo.

Actualmente la gran mayoría de medios de cultivo formulados para la propagación *in-vitro* de *Cannabis sativa* están compuestos por una extensa cantidad de sales inorgánicas, carbohidratos y aditivos como hormonas, vitaminas y/o aminoácidos. La simplificación de estos medios podría contribuir a un desarrollo más eficiente, sencillo y económico de la micropropagación tanto de cannabis como de otras especies vegetales. Además, dentro del sector productivo de estas especies, existe cierta predilección, por parte del consumidor, a la compra de productos cuyo manejo agrícola sea lo más orgánico posible.

Por ello, el objetivo principal de esta investigación es la optimización de medios orgánicos, y el conocimiento de la necesidad de suplementar o no los mismos con vitaminas en ausencia de hormonas; para la instauración y posterior subcultivo de explantes procedentes de plantas madre de dos variedades diferentes; de manera que, todo el proceso productivo, desde la obtención de plantas *in-vitro* hasta el cultivo en invernadero de plantas adultas; podría realizarse completamente en base a una fertilización de origen orgánica, otorgándole un valor añadido al producto final. Cabe recalcar la importancia de dicho estudio debido al consumo directo por parte del paciente del producto final resultante, flor seca en grado API, evitando la adición de componentes no deseados en la flor así como el incremento de la concentración de terpenos.



## Towards tomato drought improvement by colchicine-mediated generation of polyploids.

Pedro Cerdá-Bennasser<sup>1</sup>, Jeroni Galmés<sup>1</sup>, Miquel Àngel Conesa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INAGEA – PlantMed group, Universitat de les Illes Balears, Carretera de Valldemossa km 7.5, 07122, Palma de Mallorca, Illes Balears.

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is among the most important vegetables worldwide, both in terms of production and economic profit. In a climate change scenario, breeding programs to obtain upgraded drought tolerant varieties are essential towards a sustainable agriculture. The aim of this work is to use the exceptional performance of 'de Ramellet' and other Mediterranean landraces under long-term water deficit to obtain new varieties with an enhanced tolerance to drought stress. Wide research has been done around polyploidy as a powerful tool to increase some agronomic traits. Tetraploid crops obtained via application of colchicine, or spontaneous, have demonstrated enhanced drought tolerance (Zhang et al 2015; Rao et al 2020). However, tetraploidization is not a key drought improvement strategy in most horticultural crops, and particularly in tomato. An efficient protocol to induce genomic duplication using colchicine has been adapted to generate different 'de Ramellet' and 'da Serbo' tetraploids from diploid accessions showing outstanding drought tolerance (Praça et al 2009). To do it, shoot tips from germinated plantlets have been treated with colchicine (5 to 12 mM). The explants were incubated for 96 and 120 h at 25 °C in the dark in liquid Murashige & Skoog medium containing MES, vitamins and colchicine. Explants were rinsed with H<sub>2</sub>O and placed into tissue elongation media containing Murashige & Skoog containing MES and vitamins, glucose, plant agar and trans zeatin. After 2 weeks, explants with an appropriate size (0.5 to 1.5 cm) were transferred to rooting media containing the same reagents as elongation media changing trans zeatin for IBA phytohormone. All the process aforementioned was performed at room temperature with photoperiod 16:8. When properly grown, plants were transferred to soil in transparent plastic boxes for a correct acclimation, and leaf samples were collected to analyze polyploidy level with a flow cytometer, following the methodology of Galbraith et al. (1983). Agronomic traits and plant physiology of polyploid plants will be characterized to quantify the level of improvement as compared to the diploid, original genotypes, under well-watered and long-term water stress conditions. Comparison of phenotypic data with gene expression (RNAseq) and metabolomics analyses will deepen the genetic basis that provides enhanced drought tolerance to polyploid plants, allowing to focus on important genes to be considered for generating upgraded commercial varieties.

Funding: SEQ-LIFE (PDR2020/59; Direcció General de Política Universitària i Recerca. Finançat amb el fons de l'Impost del Turisme Sostenible del Govern de les Illes Balears).

Zhang F. et al (2015) *Trees* 29, 1773–1780; Rao S. et al (2020) *Hortic. Res.*, 7:1–18; Praça M. M. et al (2009) *Sci. Hortic* 112:501-505; Galbraith et al (1983) *Science* 220(4601):1049-51.



## Uso del activador de nanovibraciones, o generador de nanopartículas, NeuG7 en bioreactores GreenTray® para la micropropagación de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.)

Carlos R. Mendoza<sup>1</sup>, Mayra L. Orellana<sup>1</sup>, Shushi Nomura<sup>2</sup>, Ramon Dolcet-Sanjuan<sup>3</sup> And Omara Terrones<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Madre Tierra Puebla S de RL. 89 oriente 1413. Granjas San Isidro. Puebla, México CP 72587).

<sup>2</sup> Wellness Co. LTD. 3-13-14.2F Tsukamoto, Yodogawa-Ku, Osaka, Japan 5320026.

<sup>3</sup> Fruticulture Program, IRTA Fruitcentre, Parc Agrobiotech, 25003 Lleida, Spain.

<sup>4</sup> Cenca LTD. San Andres 7 Colonia San José del Puente, Puebla, México CP 72170.

Email de contacto: crolandom1@hotmail.com

La micropropagación es un método de propagación eficiente para la producción de grandes cantidades de plantas clonales. La producción en biorreactores en medio líquido ha sido probada en los últimos años, sin embargo, uno de los principales inconvenientes que presenta esta tecnología son las posibles contaminaciones por virus, bacterias y hongos, en el medio de cultivo, frecuentemente derivadas del material vegetal.

or otro lado, el activador de nanopartículas NeuG7 es un innovador sistema japonés patentado (WO2003055591) de tecnología de resonancia de ondas morfológicas, similar a los nanotubos de carbono. En el sistema NeuG7, se produce una importante generación y activación de fluidos, como el agua y el aire, al nivel de nanopartículas que circulan a través de ellos, y se manifiestan en funciones como esterilización y desodorización. En la literatura están probados sus efectos antibacterianos, antivirales y antifúngicos.

En el presente estudio se adaptaron bioreactores GreenTray® con el sistema NeuG7, tanto para la fase líquida como en la fase gaseosa. El objetivo de este estudio es probar la eficiencia del Sistema NeuG7, en la producción de arándano variedad Biloxi (*Vaccinium corymbosum* L.) propagados en bioreactores GreenTray®, evaluando el NeuG7 como agente antibacteriano y antifúngico, y su utilización de forma antiséptica, en cultivos contaminados, o preventiva.

En el primer ensayo se utilizó brotes del arándano Biloxi contaminado con una bacteria del género *Staphylococcus* o por un hongo, no identificado. En la primera semana de detección de la bacteria, los explantes se cambiaron a un bioreactor GreenTray® adaptado con el sistema NeuG7 y se observó su comportamiento durante las siguiente 4 semanas. Se siguió el mismo procedimiento para el caso de brotes de arándano contaminados por hongo.

En el segundo ensayo se utilizaron explantes que no presentaron contaminación y se colocaron en bioreactores GreenTray® adaptados con el Sistema NeuG7, siguiendo el mismo procedimiento de micropropagación en las fases de multiplicación y elongación y se determinó su eficiencia. En este ensayo, durante la fase de multiplicación y elongación, después de 50 días de cultivo no se ha apreciado ningún síntoma de contaminación, obteniendo resultados similares a los obtenidos tradicionalmente, en medio semi sólido, en cuanto a la tasa de multiplicación y al crecimiento de los explantes.

Los resultados obtenidos en estos ensayos son muy alentadores, ya que, en los dos ensayos, después de 4 semanas de cultivo en el biorreactor GreenTray® incorporando el generador de nanopartículas NeuG7, los cultivos de arándano Biloxi se mantuvieron libres de contaminación, bacteriana o fúngica, y las tasas de multiplicación son muy competitivas.





## Identificación de mutantes de tomate afectados en respuesta necrótica

Marybel Jáquez-Gutierrez<sup>1</sup>, Alberto Aguiar<sup>1</sup>, Constanza Martin-Vásquez<sup>1</sup>, Benito Pineda, Fernando J. Yuste-Lisbona<sup>2</sup>, Rafael Lozano<sup>2</sup>, Vicente Moreno<sup>1</sup>, Alejandro Atarés<sup>1</sup>

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

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

Email de contacto: mary\_ja\_gu@hotmail.com

La necrosis es la muerte de células o tejidos en una planta ocasionada por diversos factores tales como enfermedades, condiciones ambientales desfavorables y deficiencia de nutrientes. El estudio de estos mecanismos a partir de mutantes que tengan respuestas necróticas alteradas puede facilitar la identificación de los genes involucrados. En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una colección de líneas T-DNA de tomate y especies silvestres relacionadas en el contexto de varios proyectos de investigación.

Se ha realizado la evaluación de estas colecciones de líneas T-DNA y se han identificado ocho mutantes recesivos que presentan respuesta necrótica en diversos tejidos a lo largo del ciclo de vida de las plantas: necrosis moderada (*tomato necrotic moderate response mutant; tnm 1, 2 y 3*), necrosis severa (*tomato necrotic severe response mutant; tns 1, 2 y 3*) y necrosis grave (*tomato necrotic critical response mutant; tnc 1 y 2*). En los mutantes *tnm* se observa un porte débil de la planta con presencia de zonas necróticas en las hojas. Aunque su desarrollo fue lento, las plantas llegaron a la etapa adulta desarrollando flores y frutos. En los mutantes *tns* se observó, en etapas iniciales del desarrollo, clorosis en las hojas hasta llegar a una necrosis completa de la planta que incluía el tallo, imposibilitando a la planta llegar a la fase adulta. Por último, las alteraciones en los mutantes *tnc* se presentaron desde el inicio de su desarrollo y comprometiendo la viabilidad de la planta desde los primeros días de cultivo.

Nuestros mutantes son un valioso material para abordar el estudio de los mecanismos que intervienen en la respuesta necrótica y en la muerte celular en tomate. Además, la evaluación de plantas *in vitro* y el empleo de injertos ha permitido analizar de forma más detallada el fenotipo mutante de estas líneas. Tras llevar a cabo el análisis genético se ha determinado que uno de los ocho mutantes presenta cosegregación entre un T-DNA y el fenotipo mutante. El futuro mapeo de los otros siete mutantes permitirá el clonaje de los genes que se encuentran alterados en ellos.

### Agradecimientos

Proyectos de I+D+i PID2019-110833RB-C31 y PID2019-110833RB-C32 financiados por MCIN/AEI/10.13039/501100011033. Constanza Martin-Vásquez agradece a la Generalitat Valenciana la concesión de una beca Santiago Grisolí. Alberto Aguiar agradece a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo otorgado mediante el programa de Formación de Doctores Jóvenes.



## Recapitulación del mutante *Arlequín* sin secuencias de DNA foráneo mediante edición CRISPR y posterior segregación del vector molecular

Benito Pineda<sup>1</sup>, Begoña García-Sogo<sup>1</sup>, José Luis Contreras<sup>1</sup>, Ignacio Moreno<sup>1</sup>, Alejandro Atarés<sup>1</sup>, Abraham S. Quevedo-Colmena<sup>2</sup>, Fernando Juan Yuste-Lisbona<sup>2</sup>, Rafael Lozano<sup>2</sup>, Vicente Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universitat Politècnica de València, Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia.

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

Email de contacto: bpineda@btc.upv.es

Pese a lo valioso que pueda ser, un mutante insercional está sometido a la estricta regulación de los OGMs en la Unión Europea, lo que prácticamente impide su comercialización. ¿Sería posible obtener una fenocopia de un mutante insercional sin secuencias de DNA foráneo? Si se trata de un mutante recesivo de anulación de función, la recapitulación se podría lograr editando la secuencia codificadora y seleccionando un evento de edición funcionalmente similar al del mutante. En el caso de un mutante dominante de ganancia de función, la recapitulación sería mucho más difícil, ya que habría que editar el promotor para lograr un nivel de transcripción similar al del mutante, lo que no sería posible con una estrategia de sobreexpresión (e. g., p35s).

*Arlequín* (*Alq*) es un mutante insercional de tomate, de tipo semidominante, en el que se produce una conversión homeótica de los sépalos en órganos suculentos que maduran como un fruto. Los frutos derivados de los sépalos tienen altos niveles de grados Brix, lo que es interesante en el tomate de industria, y los procedentes del ovario tienen parámetros de calidad superiores, lo que es relevante en el tomate para el consumo en fresco (Pineda et al, 2010). La caracterización molecular reflejó que los cambios en el patrón del desarrollo de los sépalos se deben a una expresión ectópica del gen MADS-Box *TAGL1/ALQ*, consecuencia de la inserción de un T-DNA truncado en un dominio que regula la transcripción de dicho gen (Giménez et al., 2010). El análisis funcional de *TAGL1/ALQ* indicó que el gen desempeña un papel importante en el proceso de maduración, y actúa como un regulador clave en otras etapas del desarrollo reproductivo. Así, Ribelles et al (2019) demostraron que el mayor nivel de expresión del gen *TAGL1/ALQ* activa eventos de división celular en el ovario previos al proceso de polinización, lo que conduce a una mayor tasa de cuajado de fruto. Además, el cuajado independiente de polinización y el mayor nivel de citoquininas endógenas conllevan al mantenimiento de la producción en condiciones de salinidad moderada (Ribelles et al., 2019).

Con el fin de obtener una fenocopia de este mutante sin secuencias de DNA foráneo, editamos la secuencia que regula la expresión del gen *TAGL1/ALQ* mediante CRISPR/Cas9. Tras el fenotipado de las plantas editadas en el invernadero, identificamos una que recapitulaba el fenotipo *Arlequín*. Por último, la segregación del vector molecular ha permitido obtener plantas con fenotipo *Arlequín* que serían indistinguibles de un mutante espontáneo.

### Referencias

Pineda et al (2010). *Plant and Cell Physiology*, 51: 435-447

Giménez-Caminero et al (2010). *PlosONE*, 5(12): e14427

Ribelles et al (2019). *Journal of Experimental Botany*, 70 (20): 5731-5744

### Agradecimientos

Proyectos de I+D+i PID2019-110833RB-C31 y PID2019-110833RB-C32, financiados por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033. El contrato de B.G-S. (PID2019-110833RB-C32) ha sido financiado por MCIN/ AEI/10.13039/501100011033.



## Stable expression of SARS-CoV-2 spike and receptor-binding domain proteins in Bomba rice

Andrea Saba-Mayoral<sup>1</sup>, Guillermo Sobrino-Mengual<sup>1</sup>, Ludovic Bassie<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,2</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Applied Plant Biotechnology Group, Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

andrea.saba@udl.cat

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is a novel coronavirus responsible for the Covid-19 pandemic which infected more than 676.6 million people and caused more than 6 million deaths worldwide. Even though Covid-19 is no longer a pandemic (at least in the industrialized world), it is critical to be prepared for future pandemics drawing on the lessons learned from Covid-19. This is urgent, in particular in developing countries which have not benefitted from vaccination campaigns during Covid-19. We developed a transferrable plant-based production system suitable for developing country applications which does not rely on transient expression. The S1 protein and the receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike protein are important diagnostic reagents and vaccine candidates. We evaluated the constitutive expression of the S1 and RBD proteins in transgenic rice plants and confirmed the accumulation of functional proteins in callus and seeds. Our results demonstrated that crude extracts from callus and seeds, expressing S1 or RBD, were able to bind to recombinant ACE-2 produced in HEK-cells, confirming that the rice-expressed proteins were soluble and correctly folded. This system therefore sets the stage for the development of efficient transgenic plant-based production processes for COVID-19 vaccines and reagents in developing countries. Importantly, because of the generic nature of the technology, the system can be easily adapted for use against future infectious diseases.



## Engineering an *E. coli* glycolate catabolic pathway into rice to enhance photosynthetic efficiency and productivity

Ashwin Vargheese<sup>1</sup>, Wenshu He<sup>1</sup>, Greta Nölke<sup>2</sup>, Stefan Schillberg<sup>2</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Forestry and Agricultural Sciences and Engineering, University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.

<sup>2</sup>Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, 52074 Aachen, Germany.

<sup>3</sup>ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Passeig Lluís Companys 23, 08010 Barcelona, Spain.

Email: paul.christou@udl.cat

Yield and productivity of many C3 crop plants are directly related to the carbon fixation activity of the photosynthetic enzyme Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). This chloroplastic enzyme is far from being efficient because it catalyzes two competing biochemical reactions, carboxylation and oxygenation of Ribulose-1,5-bisphosphate (Rubp). Under high CO<sub>2</sub> concentrations, Rubisco favors the carboxylation of Rubp which leads to carbon fixation. However, lower CO<sub>2</sub> concentrations and high temperatures push Rubisco towards oxygenating Rubp producing phosphoglycolate during photorespiration. Even though photorespiration recycles the toxic phosphoglycolate into phosphoglycerate, it is energetically expensive. Hence, reducing photorespiration is expected to enhance photosynthetic efficiency. A bacterial glycolate catabolic pathway bypasses the photorespiratory pathway and recycles glycolate into glycerate in an energy efficient manner. We describe ongoing experiments to enhance photosynthetic efficiency by engineering an *E. coli* glycolate catabolic pathway into rice. The introduced pathway comprises the three bacterial chloroplast-targeted enzymes glycolate dehydrogenase, glyoxylate carboligase and tartronic semialdehyde reductase.





## Engineering a novel ectopic oxygen scavenging pathway into rice chloroplasts en route to enhance photosynthetic efficiency

Wenshu He<sup>1</sup>, Ashwin Vargheese<sup>1</sup>, Greta Nölke<sup>2</sup>, Stefan Schillberg<sup>2</sup>, Teresa Capell<sup>1</sup>, Paul Christou<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Agricultural and Forest Sciences and Engineering (DCEFA), University of Lleida-Agrotecnio CERCA Center, Lleida, Spain.

<sup>2</sup> Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology IME, Aachen, Germany.

<sup>3</sup> ICREA, Catalan Institute for Research and Advanced Studies, Barcelona, Spain.

Email: paul.christou@udl.cat

Increasing crop productivity to address the growing demand for food is critical. Given that carbon assimilation by photosynthesis is the source of plant productivity, improving the efficiency of photosynthesis has been a major strategy to increase crop productivity. In C3 crops, photorespiration reduces overall photosynthetic efficiency because it results in a 20-50% loss of carbon fixed by photosynthesis. Therefore, reducing photorespiration in C3 crops has been considered an important strategy to improve photosynthetic efficiency and in turn yields in major crops. The oxidation reaction competes with carboxylation at the same active site in Rubisco. The relative concentration of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in the chloroplast stroma mostly determine the balance between carboxylation and oxidation reactions. Carboxylation is favored over oxygenation at low O<sub>2</sub> concentration at the site of Rubisco. Here, we described experiments to engineer a novel oxygen scavenging pathway in rice chloroplasts to minimise production of O<sub>2</sub>, thus reducing photorespiration. We introduced *Lactobacillus buchneri* lactate oxidase (LOX), *Escherichia coli* lactate dehydrogenase (LDH), and *Oryza sativa* catalase (CAT) into rice targeting chloroplasts. LOX serves as the catalyst for the initial step, utilizing O<sub>2</sub> and oxidizing lactate to pyruvate. LDH completes the pathway by converting pyruvate back to lactate. CAT removes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, generated by this pathway. We generated a number of transgenic rice lines and confirmed that the recombinant proteins were correctly processed. Ongoing experiments aim to ascertain the effectiveness of this novel pathway in reducing photorespiration sufficiently to permit substantial increases in photosynthesis, without compromising plant development and fertility.



# SECIVTV 2023

XV Reunión de la Sociedad Española  
de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales





# SECIVTV 2023

XV Reunión de la Sociedad Española  
de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales





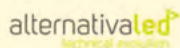






## PATROCINADORES

### Patrocinio Oro



### Patrocinio Plata



## ORGANIZADO POR:



## CON LA COLABORACIÓN DE:



**Diputació de Lleida**



### SEDE

Auditorio CCCT – Campus Cappont - Universitat de Lleida - C/ Jaume II, 67 25001 Lleida

### SECRETARÍA TÉCNICA

Fundació Universitat de Lleida - Campus Cappont - C/ Jaume II, 67 25001 Lleida  
973 00 35 57 - fundacio@udl.cat