

**ENCUESTA PARA LA REUNIÓN SOBRE EMBRIOGÉNESIS A CELEBRAR
EN MADRID EL DÍA 26 DE NOVIEMBRE DE 2003**

ÍNDICE DE RESPUESTAS RECIBIDAS

ENVIADA POR ANA CASTILLO	PG. 2
ENVIADA POR JUAN M. GONZÁLEZ	PG. 7
ENVIADA POR M^a ÁNGELES BUENO	PG. 12
ENVIADA POR CARMINA GISBERT	PG. 16
ENVIADA POR MERCEDES DABAUZA	PG. 20
ENVIADA POR MARILUZ GONZÁLEZ	PG. 24
ENVIADA POR ÓSCAR OLIVARES	PG. 28
ENVIADA POR RICARDO ORDÁS	PG. 32
ENVIADA POR FERNANDO PLIEGO	PG. 36
ENVIADA POR ANA VIÉITEZ	PG. 40
ENVIADA POR ANA VÁZQUEZ	PG. 45
ENVIADA POR JUAN OLLER	PG. 49
ENVIADA POR M^a CARMEN RISUEÑO	PG. 57
ENVIADA POR MARIANO TORIBIO	PG. 61

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003

ENVIADA POR ANA CASTILLO

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 Denominación del grupo de trabajo: Aplicación de cultivos celulares y desarrollo de técnicas de biotecnología para la mejora vegetal
- 1.2 Personas que lo constituyen: Luis Cistué, M^a Pilar Vallés, Ana M^a Castillo, María Muñoz, Mercedes Soriano, Begoña Echavarrí y Miguel Sanz.
- 1.3 Institución: Estación Experimental de Aula Dei (CSIC)
- 1.4 Población: Zaragoza
- 1.5 ¿Estudia embriogénesis somática, gamética o ambas?: ambas
- 1.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: cebada (ambos tipos de embriogénesis), trigo panadero y trigo duro (gamética)
- 1.7 ¿Está tratando de inducir embriogénesis en otras especies?: No
- 1.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: cebada, trigo panadero y trigo duro
- 1.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: diferentes, en gamética la embriogénesis es directa, en somática es indirecta. Intervienen diferentes genes (hay genotipos que responden bien en gamética y mal en somática, y al contrario)
- 1.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas):
 En embriogénesis gámetica: inducción de la microspora (pretratamiento), división, embriogénesis y regeneración
 En embriogénesis somática: inducción, mantenimiento de la capacidad embriogénica (o multiplicación) y regeneración

2. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 2.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: anteras, microsporas y embriones inmaduros
- 2.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : en trigo sí, en cebada microsporas aisladas y anteras.
- 2.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: Cultivo de anteras o microsporas: Se cosechan espigas que contienen anteras en estado uninucleado tardío. Lo ideal es hacer tinciones con DAPI, lo más práctico encontrar caracteres morfológicos de la espiga que estén correlacionados con el estado de desarrollo de la microspora (distancia de la hoja bandera y la última hoja, color y posición de la parte superior de las anteras respecto a las glumas y textura de la espiga)
 Cultivo de embriones inmaduros: se cosechan las semillas que contienen embriones de

12 a 14 días después de la polinización (grano en estado de transición de lechoso a pastoso y embrión que no ha empezado a acumular almidón)

- 2.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : No
- 2.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
- 2.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? :
Las plantas deben estar bien regadas, abonadas y libres de enfermedades.
Consideramos que es fundamental partir de plantas en buen estado fisiológico.
Tenemos grandes variaciones entre diferentes grupos de plantas crecidas en las cámaras de crecimiento en las mismas condiciones, lo que dificulta enormemente la experimentación
- 2.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : Sí, en cebada a partir de embriones maduros procedentes de semilla, pero actualmente no los estamos utilizando
- 2.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?:
En ambas embriogénesis el estado de desarrollo.

3. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 3.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?: Cultivo directo sobre el medio.
- 3.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 3.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :
.....
- 3.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

4. INDUCCIÓN

- 4.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : En embriones inmaduros, se elimina el eje del embrión, cultivándose solamente el escutelo.
- 4.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : En embriogénesis gamética utilizamos un pretratamiento osmótico y posteriormente se transfieren al medio de inducción. En embriogénesis somática, no.
- 4.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : En gamética hacemos el pretratamiento en medio sólido y posteriormente se transfieren a medio de inducción líquido para que comiencen las primeras divisiones. En somática, sólido
- 4.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : En embriogénesis somática la zona donde se encontraba el eje del embrión debe de estar en contacto con el medio.
- 4.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : En embriogénesis gamética citoquininas o combinación de auxinas y citoquininas en el medio de inducción. En embriogénesis somática auxinas
- 4.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : Sí, el efecto del Ca en el medio de pretratamiento de las anteras.
- 4.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores?

: En anteras es imprescindible la aplicación del pretratamiento osmótico. Otro factor muy importante es el genotipo.

- 4.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : No.
- 4.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : No
- 4.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: En embriogénesis gamética sí, en somática no.

5. MANIFESTACIÓN

- 5.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : Si
- 5.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : condiciones de crecimiento de las plantas madre, composición del medio de cultivo incluidos los reguladores de crecimiento, pretratamiento de las anteras
- 5.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : En embriogénesis gamética directa, en somática indirecta.

6. MULTIPLICACIÓN

Embriogénesis somática

- 6.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : Si hay líneas en las que resulta difícil mantener la capacidad embriogénica.
- 6.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : por proliferación de callo embriogénico
- 6.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
.....
- 6.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : ninguna
- 6.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? No, en el mismo callo tenemos proembriones y embriones diferenciados.
- 6.6 ¿Empieza algún sistema de selección y separación de embriones? : No.
- 6.7 ¿Empieza algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : No
- 6.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : No
- 6.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? No

7. DIFERENCIACIÓN

- 7.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : En somática, tenemos problemas de exceso de diferenciación en la fase de mantenimiento del callo embriogénico.

- 7.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
.....
- 7.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
Tenemos embriones sin escutelo, sin raíz o meristemo radicular poco desarrollado, embriones con forma de embudo que no germinan o que producen solamente una hoja, etc.
- 7.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : En gamética sí, en somática no.
- 7.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : No lo hemos estudiado.

8. MADURACIÓN

- 8.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : Somáticos: la forma y el color; gaméticos: el tamaño, la forma y el color
- 8.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; En gamética, unas veces sí, otras no ¿Qué la determina? : Existe un factor genético y muy probablemente otros factores fisiológicos que no nos hemos metido a estudiar
- 8.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : no lo hemos estudiado pero estamos interesados
- 8.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? No, pero estamos interesados
- 8.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : Los somáticos sí, los gaméticos no
- 8.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : No.
- 8.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : color, tamaño, forma.
- 8.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : no
- 8.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : En somática es baja, En gamética: depende mucho del genotipo y de la especie.

9. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 9.1 ¿Hace semillas sintéticas? Actualmente no
- 9.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? : No
- 9.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : En la mayoría de los casos son inferiores, aunque existe dependencia del genotipo.
- 9.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : Si en ocasiones, existe bloqueo de la raíz, otras veces del tallo, dependiendo del genotipo y de la calidad del embrión.
- 9.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : *in vitro*.

- 9.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : En somática se utiliza el mismo medio basal sin reguladores, en gamética de cebada introducimos una auxina.
- 9.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? : No
- 9.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : No
- 9.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : El vigor de la planta

10. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 10.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : En somática, especialmente al aumentar el tiempo en cultivo *in vitro* tenemos algunas plantas de menor tamaño, con mayor o menor número de tallos, y un retraso en la floración. En gamética normalmente no tenemos diferencias apreciables, a excepción de las características típicas de las plantas haploides.
- 10.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :
- 10.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? : Normalmente sí, en la siguiente generación.
- 10.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : Sí
- 10.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : Es una de las cosas en las que estamos interesados.
- 10.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación? Citológica y molecular
- 10.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; hemos aplicado colchicina en el medio de inducción ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento? sí

11. CONCLUSIÓN

- 11.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial?
Ninguno de ellos
- 11.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 11.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :**

En ambas embriogénesis:

- la gran dependencia del genotipo y de las condiciones fisiológicas de las plantas madre
- ¿cuanto hay de factores genéticos y cuanto de fisiológicos?
- Problema de albinismo en embriogénesis gamética
- Pretratamiento e inducción de la microspora a la vía esporofítica

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR JUAN M. GONZÁLEZ TRIGUERO**

12. INTRODUCCIÓN

12.1 Denominación del grupo de trabajo:

12.2 Personas que lo constituyen: Juan M. González, Nicolás Jouve, Silvia Rubio, Alfredo de Bustos

12.3 Institución: Dpto. Biología Celular y Genética. Universidad de Alcalá

12.4 Población: Alcalá de Henares (Madrid)

12.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: Gamética, en mucha menor medida somática.

12.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: Triticale, Trigo, Cebada

12.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: No, aunque intenté hace algunos años en lino, sin resultados.

12.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: trigo blando, trigo duro, triticale

12.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:

12.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): Inducción de embriones gaméticos; Regeneración; Proporción de plantas verdes obtenidas

13. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

13.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: Embriones cigóticos inmaduros

13.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : Lo he intentado en triticale pero sin éxito

13.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: En androgénesis: a partir de espigas con microsporas en estado uninuclear medio.

En embriogénesis somática, a partir de embriones inmaduros de 15 días.

13.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : En androgénesis, pretratamiento de las espigas con frío (4°C) durante 15 días en el caso de triticale y durante 7 días en el caso de trigo blando.

13.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? : Se incrementa notablemente el número de microsporas que desarrollan embriones gaméticos.

13.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : Condiciones de cultivo óptimas, sobre todo ausencia de enfermedades, plagas...

13.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : no

13.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?:

.....

14. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 14.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
- 14.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 14.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :
.....
- 14.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

15. INDUCCIÓN

- 15.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? :
- 15.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? :
- 15.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : sólido
- 15.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : para el cultivo de embriones cigóticos inmaduros, se cultivan con el escutelo hacia arriba.
- 15.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : 2,4-D
- 15.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : No
- 15.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores?
: En androgénesis, es importante el azúcar empleado, en general da mejores resultados la maltosa que la sacarosa.
- 15.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : No
- 15.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :
- 15.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: En androgénesis, hemos hecho un estudio sobre la influencia del genotipo en la respuesta androgenética.

16. MANIFESTACIÓN

- 16.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? :
- 16.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :
- 16.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? :

17. MULTIPLICACIÓN

- 17.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
- 17.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : En androgénesis, la regeneración es directa a partir del embrión gamético(embriode), pero a veces hay una proliferación previa de un callo más o menos amorfo.

- 17.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
.....
- 17.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :
- 17.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos?. En un estudio del desarrollo de las microsporas, hemos podido observar que tienen una gran asincronía.
- 17.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? :
- 17.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? :
- 17.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :
- 17.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? No

18. DIFERENCIACIÓN

- 18.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? :
- 18.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
.....
- 18.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
.....
- 18.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? :
- 18.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

19. MADURACIÓN

- 19.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : en androgénesis, el tamaño y la forma. Muchos tienen un aspecto globular y a veces en forma de torpedo.
- 19.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? :
- 19.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :
- 19.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? No
- 19.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : Los gaméticos, son más pequeños y con formas algo aberrantes.
- 19.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? :
- 19.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? :
- 19.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :
- 19.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

20. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 20.1 ¿Hace semillas sintéticas? No
- 20.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? :
No
- 20.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : En androgénesis,
son porcentajes bajos, aunque dependientes del genotipo
- 20.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran
asincronía entre ambos? : Si,
- 20.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : In vitro
- 20.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin
reguladores? : Mejor sin reguladores.
- 20.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del
desarrollo del meristemo caulinar? : No
- 20.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : Si
- 20.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

21. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 21.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? :
- 21.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? : En androgénesis, gran cantidad de
plantas albinas.
- 21.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 21.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :
- 21.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de
regeneración por embriogénesis? :
- 21.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 21.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del
cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de
regeneración por dicho tratamiento? Realizo la duplicación en plántulas de 3-4 hojas
mediante inmersión de las raíces en una solución de colchicina. Actualmente estoy
esperando los resultados de un tratamiento con colchicina en la fase de inducción de
embriones gaméticos y de germinación de los mismos.

22. CONCLUSIÓN

- 22.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración
por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :
- 22.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 22.3 **¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de
regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por
los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :**

**Cultivo de microsporas aisladas, Duplicación cromosómica. Protocolo eficaz
de inducción de embriogénesis somática en cereales a partir de distintos**

explantes (embriones inmaduros, embriones maduros etc).

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR M^a ÁNGELES BUENO**

23. INTRODUCCIÓN

- 23.1 Denominación del grupo de trabajo: Lab. de Cultivo de Tejidos del CIFOR-INIA
- 23.2 Personas que lo constituyen: Dra M^a Angeles Bueno, Dra M^a Jesús Prado, Lda Beatriz Pintos.
- 23.3 Institución: INIA.
- 23.4 Población: Madrid.
- 23.5 ¿Estudia embriogenesis somática, gamética o ambas?: Ambas
- 23.6 Especies en las que ha obtenido embriogenesis: *Q.suber* L. *Q.canariensis* L
- 23.7 ¿Está tratando de inducir embriogenesis en otras especies?:
- 23.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogenesis: *Q.suber* L. *Q.canariensis* L
- 23.9 Caso de practicar con la misma especie embriogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: Diferentes.
- 1.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): Inducción, proliferación, maduración, germinación.

24. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 24.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogenesis?: Embrión cigótico inmaduro y anteras.
- 24.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :
- 24.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo:
Directamente del arbol.(Bellota inmadura y amentos)
- 24.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : No.
- 24.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogenesis? : ...
- 24.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogenesis? :
El estado de desarrollo del explanto inicial.
- 24.7 ¿Ha obtenido embriogenesis en explantos procedentes de plantas adultas? : Si se está considerando que se toman directamente de plantas adultas los explantos, la respuesta es Si.
- 24.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?:
El estado de desarrollo.

25. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 25.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
Directamente sobre el medio de cultivo.
- 25.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? : Ninguno.
- 25.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :

.....
25.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

26. INDUCCIÓN

- 26.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : No.
26.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : Estrés de temperatura en la embriogénesis gamética.
26.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : Se puede hacer en ambos.
26.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : No.
26.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : 2,4 D.
26.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? :
- 26.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : No.
- 26.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : Celulares y ultraestructurales en colaboración con la Dra Risueño. Moleculares en nuestro Lab.
- 26.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :
- 4.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?:

27. MANIFESTACIÓN

- 27.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : .Si.
27.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : Eliminar el 2,4D.
27.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : Directa.

28. MULTIPLICACIÓN

- 28.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : No.
28.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : La embriogénesis recurrente.
28.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : En la fase inicial.
28.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : Añadir al medio base, glutamina.
28.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? Sí en las primeras fases
28.6 ¿Empieza algún sistema de selección y separación de embriones? :
- 28.7 ¿Empieza algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? :
- 28.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :

28.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas?

29. DIFERENCIACIÓN

29.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : Varios.

29.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :

29.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
1 solo cotiledón, cotiledones muy pequeños, embriones fusionados, eje embrionario negro en el punto de inserción.

29.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : Sí.

29.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : No muchos.

30. MADURACIÓN

30.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : Tamaño, peso y color.

30.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; Si ¿Qué la determina? :

30.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : No

30.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?. Si el frío.

30.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :
Parecidos.

30.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : Sí.

30.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : Sí, los anteriores.

30.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :

30.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : Mediana.

31. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

31.1 ¿Hace semillas sintéticas?. Actualmente no.

31.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? : Sí, vernalización.

31.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : Se aproximan

31.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : Sí.

31.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : *In vitro*.

31.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : Si, medio basal con reguladores.

- 31.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :
- 31.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : Sí.
- 31.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : Hemos constatado una gran limitación con nuestro invernadero, porque el mismo material llevado al invernadero de Tragsa en Maceda funciona con unos buenos rendimientos.

32. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 10.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : Ninguna
- 10.2.¿Qué tipo de malformaciones se observan? : No hemos observado.
- 10.3¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 10.4¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : Se está planificando con Tragsa.
- 10.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :
- 10.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 10.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; Varios tratamientos aplicados en el inicio de la fase del cultivo. También existe duplicación espontanea. ¿se vé afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento? Sí.

11 CONCLUSIÓN

- 11.5 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? : En *Q.suber* L, se está llevando a cabo la transferencia de tecnología con el Proyecto P4 del MCYT.
- 11.6 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? : Sí.
- 11.7 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR CARMINA GISBERT DOMÉNECH**

33. INTRODUCCIÓN

33.1 Denominación del grupo de trabajo: APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE CULTIVO *IN VITRO* PARA LA MEJORA GENÉTICA DE HORTÍCOLAS

33.2 Personas que lo constituyen: CARMINA GISBERT DOMÉNECH

33.3 Institución: CENTRO PARA LA CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD VALENCIANA. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA.

33.4 Población: VALENCIA

33.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: ambas

33.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: *Lycopersicon pennellii*

33.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: .Sí, en *C. annuum* y *Solanum muricatum*.

33.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: *L. pennellii*.

33.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: -

33.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): .-

34. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

34.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?:

34.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :

34.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo:

34.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? :

34.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :

34.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? :

.....

34.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? :

34.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica? :

.....

35. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

35.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:

35.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :

35.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :

.....

35.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

36. INDUCCIÓN

- 36.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? :
- 36.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? :
- 36.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? :
- 36.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? :
- 36.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? :
- 36.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? :
- 36.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? :
- 36.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? :
- 36.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :
- 36.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?:

37. MANIFESTACIÓN

- 37.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? :
- 37.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :
- 37.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? :

38. MULTIPLICACIÓN

- 38.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
- 38.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? :
- 38.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
- 38.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :
- 38.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos?
- 38.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? :
- 38.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? :
- 38.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :
- 38.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas?

39. DIFERENCIACIÓN

- 39.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? :
- 39.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
.....
- 39.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
.....
- 39.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? :
- 39.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

40. MADURACIÓN

- 40.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? :
- 40.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? :
- 40.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :
- 40.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?
- 40.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :
- 40.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? :
- 40.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? :
- 40.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :
- 40.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

41. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 41.1 ¿Hace semillas sintéticas?
- 41.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? :
.....
- 41.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :
- 41.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :
- 41.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? :
- 41.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? :
- 41.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :
- 41.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? :
- 41.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

42. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 42.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? :
- 42.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :
- 42.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 42.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :
- 42.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :
- 42.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 42.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se vé afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

43. CONCLUSIÓN

- 43.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :
- 43.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 43.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR MERCEDES DABAUZA**

44. INTRODUCCIÓN

44.1 Denominación del grupo de trabajo: Viticultura y Enología del Departamento de Especies Leñosas

44.2 Personas que lo constituyen: 10

44.3 Institución: Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

44.4 Población:Murcia

44.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: ambas

44.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: Vitis vinifera

44.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: no

44.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: vid.

44.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: estamos estudiándolo todavía

44.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): 1)obtención de callo embriogénico, 2)diferenciación de embriones y 3)elongación y desarrollo de los embriones

45. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

45.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: anteras, hojas

45.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : no

45.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: anteras de flores inmaduras y hojas de plántulas in vitro

45.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : no

45.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :

45.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? :
.....

45.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : no se ha estudiado

45.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?:
..... el estado de maduración de las anteras

46. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

46.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
directamente sobre medio de inducción

- 46.2 ¿A qué tipo de acondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 46.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :
.....
- 46.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

47. INDUCCIÓN

- 47.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? :no
- 47.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : no
- 47.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? :sólido
- 47.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? :no
- 47.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : 2,4-D y BA
- 47.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? :no
- 47.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : no
- 47.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : no
- 47.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :no
- 47.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: no

48. MANIFESTACIÓN

- 48.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : si
- 48.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : eliminación de los reguladores de crecimiento
- 48.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : indirecta, a partir de callo

49. MULTIPLICACIÓN

- 49.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : sí
- 49.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : ambas
- 49.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : en embriones cotiledonarios
- 49.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : fotoperiodo en vez de cultivo en oscuridad
- 49.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? no
- 49.6 ¿Empieza algún sistema de selección y separación de embriones? : sí
- 49.7 ¿Empieza algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : no
- 49.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase?

(origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : no
 49.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? no

50. DIFERENCIACIÓN

- 50.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : cultivo en medio sin reguladores
 50.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? : no lo hemos estudiado
 50.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : embriones con cotiledones fusionados, con un solo cotiledón, multicotiledonarios, con doble raíz. No las controlamos
 50.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : sí
 50.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : no lo hemos estudiado

51. MADURACIÓN

- 51.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? :
 51.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? : no
 51.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : no lo hemos estudiado
 51.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? no
 51.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : los embriones somáticos normales son iguales a los zigóticos
 51.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : no
 51.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : tamaño y forma
 51.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :no
 51.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : media

52. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 52.1 ¿Hace semillas sintéticas? no
 52.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? : no
 52.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : no lo hemos estudiado
 52.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : no

- 52.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : *in vitro*
- 52.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : medio basal
- 52.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :no
- 52.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : no
- 52.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : el tamaño de la planta y el mantenimiento de la humedad

53. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 53.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : estamos estudiándolo
- 53.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :
- 53.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 53.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : no
- 53.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : no
- 53.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 53.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

54. CONCLUSIÓN

- 54.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :
- 54.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 54.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :

El mayor problema lo tenemos en la embriogénesis a partir de hojas de plántulas *in vitro*, ya que obtenemos embriones con radícula pero no desarrollan los cotiledones, se quedan como un glomérulo compacto.

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR MARILUZ GONZÁLEZ**

55. INTRODUCCIÓN

- 55.1 Denominación del grupo de trabajo: Conservación de flora amenazada
- 55.2 Personas que lo constituyen: 5.....
- 55.3 Institución: ..Universidad de Santiago....
- 55.4 Población:Santiago de Compostela. ..
- 55.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: ..Somática...
- 55.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: Vid, Centaurea, Chelidonium, Raphanus,
- 55.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: Sí
- 55.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: Vid, Centaurea, y todas las nombradas antes.....
- 55.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:
- 55.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas):

56. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 56.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: hoja, cotiledones,
- 56.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :
- 56.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: Esterilizando la superficie del explanto por métodos convencionales
- 56.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : Cultivo en condiciones idóneas....
- 56.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
- 56.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? :
- 56.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? :En vid
- 56.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?:

57. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 57.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
- 57.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 57.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :

.....
57.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

58. INDUCCIÓN

- 58.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? :
- 58.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? :
- 58.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : .Sólido....
- 58.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : .Si....
- 58.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : .2,4-D, BA, TDZ....
- 58.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : No.....
- 58.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? :la luz/oscuridad.....
- 58.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : ..
- 58.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :
- 58.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?:

59. MANIFESTACIÓN

- 59.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : Si.....
- 59.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : ..paso a medio basal sin reguladores...
- 59.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : .ambos casos....

60. MULTIPLICACIÓN

- 60.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
- 60.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? :
- 60.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
- 60.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :
- 60.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos?
- 60.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? :
- 60.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? :
- 60.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :
- 60.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas?

61. DIFERENCIACIÓN

- 61.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? :
- 61.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
- 61.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
- 61.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? :
- 61.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

62. MADURACIÓN

- 62.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? :
- 62.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? :
- 62.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :
- 62.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?
- 62.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :
- 62.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? :
- 62.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? :
- 62.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :
- 62.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

63. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 63.1 ¿Hace semillas sintéticas?
- 63.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? :
- 63.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :
- 63.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :
- 63.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? :
- 63.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? :
- 63.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :
- 63.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? :
- 63.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

64. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

64.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? :

64.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :

64.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :

64.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :

64.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :

64.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?

64.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

65. CONCLUSIÓN

65.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :

65.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :

65.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR ÓSCAR OLIVARES****66. INTRODUCCIÓN**

- 66.1 Denominación del grupo de trabajo: Protoplastos de Cítricos
- 66.2 Personas que lo constituyen: Óscar Olivares
- 66.3 Institución: IVIA.
- 66.4 Población: Moncada, Valencia
- 66.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: ambas
- 66.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: Citrus, Microcitrus, Fortunella, Glycosmis
- 66.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: no
- 66.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: Citrus, Microcitrus, Fortunella, Glycosmis
- 66.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: semejantes
- 66.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas):

67. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 67.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: protoplastos, callos embriogénicos, anteras, óvulos
- 67.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : no
- 67.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: los protoplastos a partir de callo embriogénico, los callos a partir de óvulos
- 67.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante?: no
- 67.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
- 67.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis?: la época de recolección de óvulos y anteras es determinante del resultado posterior
- 67.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : yo no lo he intentado, pero el grupo de Transformación Genética de Leandro Peña sí.
- 67.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: edad y época del año

68. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 68.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?: no la aplico..
- 68.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 68.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :

.....
68.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

69. INDUCCIÓN

- 69.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : sí
69.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : sí
69.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : sólido
69.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : en mi caso no lo creo
69.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : fuentes de carbono
69.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : no
69.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : a pesar de tratarse de material in vitro, la época del año influye en la capacidad embriogénica de callos y callos derivados de protoplastos.
69.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : no.
69.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : no, pero parece claro que el origen es unicelular en los cítricos
69.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: no

70. MANIFESTACIÓN

- 70.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : no
70.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :

70.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : ambas

71. MULTIPLICACIÓN

- 71.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : no
71.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : ambas
71.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : incluso en fase globular
71.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : ninguna
71.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? No lo hemos intentado
71.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : únicamente la lupa
71.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : sí, medio líquido en agitación continua
71.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase?

(origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : no

71.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? Sí, y de embriones

72. DIFERENCIACIÓN

72.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : el desarrollo de los embriones de cítricos puede ser el estándar sin ningún cambio en las condiciones de cultivo o totalmente irregular

72.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? : no lo hacemos

72.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : desarrollo a pseudobulbi y embriones malformados. Empleamos en microinjerto para obtener plantas completas.

72.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : sí.

72.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : no lo empleamos

73. MADURACIÓN

73.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : tamaño

73.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? : no

73.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : no lo empleamos

73.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? Hemos empleado membranas sobre el medio de cultivo

73.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : sí, los zigóticos siguen un patrón de desarrollo más normal habitualmente

73.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : no.

73.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : sí

73.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : no.

73.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : alta

74. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

74.1 ¿Hace semillas sintéticas? no

74.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? : no

74.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :

74.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :

74.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : *in vitro*.

- 74.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : medio basal sin reguladores
- 74.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? : no.
- 74.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : no
- 74.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : mantenimiento de la humedad en los primeros días, y la progresividad

75. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 75.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : velocidad inicial de crecimiento
- 75.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? : a nivel de planta ninguna
- 75.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 75.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : sí, con plantas procedentes de callos crioconservados via embriogénesis somática
- 75.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : no en todas, pero sí en los resultados finales
- 75.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación? Análisis con microsatélites, marcadores de zonas hipervariables y AFLPs
- 75.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento? La duplicación es espontánea. Las líneas no son muy estables genéticamente

76. CONCLUSIÓN

- 76.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? No vamos en esa dirección.

76.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? : .

¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? : Para nosotros la embriogénesis somática y gamética son únicamente vías para regenerar los genotipos de interés. Un aspecto importante y que estamos estudiando recientemente es el empleo de membranas para regularizar la germinación de los embriones somáticos (Referencia: NORMALIZING SWEET ORANGE (C. SINENSIS (L.) OSBECK) SOMATIC EMBRYOGENESIS WITH SEMI-PERMEABLE MEMBRANES RANDALL P. NIEDZ*, SCOTT E. HYNDMAN, ELDRIDGE T. WYNN, AND MICHAEL G. BAUSHER In Vitro Cell. Dev. Biol.–Plant 38:552–557, November–December 2002)

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR RICARDO ORDÁS**

77. INTRODUCCIÓN

77.1 Denominación del grupo de trabajo: Biotecnología Vegetal

<http://web.uniovi.es/vicinves/unidades/gruposInv/DptoBiolOrganismos/BiotecVegetal/main.htm>.

77.2 Personas que lo constituyen: 6

77.3 Institución: Universidad de Oviedo

77.4 Población: Oviedo

77.5 ¿Estudia embriogénesis somática, gamética o ambas?: NO

77.6 Especies en las que ha obtenido embriogénesis: *Humulus lupulus* (lúpulo)

77.7 ¿Está tratando de inducir embriogénesis en otras especies?: NO

77.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: Ninguna

77.9 Caso de practicar con la misma especie embriogénesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:

77.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): Aún no las tenemos claramente identificadas, como mucho hasta torpedo, y hay muchas anomalías. (Ver adjunto).

78. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

78.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: Hojas y estípulas.

78.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :

78.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: A partir de hojas del primer nodo de plantas de invernadero recién brotadas y obtenidas de rizoma (¿Estado fisiológico?). Asepsia con lejía.

78.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : NO

78.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :

78.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : Hemos observado cierta correlación con el cultivar (genotipo).

78.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : SI, si consideramos que son cultivares que se propagan vegetativamente. Son plantas cuya parte aérea muere cada año y rebrota a partir de rizomas (hemicriptófito).

78.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: ¿?

79. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

79.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:

Preacondicionamos en medio libre de hormonas durante una semana. Protocolo de Alcornoque (tuyo).

- 79.2 ¿A qué tipo de preacondicionamiento somete a los explantos iniciales? : ½ de Macros de Gamborg y resto de MS, 1% sacarosa.
- 79.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? : Para limpiar contaminados.
- 79.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? : No lo hemos estudiado.

80. INDUCCIÓN

- 80.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : Hemos realizado cortes transversales en los nervios centrales, pero no tenemos material suficiente para realizar una estadística respecto a los no lesionados.
- 80.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : NO
- 80.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : Medio solido.
- 80.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : Siempre colocamos la cara adaxial en contacto con el medio.
- 80.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : NAA y BA.
- 80.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : NO
- 80.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : genotipo y estado de desarrollo y en menor medida la composición del medio.
- 80.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : NO
- 80.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : NO
- 80.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: NO.

81. MANIFESTACIÓN

- 81.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : NO. Observamos ya embriogénesis en el mismo medio de inducción, previamente a la transferencia al medio de manifestación.
- 81.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : ¿?
- 81.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : En tres cultivares es directa en el cuarto observamos la formación de callo pero no hemos determinado si el origen de los embriones es directo o indirecto.

82. MULTIPLICACIÓN

- 82.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : SI
- 82.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de

callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : No lo sabemos.

82.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :

.....

82.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :

Ninguna.

82.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? no

82.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : no

82.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : no

82.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : Estamos en ello...

82.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? NO

83. DIFERENCIACIÓN

83.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : Estamos probando aumentar el osmótico (sacarosa) y la concentración de agar, y también ABA y STS, desecación en general (cinta de pintor y colocar papel de filtro entre los embriones y el medio), pero aun no tenemos resultados positivos.

83.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? ¿?

83.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? n (Ver adjunto).

83.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : SI

83.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : NO

84. MADURACIÓN (Aun no hemos conseguido pasar de la anterior fase)

84.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? :

84.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? :

84.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

84.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?

84.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :

84.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? :

84.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? :

84.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :

84.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

85. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

85.1 ¿Hace semillas sintéticas?

85.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? :

.....

85.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :

85.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :

85.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? :

85.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? :

85.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :

85.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? :

85.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

86. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

86.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? :

86.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :

86.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :

86.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :

86.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :

86.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?

86.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

87. CONCLUSIÓN

87.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :

87.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :

87.3 **¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :****MULTIPLICACIÓN Y MADURACIÓN.**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR FERNANDO PLIEGO**

88. INTRODUCCIÓN

- 88.1 Denominación del grupo de trabajo: [Regeneración y transformación genética de frutales \(aguacate y olivo\)](#)
- 88.2 Personas que lo constituyen: [Fernando Pliego Alfaro, Carolina Sánchez Romero, Araceli Barceló Muñoz, José Angel Mercado Carmona, Belén Márquez Martín, Catalina Chaparro Pulido y Gema Pérez Barranco](#)
- 88.3 Institución: [C.I.F.A. Churriana. \(Cortijo de la Cruz s/n. 29140 Churriana – Málaga\). Universidad de Málaga. \(Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Ciencias. Campus de Teatinos s/n. 29071 Málaga\)](#)
- 88.4 Población: [Málaga](#)
- 88.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: [Somática](#)
- 88.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: [Aguacate y olivo](#)
- 88.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: [No](#)
- 88.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: [Aguacate](#)
- 88.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: [---](#)
- 88.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): [Inducción, mantenimiento, desarrollo de embriones somáticos blanco-opacos, maduración y germinación](#)

89. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 89.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: [Embrión zigótico inmaduro](#)
- 89.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : [---](#)
- 89.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: [Aislamiento a partir de frutos inmaduros](#)
- 89.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : [No](#)
- 89.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? [---](#)
- 89.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : [Genotipo \(a nivel de cultivar y también de embrión zigótico\)](#)
- 89.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : [No](#)
- 89.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: [Tamaño \(edad del explanto\)](#)

90. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

90.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:

[Cultivamos directamente en medio de inducción](#)

90.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :---

90.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :

90.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :---

91. INDUCCIÓN

91.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : [No](#)

91.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : [No](#)

91.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : [En medio sólido](#)

91.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : [No](#)

91.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : [Picloram](#)

91.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : [No](#)

91.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores?

: [El agente gelificante](#)

91.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : [No](#)

91.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : [No](#)

91.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: [Sólo se ha estudiado la influencia del genotipo.](#)

92. MANIFESTACIÓN

92.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : [No](#)

92.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :---

92.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : [Indirecta](#)

93. MULTIPLICACIÓN

93.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : [Normalmente no](#)

93.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : [Por proliferación de callo embriogénico](#)

93.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :

93.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :

[Ninguna](#)

93.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? [Sí](#)

93.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : [Sí, mediante](#)

filtración

- 93.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : **No**
- 93.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : **Se están iniciando ahora**
- 93.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? **No**

94. DIFERENCIACIÓN

- 94.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : **Eliminación del picloram, cambio de medio basal y aumento de la concentración del agente gelificante**
- 94.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? : **Eliminar el picloram y aumentar la concentración de agente gelificante**
- 94.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : **Malformaciones diversas**
- 94.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : **Sí**
- 94.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : **No está claro**

95. MADURACIÓN

- 95.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : **La aparición de embriones blanco-opacos**
- 95.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? : **Sí, el genotipo**
- 95.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : **No son definitivos**
- 95.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? **Sí, aplicación de agentes osmóticos**
- 95.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : **Sí**
- 95.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : **Sí**
- 95.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : **No. La fase de maduración se inicia con embriones somáticos blanco-opacos que se supone han empezado a madurar**
- 95.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : **Sí**
- 95.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : **Medio**

96. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 96.1 ¿Hace semillas sintéticas? **No**

- 96.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/ estratificación)? : **No**
- 96.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : **No**
- 96.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : **Sí**
- 96.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : **In vitro**
- 96.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : **Utilizamos BAP**
- 96.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? : **No**
- 96.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : **No**
- 96.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : **El vigor de la plántula**

97. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 97.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : **El vigor (no siempre), tallos hiperhídricos, hojas malformadas, baja frecuencia de germinación completa (tallo y raíz)**
- 97.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? : **Las citadas**
- 97.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? : **A veces la hiperhidricidad**
- 97.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : **No**
- 97.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : **No**
- 97.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación? ---
- 97.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento? ---

98. CONCLUSIÓN

- 98.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? : **En ninguna**
- 98.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? : **No**
- 98.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? : Nos gustaría discutir sobre pretratamientos de planta madre, fase de inducción y maduración**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR ANA VIEITEZ**

99. INTRODUCCIÓN

- 99.1 Denominación del grupo de trabajo: Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales
- 99.2 Personas que lo constituyen: A. Ballester; E. Corredoira; C. San-José; N Vidal; A M Vieitez; J Vieitez
- 99.3 Institución:CSIC.
- 99.4 Población:Santiago de Compostela.
- 99.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?:Embriogénesis somática
- 99.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: *Camellia japónica*; *C. reticulata*; *Castanea sativa*; *Fagus sylvatica*; *Quercus robur*; *Ulmus glabra*; *U. minor*
- 99.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: No
- 99.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: Todas las anteriores.
- 99.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:
- 99.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): Inducción, multiplicación, maduración y germinación-conversión.

100. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 100.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?:
Embriones cigóticos (ejes y secciones de cotiledón) en camelia, castaño, haya y olmo; entrenudos en roble; hojas en camelia, castaño y roble; raíces en camelia.
- 100.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :
- 100.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo:
Sería una contestación muy extensa para esta encuesta.
- 100.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : Brotación forzada en fitotrón (hojas de roble adulto).
- 100.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
.....
- 100.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : Genotipo, estado de desarrollo, edad.
- 100.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? :
Si en roble
- 100.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: Tipo de explanto (eje embrionario, cotiledón, hoja, raíz) y su estado de desarrollo (maduración embrión cigótico, desarrollo de la hoja).

101. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 101.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
Cultivo directo en medio de inducción.
- 101.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
Tranferencia a medio fresco a las 24-48 h.
- 101.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? : Paliar excesivos exudados en el medio.
- 101.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

102. INDUCCIÓN

- 102.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : Seccionado de cotiledones, entrenudos y hojas.
- 102.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? :
- 102.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : Sólido.
- 102.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : No en hojas.
- 102.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : BA + 2,4-D en olmo y haya; BA + AIB en camelia; BA + ANA en castaño y roble; medio sin reguladores en camelia.
- 102.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : No
- 102.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : Genotipo; factor oscuridad en hojas de camelia; seccionado de hojas en roble.
- 102.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : Si, en camelia.
- 102.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : Ambos orígenes en camelia.
- 102.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: No.

103. MANIFESTACIÓN

- 103.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : No en camelia; si en castaño, haya, roble y olmo.
- 103.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : Disminución o eliminación de los reguladores de crecimiento.
- 103.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : Directa en camelia (embriones cigóticos y raíces). Indirecta en camelia (hojas), castaño, haya, roble y olmo.

104. MULTIPLICACIÓN

- 104.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
Depende del genotipo.
- 104.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : Callo embriogénico en olmo y haya, y embriogénesis recurrente en camelia, castaño y roble.
- 104.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : Predominantemente en la etapa cotiledonar temprana.
- 104.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : Diferencias en reguladores de crecimiento o sin reguladores.
- 104.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? No totalmente.
- 104.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : Selección visual y separación manual.
- 104.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : Medio líquido en agitación en castaño y haya.
- 104.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : Si en camelia (pluricelular), olmo (pluricelular y ocasionalmente unicelular), haya (unicelular).
- 104.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? Si en castaño y roble.

105. DIFERENCIACIÓN

- 105.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : se diferencian en el medio de multiplicación.
- 105.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? : GA3 (camelia), almacenamiento en frío durante 1-2 meses (camelia, roble castaño).
- 105.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : Fusión de cotiledones, policotiledonía, fasciación.
- 105.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? :
- 105.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : No se ha ensayado en esta etapa.

106. MADURACIÓN

- 106.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : Tamaño, forma, color, capacidad de germinación.
- 106.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? : Si; puede estar determinada por el genotipo, subcultivo prolongado (envejecimiento del cultivo).
- 106.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : No en castaño, roble y olmo
- 106.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? Tratamientos osmóticos, desecación parcial, frío.

- 106.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :
Generalmente de menor tamaño, en especial los cotiledones.
- 106.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : Si, en olmo.
- 106.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : Tamaño, color y apariencia similar a los embriones cigóticos.
- 106.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : Acumulación de sustancias de reserva en cotiledones, en castaño y roble.
- 106.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : Relativamente baja.

107. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 107.1 ¿Hace semillas sintéticas? Si, en camellia.
- 107.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? : Aplicación de frío en castaño, roble y camelia.
- 107.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : Son inferiores.
- 107.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : Tendencia abloqueo de raíz en camelia y castaño; tendencia a bloqueo del tallo en olmo, roble y haya.
- 107.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : Germinación *in vitro*.
- 107.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : GA3+ AIA en camelia; medio líquido con sustrato de papel en olmo; medio con BA en castaño y roble.
- 107.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? : No
- 107.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : Depende de la especie; es más difícil en olmo.
- 107.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? : Estado de desarrollo de la plántula somática cuando se hace el trasplante, genotipo y condiciones ambientales adecuadas.

108. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 108.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : Anomalías en las primeras hojas: escuamiformes (roble y castaño) tipo cotiledonar (camelia); tallos engrosados (roble castaño).
- 108.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :
- 108.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? : Si
- 108.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : No

- 108.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : Si, en roble.
- 108.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación? RAPDs
- 108.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

109. CONCLUSIÓN

- 109.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? : Camelia.
- 109.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? : Etapas de multiplicación y germinación aplicando el sistema de inmersión temporal.
- 109.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? : Inducción en material adulto; Germinación de los embriones.**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR ANA VÁZQUEZ**

110. INTRODUCCIÓN

- 110.1 Denominación del grupo de trabajo: No tenemos nombre..Departamento de Genética. UCM. Madrid.
- 110.2 Personas que lo constituyen: .Javier Espino, Rosario Linacero, Julia Rueda, Ana Vázquez..
- 110.3 Institución: .Dto. Genética, Fac. Biología, UCM
- 110.4 Población: Madrid.
- 110.5 ¿Estudia embriogenesis somática, gamética o ambas?: ..Somática...
- 110.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: ..*Secale cereale*, *Secale vavilovii*, *Saccharum officinarum*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Medicago sativa*, *Triticale*.
- 110.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: .No....
- 110.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: .En todas las mencionadas....
- 110.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:
- 110.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): En *Medicago* todas, en gramíneas se distinguen las fases globular y escutelar....

111. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 111.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?:Embrión inmaduro, inflorescencia inmadura, hoja, plántula.
- 111.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? :
- 111.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: Embrión e inflorescencia se toman de las plantas creciendo en el campo-invernadero.Las hojas y las plántulas se obtienen de embriones germinados in vitro.
- 111.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? :No.
- 111.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
- 111.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : La temperatura a la que crece la planta.
- 111.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? :
No
- 111.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: El tipo de explante y el genotipo .

112. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 112.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?: Sobre el medio de inducción, aparte de los explantes que se obtienen de plántulas in vitro pero estas crecen en medios mínimos, solo se trata de que germine la semilla.
- 112.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
- 112.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? :
- 112.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

113. INDUCCIÓN

- 113.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : En el caso del embrión no, en los demás explantes se trocean.
- 113.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : No
- 113.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : Sólido
- 113.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : En el embrión el escutelo esta hacia arriba y el eje del embrión en contacto con el medio.
- 113.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : 2,4 D
- 113.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : No
- 113.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : El genotipo
- 113.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : No
- 113.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : No
- 113.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: Si..

114. MANIFESTACIÓN

- 114.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? :No en gramíneas, en *Medicago* se modifica el medio.
- 114.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :
- 114.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : Indirecta

115. MULTIPLICACIÓN

- 115.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
Depende de las líneas
- 115.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : Proliferación de callo

embriogénico

- 115.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
- 115.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? :
- 115.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? No lo hemos intentado
- 115.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : No
- 115.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : No en gramíneas, en alfalfa en medios líquidos
- 115.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :
- 115.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? No.

116. DIFERENCIACIÓN

- 116.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : Se ponen en medios sin hormonas.
- 116.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
- 116.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : A veces no se completa la embriogénesis. No lo controlamos.
- 116.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : en Medicago es muy fácil, en las gramíneas depende, para algunos embriones es fácil en otras ocasiones no tanto
- 116.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

117. MADURACIÓN

- 117.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : Su aspecto.
- 117.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; Si
¿Qué la determina? : El tiempo de permanencia en el cultivo sin transplantar.
- 117.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :
- 117.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? No
- 117.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : Aparentemente no. Sin embargo los genes Lea se expresan antes en la somática que en la cigótica..
- 117.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : No
- 117.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : Su apariencia en conjunto.
- 117.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : No

- 117.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

118. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 118.1 ¿Hace semillas sintéticas? No
- 118.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? : No
- 118.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :
- 118.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :
- 118.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : .In vitro
- 118.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : Basal
- 118.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? : No
- 118.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : No realmente
- 118.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

119. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 119.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla? : En muchos casos son iguales, en otros casos menos vigorosas (¿anormales en su crecimiento?)
- 119.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? : Sobre todo en centeno muchas albinas
- 119.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :No
- 119.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :
- 119.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :
- 119.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 119.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se vé afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

120. CONCLUSIÓN

- 120.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? En *Medicago*
- 120.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 120.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? : Todos los**

aspectos en general y además el control genético del proceso.

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003

ENVIADA POR JUAN OLLER

121. INTRODUCCIÓN

- 121.1 Denominación del grupo de trabajo: Micropropagación de *E. globulus* Labill.
- 121.2 Personas que lo constituyen: Director de investigación, técnico superior y dos auxiliares de laboratorio. Convenio de colaboración con el IMIA de Madrid.
- 121.3 Institución: Centro de Investigación y Tecnología del Grupo Empresarial ENCE, S.A. (ENCE-CIT).
- 121.4 Población: Pontevedra.
- 121.5 ¿Estudia embriogenesis somática, gamética o ambas?: Embriogenesis somática.
- 121.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: *Eucalyptus globulus* ssp. *globulus*.
- 121.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: No.
- 121.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogenesis: Ninguna.
- 121.9 Caso de practicar con la misma especie embriogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:
- ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): Hasta el momento sólo se ha alcanzado inducción y manifestación de embriogenesis

122. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 122.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogenesis?: En embrión cigótico procedente de semilla seleccionada, separando previamente el endospermo, que es de tipo líquido. También se está testando la respuesta en hojas epicórmicas de clones, en embriones cigóticos inmaduros y en estambres.
- 122.2 Si trabaja en androgenesis, ¿cultiva microsporas aisladas?:.
- 122.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo:
- las hojas se han tomado de brotes epicórmicos inducidos en trozos de brotes de cepa, brotes chupones o ramas de copa; se están empezando a tomar de brotes axilares de pies-madre de clon selecto.
 - los embriones cigóticos maduros se obtienen de semillas que constituyen familias de medihermanos de madre seleccionada. Los estambres y los

embriones inmaduros se extraen de cocos inmaduros.

- 122.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : No, a no ser que el material proceda de pies-madre de clon selecto de los invernaderos. En ese caso, se les suele administrar abono de liberación lenta mezclado en el substrato (Osmocote), y esporádicamente abono foliar (urea) y fungicidas (benomilo y otros).
- 122.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis?: En un principio, creemos que no. Aunque quizás haya que considerar la estructura de las hojas de los brotes epicórmicos, que pueden ser más tiernas y verdes que las normales.
- 122.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : Creemos que el periodo anual de recogida del material y la posición que ocupa en la planta o árbol.
- 122.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : En algunos genotipos se han obtenido estructuras cuya capacidad embriogénica no ha podido ser determinada hasta el momento, porque no han terminado de diferenciarse. Aunque si podemos afirmar que unos clones son más reactivos que otros, produciendo formaciones semejantes a los clusters embriogénicos.
- 122.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: El estado de expansión foliar, el grado de madurez del tejido.

123. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 123.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?: Depende del material de partida. Si es sobre material vegetal recubierto, es decir sobre el que hay que diseccionar para localizar el explanto, no sería necesario, ya que podemos presuponer que viene libre de contaminantes o virus. Pero si el material inicial que va a cultivarse recibe directamente la acción de los agentes desinfectantes sobre su superficie (p. e. hojas), es aconsejable pasar previamente por una fase de establecimiento de corta duración.
- 123.2 ¿A qué tipo de preacondicionamiento somete a los explantos iniciales? : En el caso de ser aplicado, nos decantamos por un medio pobre en nutrientes y sin reguladores de crecimiento durante 7 días a 25°C y oscuridad constante.
- 123.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? : Sí, para eliminar durante la fase inicial los explantos que se contaminan, ahorrar material y tiempo; además de reducir el estrés de los explantos al ser introducidos por primera vez en el cultivo *in vitro*, o ver anticipadamente la respuesta fisiológica de los explantos al ser cultivados, como por ejemplo, la exudación fenólica en el caso del eucalipto.
- 123.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? : Posiblemente, no. Creemos que la verdadera embriogénesis (pre o determinación celular) empieza al aplicar el pulso de auxinas en la fase de inducción.

124. INDUCCIÓN

- 124.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : En principio, no. Aunque este aspecto está subordinado a que los explantos son muy pequeños.
- 124.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : No.
- 124.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : En medio sólido.
- 124.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : Por nuestra experiencia en la especie, parece que no es un factor determinante.
- 124.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : Fundamentalmente auxinas (ANA o IBA), aunque en alguna secuencia también se ha testado la combinación con citoquinina (BAP).
- 124.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : No, específicamente, aunque se ha probado la reducción genérica de la concentración de todos los macronutrientes a la mitad de su valor estandarizado.
- 124.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : Obviamente, la viabilidad del explanto durante las etapas iniciales.
- 124.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : Sí. Hemos localizado el estadio globular temprano, con el acumulo de metabolitos energéticos (sacarosa y almidón) y sus mitosis continuadas; y la fase torpedo, con la insinuación del surco cotiledonar y el septo que independiza el embrión del resto del callo.
- 124.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? : No podemos por el momento afirmar tal precisión.
- 124.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: Nos gustaría, pero aún no disponemos de líneas embriogénicas y no-embriogénicas totalmente definidas.

125. MANIFESTACIÓN

- 125.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : Depende del material de partida. Posiblemente con una mayor experiencia y en un futuro cercano, sí.
- 125.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : Testar el medio semi-sólido o líquido, o incluso la inmersión temporal.
- 125.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : Suele ser directa, y se generan al final de la fase de iniciación, con auxinas al 10% y fotoperiodo (7-8 semanas).

126. MULTIPLICACIÓN

- 126.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriónicas? : Si. Los cultivos se mantienen, pero no se multiplican eficazmente.
- 126.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriónico o por embriogénesis recurrente? : Para la embriogénesis primaria suele ser por proliferación del callo embriónico, el cual previamente presenta un aspecto parecido a la piel de serpiente o de tipo escamosa-brillante. La embriogénesis recurrente se observa en algunos embriones, pero con carácter puntual, alcanzando como máximo la fase globular-torpedo.
- 126.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : Después de cómo mínimo dos repicados en la fase de mantenimiento (sin hormonas).
- 126.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : La no aportación de hormonas exógenas.
- 126.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? : No.
- 126.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : La disección en cabina de los embriones primarios para facilitar el contacto de los explantos con el medio de cultivo, y estimular su proliferación.
- 126.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : En este momento estamos testando el efecto del medio de mantenimiento (sin hormonas) de los embriones en condiciones de agitación a 50 r.p.m. para ver si mejoramos la proliferación.
- 126.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : No.
- 126.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriónicas? Aún no.

127. DIFERENCIACIÓN

- 127.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : Ninguno en especial. Los embriones “cotiledonares” han aparecido por simples repicados en medios sin hormonas. Otra cosa va a ser, la optimización del rendimiento posterior de dicha diferenciación.
- 127.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
- 127.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
- 127.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : No. Son tan pequeños que difícilmente se pueden aislar. Únicamente podemos esperar que se desprendan por sí solos.
- 127.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : (Hasta ahora, aún no ha sido testada).

128. MADURACIÓN

- 128.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : La evolución de los cultivos es tan rápida que no nos ha sido posible diferenciar claramente su grado de maduración.
- 128.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? : Posiblemente sí. Creo que la determina la escasa dependencia que el embrión tiene del endospermo, que en nuestro caso y observando el embrión cigótico, es de tipo fluido y muy reducido.
- 128.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : (Hasta ahora, aún no ha sido testada).
- 128.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?
- 128.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : Diría que no. Ambos son muy pequeños.
- 128.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : Hemos realizado algunos cortes histológicos, pero no hemos realizado un estudio pormenorizado sobre ello.
- 128.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : No disponemos de suficiente material en la embriogénesis secundaria para analizar este aspecto.
- 128.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : Por el momento, no.
- 128.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones?: Baja, tanto una como la otra.

129. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 129.1 ¿Hace semillas sintéticas?
- 129.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? :
- 129.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :
- 129.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? :
- 129.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? :
- 129.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? :
- 129.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del

desarrollo del meristemo caulinar? :

129.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? :

129.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

130. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

130.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla?
:

130.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :

130.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :

130.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :

130.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :

130.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?

130.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

131. CONCLUSIÓN

131.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial?

En *Eucalyptus globulus* Labill. aún no hemos alcanzado esta fase de la investigación.

131.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos?

Probablemente, sí. Siempre que se transfieran y optimicen las condiciones de cultivo al medio líquido.

131.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática?

Cómo afecta el hecho de que el embrión disponga de pocas reservas nutricionales (hay que recordar que la semilla del eucalipto tiene un endospermo fluido muy reducido, aunque muy eficaz).

La reversión al color rojizo que adquieren progresivamente los embriones somáticos durante la fase de maduración, pudiendo llegar a incluso brunificación, ¿Se puede considerar como un síntoma de parada del cultivo o es consecuencia de la propia maduración del embrión?. ¿Cuáles son las condiciones de luz más frecuentemente utilizadas?

¿Existen experiencias de control de la vitrificación en medios líquidos?
¿Cómo controlan la hiperhidricidad?

¿Qué factores pueden limitar la expresión de la embriogénesis recurrente, y porqué se observa una estaticidad aparente del cultivo al llegar al clúster

embriogénico primario?. ¿Existen experiencias de aplicación de antioxidantes o estabilizantes membranales durante esta fase?

¿Puede suceder que la prolongación de las fases de los cultivos, en general, afecten a la obtención de estructuras inviables, anormales y/o aberrantes?. O por el contrario, suele darse el caso que el sistema de propagación embriogénico es suficientemente autónomo como para que no exprese un efecto de habituación o memoria.

Hasta que punto vuestro sistema de generación de embriones somáticos es repetible: recogida en la misma época del año, tipo de explanto, sistema de inducción, ...

¿Cuál es el nivel y qué condiciones limitan (si las hay) la productividad propagativa de vuestro sistema? ¿Es mejorable o está limitado de forma intrínseca por la especie?

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003**ENVIADA POR M^a CARMEN RISUEÑO**

132. INTRODUCCIÓN

- 132.1 Denominación del grupo de trabajo: ORGANIZACIÓN NUCLEAR Y DESARROLLO EN PLANTAS
- 132.2 Personas que lo constituyen: MARIA CARMEN. RISUEÑO, PILAR S. TESTILLANO, PABLO GONZÁLEZ-MELENDI, MARIA JOSE CORONADO
- 132.3 Institución: CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS, CSIC
- 132.4 Población: MADRID
- 132.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: GAMETICA
- 132.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: Capsicum annuum, Nicotiana tabacum, Brassica napus
- 132.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: Prunus persica
- 132.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: IGUAL QUE EN 1.6
- 132.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?:
- 132.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas):

133. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 133.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?:MICROSPORAS Y ANTERAS
- 133.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : SI
- 133.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo:
- 133.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : NO
- 133.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? :
- 133.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : GENOTIPO, SALUD, EDAD Y ESTACIÓN
- 133.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : SI
- 133.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: ESTADIO DE DESARROLLO, PRETRATAMIENTOS

134. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 134.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?:
.....
- 134.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? :
FRIO, CALOR, SEMIAYUNO
- 134.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? : NO, ES PARA LA INDUCCION
- 134.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? :

135. INDUCCIÓN

- 135.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : NO
- 135.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : AYUNO, CALOR Y FRIO
- 135.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? :
AMBOS (SEGÚN EL EXPLANTO)
- 135.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? NO
- 135.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : NINGUNO/ 2,4-D
- 135.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? :
- 135.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial,
¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? :
- 135.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : SI
- 135.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? NO
- 135.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: NO

136. MANIFESTACIÓN

- 136.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? :
- 136.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? :
- 136.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? :

137. MULTIPLICACIÓN

- 137.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? :
- 137.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? :
- 137.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? :
- 137.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación?
:
- 137.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos?
- 137.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? :

- 137.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? :
- 137.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) :
- 137.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas?

138. DIFERENCIACIÓN

- 138.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? :
- 138.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis recurrente? :
- 138.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? :
- 138.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? :
- 138.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :

139. MADURACIÓN

- 139.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? :
- 139.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; ¿Qué la determina? :
- 139.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? :
- 139.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración?
- 139.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? :
- 139.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? :
- 139.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? :
- 139.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? :
- 139.9 ¿En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? :

140. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

- 140.1 ¿Hace semillas sintéticas?
- 140.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? :
- 140.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? :
- 140.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran

asincronía entre ambos? :

- 140.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? :
- 140.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? :
- 140.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del desarrollo del meristemo caulinar? :
- 140.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? :
- 140.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? :

141. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

- 141.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla?
:
- 141.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? :
- 141.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? :
- 141.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? :
- 141.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? :
- 141.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación?
- 141.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se vé afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

142. CONCLUSIÓN

- 142.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? :
- 142.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? :
- 142.3 ¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? :**

ENCUESTA SOBRE EMBRIOGÉNESIS *IN VITRO*. NOVIEMBRE DE 2003

ENVIADA POR MARIANO TORIBIO

143. INTRODUCCIÓN

- 143.1 Denominación del grupo de trabajo: *Cultivo de tejidos vegetales IMIA*
- 143.2 Personas que lo constituyen: *.Cristina Celestino, Celia Fernandez, Inmaculada Hernández, Elena Carneros, Dolores Lopez-Vela, Jesús Jiménez, Mariano Toribio. Personal técnico: Nuria Cleto, Noelia Ramirez, Eutimio Fernández, Noelia Garrido, Cristina Rubio*
- 143.3 Institución: *.Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA)*
- 143.4 Población: *Alcalá de Henares (Madrid)*
- 143.5 ¿Estudia embryogenesis somática, gamética o ambas?: *Embriogénesis somática*
- 143.6 Especies en las que ha obtenido embryogenesis: *.Alcornoque , roble y eucalipto?*
- 143.7 ¿Está tratando de inducir embryogenesis en otras especies?: *Pino piñonero*
- 143.8 Especies en las que ha logrado la regeneración completa vía embriogénesis: *.Alcornoque*
- 143.9 Caso de practicar con la misma especie embryogenesis somática y gamética, ¿ambos sistemas embriogénicos son iguales, semejantes o diferentes?: *.....*
- 143.10 ¿Qué fases del proceso completo de regeneración serían claramente distinguibles en la especie o especies con las que trabaja? (si hay diferencias entre especies, indicarlas): *En alcornoque: inducción-manifestación, embriogénesis recurrente, maduración y conversión (germinación y aclimatación)*

144. PLANTA DONANTE DE EXPLANTOS INICIALES

- 144.1 ¿En qué tipo de explanto o explantos iniciales ha inducido embriogénesis?: *Alcornoque:Embrión cigótico, hoja de planta joven y de árbol adulto; Roble: hoja de árbol adulto; Pino: embriones cigóticos maduros e inmaduros, hojas de inserción aislada; Eucalipto: hoja de árbol adulto, embrión cigótico...*
- 144.2 Si trabaja en androgénesis, ¿cultiva microsporas aisladas? : *.....*
- 144.3 Describa cómo obtiene los explantos iniciales, especificando para cada tipo: *Hoja de planta joven: plantas germinadas de bellota; Hoja de árbol adulto: a partir de brotes epicórmicos emitidos en ramas (se fuerza la brotación en cámaras de cultivo en condiciones de alta humedad). Hojas de inserción aislada procedentes de brotes del año tomados de árbol.*
- 144.4 ¿Efectúa algún tratamiento previo sobre la planta donante? : *No*
- 144.5 ¿Tiene dicho tratamiento algún efecto sobre la inducción de embriogénesis? : *.....*

- 144.6 ¿Qué factores relativos a la planta donante tienen influencia sobre la embriogénesis? : *Alcornoque y roble: genotipo, momento de recogida de las ramas.*
- 144.7 ¿Ha obtenido embriogénesis en explantos procedentes de plantas adultas? : *.Si, en roble y en alcornoque....*
- 144.8 ¿Qué factores relativos al explanto inicial influyen sobre la capacidad embriogénica?: *Alcornoque: tamaño de la hoja (grado de desarrollo)*

145. INTRODUCCIÓN EN CULTIVO

- 145.1 ¿Aplica esta posible fase o cultiva directamente sobre medio de inducción?: *Alcornoque y pino: utilizamos una primera fase de introducción*
- 145.2 ¿A qué tipo de precondicionamiento somete a los explantos iniciales? *Alcornoque y pino: en medio de cultivo pobre en nutrientes durante siete días en condiciones de oscuridad*
- 145.3 ¿Lo hace para resolver algún problema específico del establecimiento del cultivo? *En un primer momento se utilizó para evitar los problemas de fenolización en el cultivo de hojas de planta joven. Además sirve para desechar las hojas contaminadas.*
- 145.4 ¿Tiene este tratamiento alguna influencia sobre la embriogénesis? : *Alcornoque: . No es crítico para la obtención de embriones somáticos pero se ha visto que utilizando esta primera fase se aumenta el porcentaje de hojas que dan embriogénesis somática.*

146. INDUCCIÓN

- 146.1 ¿Somete al explanto inicial a algún tipo de lesión o disgregación? : *Alcornoque: no; Pino: fraccionamiento de piñones maduros e inmaduros en rodajas. Separación del cuerpo del embrión del megagametofito.*
- 146.2 ¿Aplica algún stress de otro tipo? : *Alcornoque y pino: la aplicación durante la primera fase de un medio pobre en nutriente (puede suponer un tipo de estrés, pero no está comprobado).*
- 146.3 ¿Realiza la inducción en medio sólido, en líquido o en ambos tipos? : *.Alcornoque, roble, pino y eucalipto: medio sólido*
- 146.4 ¿Es importante la posición del explanto sobre el medio de cultivo? : *Alcornoque: se coloca la hoja con el envés en contacto con el medio de cultivo. Se han hecho ensayos con el haz en contacto con el medio no observándose diferencias significativas, por tanto para nuestro sistema no lo consideramos importante*
- 146.5 ¿Qué regulador o reguladores utiliza en esta fase? : *Pino: 2.4D, NAA y BAP. Alcornoque y roble: NAA y BAP*
- 146.6 ¿Ha estudiado el efecto del pH o del calcio sobre la inducción? : *.No*
- 146.7 Además de la influencia relativa a la planta donante y al explanto inicial, ¿considera algún otro factor importante sobre la inducción, aparte del efecto de los reguladores? : *Alcornoque: tiempo de permanencia en el medio de inducción.*
- 146.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos o moleculares

- sobre la transición de las células somáticas al estado embriogénico? : *No*
- 146.9 ¿Ha determinado el origen uni o pluricelular de los embriones somáticos? :
No
- 146.10 ¿Ha realizado estudios sobre el control genético de la capacidad embriogénica?: *Alcornoque: sí, se ha observando control genético.*

147. MANIFESTACIÓN

- 147.1 ¿Hay que modificar las condiciones de inducción para lograr la manifestación de embriogénesis en la especie/s con las que trabaja? : *Alcornoque: sí en una primera fase disminuir las concentraciones de los reguladores y posteriormente suprimirlos del medio de cultivo. También se varían las condiciones de luz.*
- 147.2 ¿Qué modificaciones son esenciales? : *No lo sabemos, pues no han sido ensayadas.*
- 147.3 La aparición de embriones ¿es directa o indirecta? : *Aparentemente directa, no observamos formación de callo*

148. MULTIPLICACIÓN

- 148.1 ¿Tiene dificultades con la multiplicación de las líneas embriogénicas? : *No*
- 148.2 En su sistema de regeneración, ¿la multiplicación se produce por proliferación de callo embriogénico o por embriogénesis recurrente? : *Alcornoque: por embriogénesis secundaria*
- 148.3 ¿En qué fase del desarrollo del embrión se produce la embriogénesis secundaria? : *Alcornoque: cotiledonar mayoritariamente.*
- 148.4 ¿Qué condiciones de cultivo son diferentes a las de la fase de manifestación? : *Ninguna.*
- 148.5 ¿Ha logrado cultivos sincrónicos? : *“tentativa”*
- 148.6 ¿Emplea algún sistema de selección y separación de embriones? : *Selección manual*
- 148.7 ¿Emplea algún sistema de cultivo en medio líquido (estacionarios con agitación o burbujeo, o inmersión transitoria) para la multiplicación? : *Alcornoque: se realizaron ensayos en medio estacionario con agitación y actualmente se han iniciado ensayos en inmersión transitoria*
- 148.8 ¿Ha realizado estudios anatómicos/histológicos/histoquímicos sobre esta fase? (origen uni o pluricelular de los embriones secundarios) : *Sí (junto con Marisa Molinas de la Univ. de Gerona)*
- 148.9 ¿Hace crioconservación de líneas embriogénicas? : *No*

149. DIFERENCIACIÓN

- 149.1 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr la diferenciación de los embriones hasta el estado cotiledonar? : *Ninguno.*
- 149.2 ¿Qué tratamiento precisa aplicar para lograr detener la embriogénesis

recurrente? : *Medio nutritivo pobre??*

149.3 ¿Qué tipo de anomalías observa en los embriones producidos, y cómo las controla? : *más de dos cotiledones, embriones fusionados*

149.4 ¿Le resulta fácil obtener embriones aislados? : *No es difícil, en medios de proliferación se encuentran embriones tanto formando masas como aislados y en distintos grados de desarrollo (supone tener cultivos ampliados).*

149.5 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : *No*

150. MADURACIÓN

150.1 ¿Qué criterios aplica para determinar el grado de maduración de sus embriones somáticos/gaméticos? : *Tamaño y apariencia (color), sin embriogénesis secundaria.*

150.2 ¿Observa maduración espontánea en sus cultivos?; *Sí* ¿Qué la determina? : *Pensamos que esta relacionado con la falta de nutrientes*

150.3 ¿Obtiene resultados positivos con el ABA? : *No, obtención de embriogénesis secundaria*

150.4 ¿Ha utilizado otros tratamientos como aplicación de osmóticos, regulación del metabolismo del etileno, desecación, depleción de nutrientes, frío u otros, para favorecer la maduración? *Aplicación de osmóticos (sacarosa, PEG, depleción de nutrientes, desecación en ambiente de alta humedad.*

150.5 Sus embriones somáticos/gaméticos, ¿son muy diferentes a los cigóticos? : *Son similares (aunque tamaño de cotiledones más pequeño).*

150.6 ¿Ha realizado estudios sobre embriogénesis cigótica a fin de comparar entre unos embriones y otros? : *Se están realizando ensayos*

150.7 ¿Existe algún rasgo morfológico (tamaño, forma, color...) para discernir que embriones están maduros y aptos para germinar? : *Sí, tamaño y apariencia (color), sin embriogénesis secundaria.*

150.8 ¿Dispone de marcadores histoquímicos o moleculares que definan a los embriones maduros? : *No*

150.9 En su sistema embriogénico, ¿es alta o baja la tasa de obtención de embriones maduros en relación a la producción total de embriones? : *tasa media*

151. GERMINACIÓN Y PASO A TIERRA

151.1 ¿Hace semillas sintéticas? *No*

151.2 ¿Aplica algún tratamiento previo a la germinación (vernalización/estratificación)? : *Sí, 60 días a 4°C en medio de cultivo sin hormonas*

151.3 ¿Los porcentajes de germinación son similares a los de semilla? : *más bajos*

151.4 ¿Le ocurre el problema de bloqueo del crecimiento de tallo o raíz, o una gran asincronía entre ambos? : *Si, a veces (ocasional)*

151.5 ¿Germina *in vitro* o efectúa germinación directa *ex vitro*? : *In vitro*

151.6 Hay algún requisito específico en el medio de germinación, o usa medio basal sin reguladores? : *Usamos medio basal sin reguladores*

151.7 ¿Tiene experiencia en la utilización del ácido ascórbico como estimulante del

desarrollo del meristemo caulinar? : *No*

151.8 ¿Tiene dificultades con la aclimatación? : *Sí*

151.9 ¿Qué factores considera que influyen más sobre la aclimatación? *Adecuación de las plantas a niveles de humedad bajos, calidad de planta*

152. CONFORMACIÓN DE LAS PLANTAS PRODUCIDAS

152.1 ¿Cual es la diferencia/s más apreciable/s con las plantas obtenidas de semilla?
: *Son menos vigorosas*

152.2 ¿Qué tipo de malformaciones se observan? : *Malformaciones en hojas (hojas cotiledonares)*

152.3 ¿Revierten dichas malformaciones con el tiempo en cultivo? : *Si*

152.4 ¿Han establecido ensayos comparativos en campo? : *Sí, se está comparando el crecimiento de plantas procedentes de embriogénesis (a partir de hojas de planta joven y hojas de árbol adulto) y procedentes de la germinación de bellotas*

152.5 ¿Han evaluado la estabilidad genética en las diferentes fases del proceso de regeneración por embriogénesis? : *Sí, en fase de embriogénesis recurrente*

152.6 ¿Qué metodología emplea para dicha evaluación? *Marcadores RAPD y AFLP.*

152.7 Si trabaja con embriogénesis gamética, ¿qué tratamiento aplica, y en qué fase del cultivo, para lograr la duplicación cromosómica?; ¿se ve afectado su sistema de regeneración por dicho tratamiento?

153. CONCLUSIÓN

153.1 ¿En cual de las especies con las que trabaja considera que su sistema de regeneración por embriogénesis podría estar a nivel de aplicación preindustrial? : *El alcornoque.*

153.2 ¿Podría automatizarse alguno de sus pasos? : *Si, la multiplicación(embriogénesis recurrente).*

153.3 **¿Qué aspecto considera más importante o llamativo de su proceso de regeneración que le gustaría poner en común para su análisis y discusión por los asistentes a la reunión sobre embriogénesis somática? : *Importante efecto del momento de la recogida de trozos de ramas de los árboles adultos sobre la capacidad embriogénica de hojas en expansión procedentes de brotes epicórmicos inducidos en dichos trozos de ramas en condiciones controladas.***