Referencia: **«2FD1997-0325»**

MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

INFORME FINAL

Investigador Principal:	«RAMON» «DOLCET SANJUAN»
Título del Proyecto:	«PRODUCCION DE LINEAS PURAS DE PIMIENTO, BERENJENA, MELON Y PEPINO MEDIANTE LA OBTENCION DE DIHAPLOIDES CON EL CULTIVO IN VITRO DE ANTERAS O EL RESCATE DE EMBRIONES PARTENOGENICOS.»
Organismo:	«INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTARIES»
Centro:	«CENTRE DE CABRILS»
Departamento:	«GENETICA VEGETAL»
Fecha de Inicio:	«01-NOV-1998»
Fecha de Finalización:	«31-OCT-2001»

Fecha: 4 de Abril del 2002

Conforme el
Representante Legal
del Organismo:

El Investigador Principal:

Fdo: Agustí Fonts Cavestany

Fdo: Ramon Dolcet Sanjuan

Ilmo. Sr. Subdirector Gral. de Proyectos de Investigación
Paseo de la Castellana, 160. 28071 MADRID

A. MEMORIA. Resumen de los resultados del proyecto en relación con los objetivos propuestos (máximo 2000 palabras).
Destaque su relevancia científica y/o su interés tecnológico.
En el caso de haber obtenido resultados no previstos inicialmente, indique su relevancia para el proyecto.
En caso de resultados fallidos, indíquense las causas.

Durante el desarrollo de este proyecto, desde la fecha de su inicio (noviembre 1998) y hasta la actualidad, se han realizado los trabajos previstos en el plan de trabajo, cumpliéndose los objetivos propuestos para cada una de las cuatro especies hortícolas en las que se ha centrado el proyecto. En concreto y para cada especie vegetal estas actividades son las siguientes:

Pimiento. Mediante la repetición simultánea y paralela del trabajo, durante los años 1999 y 2000, en el laboratorio del IRTA y en el de la empresa Semillas Fitó, a la que se ha transferido la tecnología desarrollada por el IRTA, se ha finalizado la comprobación de que la producción de líneas dihaploides (DHLs) alcanza niveles comparables en ambos laboratorios. El número final de DHLs, cuya semilla se ha recogido de Mayo a Agosto del 2000, ha sido de 80. A principios del año 2000 la empresa ya disponía de variedades comerciales híbridas de pimiento, cuyas líneas puras, DHLs, proceden del protocolo establecido y transferido basado en el cultivo *in vitro* de anteras. En consecuencia podemos asegurar que la metodología para la producción de DHLs de pimiento ha sido transferida con éxito a la empresa. Este hecho es de gran relevancia tecnológica ya que hasta la fecha en nuestro país no había sido establecida una metodología para la producción de líneas puras de pimiento, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, que garantizase la obtención de una cantidad suficiente de líneas como para ser incorporada en los programas de mejora y ser utilizada en la producción de híbridos comerciales. Este hecho garantiza la competitividad de la empresa de semillas frente a otras empresas multinacionales, que utilizan dicha metodología, al reducir a dieciocho meses el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas puras.

Berenjena. Al igual que en pimiento, durante los años 1999 y 2000, se ha repetido también de forma simultánea y paralela el trabajo de producción de DHLs de berenjena mediante el cultivo *in vitro* de anteras, en el laboratorio del IRTA y en el de Semillas Fitó. De este modo se ha comprobado que la producción de líneas puras dihaploides alcanza niveles comparables en ambos laboratorios. El número final de DHLs, cuya semilla se ha recogido de Mayo a Agosto del 2000, ha sido de 70 líneas de berenjena. Además, a inicios del año 2000 la empresa ya disponía también de variedades comerciales híbridas de berenjena, cuyas líneas puras, DHLs, procedían del protocolo establecido y transferido basado en el cultivo *in vitro* de anteras. En consecuencia podemos asegurar que la metodología para la producción de DHLs de berenjena ha sido transferida con éxito a la empresa. Tal como se ha mencionado en pimiento este logro es de gran relevancia tecnológica, más que científica, ya que hasta la fecha y en nuestro país no había sido establecida una metodología para la producción de líneas puras de berenjena, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, que garantizase la obtención de una cantidad suficiente de líneas como para ser incorporada en los programas de mejora y ser utilizada en la producción de híbridos comerciales. Esto aumenta la competitividad de la empresa de semillas frente a otras empresas multinacionales que emplean dicha metodología, al reducir a catorce meses el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas puras.

Melón. Durante los dos primeros años de este proyecto, de Marzo del 1999 a Julio del 2001, y de forma simultánea a los trabajos realizados en las dos anteriores especies, se ha transferido a la empresa Semillas Fitó el proceso para la producción de DHLs de melón. Durante este tiempo se ha repetido el mismo protocolo en ambos laboratorios. En los dos años en que se ha realizado este proceso, los resultados han sido comparables. El número final de DHLs, cuya semilla ha sido recogida durante Julio y Agosto del 2000 y 2001, ha superado las 200 líneas, a partir de 5 híbridos de melón por año. Como los resultados han sido satisfactorios y similares entre ambos laboratorios, la transferencia de la metodología basada en el rescate *in vitro* de embriones partenogénicos, inducidos *in vivo* mediante la polinización con polen irradiado con rayos gamma, se ha considerado finalizada. La transferencia de esta metodología a la empresa abre la posibilidad de emplear la misma en otras especies como por ejemplo el pepino y otras cucurbitáceas. Además, la existencia en este cultivo de un programa de mejora, cuyos objetivos más relevantes se encuadran en la mejora de las resistencias a enfermedades de importancia agronómica, favorece el empleo de esta metodología junto con el desarrollo de marcadores moleculares que faciliten la selección precoz de nuevas líneas resistentes. Este logro es de interés científico y de relevancia tecnológica, ya que hasta la fecha y en nuestro país no había sido establecida una metodología para la producción de líneas puras de melón, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, que garantizase la obtención de una cantidad suficiente de líneas como para ser incorporada en los programas de mejora y ser utilizada en la producción de híbridos comerciales. Actualmente la empresa ya dispone de variedades comerciales híbridas de melón, cuyos parentales son DHLs obtenidas con esta metodología. Esto aumenta la competitividad de la empresa de semillas frente a otras empresas multinacionales que emplean dicha metodología, o la aventaja frente a otras que aun no disponen de la misma, al reducir a dieciocho meses el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas puras.

Pepino. Finalmente, el laboratorio del IRTA inició, en Abril de 1999, la puesta a punto de un protocolo para la producción de DHLs de pepino. Este proceso finalizó en Julio del 2000 con la producción de 51 DHLs con semilla. Estos resultados fueron muy positivos, ya que no hay ningún otro grupo nacional o extranjero que haya publicado la producción de un número tan elevado de DHLs de pepino. Considerando el éxito conseguido en el primer cultivo, y desde Marzo del 2000 hasta la actualidad, se ha transferido la esta metodología al laboratorio de Semillas Fitó. Esta transferencia, que se ha realizado durante dos cultivos sucesivos, en el 2000 y 2001, ha finalizado satisfactoriamente con la producción de unas 150 DHLs de pepino, y la obtención de resultados comparables y similares entre el laboratorio del IRTA y el Semillas Fitó S.A. Estos resultados tienen relevancia científica y interés tecnológico. Hasta la fecha, en nuestro país no había sido establecida una metodología para la producción de líneas puras de pepino, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, que garantizase la obtención de una cantidad suficiente de líneas como para ser incorporada en los programas de mejora y ser utilizada en la producción de híbridos comerciales. Muy pronto la empresa ya dispondrá de variedades comerciales híbridas de pepino, cuyos parentales sean DHLs obtenidas con esta metodología. Esto aventaja la empresa de semillas frente a otras empresas multinacionales, la mayoría de las cuales aún no disponen de dicha metodología.

B. RESULTADOS MÁS RELEVANTES ALCANZADOS EN EL PROYECTO

Durante el desarrollo de este proyecto se han puesto a punto y se han transferido, a la empresa Semillas Fitó S.A., las tecnologías para la producción de líneas puras en cuatro especies hortícolas, pimiento, berenjena, melón y pepino. La producción científica esta limitada por la prioridad de transferir a la empresa antes de publicar los resultados. Sin embargo, el grupo investigador se ha consolidado en el desarrollo de estas tecnologías en varias especies hortícolas, y puede competir, con base justificada por sus resultados, en la obtención de financiación pública y contratos privados para la obtención de líneas puras en estas y otras especies hortícolas.

La transferencia de las metodologías, dos de ellas basadas en el cultivo *in vitro* de anteras y las otras en el rescate *in vitro* de embriones partenogénicos, inducidos *in vivo* mediante la polinización con polen irradiado con rayos gamma, se ha considerado satisfactoria ya que los resultados han sido similares entre el laboratorio del IRTA y el de Semilla Fitó. La transferencia de estas metodologías a la empresa abre la posibilidad de emplear las mismas en otras especies. La existencia de programas de mejora en estos cultivos, cuyos objetivos más relevantes se encuadran en la mejora de las resistencias a enfermedades de importancia agronómica, favorece el empleo de esta metodología junto con marcadores moleculares que faciliten la selección precoz de nuevas líneas resistentes. Este logro es de interés científico y de relevancia tecnológica, ya que hasta la fecha y en nuestro país no había sido establecida una metodología para la producción de líneas puras de pimiento, berenjena, melón o pepino, mediante técnicas de cultivo *in vitro*, que garantizase la obtención de una cantidad suficiente de líneas como para ser incorporada en los programas de mejora y ser utilizada en la producción de híbridos comerciales. Actualmente la empresa ya dispone de variedades comerciales híbridas de pimiento, berenjena y melón, cuyos parentales son DHLs obtenidas con esta metodología. Esto aumenta la competitividad de la empresa de semillas frente a otras empresas multinacionales que emplean dicha metodología, o la aventaja frente a otras que aun no disponen de las mismas, al reducir el tiempo necesario para la obtención de nuevas líneas puras.

C. RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO

1. Formación del personal	Nº			
Personal Formado	(12)			
Personal formado o en formación que se ha transferido al sector industrial:				
Doctores (2) Titulados Superiores	(5)	Técnicos	(5)	
2. Tesis doctorales	(1)			
3. Artículos científicos en revistas	( )	nacionales	(3)	internacionales
4. Artículos de divulgación en revistas	( )	nacionales	( )	internacionales
5. Artículos de revisión en revistas	( )	nacionales	(1)	internacionales
6. Libros, capítulos de libros y monografías	( )	nacionales	( )	internacionales
7. Conferencias en congresos (por invitación)	( )	nacionales	(3)	internacionales
8. Patentes y otros títulos de propiedad industrial	( )	registrados	( )	en explotación
	( )	España	( )	extranjero

1. FORMACIÓN DE PERSONAL EN RELACIÓN AL PROYECTO, describir brevemente.

Durante el desarrollo de este proyecto se ha formado parte del personal del laboratorio de cultivo *in vitro* de la empresa Semillas Fitó, a la que se ha transferido la metodología desarrollada. Entre este hay un titulado superior y dos técnicos de laboratorio. Del mismo modo, en el laboratorio del IRTA se han formado tres técnicos de laboratorio, que posteriormente han sido contratados en otros grupos de investigación. Dos titulares superiores han realizado durante estos años sus trabajos finales de carrera en temas relacionados con el proyecto. También han estado en prácticas de laboratorio dos estudiantes de Biología en su último curso. Durante los meses de Junio a Septiembre del 2001 ha estado en el laboratorio un Doctor investigador del "Agricultural Research Unit" del "Philippine Nuclear Research Institute" con una beca del IAEA, interesada en la producción de DHLs en hortícolas. Y finalmente, desde el inicio del proyecto y hasta finales del 2002 hay un titulado superior realizando su tesis doctoral con relación a la producción de DHLs en melón.

2. TESIS DOCTORALES REALIZADAS TOTAL O PARCIALMENTE EN EL PROYECTO.
Indicar: Título, nombre del doctorado, Universidad, Facultad o Escuela, fecha de comienzo, fecha de lectura, calificación y director.

Desde el inicio del proyecto, en 1999, y hasta finales del 2002 hay una doctoranda realizando totalmente su tesis en el proyecto:
Título: Generación y descripción molecular de una población de líneas dihaploides en melón.
Doctorando: Maria José Gonzalo Pascual.
Universidad: Universitat de Lleida.
Facultad o Escuela: Escola Tècnica Superior d'Enginyers Agrònoms.
Fecha de Comienzo: Enero 1999.
Fecha de Lectura: Diciembre 2002.
Director: Ramon Dolcet Sanjuan

En el Departamento de Genética Vegetal existen actualmente dos tesis doctorales más, en desarrollo que utilizan las DHLs de melón generadas con el proyecto actual como material vegetal de partida.

3. ARTICULOS CIENTÍFICOS EN REVISTAS.
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

Oliver, M., J. Garcia-Mas, M. Morales, R. Dolcet-Sanjuan, M.C. de Vicente, H. Gómez, H. van Leeuwen, A. Monfort, P. Puigdomènech, and P. Arús. 2000. The Spanish melon genome project: construction of a saturated genetic map. Acta Horticulturae, 510:375-378.

Dolcet-Sanjuan, R., E. Clavería, M. Llauradó, A. Ortigosa, and P. Arús. 2001. Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) dihaploid lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Acta Horticulturae, 560:141-144.

Morales, M., M. Luís-Arteaga, J.M. Álvarez, R. Dolcet-Sanjuan, A. Monfort, P. Arús, and J. Garcia-Mas. 2002. Marker saturation of the region flanking the gene *NSV* conferring resistance to the melon necrotic spot carmovirus (MNSV) in melon. Journal of the American Society for Horticultural Science, (in press)

Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria, M.J. Gonzalo, and J. Garcia-Mas. 2002. Optimisation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. Acta Horticulturae (in press)

4. ARTÍCULOS DE DIVULGACIÓN EN REVISTAS.
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación.

Dolcet-Sanjuan, R. 2001. Què és una planta transgènica ?. Els organismes transgènics: present i futur, Unió de Joves Pagesos, Universitat de Cervera, Cervera (Lleida).

Dolcet-Sanjuan, R. 2001. Micropropagación y microinjerto en frutales. Formato en CD. In: R. Portoles and J.A. Salas (eds.). Técnicas de plantación, poda y aplicación de fitosanitarios en el sector frutícola de pepita y hueso. ASAJA Alto Aragón, Huesca.

5. ARTÍCULOS DE REVISIÓN.
Indicar: Autor(es),título, referencia de la publicación.

R. Dolcet-Sanjuan (invited by Mohan Jain). Review article: Double haploid production in vegetable crops. Plant Cell Tissue and Organ Culture – Reviews section.

6. LIBROS, CAPÍTULOS DE LIBROS Y MONOGRAFÍAS.
Indicar: Autor(es), título, referencia de la publicación

7. CONFERENCIAS EN CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES (POR INVITACIÓN)
Indicar: Autor(es), nombre del congreso, lugar de celebración, año.

Oliver, M., J. Garcia-Mas, M. Morales, R. Dolcet-Sanjuan, M.C. de Vicente, H. Gómez, H. van Leeuwen, A. Monfort, P. Puigdomènech, and P. Arús. Cucurbitaceae 2000. Jerusalem, 2000.

Claveria, E., A. Huerta, and R. Dolcet-Sanjuan. Congress On In Vitro Biology, Society for In Vitro Biology. New Orleans, Louisiana, 1999.

Dolcet-Sanjuan, R., E. Clavería, M. Llauradó, and A. Ortigosa. The 4th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding, International Society for Horticultural Science (ISHS) Commission Biotechnology. Tampere, Finland, 2000.

Dolcet-Sanjuan, R., E. Claveria, M.J. Gonzalo, and J. Garcia-Mas. 2002. Optimisation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) dihaploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. XXVIth International Horticultural Congress, ISHS, Toronto, Canada, August 11-17.

8. PATENTES Y OTROS TÍTULOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL.
Indicar: Autor(es),título , registro, entidad titular de la patente, año, países, clase.

D. CARÁCTER DE LOS RESULTADOS DEL PROYECTO (señalar hasta dos opciones)

( ) Teóricos (**X**) Teórico-prácticos

( ) Prácticos (**X**) De inmediata aplicación industrial

E. COLABORACIONES Y PARTICIPACIÓN EN PROGRAMAS INTERNACIONALES.

1. Si el proyecto ha dado lugar a colaboraciones con otros grupos de investigación, coméntelas brevemente.
En caso contrario, indicar qué dificultades ha encontrado.

Las dificultades encontradas en las colaboraciones internacionales se encuentran en los intereses comerciales contrapuestos de las empresas, con las que colaboran los grupos de investigación extranjeros y nuestro grupo de investigación.

El proyecto ha dado lugar a algunas colaboraciones con grupos internacionales de investigación. Se han interesado por nuestros resultados el grupo de S.M. Jain, International Atomic Energy Agency, FAO/IAEA Joint Division, Viena; el de J.B.M. Custers, Plant Research International, Wageningen; o el de A.G. Juhász, Vegetable Crops Research Institute, Budapest, entre otros. Con ellos se han producido intercambios de información y material, dentro de las restricciones que existen al tener ellos y nosotros contratos con empresas privadas en competencia. Sin embargo, estos contactos son muy útiles para situar nuestros resultados en el ámbito internacional.

2. Si ha participado en proyectos del Programa Marco de I+D de la UE y/o en otros programas internacionales en temáticas relacionadas con las de este proyecto, indique programa, tipo de participación y beneficios para el proyecto.
Mencione las solicitudes presentadas al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto, aunque no hayan sido aprobadas.

Este proyecto no tiene nexos con otros proyectos de I+D comunitarios, nacionales, o internacionales, por tanto no ha sido posible de momento presentar solicitudes al Programa Marco de la UE durante la ejecución del proyecto. Sin embargo, nuestra intención es hacerlo en un futuro próximo con otras especies.

F. PROYECTOS COORDINADOS [1]

1. Describa el desarrollo de la coordinación entre Subproyectos, y los resultados de dicha coordinación en relación a los objetivos globales del Proyecto.

Este no es un proyecto coordinado.

.

[1] A rellenar sólo por el coordinador del proyecto.

G. RELACIONES O COLABORACIONES CON DIVERSOS SECTORES

G1. Si en el proyecto ha habido colaboración con Entes Promotores Observadores (EPO) participantes:

1. Describa en detalle la relación mantenida con los EPO's, y la participación concreta de éstos en el proyecto, especificando, si procede, su aportación al mismo en todos sus aspectos. (Si se ha modificado la relación y/o el apoyo del EPO, en relación con lo previsto a la aprobación del proyecto, descríbalo brevemente).

La EPO colaboradora en este proyecto ha sido la empresa Semillas Fitó S.A., que ha participado con la aportación de recursos humanos y materiales necesarios para realizar la parte que le corresponde en este proyecto. Esta ha instalado el equipo necesario de cultivo *in vitro* (cámaras de flujo, cámaras de cultivo, autoclaves, lupas, etc.), adquirido el material fungible, y contratado el personal necesario para la realización del plan de trabajo que le incumbe. Además la empresa también ha aportado el espacio de invernadero y mano de obra necesarios para realizar los cruzamientos y autofecundaciones. El coste empresa total, para los tres años de duración de este proyecto, ha sido de 49.280.000 Ptas.

2. Describa, si procede, las transferencias realizadas al (los) EPO (s) de los resultados obtenidos, indicando el carácter de la transferencia y el alcance de su aplicación.

La empresa ha incorporado en su esquema de producción de nuevas variedades de pimiento, berenjena, melón, y pepino, la metodología desarrollada en este proyecto para producir DHLs mediante técnicas de cultivo *in vitro*. Durante este proyecto se ha finalizado la transferencia de las metodologías para pimiento, berenjena, melón y pepino, mediante la formación del personal de la empresa, definición de un protocolo adaptado a las necesidades de la empresa, y comprobación de que los resultados obtenidos han sido comparables a los del IRTA. La colaboración de Semillas Fitó en la transferencia a su laboratorio de los procesos de producción de DHLs desarrollados por el IRTA, ha garantizado el éxito de este proyecto FEDER.

3. Indique si esta colaboración ha dado lugar a la presentación de nuevos proyectos o si se tiene intención de continuarla en el futuro. En caso afirmativo, describa brevemente cómo va a concretarse.

El proyecto FEDER no es el único vinculo con la empresa Semillas Fitó, con la que existe un contrato de investigación vigente. Además, se ha creado una Unidad Mixta Fitó-IRTA que consolida la colaboración y futuras transferencias de resultados. Posteriormente se ha presentado un proyecto PROFIT, que no se ha aprobado, para la producción de DHLs en tomate. El mismo tipo de proyecto se presentarán en futuras convocatorias.

G2. Si el proyecto ha dado lugar a otras colaboraciones con el entorno socioeconómico (industrial, administrativo, de servicios, etc.), no previstas inicialmente en el proyecto, descríbalas brevemente.

Otras colaboraciones surgidas por los resultados obtenidos en este proyecto son las ya mencionadas en el apartado E.1. Además existen otros posibles contratos, pendientes de aprobación, con otras empresas interesadas en obtener este tipo de material vegetal.

H. RESUMEN DE GASTO DEL PROYECTO

Miles de pta.

1. Gastos de personal (indicar datos personales, situación laboral y función desempeñada)

María José Gonzalo Pascual (DNI 34.101.842), Becaria de Formación de Investigadores de Tipo Predoctoral en el IRTA.

Total

---

2. Material inventariable (describir brevemente el material adquirido)

Cámara de flujo Telstar, Lupa binocular, y un Incubador Carbolite.

Total

---

3. Material fungible (describir brevemente el tipo de material)

Medios de Cultivo, placas Petri y otro material estéril desechables, reactivos de biología celular y molecular, material de invernadero para el crecimiento de plantas.

Total

---

4. Viajes y dietas (describir brevemente)

Asistencia a un congreso durante el año 2000, y viajes relacionados con la recolección de material vegetal, análisis de citometría de flujo, e irradiación del polen.

Total

---

5. Otros gastos (describir brevemente)

Total

---

6. Costes indirectos.

Total

---

7. En caso de que exista algún remanente de consideración en alguno de los capítulos, indique su cuantía y las previsiones de gasto.

TOTAL GASTOS DEL PROYECTO :

CONFORME con el resumen de gastos realizados en el Proyecto, el Responsable de los Servicios de Gestión del Organismo o Centro beneficiario.

D./Dª. : Fecha :

Cargo : Firma y Sello :