

# Tesis y Seminarios

## Tesis doctorales



### Fenoles en *Castanea sativa* Mill.: desde el monte a la industria

**Autor:** Francisco Fuente Maqueda

**Año:** julio 2018

**Directores:** Dras. Isabel Feito (SERIDA) y Ana M<sup>a</sup> Rodríguez (Universidad de Oviedo)

**Lugar de presentación:** Facultad de Biología. Universidad de Oviedo

Los fenoles constituyen una parte importante del llamado metabolismo secundario de las plantas. Sus funciones son muy variadas, formando parte de compuestos estructurales como la lignina, hormonales como el ácido salicílico y, sobre todo, en la interacción vegetal con su entorno, actuando como fitoalexinas, sustancias alelopáticas o disuasorios nutritivos. Sin embargo, el interés analítico en estas especies químicas se promovió por el papel que desempeñan en alimentación, farmacología y en numerosos procesos industriales como el curtido del cuero, el envejecimiento del vino y otras bebidas o en la durabilidad de la madera.

A pesar del gran interés potencial del castaño y de los fenoles, se dispone de poca información en ambos campos y menos aun considerándolos conjuntamente. Por esto con ánimo de fomentar la especie y los productos derivados de ella, los objetivos planteados en esta tesis son: optimizar la metodología del análisis fenólico para distintos

tejidos y órganos del castaño, valorar la importancia del perfil fenólico en la interacción ecosistema x árbol y determinar la influencia de la gestión forestal en el contenido fenólico como acción preventiva en las defensas de *C. sativa*.

El procedimiento analítico optimizado permitió obtener el perfil fenólico de todos los tejidos y órganos de interés de la especie.

Para la determinación de las interacciones entorno/planta se valoraron dos zonas contrastantes desde el punto de vista productivo, distinta Calidad de Estación (CE), dentro de la Comunidad Autónoma, que se comprobó modifican el perfil fenólico de los órganos y tejidos de esta especie de forma diferencial. Los órganos con mayor interacción con el entorno, como pueden ser las hojas o las cortezas, muestran un incremento general de estos metabolitos en la zona más desfavorable para la especie, concejo de Caso, y por el contrario los órganos menos expuestos, como puede ser la madera, muestran mayor acúmulo en la zona más favorable, concejo de Allande. En base a estos resultados se constata que el principal producto derivado de esta especie, la madera, se verá favorecida por una buena CE, no sólo en la cantidad producida sino también en la calidad, al aportarle estos compuestos una mayor durabilidad en su uso en construcción y un mayor potencial para tonelería. Por el contrario, la mayor concentración de metabolitos secundarios en los órganos externos de los árboles de Caso, que coinciden con los caducos o con los que se desprenden del árbol por diferentes causas, modificaran el entorno potenciando aspectos desfavorables como la menor disponibilidad de nutrientes, al actuar negativamente sobre la microbiota

Las actuaciones que se realizan en el monte, como podas y claras, tienen un efecto beneficioso sobre la incidencia de la principal enfermedad del castaño en Asturias, el chancho producido por *Cryphonectria parasitica*. Sin embargo, este efecto parece deberse a una menor presencia del hongo debido a la mejora de las condiciones ambientales, como mayor insolación y aireación, ya que no parece existir relación directa con la modificación observada en el perfil fenólico. Si bien, el papel de los fenoles en las defensas del árbol se puede presumir a partir de la mayor concentración detectada en el mes de julio, periodo en el que, según la bibliografía, la reacción frente a la enfermedad es mayor, y de su efecto inhibitor en el crecimiento *in vitro* de *C. parasitica* y hongos de pudrición de la madera.



### Sistema de cultivo para mejorar la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*

**Autor:** Antonio Vinicio Murillo Ríos

**Año:** septiembre 2018

**Directores:** Dres. Enrique Gómez Piñeiro, Marta Muñoz Llamosas (SERIDA)

**Lugar de presentación:** Universidad Politécnica de Valencia

En la última década, la producción de embriones bovinos *in vitro* se ha incrementado notablemente, convirtiéndose en la principal tecnología de embriones a escala mundial. En bovino, la producción de embriones *in vitro* incluye el diseño y preparación de medios de cultivo, los cuales son esenciales para dar soporte al desarrollo de ovocitos y embriones. Sin embargo, la producción de embriones *in vitro* aún continúa limitada por varios factores. El cultivo *in vitro* después de la fecundación es un período crítico para producir embriones de buena calidad y viabilidad. Además, el correcto desarrollo y mantenimiento de la gestación hasta el parto y la adecuada salud perinatal de los terneros están altamente correlacionados con los medios y sistemas de cultivo *in vitro*. En bovinos, el cultivo individual *in vitro* en condiciones definidas después de día-6 favorece el desarrollo embrionario y permite realizar diferentes análisis no invasivos del medio de cultivo. Por el contrario, los suplementos no definidos presentes en los medios de cultivo convencionales pueden reducir la repetibilidad de los análisis. Por lo tanto, el objetivo

general de este trabajo de tesis doctoral fue optimizar un sistema de cultivo para mejorar la calidad y la viabilidad de embriones bovinos *in vitro*. Con este propósito se desarrollaron cuatro grupos de experimentos.

En primer lugar, evaluamos los efectos de la eliminación de proteína sobre el desarrollo de blastocitos durante un período corto de cultivo individual. La viabilidad del embrión a diferentes plazos fue analizada mediante supervivencia a la criopreservación y recuento diferencial de células embrionarias; porcentajes de gestación; y duración de la gestación, peso y morfometría de los terneros nacidos. Además, se realizó un análisis de expresión génica en blastocistos expandidos de Día-7 tanto antes como después de la criopreservación. De este capítulo se puede concluir que el cultivo de embriones individuales durante 24 h en un medio libre de proteína produce menos blastocistos pero aumenta los porcentajes de nacimiento después de la vitrificación y la transferencia a receptoras.

A continuación se abordó la evaluación de la viabilidad de los blastocistos expandidos producidos en función de la cinética del embrión y la restricción de proteína durante un período corto en cultivo individual. Así, las mórulas y los blastocistos tempranos de día 6 se cultivaron individualmente con y sin proteína durante 24 h. El desarrollo y el contenido de lípidos se analizaron en blastocistos expandidos derivados de mórulas (M-XB) y de blastocistos tempranos (EB-XB). La expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico, las respuestas al estrés y la apoptosis se analizaron en M-XB frescos y vitrificados, producidos con y sin proteína. Los índices de gestación, los porcentajes de nacimientos y el peso al nacimiento se registraron después de la transferencia de embriones. Los resultados indican que la cinética embrionaria y la vitrificación impactan en los fenotipos al nacimiento, al menos en el subconjunto de las terneras. Las alteraciones pueden involucrar la proteína exógena y la movilización de las reservas de lípidos.

Posteriormente, se investigó si una concentración muy baja de FCS (0.1%) en cultivo desde el día 1 hasta el día 6 podría mejorar los porcentajes de blastocisto temprano (EB) y, a continuación, aumentar los porcentajes de blastocisto expandido (XB) en día 7 después de un cultivo individual sin proteína. La calidad de los embriones producidos se evaluó en términos de supervivencia a la criopreservación, porcentaje de apoptosis, acumulación de lípidos y transferencia a receptoras. Se concluye en este capítulo que la concentración mínima de FCS mejora los porcentajes de EB en el Día 6, permitiendo obtener más XB después de 24h de cultivo individual sin proteína. La calidad de los XB producidos con FCS es similar a los XB producidos con BSA en términos de apoptosis, acumulación de lípidos e índice de gestación.

Finalmente, el objetivo en el cuarto capítulo fue cuantificar la proteína total HDGF en el fluido uterino mediante multiple reaction monitoring (MRM), técnica que permite reconocer la proteína total. Además, analizamos los efectos de rHDGF en etapas embrionarias específicas con embriones bovinos de Día-6 cultivados *in vitro* con y sin proteína (BSA); y sobre la viabilidad de la preñez y los fenotipos de los terneros después de la transferencia de embriones a receptoras. Además, se cuantificó el ARNm de HDGF en células endometriales cocultivadas con un embrión macho o un embrión hembra. De este capítulo se puede concluir que el HDGF total cuantificado por MRM tendió a aumentar en el UF sin embriones, mientras que el sexo del embrión podría regular la expresión endometrial de HDGF. Sin embargo, se debe ser cauteloso con el uso de suplementos macromoleculares específicos en cultivo, ya que pueden contener el GF en estudio, como ocurre con la presencia de HDGF en la BSA comercial, lo que puede alterar los resultados de los experimentos. En última instancia, el uso de rHDGF es compatible con la gestación y el nacimiento de terneros normales.



### Sistemas alternativos de producción de carne de vacuno en extensivo con razas autóctonas asturianas

**Autora:** Alicia Román Trufero

**Año:** octubre 2018

**Directores:** Dres. Rafael Celaya Aguirre, Koldo Osoro Otaduy (SERIDA)

**Lugar de presentación:** Facultad de Veterinaria, Universidad de León

Para esta Tesis se plantearon distintos sistemas alternativos a los convencionales para la producción de vacuno en extensivo. Co-

mo primera alternativa, se estudió la producción de cebón de las dos razas asturianas, Asturiana de los Valles (AV) y Asturiana de la Montaña (AM), comparando dos manejos, uno en el que los cebones añojos pastaban en puertos de montaña durante el verano, y otro en el que los cebones permanecían en praderas de valle. Los pastos de montaña (a 1600-1800 m de altitud) consistían en su mayor parte en pastos herbáceos dominados por *Festuca rubra*, siendo el resto matorrales de brecina (*Calluna vulgaris*) con arándano (*Vaccinium myrtillus*) junto con piornales de *Genista florida*. Las praderas de valle eran sembradas con rai-grás inglés (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). Se utilizaron un total de 83 terneros nacidos en la paridera de invierno de cuatro años, y que eran castrados cuando tenían alrededor de un año de edad. Los cebones se sacrificaban cuando tenían unos 33 meses.

En general, las ganancias de peso fueron mayores en los cebones AV que en los AM. Sin embargo, durante el verano de su segundo año de vida, en los pastos de montaña los AV presentaron menores ganancias que los AM, al contrario que en las praderas de valle, lo que resultó en una interacción genotipo x ambiente. En el puerto además se estudió la conducta de pastoreo mediante controles visuales y la selección de dieta mediante la técnica de los *n*-alcanos (marcadores fecales) en julio y en septiembre de dos años. El tiempo de pastoreo de los cebones añojos aumentó de julio a septiembre como adaptación a la disminución en la disponibilidad de pasto herbáceo. Aunque ambas razas mostraron preferencia por el pasto herbáceo, los cebones de raza AM pastaron sobre los brezales en mayor proporción que los AV. Los cebones de ambas razas seleccionaron mayoritariamente las herbáceas (71-89%), mientras que entre las leñosas, el porcentaje de arándano en la dieta era mayor (10-21%) que el de brecina (2-8%), aumentando el porcentaje de ambas especies de julio a septiembre.

Una vez que bajaban de puerto, los cebones mostraron un crecimiento compensatorio, alcanzando pesos similares a los cebones que permanecían en valles. En la fase de acabado, de 3-4 meses de duración, no se observaron diferencias en las ganancias de peso entre manejos o razas. El peso final al sacrificio resultó mayor en los cebones AV que en los AM (714 vs. 616 kg), al igual que el peso y el rendimiento de la canal, mientras que no se observaron diferencias entre los manejos.

La segunda alternativa planteada fue la del cebo ecológico de terneros, comparándose con un sistema convencional en régimen semi-extensivo. Se utilizaron 67 terneros de raza AV nacidos en la paridera de invierno durante tres ciclos productivos, cada uno

consistiendo en pastoreo de otoño tras destete, invernada, pastoreo de primavera y acabado. Se establecieron tres repeticiones por tratamiento, distribuyendo a los animales en 6 parcelas de 1,6 ha con praderas de raigrás-trébol, y manejando lotes de 4-5 animales por parcela. Las parcelas del manejo convencional se abonaron con fertilizantes sintéticos (NPK), mientras que en las de ecológico se utilizó estiércol.

No hubo diferencias entre tratamientos en los rendimientos individuales de los terneros, siendo las ganancias medias de 846, 786 y 1381 g/día en el pastoreo de otoño, invernada y pastoreo de primavera, respectivamente. En las parcelas tratadas con fertilizantes sintéticos la producción de hierba en primavera era mayor, permitiendo manejar una mayor carga ganadera que en los pastos ecológicos. Esto se tradujo en mayores ganancias diarias de peso por superficie en convencional que en ecológico, y por tanto en una mayor producción animal por hectárea al final del pastoreo de primavera en el primero (2183 vs. 1606 kg/ha).

En la fase de acabado, además del acabado convencional (a base de concentrado y paja de cereal), se compararon tres tipos de alimentación en ecológico: pastoreo, ensilado de hierba y ensilado de maíz, suplementados todos ellos con concentrado ecológico. Las mayores ganancias de peso las obtuvieron los añejes del acabado convencional (1340 g/día), si bien se consiguieron ganancias aceptables con ensilado de maíz (1116 g/día) y superiores a las obtenidas en pastoreo (753 g/día) o con ensilado de hierba (664 g/día). Tras el sacrificio, la disección de la 6ª costilla reveló mayores porcentajes de grasa en los tratamientos convencional y de ensilado de maíz respecto a los de ensilado de hierba y pastoreo (10,2% vs. 7,5%).

## Trabajos Fin de Master



**Mapeo por asociación para la identificación de las regiones genómicas implicadas en el control genético de la respuesta a *Sclerotinia sclerotiorum* en judía común (*Phaseolus vulgaris*)**

**Autora:** Sarah Panera Martínez

**Año:** junio 2018

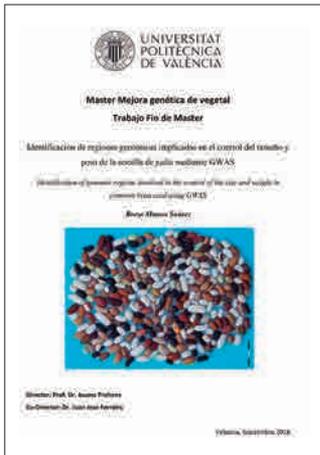
**Directora:** Ana Campa Negrillo

**Lugar de presentación:** Universidad de Oviedo

El moho blanco o esclerotinia, es una enfermedad causada por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, que afecta a los cultivos de ju-

día común (*Phaseolus vulgaris*). El objetivo de este estudio fue identificar las regiones genómicas implicadas en la resistencia genética a un aislamiento local de esclerotinia mediante un análisis de mapeo por asociación. Para ello se utilizó el Panel-SERIDA, compuesto por 308 accesiones previamente genotipadas mediante GBS para 3099 marcadores SNP. La respuesta al aislamiento local de esclerotinia se evaluó en condiciones controladas de invernadero. Se verificó la herencia cuantitativa de este carácter y se identificaron 22 líneas que pueden ser consideradas potenciales fuentes de resistencia. El mapeo por asociación se realizó utilizando el método lineal mixto y permitió identificar un total de 24 SNPs significativamente asociados con la respuesta a esclerotinia, localizados en todos los cromosomas excepto en el cromosoma Pv11. Se consideraron 100 Kb arriba y abajo de la posición de cada SNP de manera que los 24 SNPs se agruparon en 17 regiones cromosómicas. De estas 17 regiones, 7 habían sido identificadas en otro trabajos previos de mapeo en poblaciones biparentales (QTLs WM1.1, WM3.3, WM5.5, WM7.4 y WM8.3, así como los meta-QTLs WM5.4 y WM6.2) de manera que los resultados obtenidos en este trabajo permiten validar su implicación en la respuesta a esclerotinia. Se proponen 8 nuevas regiones en los cromosomas Pv01, Pv02, Pv04, Pv09 y Pv10 que parecen estar implicadas en la resistencia a esclerotinia y no habían sido identificadas hasta la fecha. Finalmente, se estudiaron los genes subyacentes a estas regiones anotados en el genoma de judía y se identificaron un total de 55 genes cuyas funciones se relacionan con la interacción planta-patógeno y por tanto se proponen como genes candidatos a participar en la respuesta a esclerotinia en judía.





**Identificación de regiones genómicas implicadas en el control del tamaño y peso de la semilla de judía mediante GWAS**

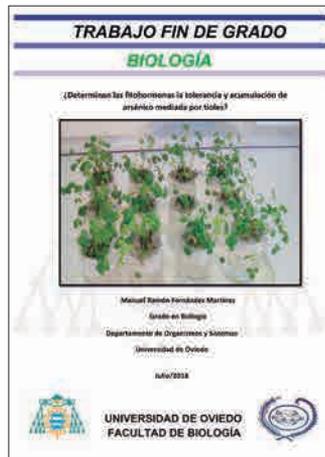
**Autor:** Brezo Mateos Suárez

**Año:** septiembre 2018

**Directores:** Prof. Dr. Jaume Prohens, COMAV (Universidad Politécnica de Valencia), Juan José Ferreira (SERIDA)

**Lugar de presentación:** Universidad Politécnica de Valencia

**Trabajo Fin de Grado**



**¿Determinan las fitohormonas la tolerancia y acumulación de arsénico mediada por tioles?**

**Autor:** Manuel Ramón Fernández Martínez

**Año:** julio 2018

**Directores:** Dras. Aida González Díaz (Universidad de Oviedo), Isabel Feito Díaz (SERIDA)

**Lugar de presentación:** Universidad de Oviedo

La creciente acumulación de metales pesados en el suelo o agua supone un gran problema ambiental. La acumulación de As en las plantas de cultivo y su posterior consumo plantea una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. *Medicago sativa L.*, es una planta forrajera con potencial para ser utilizada en fitoestabilización, por lo que en este trabajo se plantea evaluar su capacidad de acumulación de As en diferentes partes de la planta así como valorar la influencia de la aplicación exógena de benziladenina (BA) frente al As en relación con el metabolismo tiólico y el perfil hormonal. Los análisis se realizaron tras la exposición durante 72 h a una concentración 30 µM de As (V), en presencia de BA (10 y 50 µM) o en ausencia de esta fitohormona. Los resultados muestran que la alfalfa jugaría un rol importante en la fitoestabilización puesto que acumula concentraciones elevadas de As en las raíces. También, se observó que la alfalfa, en respuesta a As promueve la síntesis de compuestos tiólicos, los cuales están en mayor cantidad en la parte aérea que en raíz a pesar de que el As se concentra fundamentalmente en el sistema radical. La aplicación de Benziladenina (BA) promueve la acumulación de As ya que se encontraron mayores concentraciones de este elemento en todos los tratamientos y tejidos a excepción de la raíz con aplicación de 10 µM de BA. Esta fitohormona modifica el metabolismo de tioles y a nivel hormonal modifica el perfil no solo por la mayor actividad citoquinina debida a la absorción de BA sino también a través de la modificación del resto de grupos hormonales y fundamentalmente de los reguladores del crecimiento relacionados con el estrés. ■

El peso y la morfología de la semilla son caracteres de gran relevancia en judía (*Phaseolus vulgaris L.*) debido a que determinan la clase comercial y el rendimiento de los cultivos. En este estudio se llevó a cabo un estudio de asociación (GWAS) con 3099 SNP (distancia > 500pb, valores perdidos < 5%, MAF > 0.01) sobre un panel de diversidad de 308 genotipos (SERIDA-Diversity Panel) previamente genotipados mediante GBS (Genotyping by Sequencing). Se detectaron 231 asociaciones significativas que implicaban 146 SNP. Estos SNP fueron agrupados en 25 regiones etiquetadas por al menos 2 SNP y situadas a una distancia física superior a 1 Mb. 9 regiones detectadas se solapaban con QTL asociados con caracteres de semilla en estudios previos. 11 de estas regiones contenían 16 genes candidatos propuestos por su homología con genes de la especie modelo *Arabidopsis thaliana L.* que participan en el control del fenotipo de la semilla. Los resultados de este trabajo permitieron validar algunos QTL e identificar nuevas regiones relacionadas con el control del fenotipo de la semilla.

