

**Título:** DESIGN OF SUITABLE CULTURE MEDIA FOR PISTACHIO ROOTSTOCKS USING COMPUTER-BASED TOOLS

**Nombre:** Nezami Alanagh, Esmaeil

**Universidad:** Universidad de Vigo

**Departamento:** Biología vegetal y ciencias del suelo

**Fecha de lectura:** 19/12/2018

**Programa de doctorado:** Programa Oficial de Doctorado en Biotecnología Avanzada

**Dirección:**

> **Director:** PEDRO PABLO GALLEGO VEIGAS

> **Director:** Ghasem Ali Garoosi

**Tribunal:**

> **presidente:** Ignacio Zarra Cameselle

> **secretario:** Jorge Gago Mariño

> **vocal:** NIEVES PILAR VIDAL GONZÁLEZ

**Descriptor:**

> BIOTECNOLOGIA

> CULTIVO DE TEJIDOS

> INTELIGENCIA ARTIFICIAL

> ANALISIS Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

**El fichero de tesis** no ha sido incorporado al sistema.

**Resumen:** El nombre actual de pistacho en español, al igual que pistake (griego), pistache (francés), pistachio (inglés), pistacchio (italiano), pistazie (alemán), pistashka (ruso) o incluso fustuk (árabe) provienen todos de la misma palabra del antiguo persa ¿pista¿.

Todos los estudios publicados hasta la fecha, apuntan a que el origen del pistacho se encuentra en Asia Central, concretamente en las regiones del noreste del actual Irán y del norte de Afganistán. De hecho, las primeras evidencias arqueológicas del consumo de pistachos datan del 6.750 a. C., descubiertas en Jarmo (Iraq). Posteriormente, Dioscórides en el siglo 1 d. C. describió su cultivo en Siria en su ¿De Materia Médica¿ y un poco más tarde, Plinio el Viejo en el 30 d. C. dejó por escrito su envío a Roma y a Hispania.

Actualmente, se cultivan 100 variedades de pistacho en todo el mundo, con un mercado global de más de 1.200 millones de dólares estadounidenses. Los principales productores mundiales son Irán y Estados Unidos. Ambos representan casi el 70 % de la producción global, seguidos por Turquía (16 %), Siria (5,4 %), China (7,9 %) y España, sexto país, con el 0,2 %. El pistacho es el principal cultivo de Irán (15 %), seguido por el cultivo de la vid (12 %), los manzanos (9 %), los dátiles (9 %), las almendras y naranjas (7 %) y las avellanas (5 %) del total de la producción frutícola.

Desde un punto de vista botánico, el género *Pistacia*, pertenece a la familia de las Anacardiaceae, y fue descrito por Linneo en *Species Plantarum* en 1753. Son árboles que crecen de forma natural en zonas desérticas y semidesérticas, y que muestran gran tolerancia a suelos salinos y resistencia a un amplio rango de temperatura (-10°C a 40 °C). Son plantas dioicas, que producen racimos (inflorescencias) de frutos tipo drupa, que contienen semillas oleaginosas comestibles con gran aceptación culinaria entre los frutos secos. La palabra pistacho se emplea globalmente tanto para el árbol como para su fruto y se refiere únicamente a la planta y el fruto de la especie *Pistacia vera* L.

Desde un punto de vista agronómico, el pistacho es una planta muy sensible a la humedad. Necesita suelos con buen drenaje para evitar la podredumbre de las raíces durante los inviernos, por lo que se cultiva en zonas muy soleadas, preferentemente con climas suaves que permitan veranos largos y calurosos para la adecuada maduración de los frutos.

La planta de pistacho es muy susceptible a algunos hongos como *Verticillium* y *Botryosphaeria*, lo que obliga al uso de un portainjerto resistente. Tradicionalmente se empleaban como patrón especies silvestres puras como *Pistacia khinjuk*, *P. atlantica*, *P. terebinthus*, *P. integerrima*, *P. palaestina* o híbridos de cruces entre ellas. Así se ha conseguido uno muy resistente a hongos denominado UCB1 (cruce de *P. atlantica* × *P. integerrima*) o bien cultivares de *Pistacia vera* como el 'Ghazvini'. Ambos, el UCB1 y el cv. Ghazvini han sido empleados en esta Tesis.

La elección del patrón no es sencilla y deben tenerse en cuenta las particularidades que va a aportar al vástago (cultivar frutal) como las características de crecimiento, la posible incompatibilidad con el vástago a injertar, la tolerancia al frío y a la salinidad, la tolerancia a patógenos edáficos, la capacidad de captación de nutrientes, la calidad del fruto del vástago una vez injertado y la reducción de la vecería (alternancia bianual de cosechas). Tradicionalmente, las plantas de pistacho se propagaban vegetativamente a partir de estaquillado e injerto. Sin embargo, se ha descrito, que el enraizamiento de las estaquillas es un proceso complejo y con baja tasa de éxito debido fundamentalmente al genotipo vegetal empleado, la posición del brote en el árbol del que se obtiene la estaquilla, el tipo y la concentración de auxina usada como enraizante o el procedimiento de recolección de las varetas (fechas y conservación). Por otro lado, la propagación mediante injertado tampoco es fácil, ya que se han de tener en cuenta los siguientes aspectos para lograr un éxito en la operación: la compatibilidad entre el vástago y el patrón, que éste tenga un diámetro lo suficientemente grande como para acomodar el injerto, el sistema de injertado, que en el caso del pistacho se recomienda en T, el momento del injertado y el cuidado posterior. Ambos métodos se emplean rutinariamente, pero la baja tasa de enraizamiento, la falta de un sistema para producir plantas uniformes a gran escala, y lo lento y costoso de este tipo de macropropagación, han suscitado el empleo de técnicas de micropropagación como procedimiento alternativo. La micropropagación de pistacho comenzó en los años 80 con los trabajos de Barghchi y colaboradores sobre *Pistacia vera*. En ellos describen el establecimiento de ápices caulinares y segmentos nodales en medio MS suplementado con BAP y NAA. En estos primeros trabajos también se refiere la aparición de desórdenes fisiológicos como la necrosis del ápice caulinar (STN: Shoot Tip Necrosis). Posteriormente, Martinelli en 1988 describió el cultivo *in vitro* de *P. atlantica* y *P. integerrima*, y Pontikis en 1985, de *P. terebinthus*. En esos trabajos de micropropagación del pistacho, se han empleado medios de cultivo típicos como el MS, el DKW o el WPM sin mayores problemas para la micropropagación, aunque siguen describiendo la proliferación de diversos desórdenes fisiológicos que obligaban a descartar un número considerable de plántulas micropropagadas, como resultado de un desequilibrio de los componentes nutricionales de esos medios. Entre otros, los principales problemas detectados son la aparición de necrosis del ápice caulinar, ya mencionado, la formación de callo basal (BC), la hiperhidricidad, o la clorosis. Ello sugiere la necesidad de una mejora en el diseño del medio de

cultivo in vitro de pistacho, que permita favorecer el crecimiento, sin la proliferación de dichos desórdenes fisiológicos.

La formulación de un medio adecuado y exitoso, en definitiva optimizado, es el sueño de cualquier laboratorio de cultivo in vitro que se dedique a la propagación masal. Sin embargo, es una tarea difícil debido a que depende de un gran número de factores (variables independientes) que afectan de forma no-determinista, no-lineal y con múltiples interacciones entre sí, al crecimiento de los tejidos vegetales.

La obtención de plantas de calidad requiere la combinación adecuada de todos los factores (genotipo, componentes nutricionales, reguladores de crecimiento, vitaminas y condiciones de cultivo), que permitan, por un lado, el mejor crecimiento vegetativo posible y que impidan, por otro, la formación y el desarrollo de anomalías fisiológicas. A continuación, se presenta sucintamente el desarrollo histórico de los medios de cultivo desde sus inicios en los años 40 del siglo pasado hasta la actualidad.

El diseño de los medios de cultivo, se ha abordado empleando diversas estrategias. Los primeros medios de cultivo se desarrollaron en la década de los 40 del siglo pasado. Los más conocidos, el medio de White en 1943 y el de Gautheret en 1939, se basaron en combinaciones y/ o modificaciones de medios previamente descritos. Posteriormente, Hildebrandt y colaboradores en 1946, empleando como base la composición del medio de White, utilizaron la técnica de triangulación, que implica probar concentraciones seriadas de elementos de 3 en 3, de forma independiente entre sí.

En la década de los 50, Heller, empleo una técnica muy inteligente, ya que causaba la deficiencia de un elemento (X) en la planta, y a continuación lo aportaba siguiendo concentraciones crecientes hasta alcanzar la respuesta fisiológica deseada. Obviamente, solo se probaba un elemento a la vez, a este sistema en el que se usa un solo factor se denomina estrategia  $\zeta$ one-factor-at-a-time $\zeta$  (OFAT). Esta misma técnica fue empleada también para desarrollar otro de los medios más famosos, el de Nitsch y Nitsch de 1956. Estos autores combinaron OFAT con el empleo de datos publicados previamente para la misma especie. A esta segunda estrategia se le denomina hoy en día  $\zeta$ data mining $\zeta$ . Finalmente, en la década de los 60 se diseñó el medio de cultivo más empleado de la historia el MS de Murashige y Skoog de 1962. Estos investigadores emplearon la estrategia descrita OFAT, pero en su caso variaban la concentración de cada elemento en presencia de diferentes concentraciones del resto de elementos. Cuando un nivel de elemento era considerado satisfactorio, se mantenía constante para probar nuevas variaciones en el siguiente elemento.

Un claro inconveniente de la estrategia OFAT es que consume mucho tiempo y recursos. De hecho se tuvieron que realizar 16.000 cultivos tabaco para establecer el medio de Hildebrandt y se tardaron 5 años en diseñar el famoso medio MS.

Otra estrategia de diseño de medios de cultivo es la descrita por Spaargaren en 1996, basada en que el mejor punto de partida no es la composición de medios previamente descritos, sino el empleo de una proporción de nutrientes minerales en el medio similar a la composición elemental de las células y tejidos en crecimiento de la especie a cultivar. A pesar de todas las aproximaciones realizadas, la técnica de diseño más utilizada se basa en el empleo de medios de cultivo previamente descritos y la aplicación de diseños factoriales. En este sentido, De Fossard y colaboradores (1974) aplicaron lo que se denominó estrategia de amplio espectro. Emplearon un diseño factorial de 4 factores independientes (minerales, auxinas, citoquininas y compuestos orgánicos) a tres niveles (34 factorial) lo que implicó ensayar 81 combinaciones de tratamientos. Un paso adicional implicaría combinar 5 factores. Añadiendo la sacarosa como factor independiente a tres niveles, lo que implicaría un diseño 35 factorial, se requeriría ensayar 243 tratamientos. Es obvio que si quisiésemos combinar los 13 elementos esenciales para las plantas, que forman parte de todos los medios de cultivo entre sí, para determinar la concentración óptima de todos los nutrientes, el número de tratamientos sería enorme. Por todo

ello, los diseños Factoriales Completos solo son factibles cuando se pretende estudiar un número muy reducido de factores (2-3) y niveles (2-3) por factor. Sin embargo, el diseño se complica mucho si se trata de llevar a cabo un experimento en el que se estudian todos los factores simultáneamente. En ese caso el número de tratamientos aumenta exponencialmente con el incremento de factores y el experimento se hace inviable por costes y tiempo. Cuando esto ocurre se suelen emplear los diseños Factoriales Fraccionados, que reducen el número de tratamientos evaluando solamente un subconjunto de ellos. Por supuesto es más rentable que el anterior, pero el estudio de las interacciones entre los factores está limitado al subconjunto evaluado.

Una forma de reducir el número de tratamientos a ensayar implica el empleo de herramientas informáticas para el Diseño de Experimentos (DOE), que consisten en seleccionar las variables independientes (también conocidas como factores, inputs, o entradas del proceso) que causan un impacto significativo sobre las variables dependientes (también denominadas respuestas, outputs o salidas del proceso) y los niveles adecuados de esos factores para alcanzar los resultados deseados. Ello implica la definición correcta de los factores y sus niveles a estudiar, así como las respuestas que se van a medir u obtener

Los diseños D-Optimal se generan mediante algoritmos y permiten muestrear todo el espacio de diseño de una forma proporcionada, en otras palabras a partir de un número grande de tratamientos, selecciona un conjunto que sea representativo. Ese conjunto de tratamientos es el que se testa en el experimento. Existen fundamentalmente dos razones para usar diseños D-Optimal en lugar de los diseños clásicos factoriales: 1) la reducción en el número de experimentos y 2) el espacio de diseño se ve claramente limitado por ejemplo cuando la combinación de dos de los factores a unos determinados valores no tienen sentido o no son factibles. Siguiendo con los ejemplos factoriales anteriores, si quisiéramos optimizar 5 de esos 13 elementos probando 5 concentraciones diferentes (55 factorial), serían necesario probar 3.125 tratamientos diferentes, en cambio usando D-Optimal se pueden reducir a tan solo 23 (para más detalles ver Capítulo III). El DOE ha sido incorporado a lo largo de los últimos 10 años en el cultivo in vitro, como se detalla en la introducción (Capítulo I) A partir de 2010, nuestro grupo ha sido pionero en introducir diferentes herramientas informáticas de inteligencia artificial como los algoritmos genéticos, las redes neuronales artificiales y la lógica difusa en el ámbito del cultivo in vitro. Las redes neuronales artificiales (conocidas como ANNs) son herramientas informáticas inspiradas en las neuronas biológicas con capacidad para integrar información y procesarla de manera útil para tomar decisiones. Presentan capacidad de aprendizaje autónomo, siendo capaces de identificar y modelizar relaciones no lineales entre múltiples factores a diversos niveles y diversos parámetros respuesta. Así, se han empleado con mucho éxito en la ingeniería (control de un ascensor), la farmacia (diseño de formulaciones para medicamentos) y actualmente para la conducción autónoma de vehículos o el reconocimiento de voz en nuestros teléfonos móviles. Si recordamos el diagrama de Ishikawa, se comprende fácilmente porqué se ha empezado a usar las ANNs en este ámbito ya que permiten combinar un gran número de factores simultáneamente, y generar modelos que predicen los resultados de la combinación de factores nunca muestreados o incluso la selección de la mejor combinación para obtener una óptima calidad final de las plantas cultivadas in vitro. En esta Tesis, hemos combinado las ANNs y los algoritmos genéticos, para optimizar un medio de cultivo para pistacho, al que hemos denominado POM, acrónimo de ¿Pistachio Optimized Media¿ (Capítulo II). También se ha empleado una herramienta informática híbrida neurofuzzy logic que combina la generalidad de la representación de la lógica difusa, a través de sencillas reglas del tipo ¿IF - THEN¿ (SI ¿ ENTONCES) con las capacidades de aprendizaje adaptativo de las ANNs. Las reglas tipo ¿SI - ENTONCES¿ facilitan que los investigadores comprendan las relaciones causa-efecto entre los factores estudiados y las respuestas obtenidas para los distintos parámetros de crecimiento (Capítulos II y III) y para los desórdenes fisiológicos (Capítulo IV)

A continuación, se hace un breve resumen de lo tratado específicamente en cada capítulo de resultados. En el Capítulo II, se describe cómo el empleo de neurofuzzy logic (combinación de ANNs y lógica difusa) ha permitido visualizar, predecir y optimizar el efecto de varios factores independientes sobre cuatro parámetros respuesta durante la micropropagación de *Pistacia vera* L. Se usaron como factores o inputs del modelo, 26 ingredientes del medio de cultivo, incluyendo los nutrientes minerales (incluidos como iones, no como sales), glicina, varias vitaminas y reguladores del crecimiento a diferentes niveles. Como parámetros respuesta uoutputs del modelo, se emplearon cuatro variables: ratio de proliferación (PR), longitud de los brotes (SL), peso fresco total (TFW) y el peso del explanto sin el callo (HFW). Las reglas obtenidas de los modelos de neurofuzzy logic han permitido determinar el efecto positivo (BAP; 6-bencilaminopurina, ácido nicotínico y piridoxal) y negativo (nitratos, magnesio, plata y gluconato) sobre los parámetros medidos. Posteriormente, la combinación de ANNs y algoritmos genéticos, ha permitido predecir la mejor combinación de todos los componentes del medio que permiten maximizar de forma simultánea los valores de los cuatro parámetros de crecimiento estudiados, de tal modo que la combinación predicha por el modelo permitirían obtener 4,4 nuevos brotes por explanto; brotes de 28,7 mm, y brotes con un peso total de 1,1 g y, eliminando el callo, 0,53 g de material sano. Y además, reduciendo los desórdenes fisiológicos causados por otros medios. En conclusión, la información obtenida en ese capítulo demuestra la capacidad y habilidad de las herramientas de inteligencia artificial para el diseño de medios de cultivo para plantas, con características absolutamente predecibles y adaptadas a las necesidades del investigador y resulta extremadamente útil para mejorar la micropropagación masiva del pistacho.

En el capítulo III, se determinó el efecto de las sales del medio de cultivo más usado, el MS, sobre el crecimiento in vitro de dos patrones de pistacho, el Ghaznivi, que es un cultivar de la especie *Pistacia vera* L. con resistencia a patógenos y el UCB1, un híbrido de las especies *P. atlantica* (L.) × *P. integerrima* (L.) mediante la combinación, por primera vez, de diseños experimentales (DOE) y de herramientas de inteligencia artificial. Se tomó como base el MS, ya que es un buen medio para el cultivo in vitro de pistacho, a pesar de que causa algunos desórdenes fisiológicos. Los 14 macro y micro elementos que constituyen este medio, se variaron en un rango desde 0 a 5 veces su nivel en el medio MS. Se empleó un DOE para generar un espacio de diseño de 5 dimensiones, reduciendo el diseño desde los 14 elementos minerales citados a solo 5, mediante la categorización de todos ellos en los siguientes cinco factores independientes (nitrato amónico, nitrato potásico, mesos, micronutrientes y hierro). Con ello se consigue reducir el espacio de diseño de 55 lo que equivale a 3.125 tratamientos a evaluar a tan solo 29 tratamientos, que fueron los ensayados. En este caso se determinó el efecto de los 5 factores sobre los siguientes parámetros respuesta uoutputs: calidad de los brotes (SQ), ratio de proliferación (PR), longitud de los brotes (SL), y sobre algunos desórdenes fisiológicos como necrosis del ápice caulinar (STN) y la formación de callos en la base del explanto (BC). Sobre la base de un espacio de diseño bien muestreado, se modelizaron los resultados satisfactoriamente con un software híbrido de neurofuzzy logic. Los modelos permitieron visualizar, mediante las reglas IF THEN, cuáles fueron los principales factores y sus interacciones ( $SO_4^{2-} \times Cl^-$ ,  $K^+ \times SO_4^{2-} \times EDTA$ -y  $Fe^{2+} \times Cu^{2+} \times NO_3^-$ ) sobre los tres parámetros de respuesta de crecimiento: SQ, PR y SL. Además, el modelo permitió establecer que los factores  $Fe^{2+}$  y el agente quelante EDTA eran, respectivamente, los agentes causantes de la formación de los desórdenes fisiológicos estudiados (STN y BC) y además lo hacían de forma independiente del resto de los factores. La combinación de DOE y de herramientas de inteligencia artificial, como neurofuzzy logic, han permitido entender el efecto de los elementos minerales presentes en el medio MS sobre el cultivo in vitro del pistacho. De hecho, ha permitido descubrir las complejas interacciones que existen entre los macro y los micro elementos, lo cual permite implementar un nuevo medio de cultivo, diseñado para el cultivo in vitro del pistacho, en particular, pero también para mejorar la calidad de cualquier otra planta cultivada micropropagada.

En el capítulo IV, y como se comentó anteriormente, nos centramos en la asociación que parece existir entre la composición de los medios de cultivo y los desórdenes fisiológicos detectados durante el cultivo in vitro de las plantas. El objetivo de dicho capítulo fue entender las repuestas fisiológicas anormales de dos patrones de pistacho y su relación con los ingredientes de los medios de cultivo empleados. Para ello, empleamos dos herramientas informáticas: DOE y neurofuzzy logic. El DOE se empleó para generar un espacio de diseño de cinco dimensiones lo que nos ha permitido reducir los tratamientos a testar desde 6.250 a tan solo 61. Los modelos de neurofuzzy logic se usaron para entender las relaciones causa-efecto entre los 25 factores estudiados y los 7 desórdenes fisiológicos detectados durante el cultivo de ambos patrones y que incluían el STN, necrosis de hojas (LN), la decoloración de las hojas (LC), el callo basal (BC), fasciación de las hojas (LF), hiperhidricidad y epinastia. Tan sólo 4 de los 7 desórdenes pudieron ser modelizados con éxito, siendo causados por un número muy limitado de factores. Así, por ejemplo, los modelos muestran que tanto STN como BC están asociados, significativamente, a las variaciones en las concentraciones del ion EDTA. Sin embargo, mientras bajas concentraciones reducen el STN, promueven el BC. Los otros dos desórdenes modelizados, LN y LC, se ven significativamente reducidos si se emplean concentraciones elevadas de la vitamina tiamina. Sin duda alguna, estos resultados demuestran la importancia del empleo de `parámetros de crecimiento junto a datos relativos a desórdenes fisiológicos, cuando se trata de diseñar medios de cultivo adecuados para el cultivo de plantas. A nuestro juicio, las herramientas informáticas empleadas, abren una nueva vía para: a) llevar a cabo experimentos con buenos diseños experimentales; b) reducir el número final de tratamientos y por lo tanto, el trabajo experimental; c) identificar los factores clave que afectan a cada desorden fisiológico y d) obtener información veraz de los factores que promueven la aparición de los trastornos fisiológicos. Finalmente, estos resultados demuestran que para el pistacho, el medio POM diseñado por nosotros empleando herramientas de inteligencia artificial, es el medio de cultivo más adecuado aunque presenta ciertas limitaciones (favoreciendo el crecimiento y reduciendo las anomalías fisiológicas), en comparación con los desarrollados hasta el momento para el cultivo in vitro de esta especie.