

EMBRIOGÉNESIS A PARTIR DEL CULTIVO DE ANTERAS EN NÍSPERO (*Eriobotrya japonica* Lindl.)

Blasco M., Naval M.M., Badenes M.L.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 5. 46113, Moncada, Valencia, España.

Palabras clave: haploide, doble haploide, androgénesis, microspora.

INTRODUCCIÓN

El níspero (*Eriobotrya japonica* Lindl.) es originario de China y se introdujo en Europa desde Japón en el S. XVIII. El níspero se cultiva principalmente en países subtropicales y mediterráneos, siendo España la zona de mayor producción en el Mediterráneo. Sin embargo, la producción se basa en una estrecha gama varietal por lo que en el IVIA se inició un programa de mejora varietal.

La producción de plantas haploides y doble haploides (DH) ofrece una valiosa herramienta biotecnológica para la mejora de especies leñosas, reduciendo el tiempo necesario para la obtención de líneas homocigotas en comparación con la mejora convencional. En el caso de árboles frutales, que presentan un alto nivel de heterocigosidad, largo periodo juvenil, gran tamaño de planta y en algunos casos autoincompatibilidad, no existe otra vía para la obtención de estas líneas homocigotas que no implique la autofecundación de varias generaciones (Germanà, 2009).

El uso del polen se ha convertido en una de las más importantes aplicaciones en el campo de la mejora genética para la obtención de haploides y DH. La regeneración a partir de gametos masculinos ha sido descrita en manzano, frutales de hueso y cítricos (Ochatt y Zhang, 1996; Germanà, 2006).

El objetivo principal de este estudio se centra en la obtención de plantas haploides o DH mediante la inducción a embriogénesis de las microsporas a través del cultivo *in vitro* de anteras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Para realizar el estudio se utilizaron inflorescencias de 10 cultivares de *E. japonica*: Algerie, Changhong-3, Jiefanghong, Moggi Wase, Nadal, Peluches, Raúl, Sanfiliparo, Tavira y Zaozhong-6. Los árboles de los diferentes cultivares se encuentran ubicados en el Banco de Germoplasma del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) en Moncada.

Identificación de los capullos florales

Tras recoger las inflorescencias se clasificaron los capullos florales de cada uno de los cultivares en 4 estadios de desarrollo según su tamaño y el estadio de desarrollo de las microsporas de las anteras (análisis citológico).

En paralelo, realizamos la disección (separación de las anteras del conectivo), fijación (etanol absoluto: ácido acético, 3:1), tinción (DAPI 1mg.ml⁻¹) y posterior observación al microscopio de las microsporas de las anteras de los estadios clasificados a nivel morfológico.

Cultivo de anteras

Se recolectaron los capullos florales de los diferentes cultivares y se esterilizaron. La desinfección se realizó con una solución de etanol al 70% durante 5 min seguida de una inmersión en hipoclorito de sodio al 15% durante 20 min, y finalmente 3 lavados en agua destilada.

Se utilizaron 100 anteras por condición (cultivar, pretratamiento de frío y medio de cultivo). Se estudió el efecto de un pretratamiento de frío a 4°C durante 96h bajo condiciones de oscuridad, y el efecto de 3 concentraciones de ácido naftalenacético (NAA, 0, 0.5 y 1 g.l⁻¹) manteniendo constante la concentración de zeatina (1 g.l⁻¹) en el medio de cultivo, sobre la respuesta embriogénica en los distintos cultivares.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estadio idóneo de desarrollo de la microspora corresponde a los botones florales del estadio B, de un tamaño entre 6,5 y 7 mm según variedad, donde el gameto masculino se encuentra en estado de microspora polarizada y polen bicelular temprano (Fig. 1A).

A lo largo del cultivo, algunas anteras aumentan de volumen y forman un callo desorganizado blanco (Fig. 1B). Los resultados muestran una mayor frecuencia de anteras con callo (83%) en el cv. Zaozhong-6, sin pretratamiento de frío y en el medio de cultivo suplementado con 1 g.l⁻¹ de NAA.

Las anteras que habían aumentado de volumen junto con los callos que se habían formado se subcultivaron en medio de embriogénesis. El mayor porcentaje de callos con respuesta morfogénica (6%) se obtuvo para el cv. Jiefanghong, en anteras sometidas a pretratamiento de frío y en el medio de cultivo con 0.5 g.l⁻¹ de NAA (Figura 1C).

Todos estos resultados suponen un avance importante en la utilización de las técnicas biotecnológicas para la mejora genética del níspero.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por el Convenio n° 308 suscrito por el IVIA y la Cooperativa de Callosa d'Ensarrià. MB ha sido financiado por una beca de doctorado del INIA.

REFERENCIAS

- Germanà, M.A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 131-146.
- Germanà, M.A. 2009. Haploids and doubled haploids in fruit trees. In: *Advances in haploid production in higher plants*. Alisher, T. et al. (Eds.) Springer. 241-243.
- Ochatt, S.J., Zhang, Y.X. 1996. *In vitro* haploidization of fruit trees. In: Jain S, Sopory SK, Veilleux RE (eds) *In Vitro* haploid production in higher plants. Dordrecht: Kluwer, Vol. 3, pp. 193-210.

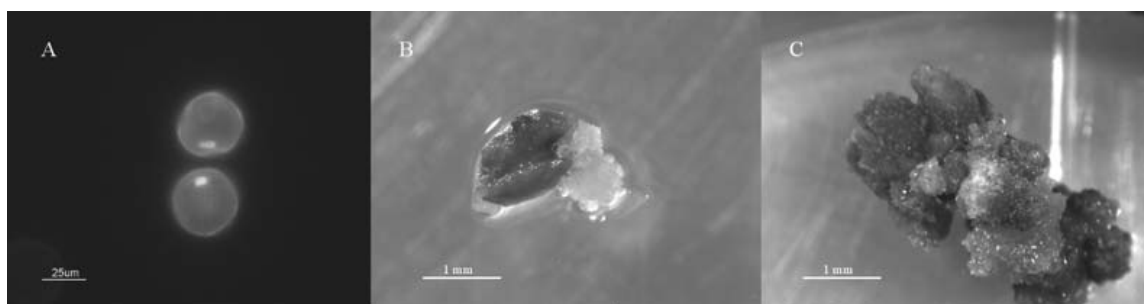


Figura 1.A. Observación al microscopio del gameto masculino en estado de microspora polarizada y polen bicelular temprano. **B.** Formación de callo desorganizado a partir de antera del cv. Algerie. **C.** Morfogénesis a partir de antera del cv. Jiefanghong.