

Morfogénesis in vitro en cultivares del género Citrullus



Laura Baleriola Muñoz

Grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Curso 2017-2018

Valencia, junio de 2018

Dirigido por: Dr Benito José Pineda Chaza

Dr Vicente Moreno Ferrero

Director experimental: Carlos Ribelles Alfonso

RESUMEN

El cultivo *in vitro* es una herramienta muy eficaz para la multiplicación y mejora genética del material vegetal. En condiciones adecuadas, permite la regeneración de plantas de manera eficiente, sencilla y con un alto rendimiento. Para obtener una buena respuesta es necesario optimizar el protocolo, adecuando las condiciones del experimento a los requerimientos culturales y morfogenéticos de cada especie. La sandía (*Citrullus lanatus*) es un cultivo de elevado interés comercial, con grandes perspectivas económicas y con un enorme potencial para la mejora genética. A pesar de su relevancia, no se han descrito métodos para la regeneración *in vitro* en algunos cultivares de interés. En este trabajo de investigación se han estudiado la aptitud morfogenética de distintos cultivares de tres especies del género *Citrullus*: *Citrullus lanatus lanatus*, *Citrullus lanatus citroides* y *Citrullus colocynthis*. Para ello, se ha evaluado el efecto que tienen los reguladores de crecimiento, el estado ontogénico del material de partida y el tipo de corte del explante sobre la respuesta morfogenética de estos cultivares. Finalmente, y dada la importancia comercial de las sandías triploides (comúnmente conocidas como sandías sin semillas), se ha evaluado la viabilidad del cultivo *in vitro* para la obtención de parentales tetraploides como alternativa al método convencional mediante tratamientos con colchicina.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*; sandía; *Citrullus*; morfogénesis; regeneración; tetraploide

SUMMARY

The *in vitro* culture is a very effective tool for the multiplication and the plant genetic improvement. In the right conditions, it allows the plant regeneration in an efficient, easy and high-performance way. In order to obtain a proper response, it is necessary to optimize the protocol, adapting the experimental conditions to the cultural and morphogenetic requirements of each species. The watermelon (*Citrullus lanatus*) has a high commercial interest and great economical perspectives. Moreover, this crop has a huge potential in its genetic improvement. Despite its relevance, no methods have been described for the *in vitro* regeneration in some interesting cultivars of watermelon. In this research work, we have studied the morphogenetic competence of different cultivars of three species of the *Citrullus* genus: *Citrullus lanatus lanatus*, *Citrullus lanatus citroides* and *Citrullus colocynthis*. To achieve this purpose, we have studied how the growth regulators, the ontogenic state and the type of explant impact on the morphogenetic response of these cultivars. Finally, since triploid watermelons (commonly known as seedless watermelons) have a high commercial importance, the viability of *in vitro* culture for obtaining tetraploid parents has been evaluated, instead of the conventional method with colchicine treatments.

Keywords: *In vitro* culture; watermelon; *Citrullus*; regeneration, tetraploid

AGRADECIMIENTOS

La realización de este TFG ha necesitado de muchos meses, y el apoyo de mucha gente.

En primer lugar, me gustaría agradecer a los compañeros de laboratorio, con los que tantas horas he compartido. Trabajar en equipo con vosotros ha sido toda una gran experiencia. El apoyo y la profesionalidad de Benito y Vicente han sido indispensables, y especialmente el tiempo, que han sacado de donde no tenían, para ayudarme. Los momentos de risas y charla con Begoña han hecho la realización de la parte práctica mucho más amena de lo que habría sido sin ella. Y por supuesto Carlos, que ha sido mi mentor y guía en múltiples aspectos. Me has ayudado y vigilado desde el principio, resuelto hasta mis dudas más tontas y aligerado con tu presencia las tareas más monótonas.

Indudablemente, también he requerido la ayuda y el apoyo espiritual de mucha gente fuera de las puertas del laboratorio. Gracias a mis padres, hermana y en general a mi familia, que habéis seguido con curiosidad la evolución de este proyecto. Gracias a mis amigos, que me han apoyado, asesorado y comprendido todo este tiempo. Mención especial a Lucas, mi pareja, que es quien más horas ha tenido que escuchar mis dudas irresolubles, quejas, anécdotas, dibujos explicativos, razonamientos y comparaciones absurdas.

Gracias, a todos aquellos que con vuestra curiosidad y entusiasmo habéis seguido la evolución de “mis plantitas”. Vuestras preguntas me han ayudado a aclarar mis ideas, o a descubrir qué cosas no tenía tan claras como pensaba. Gracias, igualmente, a los que, quizá sin entusiasmo, pero sí paciencia y resignación, habéis aguantado mis confusas explicaciones y mis fotos a bocajarro. Creo que ahora todo mi círculo cercano sabe qué es un cotiledón y que de cualquier parte de una planta sale otra, haciendo magia de laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
SUMMARY	III
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XI

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Origen	1
1.1.1 <i>Citrullus lanatus lanatus</i>	1
1.1.2 <i>Citrullus lanatus citroides</i>	3
1.1.3 <i>Citrullus colocynthis</i>	4
1.2 La regeneración <i>in vitro</i> de sandía	5
1.3 Aplicaciones biotecnológicas	7
1.3.1 Obtención de plantas tetraploides y propagación de líneas de alto valor biológico	7
1.3.2 Transformación genética	8
1.3.3 Perspectivas futuras en biotecnología	8
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 Material vegetal	13
3.2 Técnicas de cultivo <i>in vitro</i>	13
3.2.1. Esterilización	13
3.2.2. Germinación de las plántulas axénicas	13
3.2.3. Cultivo de explantes primarios	14
3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios	14
3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo	15
3.3 Nomenclatura y composición de los medios de cultivo	16
3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo	16
3.3.2. Composición de los medios de cultivo	16
3.4. Diseños experimentales	16

3.4.1. Efecto del estadio ontogénico sobre la respuesta morfogénica	16
3.4.2. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica	17
3.4.3. Efecto del tipo y corte del explante sobre la respuesta morfogénica	17
3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis	18
3.5. Tratamiento estadístico	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Efecto del estado ontogénico sobre la respuesta morfogénica	19
4.2. Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica	20
4.3. Efecto del tipo de explante sobre la morfogénesis adventicia	24
4.4. Estudio del nivel de ploidía en explantes regenerados de sandía	30
5. CONCLUSIONES	33
6. BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Cantidad de producción de sandías por país (2016). Fuente: Faostat.	1
Figura 2	Planta de <i>Citrullus lanatus lanatus</i>	2
Figura 3	Frutos de <i>Citrullus lanatus citroides</i>	3
Figura 4	Planta de <i>Citrullus colocynthis</i>	4
Figura 5	Regeneración de estructuras organogénicas tras la formación de un callo en sandía	6
Figura 6	Tipos de corte efectuados en los explantes de sandía.	17
Figura 7	Diferentes estadios ontogénicos de las plántulas de sandía	19
Figura 8	Explante de cotiledón de CIT-P cultivado en medio NBCu (a) y NTdz (b) Zona proximal del cotiledón de CIT-P en NBCU (c) y NTdz (d) a los 15 días de cultivo. Escala de barras: 1 cm.....	23
Figura 9	Tipos de corte efectuados en los explantes de sandía. Corte 1: Corte transversal desechando el extremo distal. Corte 2: Cortes transversales en 3 partes iguales. Corte 3: Corte longitudinal por el nervio central. Corte 4: Corte transversal y longitudinal. Corte 5: Cortes transversales en 3 partes iguales y corte por el nervio central.	25
Figura 10	Respuesta morfogénica en la región proximal de un explante de cotiledón utilizando el corte tipo 4 (a), con el que se obtienen 2 explantes de la zona proximal respecto a un explante de cotiledón en el que se ha realizado el corte tipo 1 (b).....	28
Figura 11	Corte tipo 2 en la línea LM5 a los 30 días de cultivo	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efecto del estadio ontogénico sobre respuesta morfogénica de explantes de cotiledón de los cultivares SB1 y WP20 de sandía. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	19
Tabla 2	Efecto del medio de cultivo sobre respuesta morfogénica de explantes de cotiledón de distintos cultivares de <i>Citrullus lanatus</i> . Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	21
Tabla 3	Efecto del tipo de explante (proximal o distal) sobre la respuesta morfogénica en diferentes cultivares de <i>C. lanatus lanatus</i> (SB1, WP20, SB2, WP106 y LAN-P), <i>C. lanatus citroides</i> (CIT-P) y <i>C. colocynthis</i> (COL-Niger 5 y COL-P)	25
Tabla 4	Efecto del tipo de corte (1, 2 o 3) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM1. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	26
Tabla 5	Efecto del tipo de corte (1, 2, 3, 4 o 5) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM3. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	27
Tabla 6	Efecto del tipo de corte (1, 2, 3, 4 o 5) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM5. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	28
Tabla 7	Porcentaje de plantas diploides y tetraploides de los cultivares de sandía LM1, LM3 y LM5. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).....	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen

La familia *Cucurbitaceae* está compuesta por dos subfamilias (Zamoniodeae y Cucurbitoideae), 8 tribus, 118 géneros y 825 especies (Jeffrey, 1983). Algunas especies de esta familia tienen una gran importancia económica, como el pepino (*Cucumis sativus* L.), el melón (*Cucumis melo* L.), la calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun & Nakai).

El origen de la sandía se sitúa en África, de donde posteriormente se extendió a Oriente Próximo, India y más tarde China. Actualmente, la mayor producción se encuentra en Asia, con China a la cabeza (79244271 toneladas), Turquía (3928892 toneladas) e Irán (3813850 toneladas). El cuarto productor de sandía es Brasil (3813850 toneladas). En 2016, España, uno de los países más importantes en cuanto a exportación, ocupó el decimotercer lugar en términos de producción (969327 toneladas).

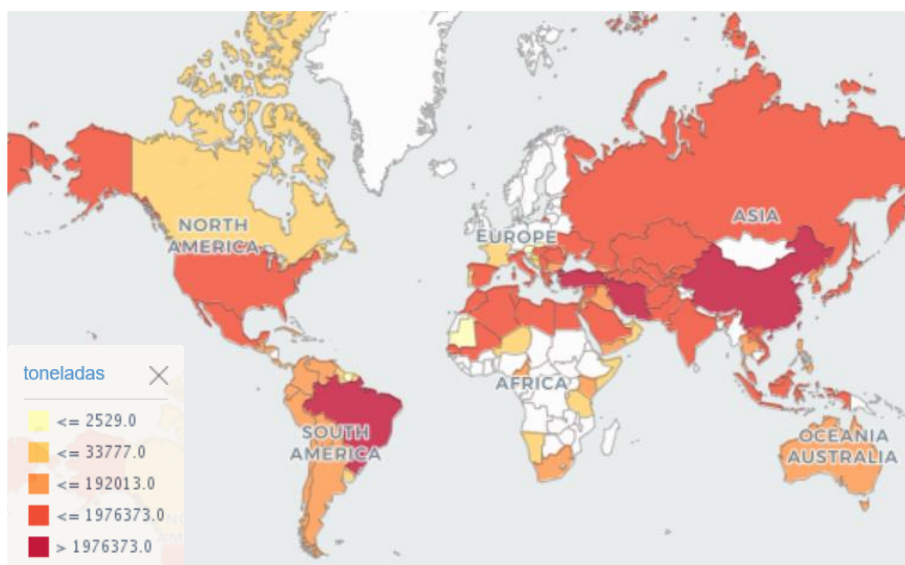


Figura 1. Cantidad de producción de sandías por país (2016). Fuente: Faostat.

1.1.1 *Citrullus lanatus lanatus*

Citrullus lanatus (Thunb.) Matsun & Nakai (hasta 1963 denominada *Citrullus vulgaris* Schrad.), comúnmente conocida como sandía, es una planta herbácea, anual y rastrera (o trepadora, con un entutorado adecuado) que alcanza una altura máxima de 4-5 metros. En el tallo, muy piloso, se localizan numerosos zarcillos. Sus hojas son pecioladas y lobuladas, distinguibles de otras cucurbitáceas por su forma pinacelada. Las

flores, de color amarillo brillante, se distribuyen a lo largo de todo el tallo y ramificaciones de la planta, donde generalmente se alternan flores masculinas y femeninas. El fruto varía entre las diferentes variedades. Su forma es ovalada o redonda, con una fina corteza en comparación a la parte carnosa. La corteza varía en el patrón de color (verde sólido o estriado), mientras que la pulpa (el endocarpo), que es la parte comestible del fruto, varía en tonalidades entre el blanco, amarillo, verde, naranja y rojo, siendo éste último el más frecuente. Finalmente, las semillas se distribuyen por toda la carne del fruto, su forma es aplastada y ovoide, de colores oscuros y dura al tacto.



Figura 2. Planta de *Citrullus lanatus lanatus*

Nutricionalmente, la sandía es un alimento muy interesante. Su fracción comestible (el 52% del peso total) está compuesta mayoritariamente por agua (94,6%), lo que explica su bajo contenido calórico ya que únicamente aporta 21 kcal por 100 g, mayoritariamente hidratos de carbono (4,5 g por 100 g), y baja proporción de lípidos (trazas) y proteínas (0,4 g por 100 g). La mayoría de los hidratos de carbono presentes se deben a los azúcares presentes, aunque también contiene fibra dietética (0,5 g por 100g).

Respecto al perfil de micronutrientes, destaca el licopeno no provitamínico (hasta 6.8 g por 100 g en variedades de color rojo), que puede incluso aumentar en sandías triploides (Davis et al., 2013, Puig Rojas y Tagle Merchan, 2010). Además de ser un potente antioxidante, al licopeno se le atribuye la capacidad de reducir el riesgo de ciertas enfermedades coronarias, así como algunos tipos de cáncer como el de cérvix, próstata, pulmón, mama y tracto digestivo (colon, recto, esófago, estómago, faringe...). Otro potente protector cardiovascular es el aminoácido citrulina, el cual abunda en la sandía, especialmente en la zona cercana a la corteza. Tras la ingesta, este aminoácido

se transforma en arginina, que tiene efecto beneficioso sobre el sistema circulatorio e inmunológico (Puig Rojas y Tagle Merchan, 2010).

Respecto a las semillas de la sandía, aunque en algunas partes de África y Asia sí se utiliza como alimento, en los países occidentales se considera un desperdicio. Sin embargo, actualmente se está revalorizando como subproducto. La composición en macronutrientes de las semillas tiene alto contenido en grasas y proteínas (50% y 32% respectivamente) y escaso contenido en agua, lo cual alarga su conservación. Las grasas son en su mayoría insaturadas (hasta un 78%) y en las proteínas abundan aminoácidos esenciales. También poseen un alto contenido en vitaminas (tiamina, riboflavina) y minerales (hierro, magnesio, manganeso), lo que en su conjunto las convierte en un producto sano e interesante de cara a su estudio. Además, debido a su alto contenido en aceite, la semilla podría utilizarse como biocombustible (Dumitru y Tutunea, 2017).

1.1.2 *Citrullus lanatus citroides*

Citrullus lanatus citroides, comúnmente denominada sandía salvaje o Tsamma, es la variedad de *Citrullus lanatus* menos conocida. Se trata de una planta anual y monoica (flores masculinas y femeninas), con escasas flores. Sus hojas son palmeadas de 3 o 4 lóbulos y de tacto áspero. Los frutos, redondos u ovalados, tienen un diámetro de entre 20 y 50 cm, y varían de color entre el blanco y verde claro con rayas verde oscuro. La pulpa del fruto es blanca y amarga con abundantes y duras semillas. El fruto se utiliza habitualmente para la fabricación de mermeladas y conservas, aunque también se consumen algunas variedades cocinadas. Las semillas y hojas también se pueden aprovechar como alimento, y algunas variedades se emplean para la alimentación animal.



Figura 3. Frutos de *Citrullus lanatus citroides*

Al tratarse de especies cercanas desde un punto de vista filogenético, se puede realizar hibridaciones o injertos con relativa facilidad entre *Citrullus lanatus citroides* y *Citrullus lanatus lanatus*. Esto tiene un enorme interés desde un punto de vista de mejora genética ya que *Citrullus lanatus citroides* posee una elevada resistencia a la sequía y a algunas enfermedades que causan graves pérdidas económicas en sandía, como el nematodo *Meloidogyne incognita*, la bacteria *Pseudomonas avenae* ssp. *Citrulli*, y hongos como *Didymella bryoniae* y *Podosphaera xanthii* (Mashilo et al 2017).

1.1.3 *Citrullus colocynthis*

Citrullus colocynthis, denominada sandía egusi, es una planta perenne, trepadora y ampliamente distribuida en Asia y África. Al tratarse de una planta habituada a climas áridos, se caracteriza por la robustez de su tallo y un potente sistema radicular. Esta característica la sitúa como una planta útil para evitar la erosión del suelo en zonas desérticas (Satyavani et al., 2011). Las hojas son lobuladas y posee un bajo número de flores. Respecto al fruto, son de pequeño calibre (7-10 cm de diámetro), de color verde con rayas amarillas y poseen semillas de aproximadamente 6 milímetros. La producción suele ser relativamente baja.



Figura 4. Fruto de *Citrullus colocynthis*

El fruto tiene una importancia económica limitada puesto que no es comestible. Sin embargo, se le atribuyen capacidades medicinales, como capacidad antidiabética, anticancerosa, citotóxica, antioxidante, antilipidémica, insecticida, antimicrobiana y antiinflamatoria; y potencial como productor de biomoléculas de interés, como glicósidos, flavonoides, alcaloides y terpenoides (Texeira y Hussain, 2017). Esta especie silvestre es resistente a diversos virus y enfermedades que causan enormes daños a las Cucurbitáceas, como el virus del yellow-stunting disorder, el virus del mosaico de la

sandía, el virus de amarilleo de Cucurbitáceas, el oídio o la antracnosis (Dabauza et al., 1997). Además, al ser propio de regiones desérticas, posee una alta capacidad de resistencia a condiciones adversas de temperatura y estrés hídrico. En conjunto, esta especie posee un enorme potencial para su explotación a través de herramientas biotecnológicas (Texeira y Hussain, 2017).

Las semillas se emplean como alimento en África debido a su alto contenido calórico, principalmente como consecuencia de su remarcable porcentaje de grasa (17-19%), que principalmente (un 75%) son ácidos grasos insaturados de alto valor nutricional (linoleico y oleico, mayoritariamente). Este alto porcentaje de grasa, similar al de las semillas de girasol o algodón, sitúan a *Citrullus Colocynthis* como un potencial candidato a la hora de obtener aceite crudo para uso doméstico (Sawaya et al., 1983) o producir biodiesel (Pal et al., 2010) en las regiones áridas.

1.2 La regeneración *in vitro* de sandía

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la regeneración de plantas se fundamenta en el cultivo de explantes (fragmentos de un órgano vegetal) en un medio de composición química definida y en condiciones de incubación controladas. El éxito de esta técnica depende tanto de la totipotencia de las células somáticas para la regeneración de plantas completas, como de otros factores como la edad de la plántula, el tipo de explante o los reguladores de crecimiento que se suelen emplear para obtener la respuesta morfogénica a partir de los explantes.

La regeneración de plantas se puede conseguir a través dos rutas distintas: la embriogénesis somática y la organogénesis.

La embriogénesis somática se basa en la formación de estructuras con crecimiento bipolar a partir de células somáticas (embriones somáticos). En plantas dicotiledóneas, como la sandía, el desarrollo de embriones somáticos atraviesa 4 fases diferentes. En la fase 0, las células experimentan divisiones hasta formar agregados embriogénicos. Durante la fase 1, los agregados celulares proliferan lentamente de manera desdiferenciada. En la fase 2, el embrión entra en la llamada etapa glomerular, durante la cual se dividen únicamente ciertas partes del embrión. Finalmente, durante la fase 3, el embrión inicia la denominada etapa corazón y, posteriormente, la etapa torpedo. La diferencia respecto al desarrollo de un embrión zigótico radica en que los embriones adventicios carecen de suspensor, por lo que tienen autonomía respecto al tejido que les dio origen, y al no tener conexión vascular entre ellos pueden ser

fácilmente separados de él. Además, al contrario de lo que ocurre con los embriones zigóticos, poseen la misma combinación genética que la planta de la que proceden, por lo que habitualmente se les utiliza como método de propagación.

Por otro lado, la organogénesis produce un crecimiento celular de tipo unipolar, dando lugar a estructuras de tipo caulinar (i.e. tallos) o radicular. La separación de un fragmento de tejido de una planta y su incubación en un medio de cultivo, con diversos nutrientes y reguladores del crecimiento, conlleva que se pierda el control que unas células generan sobre otras en el organismo completo. Esta pérdida de los controles que reprimen la división en células especializadas permite que las células retomen la capacidad de división. En este nuevo estado, las células pueden expresar nuevos patrones de diferenciación que conducen a la regeneración de plantas enteras (Handro & Floh, 1990)

La regeneración de plantas se puede producir a través de tres procesos morfogenéticos. Si la regeneración de órganos o embriones se origina tras la formación de un callo (masa celular indiferenciada producida como respuesta al corte del explante), se obtendrá un tipo de morfogénesis denominada indirecta. Por el contrario, la morfogénesis directa se ocasiona cuando las estructuras organogénicas (brotes o raíces) se originan sin la fase de formación de callo. Adicionalmente, se puede obtener un estado intermedio, en el que la regeneración de las estructuras organogénicas se produce tras una fase corta de divisiones celulares, dando lugar a lo que se denomina morfogénesis semidirecta. El tipo de regeneración tiene una gran influencia en el desarrollo de las posteriores estructuras vegetales. Una morfogénesis directa conlleva la regeneración de yemas o embriones idénticos a la planta original, mientras que durante la morfogénesis indirecta se puede producir variación somaclonal.



Figura 5. Regeneración de estructuras organogénicas tras la formación de un callo en sandía

1.3 Aplicaciones biotecnológicas

Dada la importancia económica de la sandía, se han propuesto distintas aplicaciones en el campo de la biotecnología.

1.3.1 Obtención de plantas tetraploides y propagación de líneas de alto valor biológico

El cultivo *in vitro* permite la obtención de plantas tetraploides estables (Compton et al., 1993) cuando el proceso de regeneración es de tipo indirecto o semidirecto. Alternativamente, se puede conseguir la rápida propagación de brotes a partir de híbridos F1 (Khalekuzzaman et al., 2012) manteniendo la identidad genética del material de partida cuando la morfogénesis es de tipo directa.

Por lo que respecta a la obtención de tetraploides, el método tradicional se basa en la inmersión del material vegetal en colchicina (Kihara, 1951), lo que inhibe la división celular tras la duplicación celular. Este método, ampliamente utilizado por su sencillez operativa y sus buenos resultados, conlleva dos grandes inconvenientes. En primer lugar, es muy habitual la formación de estructuras quiméricas (i.e., no en todo el material vegetal se ha producido la duplicación cromosómica). La morfogénesis adventicia reduce considerablemente la aparición de plántulas quiméricas poliploides ya que algunas de las plantas tetraploides regeneradas *in vitro* proceden de células tetraploides (Compton et al., 1996).

Así mismo, la fertilidad de las plantas tetraploides generadas mediante tratamiento con colchicina es muy baja, lo que genera dificultades a la hora de reproducirlas. Sin embargo, aunque la fertilidad de las plantas tetraploides obtenidos mediante regeneración adventicia es menor que la de las diploides, es significativamente mayor que la de las plantas tetraploides que se obtienen con colchicina (Compton et al., 2004), lo que permite su reproducción.

Respecto a los híbridos F1, sus características mejoradas no se transmiten a todos sus descendientes, lo que supone que se deban obtener semillas F1 cada año. La producción de plantas F1 mediante regeneración adventicia directa (i.e. minimiza la posibilidad de que se produzcan variaciones genéticas) se ha propuesto como una nueva vía alternativa a la producción de semilla F1, que podría reducir los costes asociados a la obtención de semilla (Khalekuzzaman et al., 2012).

1.3.2 Transformación genética

Se han reportado trabajos en los que se describe la obtención de plantas transgénicas de sandía mediante el método con *Agrobacterium tumefaciens* (Choi et al. 1994, Compton et al. 2004). Respecto a las aplicaciones que ofrece esta tecnología, Ellul et al. (2003) obtuvieron mayor tolerancia al estrés salino mediante la introducción del gen *HAL-1* de *Saccharomyces cerevisiae*. Recientemente, Liu et al (2016) obtuvieron sandías resistentes al virus del mosaico de calabacín que exhibían el carácter en la siguiente generación.

Conviene indicar que también se han obtenido plantas transgénicas de *Citrullus lanatus citroides* y *Citrullus colocynthis* (Akashi et al., 2005, Dabauza et al., 1997). Sin embargo, el verdadero interés de estas especies radica más bien en los genes de alto valor biológico que poseen, es decir aquellos que confieren a estas dos especies resistencia a estreses bióticos (i.e. plagas, enfermedades o virus) o abióticos (i.e. altas temperaturas, sequía o salinidad). La identificación y clonación de estos genes tiene un enorme interés desde un punto de vista de mejora. Para ello, se puede emplear la mutagénesis insercional, una herramienta biotecnológica en la que se asocian el análisis genético tradicional y las técnicas modernas de genética molecular con el objetivo de identificar, clonar y caracterizar funcionalmente el gen mutado. Esta estrategia se basa en el hecho de que un inserto transgénico (transposón o T-DNA) se puede utilizar como 'agente mutagénico' para la obtención de líneas de pérdida o alteración de función en plantas. En efecto, la integración de un transposón o un T-DNA en la secuencia codificante o en cualquier elemento de control de un gen endógeno puede ocasionar la anulación de función o la alteración del nivel de expresión de dicho gen, generando un fenotipo mutante. La ventaja de la mutagénesis insercional es que el clonaje del gen etiquetado se puede hacer empleando métodos basados en la PCR (e.g. TAIL- o Anchor-PCR). Sin embargo, para poder abordar con éxito esta estrategia es necesario disponer de métodos eficaces de transformación genética y, para ello, previamente se debe poner a punto un sistema de regeneración adventicia que conduzca a una alta tasa de regeneración.

1.3.3 Perspectivas futuras en biotecnología

La aparición de la herramienta de edición genética CRISPR/CAS9 abre una ventana de oportunidades a mayores cambios genéticos. Las proyecciones sitúan al método CRISPR/CAS9 como una herramienta mucho más eficaz respecto a la transferencia y manipulación de la expresión de genes concretos. Así, por ejemplo, Tian et al (2017)

obtuvieron con éxito la edición del gen CIPDS (que otorga carácter albino) en sandía. Asimismo, en pepino, Chandrasekaran et al (2016), también han obtenido resultados muy satisfactorios utilizando el método CRISPR/CAS9 para la obtención de resistencia a enfermedades víricas.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Para poder abordar las diferentes aplicaciones derivadas del cultivo *in vitro* en mejora vegetal es necesario disponer de sistemas eficientes y reproducibles que permitan la regeneración de plantas. Los estudios más relevantes en el campo de la regeneración *in vitro* de *Citrullus lanatus* se han llevado a cabo por Compton y Gray (1993a, 1994), Dong y Jia (1991) y Ellul (2002). Estos autores establecieron algunos de los requerimientos culturales y morfogénéticos que permiten la regeneración *in vitro* de plantas de sandía, tales como la edad de la plántula o combinaciones más o menos adecuadas de reguladores de crecimiento. En estos estudios también se demostró que la capacidad de regeneración a partir de cotiledones es siempre mayor que la que se obtiene a partir de otros tejidos de la planta (i.e. hojas). Sin embargo, estos autores llevaron a cabo sus estudios con variedades de referencia que se suelen utilizar para iniciar estudios de regeneración *in vitro* de sandía (i.e. var. Sugar Baby). Los problemas a la hora de regenerar *in vitro* plantas de sandía pueden estribar en la baja capacidad morfogénética de ciertos cultivares de interés cuando se emplean las metodologías empleadas en las variedades de referencia.

En este contexto, el principal objetivo de este trabajo de investigación estudiar la aptitud morfogénica de distintos cultivares de tres especies del género *Citrullus*: *Citrullus lanatus lanatus*, *Citrullus lanatus citroides* y *Citrullus colocynthis*. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto del estadio ontogénico y de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica de distintos cultivares del género *Citrullus*
2. Evaluar el efecto del tipo de explante sobre la cantidad y calidad de la respuesta morfogénica en distintos cultivares del género *Citrullus*
3. Determinar el nivel de ploidía de las plantas de sandía regeneradas *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Como material vegetal de partida se han utilizado semillas de diferentes cultivares de *Citrullus lanatus lanatus*, a saber, Sugar Baby: Rocalba (SB1), Sugar Baby: Banco COMAV (SB2), Sugar Baby, línea pura Fitó (SB3), Sugar Baby, línea pura fitó Rayada (SB4), WP20 (R20), WP20- Pull (R20-P), WP106 (R106), WP106- Pull (R106-P), Piporro de pipa blanca, Badajoz (LM1), Sandía del terreno, Cáceres (LM2), Sandía, Las Palmas de Gran Canaria (LM3), Sindria, Gerona (LM5) y *Citrullus lanatus lanatus* (LAN-P), cultivares de *Citrullus lanatus citroides*, más concretamente, *Citrullus lanatus citroides* (CIT-P) y Sandía de hacer dulce, Valencia (LM4), y también cultivares de *Citrullus colocynthis*, a saber, *Citrullus colocynthis* (COL-Niger 5), *Citrullus colocynthis* (COL-Niger 2) y *Citrullus colocynthis* (COL-P). Estos cultivares proceden de la Empresa Fitó, o han sido cedidos por el Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, y por el Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea "La Mayora" (Málaga).

3.2 Técnicas de cultivo *in vitro*

3.2.1. Esterilización

Las plántulas axénicas se obtienen a partir de semillas que, previamente, han pasado por un proceso de esterilización. Las semillas se introducen en una solución diluida al 10% de ácido clorhídrico para facilitar la eliminación de la testa con la ayuda de unas pinzas. Las semillas desprovistas de testa se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 30 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% de hipoclorito de sodio) equivalente a 50 g de cloro activo por litro, a la cual se añaden 2 gotas de detergente 7X-0-matic (Flow Laboratories) que ayuda a romper la tensión superficial de los tejidos, mejorando el contacto entre el tejido y el esterilizante. A continuación, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (5, 10 y 15 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

3.2.2. Germinación de las plántulas axénicas

Las semillas esterilizadas (apartado 3.2.1) se transfieren a recipientes de vidrio de 105 mm de altura x 95 mm de diámetro que contienen 50 ml de medio de cultivo MG. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico europeo (Sumilab, s.l.). El pH del medio se ajusta

a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. Los medios de cultivo se esterilizan por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. Las semillas se mantienen en oscuridad a 28°C hasta su germinación, periodo que oscila entre las 24 y 72 horas. Después de la nascencia, es decir, el momento en el que emerge la radícula, se trasladan a la cámara de cultivo. La cámara tiene las condiciones de luz, temperatura y humedad controladas: fotoperiodo de 16 horas luz con una intensidad luminosa de 2000 luxes - equivalente a $34 \pm E/m^2/s$ - suministrada por una fuente de luz fría y una temperatura / humedad relativa de $26 \pm 2^\circ C / 40\%$ durante el periodo luminoso y $22 \pm 2^\circ C / 70\%$ durante el periodo oscuro.

3.2.3. Cultivo de explantes primarios

Tras el inicio de la germinación se procede a la extracción de los explantes de cotiledón. Una vez cortados, los explantes se cultivan con el envés en contacto con el medio de cultivo. Para el cultivo de estos explantes se utilizan placas Petri (90 mm de diámetro x 30 mm de altura) con 30 ml de medio de cultivo que se sellan con parafilm. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.4. Regeneración de plantas a partir de explantes primarios

a) Inducción de organogénesis

El medio de cultivo empleado para la inducción de organogénesis está compuesto por una solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 mg/L vitaminas SH (Shahin, 1985), 0,1 g/L de inositol y una combinación de reguladores de crecimiento (auxinas y citoquininas). En estos medios, las zonas de corte de los explantes dan lugar a la formación de callos que presentan zonas de color crema friables y/o compactas de color verde en las que se desarrollan yemas, yemas-ápice y brotes. En función del experimento se han empleado diferentes combinaciones de reguladores que serán descritas en un apartado ulterior. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

b) Enraizamiento de los brotes

Los brotes elongados se separan del callo organogénico y se siembran en un medio de enraizamiento. Este medio está compuesto por solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 20 g/L de sacarosa, 0,1 g/L de inositol, 0,001 g/L de T-CIH y 1,0 mg/L de ácido indolbutírico para favorecer la emisión de raíces. El pH del medio se ajusta a 5.7 con KOH y HCl antes de añadir el agente gelificante. El medio de cultivo se esteriliza por calor húmedo en autoclave, a 115° C durante 30 minutos. Las primeras raíces suelen

aparecer aproximadamente a los 7 días de la siembra. A los 30 días la planta suele tener un sistema radicular bien desarrollado, y la parte aérea presenta una yema caulinar y varias yemas axilares, a partir de las cuales se pueden obtener nuevas plantas mediante propagación por vía axilar. El tipo de recipiente que utilizamos (150 mm de altura x 60 mm de diámetro) favorece la elongación de entrenudos, lo que facilita la propagación clonal. Ésta se realiza a través del cultivo del brote terminal y las yemas axilares en el medio de clonación descrito anteriormente. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2.

3.2.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo

El nivel de ploidía de las plantas se determina en fragmentos de hoja joven. El análisis se realiza mediante la cuantificación del contenido de ADN nuclear de las células según el método de Smulders et al. (1994). El tejido vegetal (un fragmento de cotiledón u hoja de aproximadamente 1 cm²) se trocea finamente con una cuchilla en una placa petri de 50mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800 µL de una solución que contiene 1mg/L de fluorocromo DAPI (4,6-diamino-2phenyl-indole) (DAPI staining solution, Partec) cuya función es teñir el ADN. Tras resuspender la mezcla, se filtra a través de una malla de nylon de 50 µm. La suspensión de núcleos se hace circular por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Ploidy Analyser), equipado con una lámpara de mercurio que emite luz ultravioleta de 366nm. La corriente de núcleos en suspensión pasa por una cámara de cuarzo (conducto de 10 µm que no permite el paso simultáneo de dos unidades), donde es iluminada por una fuente de luz ultravioleta. Como consecuencia, el fluorocromo DAPI fijado al ADN emite una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN del núcleo, que es reconocida y captada por un fotorreceptor. El sistema informático que lleva incorporado el citómetro convierte cada señal fluorescente en un punto sobre la pantalla que se sitúa en distintas posiciones de acuerdo con su intensidad. El gráfico resultante ordena los datos según el contenido nuclear de ADN en el eje de abscisas y contabiliza el número de núcleos de cada tipo en el eje de ordenadas.

3.3 Nomenclatura y composición de los medios de cultivo

3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo

En esta memoria se ha empleado la nomenclatura utilizada en publicaciones del grupo (i.e. Moreno et al., 1985 y publicaciones posteriores). La nomenclatura alude al tipo y concentración de reguladores de crecimiento del medio. Las primeras letras del medio refieren los reguladores empleados, en general una auxina y una citoquinina: (N) = ácido naftalenacético (NAA), (B) = 6-benciladenina (6 BA) y (Tdz) = Thidiazuron (Z). A las letras le siguen una serie de dígitos separados por una barra que indican la concentración del regulador en mg/L.

3.3.2. Composición de los medios de cultivo

Como se indica en el apartado 3.2.4., todos los medios de cultivo encaminados a inducir morfogénesis están compuestos por una solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 30 g/L de sacarosa, 10 mg/L vitaminas SH (Shahin, 1985), 0,1 g/L de inositol y 1 mg/L de sulfato de cobre. Para no ser repetitivos, denominaremos MB3 a esta composición que comparten todos los medios empleados en el trabajo. La composición de los reguladores de crecimiento en cada uno de los experimentos se describe en un apartado ulterior.

3.4. Diseños experimentales

3.4.1. Efecto del estadio ontogénico sobre la respuesta morfogénica

El cultivo de los explantes se realiza como se describe en el apartado 3.2.3. Los explantes se obtienen de plántulas de entre los 3-4 o 5-6 días tras el inicio de la germinación. En estos estadios ontogénicos, los cotiledones se encuentran en el momento de viraje de color blanco a verde claro (3-4 días) o han alcanzado un color verde oscuro, pero aún permanecen unidos (5-6 días). Para el cultivo de los explantes se empleó el medio de cultivo NBCu (0.02/1.0/1.0), es decir, MB3 (ver apartado 3.3.2) suplementado con 0,02 mg/L de ácido naftalenacético, 1,0 mg/L de 6-benciladenina y 1.0 mg/L de sulfato de cobre. Las condiciones de incubación fueron las descritas en el apartado 3.2.2.

3.4.2. Efecto de la combinación de reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogénica

El cultivo de los explantes se realiza como se describe en el apartado 3.2.3. Para evaluar la combinación de reguladores de crecimiento se emplearon los medios NBCu (0.02/1.0/1.0) y NTdz (0.02/1.0), es decir, medios que contienen MB3 (ver apartado 3.3.2) y como reguladores 0,02 mg/L de ácido naftalenacético, 1,0 mg/L de 6-benciladenina y 1.0 mg/L de sulfato de cobre, o 0,02 mg/L de ácido naftalenacético y 1,0 mg/L de thidiazuron respectivamente. Las condiciones de incubación fueron las descritas en el apartado 3.2.2.

3.4.3. Efecto del tipo y corte del explante sobre la respuesta morfogénica

El estudio del tipo y corte del explante se realizó con explantes procedentes de plántulas en el estadio ontogénico 3-4. Para evaluar el efecto del tipo de explante, tras el inicio de la germinación y una vez las plantas se encontraban en el estadio de desarrollo adecuado (3-4 días) se procedió a la extracción de los explantes. Para ello, una vez separados los dos cotiledones de la plántula, se eliminaron los extremos y se dividieron transversalmente en dos partes, la proximal, más cercana al ápice (denominada CP) y la distal, más alejada del ápice (CD). Los explantes se cultivaron en el medio NBCu (ver apartado 3.3.2).

Para evaluar el efecto de diferentes tipos de explantes se realizaron los cortes que se muestran en la figura 6.

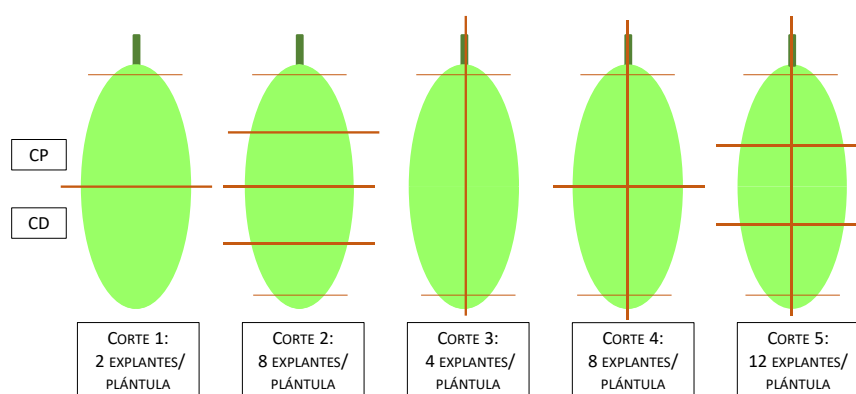


Figura 6. Tipos de corte efectuados en los explantes de sandía.

Como se puede ver en la figura 6, el corte 1 viene definido por un único corte transversal que divide el cotiledón en dos partes: proximal (más cercana al hipocótilo) y distal (más alejada). Desechando los extremos distales, con este corte se obtienen 2

explantes por plántula. En el corte 2 se realizan 3 cortes transversales, dividiendo al cotiledón en 4 partes iguales, por tanto, se obtienen 8 explantes por plántula. Con el corte 3 dividimos el cotiledón longitudinalmente, cortando por el nervio central. Se logra así obtener 4 explantes por plántula. El corte 4 consiste en un corte transversal, que divide el cotiledón en proximal y distal, y otro longitudinal por el nervio central, obteniéndose 8 explantes por plántula. En el corte 5 se divide el cotiledón transversalmente en 3 partes de igual tamaño, y se realiza un corte a través del nervio central, por consiguiente, se obtienen 12 explantes a partir de cada plántula.

En ambos experimentos, para el cultivo de los explantes se empleó el medio de cultivo NBCu (0.02/1.0/1.0), es decir, MB3 (ver apartado 3.3.2) suplementado con 0,02 mg/L de ácido naftalenacético, 1,0 mg/L de 6-benciladenina y 1.0 mg/L de sulfato de cobre; y las condiciones de incubación fueron las descritas en el apartado 3.2.2.

3.4. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis

En los experimentos se ha evaluado el número de explantes que desarrollan callos con yema, o callos en los que, en el momento de la lectura, habían desarrollado brotes. Para la exposición de los resultados se ha utilizado las fórmulas: $[(n^{\circ} \text{ de explantes con yema} / n^{\circ} \text{ explantes totales}) \times 100]$ y $[(n^{\circ} \text{ de callos con brote} / n^{\circ} \text{ callos con yema}) \times 100]$. Además, se ha estimado el número medio de brotes que se pueden extraer de un callo.

3.5. Tratamiento estadístico

El tratamiento estadístico de las variables evaluadas se llevó a cabo comparando los valores medios mediante el test de Fisher (diferencia mínima significativa) con un nivel de probabilidad del 5%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Efecto del estado ontogénico sobre la respuesta morfogénica

El objetivo de este primer experimento fue identificar qué estadio ontogénico podría ser el más adecuado para obtener la mayor respuesta morfogénica. Para llevar a cabo el experimento, se seleccionaron dos cultivares de sandía (SB1 y WP20), se utilizaron explantes de cotiledón y se estudiaron los estadios ontogénicos 3-4, momento en el que los cotiledones comienzan adquirir tonalidades verdosas; y 5-6, los cotiledones son de color verde claro por el envés, pero aún se mantienen unidos (ver figura 7)



Figura 7. Diferentes estadios ontogénicos de las plántulas de sandía

Para el cultivo de los explantes se utilizó el medio de cultivo NBCu ya empleado previamente en nuestro laboratorio y que está compuesto por la combinación de la auxina ácido naftalenacético, la citoquinina 6-benciladenina y sulfato de cobre (ver Materiales y Métodos, página 13).

Como se puede ver en la tabla 1, los mejores resultados se obtuvieron empleando cotiledones en el estadio ontogénico 3-4. En este estadio de desarrollo, el porcentaje de explantes con yema fue mayor en los dos cultivares evaluados. Además, durante los primeros 30 días de cultivo, en torno al 10% de los explantes en el estadio ontogénico 3-4 del cultivar WP20 había desarrollado brotes.

Tabla 1. Efecto del estadio ontogénico sobre respuesta morfogénica de explantes de cotiledón de los cultivares SB1 y WP20 de sandía. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar	Estadio	Explantos con yema (%)	Explantos con brotes (%)
SB1	3-4	35,00 ± 0,11 ^(a)	0 ± 0,00
	5-6	27,08 ± 0,06 ^(a)	0 ± 0,00
WP20	3-4	50,00 ± 0,07 ^(a)	10,42 ± 0,06
	5-6	35,00 ± 0,08 ^(a)	0 ± 0,00

A la hora de poner a punto un método de regeneración de plantas a partir de explantes es determinante identificar el estadio ontogénico con mayor cantidad de células competentes. La respuesta morfogénica suele ser mayor cuanto más joven es la plántula en el momento del corte del explante, y, en general, se produce una drástica disminución del número de brotes regenerados cuando se cultivan cotiledones de plantas en estadios ontogénicos más avanzados (Compton y Gray, 1993a, Dong y Jia, 1991). Sin embargo, nuestro grupo ha constatado experimentalmente que los cotiledones muy jóvenes (i.e. estadios ontogénicos 1-2) sufren habitualmente fenómenos de hiperhidratación. Además, la gran cantidad de almidón y el pequeño tamaño de las muestras en cotiledones tan jóvenes dificultan en exceso la manipulación de los explantes. Krug et al. (2005) observaron que la morfogénesis en cotiledones de 1 día era mucho menor que la de cotiledones más maduros, aunque no describieron la causa que condujo a una menor tasa morfogénica. En conjunto, nuestros resultados indican que el estadio ontogénico 3-4 puede ser más adecuado que el estadio 5-6 a la hora de obtener respuesta morfogénica a partir de explantes de cotiledón.

4.2 Efecto del medio de cultivo sobre la respuesta morfogénica

El objetivo del segundo experimento fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores del desarrollo sobre la morfogénesis de explantes de cotiledón. En este ensayo y habida cuenta de los resultados del primer experimento, seleccionamos plántulas en el estadio ontogénico 3-4. Se emplearon cuatro líneas de *C. lanatus lanatus* (SB1, WP20, WP106, LAN-P) y una de *C. lanatus citroides* (CIT-P), para determinar si en los medios de cultivo evaluados se producían diferencias relevantes entre las dos especies.

Como se puede ver en la tabla 2, a los 30 días de cultivo (i.e. momento en el que se hizo la lectura), la combinación de ácido naftalenacético (NAA) y 6-benciladenina (6-BA) promovió mayor respuesta morfogénica sobre los cotiledones de sandía que la combinación de la auxina (NAA) y thidiazuron (TDZ). En la mayor parte de las variedades de *C. lanatus lanatus*, los resultados fueron marcadamente mejores en el medio

suplementado NAA y 6-BA. En efecto, en los cultivares SB1, WP106 y LAN-P, el porcentaje de explantes con yema fue significativamente mayor. Algo similar ocurría con el porcentaje de explantes que habían desarrollado brotes y el porcentaje de brotes que se podían individualizar a partir de cada explante. Por lo que respecta a estas dos variables, los resultados fueron significativamente mayores en los cultivares WP20 y WP106. Conviene indicar que en los explantes todas las líneas de sandía que se cultivaron en medio suplementado con NAA y TDZ se apreciaron fenómenos de pardeamiento enzimático e hiperhidratación (ver figura 8), lo que sin duda repercutió negativamente sobre la capacidad morfogénica del explante. En definitiva, en los cultivares de sandía evaluados, la combinación de NAA y 6-BA resulta más adecuada que la combinación de NAA y TDZ a la hora de inducir y desarrollar estructuras morfogénicas de calidad.

Tabla 2. Efecto del medio de cultivo sobre respuesta morfogénica de explantes de cotiledón de distintos cultivares de *Citrullus lanatus*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar	Medio	Explantes con yema (%)	Explantes con brotes (%)	Nº de brotes/explante
SB1	NBCu	55,00 ± 0,02 ^(a)	0 ± 0,00	0 ± 0,00
	Ntdz	17,87 ± 0,07 ^(b)	0 ± 0,00	0 ± 0,00
WP20	NBCu	70,83 ± 0,09 ^(a)	37,50 ± 0,10	0,71 ± 0,23
	Ntdz	58,33 ± 0,10 ^(a)	0 ± 0,00	0 ± 0,00
WP106	NBCu	46,87 ± 0,09 ^(a)	50,00 ± 0,13 ^(a)	1,25 ± 0,31 ^(a)
	Ntdz	15,00 ± 0,06 ^(b)	10,00 ± 0,07 ^(b)	0,10 ± 0,07 ^(b)
LAN-P	NBCu	62,50 ± 0,10 ^(a)	41,67 ± 0,10 ^(a)	1,08 ± 0,29 ^(a)
	Ntdz	25,00 ± 0,10 ^(b)	16,67 ± 0,08 ^(a)	0,54 ± 0,28 ^(a)
CIT-P	NBCu	40,00 ± 0,11 ^(a)	30,00 ± 0,11	0,80 ± 0,30
	Ntdz	40,00 ± 0,11 ^(a)	0 ± 0,00	0 ± 0,00

Respecto al cultivar de *Citrullus lanatus citroides* (CIT-P), en ambos medios de cultivo se obtuvo un porcentaje de explantes con yema similar (tabla 2). Sin embargo, en el medio de cultivo suplementado con NAA y 6-BA se podían visualizar brotes (en el 30% de los explantes ya se veían brotes que se podían individualizar) a los 30 días de cultivo de los explantes mientras que en el medio suplementado con NAA y TDZ los brotes aún no habían emergido. Con todo, y a diferencia de lo que se observó en los cultivares de sandía, los cotiledones de esta especie no exhibieron pardeamiento enzimático a lo largo del periodo de cultivo en medio con TDZ (ver figura 9). Estos resultados podrían estar relacionados con el origen silvestre de *C. lanatus citroides*, que

hace que esta especie sea más tolerante al efecto de este regulador que los cultivares de la especie cultivada. Además, inicialmente se desarrollaron con mayor velocidad las estructuras morfológicas en el medio suplementado con thidiazuron (figura 9). No podemos, por tanto, descartar que el empleo del thidiazuron como promotor de crecimiento a otras concentraciones pueda proporcionar resultados más interesantes.

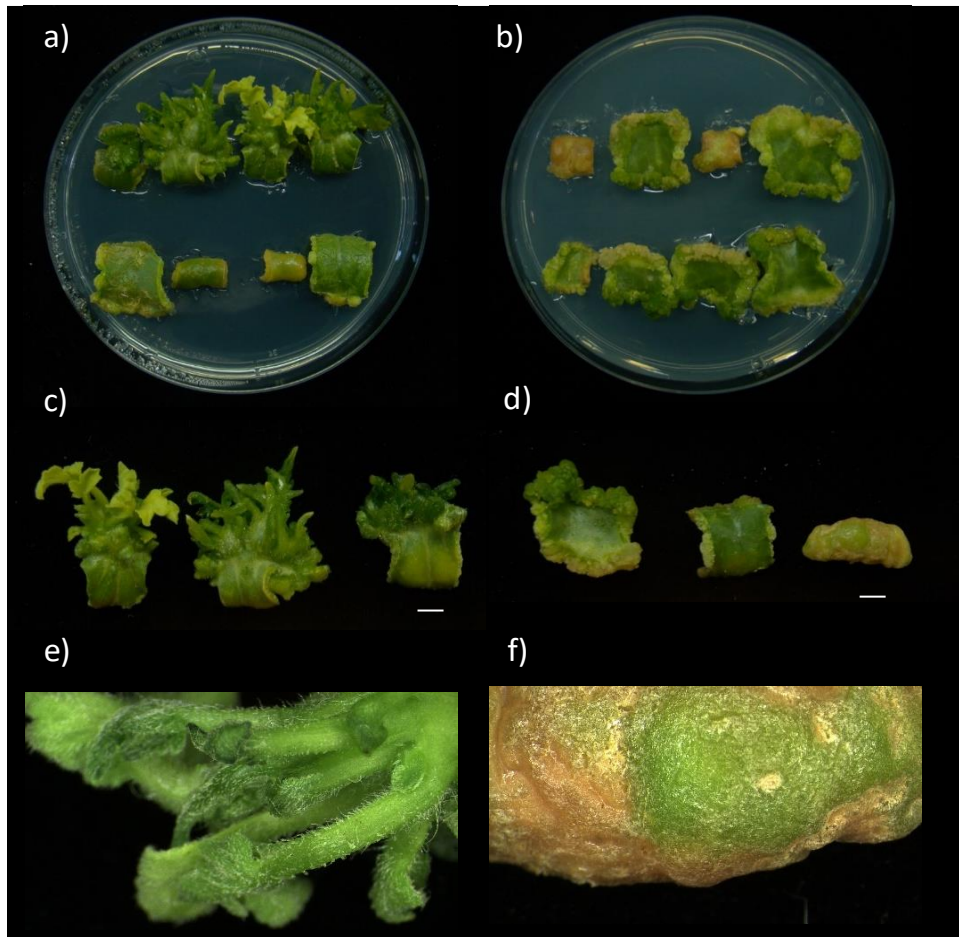


Figura 8. Explantes de cotiledón proximal del cultivar WP20 en medio NBCu (a y c) y NTdz (b y d). Brotes generados a partir de las estructuras morfológicas procedentes de explantes del cultivar WP20 en medio NBCu (e) y pardeamiento enzimático en explantes del cultivar WP20 en medio NTdz (f). Escala de barras: 1 cm

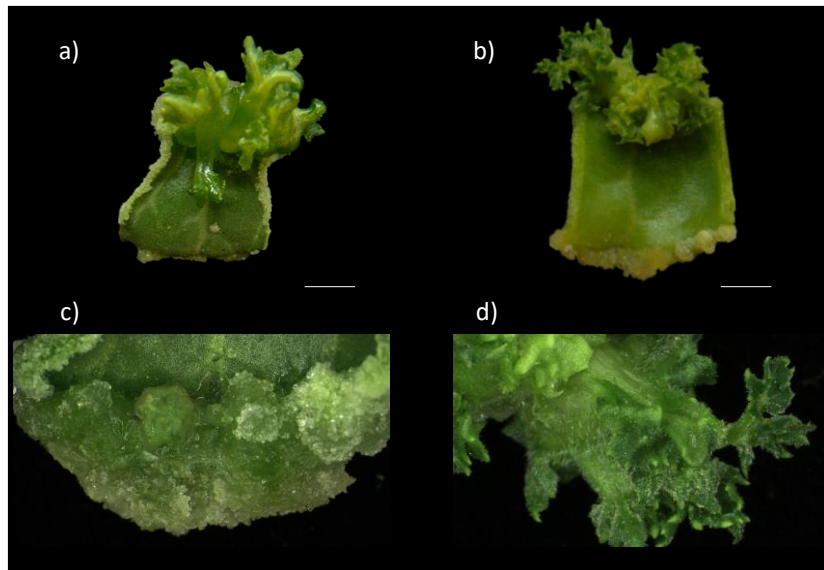


Figura 9. Explante de cotiledón de CIT-P cultivado en medio NBCu (a) y NTdz (b). Zona proximal del cotiledón de CIT-P en NBCu (c) y NTdz (d) a los 15 días de cultivo. Escala de barras: 1 cm

La elección de reguladores de crecimiento y su concentración tienen una gran influencia sobre el desarrollo de las estructuras morfogénicas. La citoquinina 6-benciladenina suele emplearse habitualmente como promotor de la morfogénesis en sandía, ya sea como único regulador o en combinación con ácido naftalenacético (Li et al, 2011, Suratam 2009). Sin embargo, Zhao et al. (2005) observaron que en *C. lanatus citroides*, a pesar de que era necesaria la adición de 6-benciladenina para inducir morfogénesis, concentraciones mayores a 1 mg L^{-1} inhibían el desarrollo de brotes. Otros autores han reportado el suplemento con otras sustancias para la inducción de morfogénesis. Por ejemplo, Chatuverdi et al. (2001) indicaron que la combinación de N6-Isopentenyladenin (2iP) y 6-benciladenina proporciona un efecto sinérgico sobre la formación de brotes. Krug et al. (2005) señalaron que la adición de un 10% de agua de coco a al medio suplementado con 6-benciladenina incrementaba el número de brotes por explante. Respecto al thidiazuron, se ha reportado que su uso reduce la competencia morfogénica en sandía (Compton et al., 2004) respecto a la benciladenina, e incrementa la aparición de fenómenos de hiperhidratación (Compton et al., 1993). Nuestros resultados son coincidentes con los de estos autores e indican que los cultivares de sandía que hemos evaluado dan lugar a una mejor respuesta morfogénica en el medio suplementado con 6-benciladenina respecto al medio suplementado con thidiazuron.

4.3 Efecto del tipo de explante sobre la morfogénesis adventicia

El objetivo del siguiente bloque de experimentos fue evaluar qué tipo de corte en el explante podría proporcionar mayor respuesta morfogénica. Para ello, el primer experimento consistió en el cultivo de explantes de cotiledones cortados transversalmente, en aras de evaluar la morfogénesis de la parte proximal del explante (más cercana al hipocótilo) respecto a la distal (más alejada del hipocótilo). Sobre la base de los resultados obtenidos en los anteriores experimentos, se utilizó el medio NBCu y explantes procedentes de plántulas en el estado ontogénico 3-4. Para llevar a cabo el experimento se utilizaron cinco cultivares de *C. lanatus lanatus* (SB1, WP20, SB2, WP106 y LAN-P), una de *C. lanatus citroides* (CIT-P) y dos de *C. colocynthis* (COL-Niger 5 y COL-P).

Como se puede ver en la tabla 3, los explantes de cotiledón proximal tienen, en general, mayor aptitud morfogénica que los distales. Con la excepción de los cultivares de *C. colocynthis*, el porcentaje de explantes con yema a partir de explantes proximales fue significativamente mayor que en explantes distales. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Compton y Gray (1994), Compton (2000) o Krug et al (2005), que indicaron que la región proximal del cotiledón genera mayor morfogénesis que la distal. Choi et al. (1994), por el contrario, obtuvieron un resultado poco común, ya que observaron mayor proporción de explantes con yemas en los extremos distales de híbridos F1 de sandía.

Respecto a los cultivares de *C. colocynthis*, cabe señalar la elevada aptitud morfogénica del cultivar COL-P. En efecto, tanto a partir de explantes de cotiledón proximal como distal se obtuvo un porcentaje de explantes con yema del 100% (tabla 3). Sin embargo, durante el periodo de cultivo no se desarrollaron a partir de estas estructuras brotes potencialmente individualizables. No se puede descartar que el subcultivo de las estructuras obtenidas (i.e. yemas) a medio fresco, o a medio con otra combinación de reguladores de desarrollo (i.e. inductores del desarrollo y elongación de brotes) permitiera el desarrollo de los brotes.

Tabla 3. Efecto del tipo de explante (proximal o distal) sobre la respuesta morfogénica en diferentes cultivares de *C. lanatus lanatus* (SB1, WP20, SB2, WP106 y LAN-P), *C. lanatus citroides* (CIT-P) y *C. colocynthis* (COL-Niger 5 y COL-P)

Cultivares	Cotiledón	% Yemas	% Brotes	Nº de brotes/explante
SB1	Proximal	55,00% ± 0,11 ^(a)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Distal	15,00% ± 0,08 ^(b)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
WP20	Proximal	70,83% ± 0,15 ^(a)	20,83% ± 0,10	0,71 ± 0,23
	Distal	29,17% ± 0,15 ^(b)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
SB2	Proximal	35,00% ± 0,25	5,00% ± 0,05	0,05 ± 0,05
	Distal	0,00 ± 0,00	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
WP106	Proximal	87,50% ± 0,25 ^(a)	50,00% ± 0,13	0,93 ± 0,28
	Distal	6,25% ± 0,13 ^(b)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
LAN-P	Proximal	62,50% ± 0,31 ^(a)	41,67% ± 0,10	1,08 ± 0,29
	Distal	12,50% ± 0,11 ^(b)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
CIT-P	Proximal	40,00 ± 0,11 ^(a)	30,00 ± 0,11 ^(a)	0,70 ± 0,27 ^(a)
	Distal	10,00 ± 0,07 ^(b)	10,00 ± 0,07 ^(a)	0,15 ± 0,11 ^(b)
COL-Niger 5	Proximal	20,00 ± 0,19 ^(a)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Distal	10,00 ± 0,20 ^(a)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
COL-P	Proximal	100,00 ± 0,00 ^(a)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Distal	100,00 ± 0,00 ^(a)	0,00% ± 0,00	0,00 ± 0,00

Con el objetivo de estudiar con mayor detalle el efecto del tipo de explante sobre la capacidad morfogénica, se diseñó un segundo experimento en el que se realizaron diferentes tipos de corte en el explante (ver figura 10). Para llevar a cabo este experimento utilizamos los cultivares de sandía LM1, LM3 y LM5.

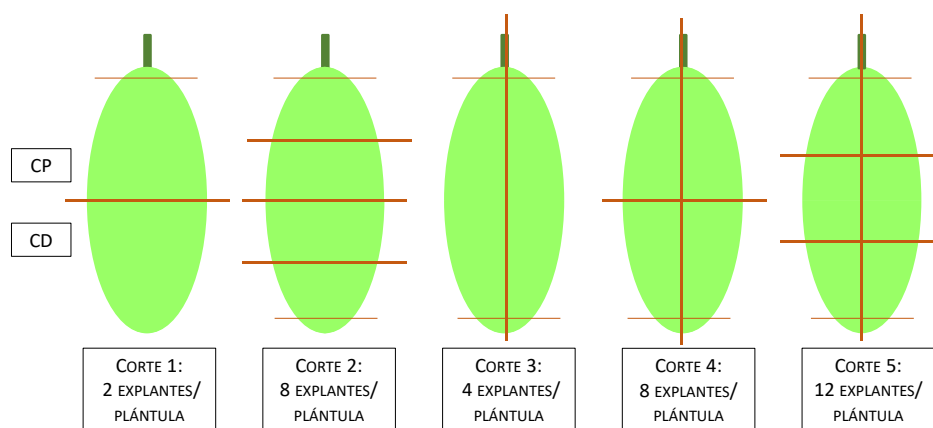


Figura 10. Tipos de corte efectuados en los explantes de sandía. Corte 1: Corte transversal desechando el extremo distal. Corte 2: Cortes transversales en 3 partes iguales. Corte 3: Corte longitudinal por el nervio central. Corte 4: Corte transversal y longitudinal. Corte 5: Cortes transversales en 3 partes iguales y corte por el nervio central.

Conviene indicar que en el cultivar LM1 solo pudimos realizar los cortes 1, 2 y 3 debido a la escasa disponibilidad de semillas (tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tipo de corte (1, 2 o 3) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM1. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar LM1				
Corte	Localización	Explantos con yema (%)	Explantos con brote (%)	Nº brotes / explante
Corte 1	Proximal	91,67 ± 0,12 ^(a)	66,67 ± 0,10 ^(a)	1,69 ± 0,21 ^(a)
	Proximal superior	100,00% ± 0,00 ^(a)	20,00 ± 0,13 ^(b)	0,20 ± 0,13 ^(b)
Corte 2	Proximal inferior	40,00% ± 0,16 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
	Distal superior	10,00% ± 0,10 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)	0,00 ± 0,00 ^(b)
	Distal inferior	20,00% ± 0,13 ^(b)	10,00 ± 0,10 ^(b)	0,10 ± 0,10 ^(b)
Corte 3	Derecha+ izquierda	97,92 ± 0,02 ^(a)	33,33 ± 0,07 ^(b)	0,44 ± 0,11 ^(b)

Por lo que respecta al cultivar LM1 y sobre la base de los resultados que se presentan en la tabla 4, se puede concluir que la zona con mayor actividad morfogénica se encuentra en la zona proximal más cercana al hipocotilo. Por el contrario, las zonas más alejadas del hipocotilo tienen menor actividad morfogénica (ver tabla 4, corte 2). Por otro lado, los resultados indican que, en función del cultivar, el empleo de un explante de un determinado tamaño puede tener una enorme importancia sobre la calidad de la respuesta morfogénica que se puede obtener a partir de la región más adecuada del explante (i.e. región proximal). Por ejemplo, en el cultivar LM1, los mejores resultados relacionados con la calidad de la respuesta morfogénica se obtienen empleando el tipo de corte 1. En este sentido, tanto el número de explantes capaces de desarrollar brotes como el número de brotes por explante durante el periodo de cultivo que duró el experimento fueron significativamente mayores respecto a los resultados que se obtuvieron para estas dos variables con otros tipos de corte. Esto se debe principalmente al hecho de que las regiones proximales del corte 2 son excesivamente pequeñas como para generar la máxima calidad de respuesta morfogénica (porcentaje de explantes con brote y número de brotes por explante). Por lo que respecta al corte 3, en el que también se encuentran presentes las regiones proximales del explante, el tamaño del explante puede que sea excesivamente grande para aprovechar el máximo potencial morfogénico. En este sentido, un tamaño de explante demasiado grande reduce el contacto del mismo con el medio de cultivo ya que al crecer se separa de él, lo que

reduce la posibilidad de obtener la máxima respuesta. Por tanto, y por lo que respecta al cultivar LM1, la mejor opción a la hora de abordar cualquiera de las aplicaciones biotecnológicas basadas en la morfogénesis es la realización del corte 1, es decir, elegir la zona de mayor potencial morfogénico de un tamaño aproximadamente igual a la mitad del explante.

Tabla 5. Efecto del tipo de corte (1, 2, 3, 4 o 5) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM3. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar LM3				
Corte	Localización	Explantes con yema (%)	Explantes con brote (%)	Nº brotes / explante
Corte 1	Proximal	91,67 ± 0,12 ^(a)	66,67 ± 0,10 ^(a)	0,88 ± 0,15 ^(a)
Corte 2	Proximal superior	100,00 ± 0,00 ^(a)	65,00 ± 0,11 ^(a)	0,75 ± 0,14 ^(ab)
	Proximal inferior	100,00 ± 0,00 ^(a)	40,00 ± 0,11 ^(b)	0,40 ± 0,11 ^(bc)
	Distal superior	60,00 ± 0,11 ^(b)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Distal inferior	50,00 ± 0,11 ^(bc)	5,00 ± 0,05 ^(c)	0,05 ± 0,05 ^(cd)
Corte 3	Derecha+ izquierda	97,92 ± 0,02 ^(a)	33,33 ± 0,07 ^(b)	0,44 ± 0,11 ^(c)
Corte 4	CP derecha + izquierda	100 ± 0,00 ^(a)	78,13 ± 0,06 ^(a)	1,00 ± 0,11 ^(a)
	CD derecha + izquierda	37,50 ± 0,06 ^(cd)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Corte 5	Proximal (D+I)	96,88 ± 0,03 ^(a)	78,13 ± 0,07 ^(a)	1,03 ± 0,18 ^(a)
	Intermedio (D+I)	50,00 ± 0,09 ^(bc)	3,13 ± 0,03 ^(c)	0,03 ± 0,03 ^(d)
	Distal (D+I)	21,88 ± 0,07 ^(d)	3,13 ± 0,03 ^(c)	0,03 ± 0,03 ^(d)

Los resultados obtenidos en el cultivar LM3 son muy similares a los de LM1. En este sentido, de nuevo, las zonas con mayor potencial morfogénico vuelven a ser las regiones proximales del cotiledón. Sin embargo, es este cultivar en concreto, en el que se pudieron evaluar más tipos de cortes (i.e. cortes 4 y 5), los mejores resultados se obtienen con los cortes 2, 4 y 5. En efecto, aunque el tipo de corte 1 genera una buena respuesta en lo que respecta a la cantidad (nº de explantes con yema) y calidad (porcentaje de explantes con brote y número de brotes por explante) de la respuesta morfogénica, los cortes 2, 4 y 5 permiten obtener un mayor número de plantas en cada experimento. Por ejemplo, respecto al corte tipo 1, con el corte tipo 2 se obtiene la misma cantidad de plantas sólo con el explante proximal superior, a lo que habría que sumarle lo que se puede obtener con el explante proximal inferior, que ofrece una cantidad y calidad morfogénica muy parecida. Algo similar ocurre con los cortes 4 y

5. Como se puede ver en la tabla 5, con esos cortes, la zona proximal ofrece una respuesta similar a la de la zona proximal realizando el corte 1, sin embargo, con los cortes 4 y 5 obtenemos 2 explantes diferentes de esa zona que ofrecen la misma calidad morfogénica (figura 11). Es decir, que, partiendo de 20 plántulas, con el corte 2 tendríamos 40 explantes proximales mientras que con los cortes 4 y 5 tendríamos 80 explantes proximales, todos ellos de calidad morfogénica similar. En definitiva, con los cortes 4 y 5 duplicaríamos la cantidad de plantas regeneradas.

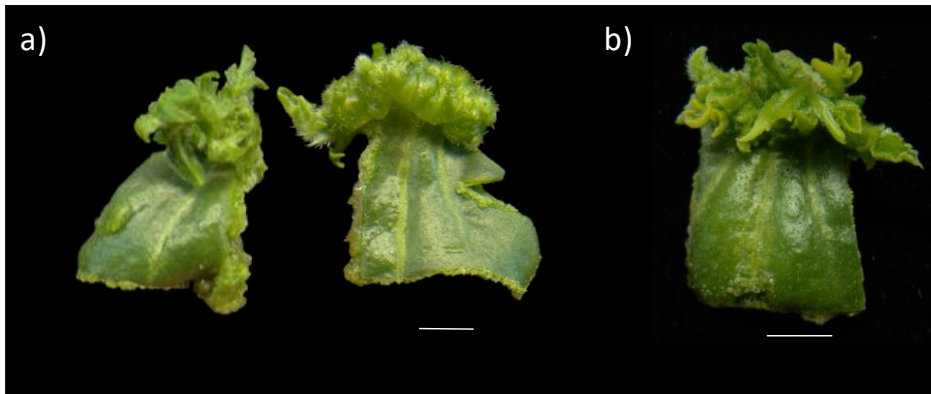


Figura 11. Respuesta morfogénica en la región proximal de un explante de cotiledón de LM3 utilizando el corte tipo 4 (a), con el que se obtienen 2 explantes de la zona proximal respecto a un explante de cotiledón en el que se ha realizado el corte tipo 1 (b).

La línea LM5 vuelve a mostrar un patrón similar a las anteriores, y en este sentido, las zonas proximales dan lugar a una respuesta morfogénica muy alta. En esta línea, a diferencia de las anteriores, el corte tipo 1 genera menor respuesta que los cortes 2, 4 y 5 (ver explantes que desarrollan brotes individualizables en la tabla 6). Es más, en esta línea los cortes que generan mayor potencial morfogénico son los cortes 4 y 5, ya que la región proximal inferior del corte 2 tiene una respuesta aceptable con respecto al porcentaje de explantes que desarrollan yema, pero la calidad de la respuesta es ese explante es nula (ver figura 12 o explantes que desarrollan brotes individualizables y nº de brotes por explante en tabla 6). Por el contrario, al igual que ocurría en la línea LM3, los cortes 4 y 5 permiten obtener 2 explantes diferentes de la zona proximal que ofrecen la misma calidad morfogénica.

Tabla 6. Efecto del tipo de corte (1, 2, 3, 4 o 5) sobre la respuesta morfogénica en el cultivar de sandía LM5. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar LM5				
Corte	Localización	Explantos con yema (%)	Explantos con brote (%)	Nº brotes / explante
Corte 1	Proximal	87,50 ± 0,07 ^(ab)	50,00 ± 0,10 ^(bc)	0,58 ± 0,13 ^(bc)
Corte 2	Proximal superior	100,00% ± 0,00 ^(ab)	87,50 ± 0,09 ^(a)	1,19 ± 0,19 ^(a)
	Proximal inferior	87,50% ± 0,09 ^(ab)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	Distal superior	56,25% ± 0,51 ^(c)	6,25 ± 0,06 ^(d)	0,06 ± 0,07 ^(d)
	Distal inferior	12,50% ± 0,09 ^(d)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Corte 3	Derecha+ izquierda	81,25 ± 0,06 ^(b)	28,13 ± 0,07 ^(cd)	0,5 ± 0,16 ^(c)
Corte 4	CP derecha + izquierda	91,67 ± 0,06 ^(ab)	66,67 ± 0,10 ^(ab)	0,96 ± 0,16 ^(ab)
	CD derecha + izquierda	25,00 ± 0,09 ^(d)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Corte 5	Proximal (D+I)	100,00 ± 0,00 ^(a)	65,63 ± 0,09 ^(ab)	0,91 ± 0,20 ^(ab)
	Intermedio (D+I)	59,38 ± 0,09 ^(c)	9,38 ± 0,05 ^(d)	0,09 ± 0,07 ^(d)
	Distal (D+I)	25,00 ± 0,08 ^(d)	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

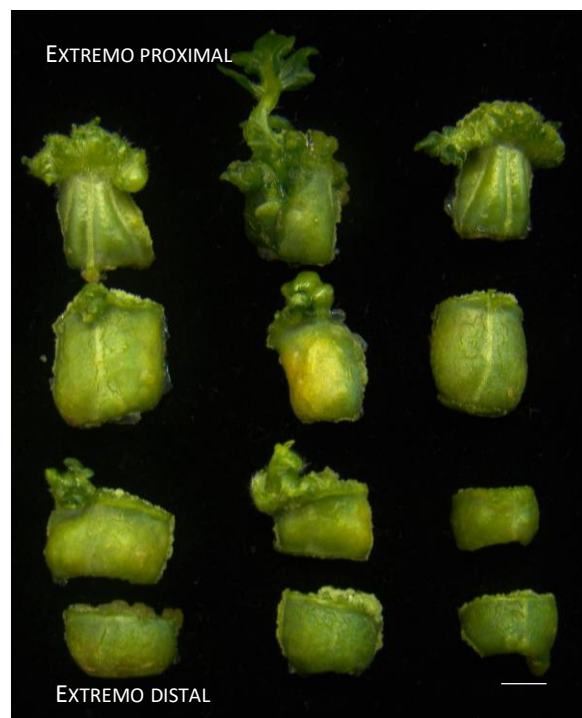


Figura 12. Corte tipo 2 en la línea LM5 a los 30 días de cultivo

Gambley y Dodd (1991) reportaron que, en los cotiledones, disminuye el número de células competentes conforme aumenta la distancia respecto a la zona más proximal. Por otro lado, aunque existe menos bibliografía al respecto, hay estudios que

indican la existencia de diferencias en la capacidad morfogénica atendiendo al eje transversal. En concreto, hay indicios que demuestran que en la zona anexa al nervio central hay mayor número de células con capacidad regenerativa. Sin embargo, se ha reportado que el corte longitudinal de los cotiledones reduce la cantidad de células totipotentes disponibles en cultivares de baja respuesta (Compton, 2000). En este experimento hemos evaluado líneas que han demostrado tener un alto potencial morfogénico, por lo que el efecto negativo del corte longitudinal no se ha observado. Acorde con los resultados de otros autores, nosotros hemos comprobado que en las líneas evaluadas disminuye la capacidad morfogénica a medida que nos acercamos a la zona distal del explante. Pero también hemos podido comprobar que el tipo de corte que se realiza en cada cultivar puede ser determinante a la hora incrementar el rendimiento en el proceso de la regeneración de plantas *in vitro*. En este sentido, en algunos cultivares se obtienen mejores resultados con un tipo de corte (i.e. corte tipo 1) mientras que en otros se obtienen rendimientos mayores con otro tipo de corte (i.e. corte tipo 2, o tipo 4 y 5).

4.4 Estudio del nivel de ploidía en explantes regenerados de sandía

En este último experimento quisimos determinar qué porcentaje de plantas de sandía regeneradas en el anterior experimento habían sufrido cambios numéricos, es decir, cambios en el nivel de ploidía. En las plantas regeneradas, este análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Se analizaron plantas regeneradas de los cultivares LM1, LM3 y LM5 y pudimos comprobar que los resultados eran muy similares en las tres líneas.

Tabla 7. Porcentaje de plantas diploides y tetraploides de los cultivares de sandía LM1, LM3 y LM5. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$; Test LSD).

Cultivar	Plantas diploides (%)	Plantas tetraploides (%)
LM1	53,03 \pm 0,29 ^(a)	46,97 \pm 0,24 ^(a)
LM3	54,69 \pm 0,13 ^(a)	45,31 \pm 0,10 ^(a)
LM5	52,35 \pm 0,13 ^(a)	47,65 \pm 0,12 ^(a)

No se observaron diferencias importantes en los niveles de ploidía de las plantas regeneradas comparando los resultados de las tres líneas (tabla 7). De media, en torno a un 53% de plantas regeneradas eran de constitución diploide y un 47% eran tetraploides. También pudimos comprobar que la mayor parte de los callos morfogénicos generaban tanto plantas diploides como plantas tetraploides (datos no mostrados).

La poliploidía es uno de los cambios somaclonales que aparecen con mayor frecuencia en las plantas regeneradas *in vitro*. La aparición de poliploides en una población de plantas regeneradas *in vitro* puede deberse a dos causas. La principal causa de este fenómeno es la regeneración a partir de células tetraploides preexistentes en el tejido vegetal de partida (mixoploidía). Así, en nuestro laboratorio se comprobó que el porcentaje de plantas diploides y tetraploides regeneradas *in vitro* de sandía (Ellul, 2002) y tomate (San Andrés, 2002) era del mismo orden que la proporción de células diploides y tetraploides del explante a partir del cual se regeneraban las plantas. Alternativamente, la regeneración de plantas tetraploides puede deberse a procesos de endorreducción o endomitosis. En este sentido, se ha demostrado que a lo largo de un proceso de regeneración mediante cultivo *in vitro* pueden producirse cambios genéticos de varios tipos, es lo que se denomina variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981). Esta variación puede traducirse en alteración en el número de cromosomas, cambios estructurales, mutaciones puntuales, recombinación mitótica, transposición o metilación de secuencias en el ADN nuclear, mitocondrial o cloroplástico (Van den Bulk et al., 1990).

Lo interesante es que la regeneración *in vitro* posibilita la obtención de tetraploides sólidos, a diferencia de los tratamientos de yemas con colchicina, que habitualmente conduce al desarrollo de citoquimeras, es decir, partes de los brotes tratados con este producto suelen duplicar el contenido de ADN mientras que otras partes del brote no lo hacen y mantienen la dotación cromosómica inicial. Por tanto, cuando los brotes tratados con colchicina han florecido y se utilizan como parentales para la obtención de triploides, no se puede tener la absoluta certeza de que realmente sean tetraploides, lo que implica un trabajo adicional para corroborar que la progenie obtenida es triploide. Por el contrario, mediante la utilización de plantas tetraploides regeneradas *in vitro* como parentales se puede tener la seguridad de que la progenie que se obtiene es de naturaleza triploide. En definitiva, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la metodología utilizada para la regeneración de plantas *in vitro* es adecuada para generar plantas tetraploides que se pueden utilizar como parentales para la obtención de líneas triploides de sandía (i.e. líneas de sandía sin semilla).

5. CONCLUSIONES

1. La evaluación de diferentes requerimientos culturales y morfogénéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en cultivares de *Citrullus* ha revelado lo siguiente: i) en explantes de cotiledón, la calidad morfogénica de los cotiledones es mayor cuando se emplean plántulas en estadios ontogénicos 3-4, y ii) respecto al empleo de thidiazuron, la 6-benciladenina es más adecuada para promover respuesta morfogénica en los explantes de cotiledón, al menos cuando se combina con el ácido naftalenacético.
2. Los explantes de mayor respuesta morfogénica son los de la zona proximal del cotiledón, mientras que las regiones más distales del cotiledón generan menor respuesta. Además, el tipo de corte que se realiza al explante de cotiledón es determinante a la hora de incrementar el número de plantas regeneradas a partir de un determinado número de explantes de partida y dependiente de cada cultivar. En este sentido, en algunos cultivares se obtiene mayor rendimiento cuando la zona proximal del cotiledón se divide longitudinal o transversalmente en dos explantes, mientras que en otros cultivares los mejores resultados se consiguen empleando toda la zona proximal del explante.
3. Los análisis de ploidía de plantas regeneradas en el medio de cultivo suplementado con ácido naftalenacético y 6-benciladenina a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas en el estadio ontogénico 3-4 han revelado que en torno al 45% de las plantas son tetraploides. Comoquiera que el método de regeneración es eficiente, se podría emplear con éxito para la generación de plantas tetraploides que se pueden utilizar como parentales para la obtención de líneas triploides de sandía (i.e. líneas de sandía sin semilla).

6. BIBLIOGRAFÍA

- AKASHI K, MORIKAWA K Y YOKOTA A (2005):** *Agrobacterium*-mediated transformation system for the drought and excess light stress-tolerant wild watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Biotechnology* 22(1), 13–18
- ALBALAT PERAITA V (2016):** *Sistemas de alto rendimiento en la regeneración in vitro de melón y pepino* (tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia, España.
- ALTHAWADI AM Y GRACE J (1986):** Water use by the desert cucurbit *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Oecologia (Berlin)*, 70: 475-480
- BORDAS M, MONTESINOS C, DABAUZA M, SALVADOR A, ROIG LA, SERRANO R Y MORENO V (1997):** Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and *in vitro* evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6, 41–50
- CHANDRASEKARAN J, BRUMIN M, WOLF D, LEIBMAN D, KLAP C, PEARLSMAN M, SHERMAN A, ARAZI T Y GAL-ON A (2016).** Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*: 17(7), 1140–1153
- CHATURVEDI R Y BHATNAGAR S (2001):** High-frequency shoot regeneration from cotyledon explants of watermelon cv. sugar baby. *In vitro Cell Dev Biol-Plant*. 37: 255-258.
- CHO MA, MOON CY, LIU JR Y CHOI PS (2008):** *Agrobacterium*-mediated transformation in *Citrullus lanatus*. *Biol Plant* 52: 365–369
- CHOI PS, SOH WY, KIM YS, YOO OJ Y LIU JR (1994):** Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 13: 344–348
- COMPTON ME (2000).** Interaction between explant size and cultivar affects shoot organogenic competence of watermelon cotyledons. *HortScience*, 35: 749-750
- COMPTON ME Y GRAY DJ (1993A).** Shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of diploid, triploid, and tetraploid watermelon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118:151–157.

- COMPTON ME Y GRAY DJ (1993B):** Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledons of watermelon. *Plant Cell Rpt.* 12: 61–65.
- COMPTON ME Y GRAY DJ (1994):** Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of tetraploid watermelon. *Hortscience* 29(3):211-213.
- COMPTON ME, GRAY DJ Y ELMSTROM GW (1993):** A simple protocol for micropropagating diploid and tetraploid watermelon using shoottip explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 33: 211–217.
- COMPTON ME, GRAY DJ Y ELMSTROM GW (1994):** Regeneration of tetraploid plants from cotyledons of diploid watermelon. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 107: 107-109
- COMPTON ME, GRAY DJ Y ELMSTROM GW (1996):** Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*. *Euphytica* 87: 165–172
- COMPTON ME, GRAY DJ Y GABA VP (2004):** Use of tissue culture and biotechnology for the genetic improvement of watermelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 231–243
- DABAUZA M, BORDAS M, SALVADOR A, ROIG LA Y MORENO V (1997):** Plant regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of cotyledon explants of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *Plant Cell Rep* 16: 888–892
- DANE F Y LIU J (2007):** Diversity and origin of cultivated and citron type watermelon (*Citrullus lanatus*). *Genet Resour Crop Evol* 54: 1255
- DANE F, LIU J Y ZHANG C (2007):** Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. *Genet Resour Crop Evol* 54:327–336
- DAVIS AR, WEBBER III CL, LIU W, PERKINS-VEAZIE P, LEVI A Y KING S (2013):** Watermelon Quality Traits as Affected by Ploidy. *Hortscience* 48(9):1113–1118
- DONG JZ Y JIA SR (1991):** High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Cell Rep* 9: 559–562
- DUMITRU MG Y TUTUNEA D (2017):** Extraction and determination of physico-chemical properties of oil from watermelon seeds (*Citrullus lanatus* L) to use in internal combustion engines. *Revista de Chimie*, 68: 2676-2681.

- ELLUL P, RIOS G, ATARES A, ROIG LA, SERRANO R Y MORENO V (2003):** The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai]. *Theor Appl Genet* 107:462–469
- ELLUL P (2002):** Morfogénesis *in vitro* y obtención de plantas transgénicas de sandía (*Citrullus lanatus* [Thunb.] Matsum. & Nakai.) (tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, España
- ELLUL P, LELIVELT C, NAVAL MM, NOGUERA FJ, SANCHEZ S, ATARÉS A, MORENO V, CORELLA P, Y DIRKS R (2007):** Watermelon. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 60. Transgenic Crops V* 121-165
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION CORPORATE STATISTICAL DATABASE (2017).** Recuperado de www.fao.org/faostat/es/#data/QC
- FREIRE SEIJO M (2003):** Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, Vol. 3, No. 4: 195 – 209
- HANDRO W Y FLOCH EIS (1990):** A organização de um laboratório de cultura de recidos de plantas. Torres AC & Caldas LD (eds.). Técnicas e aplicações da cultura de tecidos em plantas. ABCTP/EMBRAPA-CNPH, Brasília, Brasil, parte II, pp: 29-36.
- GAMBLEY RL Y DODD WA (1991):** The influence of cotyledons in axillary and adventitious shoot production from cotyledonary nodes of *Cucumis sativus* L. (cucumber). *Journal of Experimental Botany*, 42: (242), 1131-1135.
- Jeffrey C (1990):** Systematic of the *Cucurbitaceae*: An overview. In Bates DM, Robinson RW & Jeffrey C (eds) *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*. Comstock Publication Associates, Cornell University Press, Ithaca, USA.
- KHALEKUZAMAN M, MARUFA KHATUN MST, HARUNUR RASHID M, MOMINUL ISLAM SHEIKH MD, AKHTAR SHARMIN S Y ALAM I (2012):** Micropropagation of an Elite F1 Watermelon (*Citrullus lanatus*) Hybrid from the Shoot Tip of Field Grown Plants *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3), 335-340
- KIHARA H (1951):** Triploid watermelons. *Proc Am Soc Hortic Sci* 58: 217–230

- KRUG MGZ, STIPP LCL, RODRIGUEZ APM Y MENDES BMJ (2005):** *In vitro* organogenesis in watermelon cotyledons. *Pesq agropec bras.* 40: 861-865.
- LAGHETTI G Y HAMMER K (2007):** The Corsican citron melon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai subsp. *lanatus* var. *citroides* (Bailey) Mansf. ex Greb. A traditional and neglected crop. *Genet Resour Crop Evol* (2007) 54:913–916
- LARKIN PJ Y SCOWCROFT WR (1981):** Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoret. Appl. Genetics*, 60: 197
- LI J, LI XM, QIN YG, TANG Y, WANG L, MA C Y LI HX (2001):** Optimized system for plant regeneration of watermelon (*Citrullus lanatus* Thumb.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(48): 9760-9765
- LITZ RE Y JARRET RL (1993)** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En Rocas WM, Mroginski LA (eds), Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones (pp 143-172). Cali, Colombia. Centro Internacional de Agricultura Tropical
- LIU L, GU Q, IJAZ R, ZHANG J Y YE Z (2016):** Generation of transgenic watermelon resistance to Cucumber mosaic virus facilitated by an effective Agrobacterium -mediated transformation method. *Sci Horti* 205: 32–38
- MASHILO J, SHIMELIS H, ODINDO AO Y AMELEWORK B (2017):** Genetic diversity and differentiation in citron watermelon [*Citrullus lanatus* var. *citroides*] landraces assessed by simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 214: 99–106
- MORENO V, GARCÍA-SOGO M, GRANELL I, GARCÍA-SOGO B, Y ROIG LA (1985):** Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L. cv. *Amarillo Oro*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5: (2), 139-146.
- MURASHIGE T Y SKOOG. F (1962):** A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco-tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497
- NISHIBAYASHI S, KANEKO S Y HAYAKAWA T (1996):** Transformation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants using *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration from hypocotyl explants. *Plant Cell Reports* 15:809-814

- NOH J, SHEIKH S, CHON HG, SEONG MH, LIM JH, LEE SG, JUNG GT, KIM JM, JU H Y HUH YC (2012):** Screening different methods of tetraploid induction in watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai]. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53: 521
- PAL A, KACHHWAHA SS, MAJI S Y BABU MKG (2010):** Thumba (*Citrullus colocynthis*) seed oil for biodiesel. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 69: 384-389
- PATEL S Y RAUF A (2017):** Edible seeds from Cucurbitaceae family as potential functional foods: Immense promises, few concerns. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 91 (2017) 330–337
- PUIG ROJAS NM Y TAGLE MERCHAN JL (2010):** Industrialización de la *Citrullus Vulgaris* (sandía) (tesis de maestría). Universidad de Guayaquil (Ecuador)
- SAN ANDRÉS V (2002):** Introducción del gen AtNHX1 relacionado con la tolerancia a la salinidad en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Universidad Politécnica de Valencia (España)
- SAROWAR S, OH HY, HYUNG NI, MIN BW, HARN CH, YANG SK, ET AL (2003):** *In vitro* micropropagation of a Cucurbita interspecific hybrid cultivar- a root stock plant. *Plant Cell Tiss Org Cult.* 75: 179-182.
- SATYAVANI K, RAMANATHAN T Y GURUDEEBAN S. (2011):** Effect of Plant Growth Regulators on Callus Induction and Plantlet Regeneration of Bitter Apple (*Citrullus colocynthis*) from Stem Explant. *Asian Journal of Biotechnology*, 3: 246-253.
- SAWAYA, WN, DAGHIR NJ Y KHAN P (1983):** Chemical characterization and edibility of the oil extracted from *Citrullus colocynthis* seeds. *J. Food Sci.* 48: 104-106.
- SHASTHREE T, RAMAKRISHNA D, IMRAN MA Y CHANDRASHEKAR CH (2014):** Adventitious Shoot Organogenesis and Plant Regeneration from Leaf and Cotyledon Explants of *Citrullus colocynthis*. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 20:3, 235-244
- SHEIKH S, NOH J, SEONG MH, JUNG GT, KIM JM, JU H Y HUH YC (2013):** Phenotypic markers for tetraploid watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai] following parental exposure to colchicine in T0 generation. *Hort. Environ. Biotechnol.* 54(6):524-530

- SOUZA FVD, GARCIA-SOGO B, SOUZA ADS, SAN-JUÁN AP Y MORENO V (2006):** Morphogenetic response of cotyledon and leaf explants of melon (*Cucumis melo L.*) cv. Amarillo Oro. *Braz Arch Biol Tech.* 49(1): 21-27.
- SRIVASTAVA DR, ANDRIANOV VM, Y PIRUZIAN ES (1989):** Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. CV. Melitopolski). *Plant Cell Rpt.* 8: 300-302
- SURATMAN F, HUYP F Y PARVEEZ GKA (2009):** *In vitro* shoot regeneration of *Citrullus Vulgaris* Schrad (watermelon). *Biotechnology*, 8: 393-404.
- TEIXEIRA DA SILVA JA Y HUSSAIN AI (2017):** *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. (colocynth): Biotechnological perspectives. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29 (2): 83-90
- THIES JA Y LEVI A (2007):** Characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* var. *citroides*) germplasm for resistance to root-knot nematodes. *Hortscience* 42(7):1530–1533.
- TIAN S, JIANG L, GAO Q, ZHANG J, ZONG M, ZHANG H, YI REN, SHAOGUI GUO, GUOYI, GONG, FAN LIU Y YONG XU (2017):** Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon. *Plant Cell Rep* (2017), 36:399–406
- VAN DEN BULK RW, LÖFFLER HJM, LINDHOUT WH Y KOORNNEEF M (1990):** Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoret. Appl. Genetics* 80: 817
- WANG X, SHANG L Y LUAN F (2013):** A highly efficient regeneration system for watermelon (*Citrullus Lanatus* Thunb.) *Pak. J. Bot.*, 45(1): 145-150
- ZHAO S, CAO HS, KONG QS, HUANG Y Y BIE ZL (2015):** Establishment of cotyledon explants regeneration system in wild watermelon. *Acta Hort*, 1086: 87-92