



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Morfogénesis en cultivo in vitro de cultivares autóctonos de melón



Alba Górriz Bosch

Valencia, junio 2019

Tutores: Dr. Vicente Moreno Ferrero
Dr. Benito José Pineda Chaza
Director experimental: Dr. Carlos Ribelles Alfonso

Universidad Politécnica de Valencia, ETSIAMN
Grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Resumen

TÍTULO: Morfogénesis en cultivo *in vitro* de cultivares autóctonos de melón

RESUMEN: Los cultivares tradicionales de melón, como el ‘Meló Groc d’Ontinyent’ o el ‘Meló Blanc de El Perelló’, se han convertido en los últimos años en piezas codiciadas entre los consumidores aficionados a la buena mesa, sobre todo por su carne compacta y dulce, de color amarillo o blanco, y con un equilibrado contenido en azúcares. Estas líneas, cuyo cultivo se había reducido con el paso de los años, están siendo recuperadas actualmente. Los cultivares tradicionales destacan por su calidad y adaptación a nuestras condiciones ambientales, aunque carecen de resistencia a enfermedades y plagas, así como tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico cuya incidencia y severidad está aumentando en el marco actual del cambio climático global. La mayoría de las fuentes de resistencia son accesiones silvestres o tipos no comerciales, que son muy diferentes a los cultivares de importancia económica, como los ‘Piel de Sapo’ o ‘Cantalupo’. La introgresión de los genes de resistencia desde estas fuentes de variación mediante el método clásico de retrocruzamiento supondría años de selección y mejora, a fin de eliminar los genes indeseables que residen en el genoma de las fuentes de variación y recuperar las buenas características agronómicas de los cultivares tradicionales. Además, los estudios de re-secuenciación de genomas han mostrado que en los cultivares procedentes de un programa de retrocruzamiento quedan muchos más genes del donante de lo que nadie imaginaba. El reciente desarrollo de las técnicas de edición génica derivadas del sistema CRISPR/Cas ha abierto la posibilidad de introducir resistencia a ciertos tipos de estrés en cultivares tradicionales de forma rápida y sencilla, y sin provocar alteraciones en la excelente calidad y adaptación de estos cultivares. Sin embargo, para aplicar esta tecnología es necesario disponer de sistemas eficientes y reproducibles que permitan la regeneración en cultivo *in vitro* a partir del material de partida. El principal objetivo de este Trabajo Final de Grado ha sido avanzar en el conocimiento de los requerimientos culturales y morfogenéticos de cultivares tradicionales de melón, principalmente oriundos de la Comunidad Valenciana. Los resultados obtenidos han permitido determinar las condiciones más adecuadas para la regeneración de plantas en cada uno de estos cultivares.

PALABRAS CLAVE: Cultivo *In Vitro*; Cultivares Tradicionales de Melón; Meló Groc d’Ontinyent; Meló Blanc de El Perelló; Morfogénesis; Regeneración

AUTORA: Dña. Alba Górriz Bosch

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, junio de 2019

TUTORES: D. Vicente Moreno Ferrero, D. Benito José Pineda Chaza

DIRECTOR EXPERIMENTAL: D. Carlos Ribelles Alfonso

Abstract

TITLE: Morphogenetic response of traditional melon cultivars.

ABSTRACT: Traditional melon cultivars, such as the ‘Meló Groc d’Ontinyent’ or the ‘Meló Blanc de El Perelló’, have become in the last few years coveted pieces among the consumers fond of good food in the last years, especially for their compact and sweet meat, yellow or white with a balanced sugar content. These lines, whose cultivation had been reduced over the years, are currently being recovered. Traditional cultivars stand out for their quality and adaptation to our environmental conditions, although they lack resistance to diseases and pests, as well as tolerance to various types of abiotic stress whose incidence and severity is increasing in the current framework of global climate change. Most sources of resistance are wild accessions or non-commercial types, which are very different from economically important cultivars, such as ‘Piel de sapo’ or ‘Cantalupo’. The introgression of resistance genes from these sources of variation through the classic method of retrocrossing would mean years of selection and improvement, in order to eliminate the undesirable genes that reside in the genome of the sources of variation and recover the good agronomic characteristics of traditional cultivars. In addition, studies of genome re-sequencing have shown that in the cultivars coming from a retrocrossing program there are many more genes of the donor than anyone imagined. The recent development of gene editing techniques derived from the CRISPR/Cas system has opened the possibility of introducing resistance to certain types of stress in traditional cultivars in a fast and simple way, without causing alterations in the excellent quality and adaptation of these cultivars. However, to apply this technology it is necessary to have efficient and reproducible systems that allow regeneration *in vitro* culture from the starting material. The main objective of this project has been to advance the knowledge of the cultural and morphogenetic requirements of traditional melon cultivars, mainly native to the Valencian Community. The results obtained have allowed to determine the most suitable conditions for the regeneration of plants in each one of these cultivars.

KEYWORDS: *In vitro* culture; Traditional melon cultivars; Meló Groc d’Ontinyent; Meló Blanc de El Perelló; Morphogenesis; Regeneration

Resum

TÍTOL: Morfogènesi en cultiu in vitro de cultivars autòctons de meló

RESUM: Els cultivars tradicionals de meló, com el 'Meló Groc d'Ontinyent' o el 'Meló Blanc de El Perelló', s'han convertit en els últims anys en peces cobejades entre els consumidors aficionats a la bona taula, principalment per la seua carn compacta i dolça, de color groc o blanc, i amb un equilibrat contingut en sucres. Estes línies, el cultiu de les quals s'havia reduït amb el pas del anys, estan sent recuperades actualment. Els cultivars tradicionals destaquen per la seua qualitat i adaptació a les nostres condicions ambientals, encara que no posseïsquen resistència a malaties i plagues, així com tolerància a diversos tipus d'estrés abiòtic, incidència i severitat de les quals està augmentant en el marc actual del canvi climàtic global. La majoria de les fonts de resistència són accesions silvestres o tipus no comercials, que són molt diferents dels cultivars d'importància econòmica, com els 'Piel de Sapo' o 'Cantalupo'. La introgressió dels gens de resistència des d'estes fonts de variació per mitjà del mètode clàssic de retrocruztament suposaria anys de selecció i millora, a fi d'eliminar els gens indesitjables que resideixen en el genoma de les fonts de variació i recuperar les bones característiques agronòmiques dels cultivars tradicionals. A més, els estudis de reseqüenciació de genomes han mostrat que en els cultivars procedents d'un programa de retrocruztament queden molts més gens del donant del que ningú imaginava. El recent desenvolupament de les tècniques d'edició gènica derivades del sistema CRISPR/Cas ha obert la possibilitat d'introduir resistència a certs tipus d'estrés en cultivars tradicionals de forma ràpida i senzilla, i sense provocar alteracions en l'excel·lent qualitat i adaptació d'estos cultivars. No obstant això, per a aplicar esta tecnologia és necessari disposar de sistemes eficients i reproduïbles que permeten la regeneració en cultiu in vitro a partir del material de partida. El principal objectiu d'aquest Treball Final de Grau ha sigut avançar en el coneixement dels requeriments culturals i morfogènics de cultivars tradicionals de meló, principalment oriünds de la Comunitat Valenciana. Els resultats obtinguts han permés determinar les condicions més adequades per a la regeneració de plantes en cadascun d'aquestos cultivars.

PARAULES CLAU: Cultiu *In Vitro*; Cultivars Tradicionals de Meló; Meló Groc d'Ontinyent; Meló Blanc de El Perelló; Morfogènesi; Regeneració

Índice general

RESUMEN.....	III
SUMMARY	V
RESUM	VII
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Melón: descripción morfológica.....	1
1.2. Importancia económica.....	2
1.3. La producción ecológica en España.....	2
1.3.1. Variedades comerciales para el cultivo ecológico	3
1.3.2. Variedades tradicionales para el cultivo ecológico	4
1.4. Regeneración <i>in vitro</i> de melón	4
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Material vegetal.....	9
3.2. Técnicas básicas de cultivo <i>in vitro</i>	9
3.2.1. Esterilización	9
3.2.2. Germinación.....	9
3.2.3. Obtención de plantas axénicas.....	9
3.3. Nomenclatura y composición de los medios de cultivo	10
3.3.1. Nomenclatura de los medios de cultivo	10
3.3.2. Composición de los medios de cultivo.....	10
a) Medio de cultivo para la germinación	10
b) Medio de cultivo para la inducción de la morfogénesis.....	10

c) Medio de cultivo para el enraizamiento de ápices	10
d) Medio de cultivo para la elongación de brotes	10
3.4. Evaluación de la respuesta morfogénica	10
3.4.1. Inducción de organogénesis a partir de cotiledones y ápices	10
3.4.2. Inducción de organogénesis a partir de hojas	11
3.5. Determinación del nivel de ploidía de las plantas regeneradas mediante citometría de flujo	12
3.6. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis	12
3.7. Tratamiento estadístico.....	13
4. RESULTADOS	15
4.1. Evaluación de la tasa de germinación y de la calidad de la semilla	15
4.2. Caracterización de los distintos estados ontogénicos.....	16
4.3. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogénica en melón.....	16
4.3.1. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogénica en cotiledón	17
4.3.2. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogénica en ápices	18
4.4. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogénica	20
4.4.1. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogénica en cotiledón	20
4.4.2. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogénica en ápice	22
4.5. Empleo de microexplantes de hoja para la regeneración de plantas	23
4.6. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en melón	25
4.6.1. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en cotiledón.....	25
4.6.2. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en ápice	26
4.7. Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas a partir de cotiledón	27
5. DISCUSIÓN	29
5.1. Importancia de la calidad de la semilla y de la caracterización del estadio ontogénico... 29	
5.2. Efecto de la composición del medio de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogénica	30
5.3. Importancia del tipo de explante para la obtención de respuesta morfogénica.....	32
5.4. El nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	33
6. CONCLUSIONES	35
7. BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. A) tallo con fruto maduro, B) hoja, C) flor, D) fruto.....	2
Figura 2	Algunas de las líneas de melón más comunes. A) Blanco, B) Amarillo oro y C) Cantalupo.....	3
Figura 3	Detalle del corte de los explantes de cotiledón y ápice	11
Figura 4	Detalle del corte de hoja	11
Figura 5	Índices CD y ORG utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.....	12
Figura 6	Detalle de contaminación endógena en semillas de la línea I102 tras 48h en oscuridad. A y C) Botes con semillas. B y D) Después de ser retiradas	15
Figura 7	Estadios ontogénicos de las plántulas de melón de la línea PST5.....	16
Figura 8	Explantes de cotiledón (haz y envés) de la línea MGO tras 25 días de cultivo en medio IB (A) y NB (B). Escala de barras: 1 cm.....	18
Figura 9	Explantes de ápice de la línea MGO. A) Inhibición de dominancia apical en los medios IB y NB y B) Desarrollo normal del ápice en medio MB3. Escala de barras: 1 cm.	19
Figura 10	Explantes de cotiledón de la línea PST5 (de izq. a dcha.) en los medios IZ, IrZ e IKZ (A) y en el medio IBZ (B). Detalle de explantes de cotiledón tras 25 días en medio IZ (C) e IBZ (D). Escala de barras: 1 cm (A y B), 5 mm (C y D).	21
Figura 11	Cultivo de ápices de la línea MGO en A) IKZ, B) IrZ y C) IZ, donde no se inhibió el desarrollo apical y en el medio IBZ donde sí se inhibió (D y E). F) Detalle de las yemas formadas en el ápice. Escala de barras: 1 cm (E), 1mm (F).	23
Figura 12	Microexplantes de hoja de la línea BL. A y B) en IBZ tras 25 días de cultivo, D y E) tras 50 días de cultivo. Detalle de las yemas observadas tras 25 días de cultivo (C) y tras 50 días (F). Escala de barras: 5 mm (B y E), 1 mm (C y F).	24
Figura 13	Explantes de cotiledón de la línea MGO tras 25 días de cultivo. A y B) en el medio ImT, C y D) en el medio IBZ. Escala de barras: 1 cm.	26
Figura 14	Ápices de la línea PST5 en medio ImT. A) Placa completa con explantes y B) Detalle de un explante. Escala de barras: 1 cm.	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Superficie de agricultura ecológica (clasificada por comunidades autónomas) según el MAPA en el año 2017.....	3
Tabla 2	Porcentaje de semilla de calidad, tasa de contaminación endógena y germinación aberrante en las diferentes líneas de melón.....	15
Tabla 3	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón en las diferentes líneas de melón (25 días).....	17
Tabla 4	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón en las diferentes líneas de melón (50 días).....	18
Tabla 5	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días).....	19
Tabla 6	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón (25 días).....	20
Tabla 7	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón (50 días).....	21
Tabla 8	Elongación de brotes en FCu en las distintas líneas de melón (75 días).....	22
Tabla 9	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (25 días).....	22
Tabla 10	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días).....	23
Tabla 11	Inducción de la morfogénesis a partir de microexplantes de hoja de las diferentes líneas de melón en IBZ (25 días).....	24
Tabla 12	Inducción de la morfogénesis a partir de micro-explantes de hoja de las diferentes líneas de melón en IBZ (50 días).....	24
Tabla 13	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón en ImT (25 días).....	25
Tabla 14	Elongación de brotes en FCu en las distintas líneas de melón (50 días).....	25
Tabla 15	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (25 días).....	26
Tabla 16	Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días).....	27
Tabla 17	Análisis del nivel de ploidía de plantas regeneradas en experimentos de morfogénesis.....	27

1. Introducción

1.1. Melón: descripción morfológica.

El melón es una planta herbácea, anual, con porte rastrero o trepador, ya que puede ser entutorada gracias a los zarcillos caulinares sencillos que emite por las axilas de las hojas (Mármol, 2007). La parte aérea de la planta consta de un tallo principal sarmentoso de color verde, flexible y ramificado, recubierto de formaciones pilosas. Puede llegar a medir 3-4 metros de longitud y ramifica a corta distancia del suelo produciendo ramas laterales (Zapata et al, 1989). Las hojas son simples y lobuladas, alternas con peciolo largo de 10-15 cm (Mármol, 2007) y con los bordes dentados de forma y tamaño variables (Zapata et al, 1989). En la axila de cada hoja pueden brotar nuevos tallos, lo que conlleva a una mayor ramificación de la planta.

Por lo que respecta al sistema radicular, la planta presenta raíces muy abundantes y ramificadas con un rápido desarrollo, teniendo su mayor densidad a la profundidad de 30-40 cm del suelo (Zapata et al, 1989). En algunas especies, las raíces pueden llegar a superar el metro de profundidad.

Las flores son pedunculadas, solitarias y emergen de las axilas, con pétalos de color amarillento. Dependiendo de la planta, puede presentar tres tipos de flores: masculinas, femeninas y hermafroditas. Las flores masculinas aparecen en los tallos primarios, las femeninas y hermafroditas aparecen más tarde, en los nudos de las ramificaciones secundarias o terciarias, acompañadas generalmente de flores masculinas. Cuando se inicia la floración, la apertura de flores tiene lugar a primera hora de la mañana, permaneciendo las flores pistiladas receptivas durante 2-3 días (Gómez-Guillamón et al., 1997).

El fruto de melón es una baya denominada pepónide de dimensiones muy variables (Chaux y Foury, 1992) en la que la epidermis presenta diferentes coloraciones y texturas (i.e. lisa, rugosa o reticulada). La placenta, dividida en 3-4 lóbulos dobles, contiene las semillas recubiertas de una sustancia pegajosa, éstas ocupan la cavidad central del fruto, son fusiformes, aplastadas y de color blanco o amarillento, pudiendo existir entre 200 y 600 por fruto (Maroto, 1995). Finalmente, la pulpa, que puede ser blanquecina, verdosa, asalmonada o anaranjada (figura 1D).

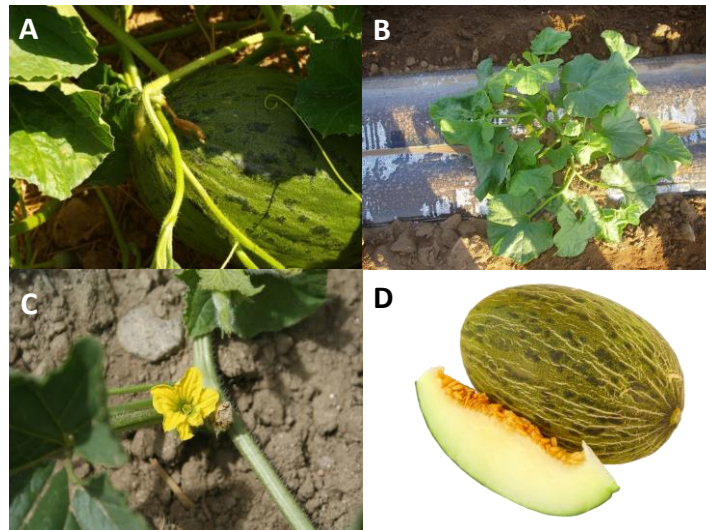


Figura 1. Algunos detalles morfológicos de la planta de melón. A) tallo con fruto maduro, B) hoja, C) flor, D) fruto.

1.2. Importancia económica

El melón es una especie de relevancia económica en España. Su producción se concentra principalmente en Castilla la Mancha, Murcia, Andalucía, La Comunidad Valenciana y Extremadura. Dado que las condiciones requeridas para el cultivo del melón se cumplen en numerosos puntos del planeta, es una especie ampliamente distribuida. La mitad de la producción mundial se localiza en Asia, más concretamente en China, con 17 millones de toneladas (FAO, 2017), seguido por Turquía, Irán y Egipto. Los últimos datos disponibles (2017) sitúan a España como el octavo productor mundial, con 655.677 toneladas, siendo el mayor productor de la Unión europea. Además, y por lo que respecta a las exportaciones, España ha sido en 2016 el líder en el ranking mundial con 444.000 toneladas, siendo Francia, Alemania, Reino Unido, Holanda y Portugal los países receptores más importantes. Esto refleja la importancia económica de esta especie para nuestro país y la enorme demanda por parte del consumidor, tanto nacional como extranjero.

1.3. La producción ecológica en España

La agricultura ecológica, según la definición del Comité de Agricultura Ecológica de la Comunidad Valenciana (CAECV), es un sistema de producción y elaboración que tiene como objetivo la obtención de alimentos de óptima calidad, libres de residuos y con un mínimo impacto humano en el medio ambiente. Algunos de los objetivos que persigue la agricultura ecológica son: i) producir alimentos de máxima calidad, tanto sanitaria como organoléptica, ii) preservar la seguridad alimentaria, iii) ser sostenible con el medio ambiente, iv) aumentar o mantener la fertilidad de los suelos manteniendo la diversidad genética del sistema agrario y su entorno (<http://www.caecv.com>).

La superficie dedicada al cultivo ecológico en España alcanzó las 2.082.172 hectáreas dedicadas a la agricultura o ganadería ecológica durante el año 2017 (tabla 1). Según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Andalucía, Castilla-La Mancha y Cataluña son las tres comunidades que lideran la producción agraria en España, manteniéndose como el primer país de la Unión Europea en superficie agrícola dedicada a este método de producción y uno de los cinco más importantes del mundo. La Comunidad Valenciana se sitúa en el séptimo lugar, justo detrás de Castilla y León.

Tabla 1. Superficie de agricultura ecológica (clasificada por comunidades autónomas) según el MAPA en el año 2017.

Comunidad Autónoma	Calificada en primer año de Prácticas (a)	Calificada en conversión (b)	Calificada en agricultura ecológica (c)	SUPERFICIE TOTAL (a+b+c)
ANDALUCÍA	33.846,95	93.872,41	846.673,51	974.392,86
ARAGÓN	3.784,34	5.579,64	47.521,22	56.885,20
ASTURIAS	1.124,79	845,434	10.783,87	12.754,10
BALEARES	1.749,61	3.102,58	27.495,52	32.347,71
CANARIAS	99,32	355,6	6.152,92	6.607,84
CANTABRIA	39,349	37,79	3.092,02	3.169,16
CASTILLA-LA MANCHA	22.393,94	85.796,71	264.203,52	372.394,17
CASTILLA Y LEÓN	6.348,13	9.578,86	26.732,46	42.659,45
CATALUÑA	27.255,53	26.256,07	147.238,15	200.749,75
EXTREMADURA	20.937,32	6.046,87	67.534,00	94.518,19
GALICIA	1.739,51	7.251,45	22.924,99	31.915,96
MADRID	273,246	443,9773	9.348,02	10.065,24
MURCIA	1.992,56	8.900,12	69.884,20	80.776,88
NAVARRA	7.507,17	3.160,53	46.643,75	57.311,45
LA RIOJA	253,2776	293,4148	4.356,36	4.903,05
PAÍS VASCO	919,5	425,6	2.899,00	4.244,10
COMUNIDAD VALENCIANA	4.490,68	12.218,81	79.768,20	96.477,69
TOTAL NACIONAL (ha)	134.755,23	264.165,86	1.683.251,70	2.082.172,80

1.3.1. Variedades comerciales para el cultivo ecológico

La producción de melón ecológico se encuentra en auge en España. En el año 2017, solo en Castilla-La Mancha se cultivaron más de 263 hectáreas, obteniéndose una producción que superó las 4.795 toneladas. De entre las variedades comerciales más cultivadas en esta región destaca el melón Piel de sapo, presentando forma ovalada y color verde grisáceo con moteado negro, tamaño medio y pulpa de color blanquecino. Otra de las variedades importantes es el melón *Charentais* o Cantalupo, que presenta una forma redondeada, aunque ligeramente achatada y un tamaño pequeño. La piel es amarilla, con líneas longitudinales, y su pulpa es de un color anaranjado (figura 2c).



Figura 2. Algunas de las líneas de melón más comunes. A) Blanco, B) Amarillo oro y C) Cantalupo.

1.3.2. Variedades tradicionales para el cultivo ecológico

Las variedades tradicionales de un cultivo son aquellas que se han diferenciado a través de un proceso histórico de selección por parte de agricultores, teniendo en cuenta los factores locales, usos y cualidades específicas (i.e. sabor y olor) y no estrictamente criterios comerciales. Generalmente estas variedades están adaptadas a las condiciones ambientales de la zona de cultivo y se encuentran fuertemente asociadas a los usos tradicionales, al conocimiento, a los hábitos y a los ritos de los agricultores que la seleccionan y cultivan (Negri, 2000). Además, suponen un gran patrimonio genético fuente de biodiversidad agrícola.

El melón amarillo de Onteniente es una variedad autóctona de la ciudad valenciana de Onteniente (figura 2b). Es un melón de piel amarilla y carne compacta, dulce y blanca, y con un equilibrado contenido en azúcares. Estas características lo hacen muy demandado por la restauración de alta gama o fruterías *gourmet*. Según estudios realizados por el Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV), otra característica destacable del melón amarillo de Onteniente es que tiene una pureza genética excepcional dado que no se ha hibridado nunca con otras especies (Lázaro *et al.* 2016).

El melón blanco es un cultivar de ciclo medio que presenta frutos grandes con forma ovalada, siendo la piel prácticamente blanca y lisa (figura 2a). En su interior, el color de la carne también es blanco y en ocasiones ligeramente verdoso con muy buena consistencia. Es ampliamente cultivado a nivel mundial, conocido como *honeydew*, sin embargo, existen pequeñas poblaciones como El Perelló que han mantenido su propia variedad durante siglos, confiriéndole la clasificación de variedad tradicional.

1.4. Regeneración *in vitro* de melón.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales para la regeneración de plantas se basa en el cultivo de explantes en un medio de cultivo de composición definida bajo unas condiciones de fotoperiodo y de temperatura controladas. Por consiguiente, la morfogénesis es el resultado de la división y diferenciación de células organizadas, con patrones definidos, y, básicamente, depende de factores como el genotipo de la planta de origen, la composición del medio de cultivo, las condiciones de cultivo y de la actividad y expresión de determinados genes (Handro & Floch, 1990).

La regeneración de plantas se puede producir mediante dos vías: la embriogénesis somática y la organogénesis.

La embriogénesis somática se basa en la formación de estructuras con crecimiento bipolar a partir de células somáticas (Mathews *et al.*, 1993). En plantas dicotiledóneas, como el melón, el desarrollo de embriones somáticos atraviesa 4 fases diferentes: fase globular, fase de corazón, fase torpedo y fase cotiledonaria. La diferencia respecto al desarrollo de un embrión cigótico radica en que los embriones adventicios carecen de suspensor, por lo que tienen autonomía respecto al tejido que les dio origen y pueden ser fácilmente separados de él por carecer de conexión vascular con el mismo. Además, a diferencia de los embriones cigóticos, presentan el mismo genoma que la planta de la que proceden, por lo que esta vía es ampliamente utilizada como método de propagación.

En melón se han logrado obtener embriones somáticos a partir de tejidos procedentes de explantes de cotiledón (Moreno *et al.*, 1985; Melara & Gatica Arias, 2009), hipocótilo (Moreno *et al.*, 1985; Tabei *et al.*, 1991), hoja (Tabei *et al.*, 1991), peciolo (Tabei *et al.*, 1991), y también a partir de diversos tipos de protoplastos (García-Sogo, 1990; Debejaujon & Branchard, 1992) y de embriones cigóticos (Ezura & Ooswa, 1994).

Por otra parte, la organogénesis produce un crecimiento celular de tipo unipolar, dando lugar a estructuras de tipo caulinar o radicular (Hossain *et al.*, 1993). Estas formaciones se obtienen a partir de explantes o callos procedentes de explantes o protoplastos (Litz & Jarret, 1991). El aislamiento de un fragmento de tejido de una planta y la puesta en contacto del mismo con un medio de cultivo, con determinadas concentraciones de nutrientes y reguladores de crecimiento, causa que se pierda el control que unas células ejercen sobre otras en el organismo completo. En consecuencia, dado que se pierden los controles que reprimen la división de

células especializadas, las células recuperan la capacidad de división, pudiendo así, expresar los patrones de diferenciación que conducen a la regeneración de plantas enteras (Handro & Floh, 1990).

En melón, se ha logrado la obtención de plantas completas mediante organogénesis a partir de fragmentos de cotiledón (Moreno *et al*, 1985; Núñez-Paleniús *et al*, 2006; Núñez-Paleniús *et al*, 2007), de hipocótilo (García-Sogo, 1990; Tabei *et al*, 1991), de hoja (Orts *et al*, 1986; García-Sogo, 1990; Yadav *et al*, 1996), de raíces (Kathal *et al*, 1994), de pecíolos (Punja *et al*, 1990a), de tallos (García-Sogo, 1990), de epicótilos (Jain & More, 1992); y de ápices caulinares (Adelberg *et al*, 1994). Además, cabe destacar la regeneración organogénica a partir de protoplastos (Moreno *et al*, 1985; García-Sogo, 1990).

Con independencia del tipo de ruta, la regeneración de plantas se puede producir a través de tres procesos morfogénicos. Si la formación de estructuras celulares organizadas va antecedida por 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, si las estructuras organogénicas se originan sin la fase de formación de callo se tratará de un tipo de morfogénesis denominada directa. Asimismo, se puede obtener un estado intermedio en el que, tras una fase corta de divisiones celulares, se regeneran las estructuras organogénicas, dando lugar a lo que se denomina morfogénesis semidirecta. Es importante el tipo de regeneración dado que la morfogénesis directa va a garantizar la estabilidad genética, es decir, las estructuras vegetales regeneradas serán idénticas al material vegetal de partida, mientras que durante la morfogénesis indirecta se puede producir variación somaclonal.

La regeneración *in vitro* de plantas requiere de la estimulación del explante con diversos reguladores de crecimiento. Se suelen utilizar dos tipos diferentes para inducir la morfogénesis: i) Auxinas para inducir el crecimiento o enraizamiento de la planta y ii) Citoquininas para promover la división y diferenciación celular. Entre las auxinas, destacan por su uso el ácido 1-naftalenacético (ANA) y el ácido indolacético (IAA) y, por lo que respecta a las citoquininas, las más empleadas son, entre otras, la 6-benciladenina (BA) y la quinetina (Kin). La zeatina (Z) se emplea cada vez más en algunas solanáceas, pero no ha encontrado bibliografía que ponga de manifiesto su uso en cucurbitáceas. Quizá, la menos conocida sea el meta-topoline (mT), citoquinina que se describió hace años como posible sustituta a la benciladenina (Strnad *et al*, 1997), pero que es poco corriente encontrar en trabajos de regeneración *in vitro*.

2. Antecedentes y Objetivos

Para poder abordar las diferentes aplicaciones derivadas del cultivo *in vitro*, es necesario disponer de sistemas eficientes y reproducibles que permitan la regeneración de plantas. Como resultado de los estudios sobre morfogénesis en melón, el grupo había desarrollado métodos reproducibles que posibilitan la regeneración de plantas a partir de explantes primarios (García-Sogo, 1990; Albalat, 2016). En estos estudios se pudo constatar que la adición de sulfato de cobre a determinadas concentraciones (i.e. 1 mg/L) tiene un efecto muy favorable sobre la morfogénesis generada en los explantes de melón (García-Sogo, 1990). Por ello, en este trabajo es uno de los componentes básicos de los medios de cultivo que se han evaluado. En este contexto, y sobre la base de los estudios previos realizados por el grupo, el presente trabajo se ha centrado en el efecto de distintos tipos de explante y reguladores de crecimiento sobre la morfogénesis en líneas comerciales y tradicionales de melón que se emplean para el cultivo ecológico. Además, se ha evaluado la idoneidad del meta-Topoline, un nuevo regulador de crecimiento con efecto citoquinínico que hasta la fecha no se había empleado en melón, para inducir respuesta morfogenética en esta especie.

En este marco general, los objetivos concretos de este proyecto han sido los siguientes:

1. Evaluar la tasa de germinación y la calidad de los lotes de semillas.
2. Caracterizar el estado ontogénico de las plántulas *in vitro*.
3. Evaluar el efecto del tipo de explante y de los reguladores de crecimiento sobre la respuesta morfogenética.
4. Evaluar el efecto del meta-Topoline sobre la respuesta morfogenética en melón
5. Determinar el nivel de ploidía de plantas axénicas de melón regeneradas *in vitro*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Como material vegetal de partida se han utilizado semillas de melón procedentes del banco de germoplasma del COMAV. En este trabajo se han evaluado 2 variedades comerciales: “Piel de sapo” (PST5) y “Cantalupo Vendrantais” (I102); y 2 variedades tradicionales: “Meló Groc d’Ontinyent” (MGO) y “Blanc de El Perelló” (BL), todas ellas siendo de elevado interés para el cultivo ecológico.

3.2. Técnicas básicas 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. Para ello, las semillas se introducen en una solución diluida al 20% de ácido clorhídrico (sulfumán comercial) que reblandece la testa, facilitando así su eliminación con la ayuda de unas pinzas. Una vez desprovistas de la testa, las semillas se esterilizan superficialmente por inmersión, durante 20 minutos, en una solución de lejía comercial diluida al 50% (5% hipoclorito de sodio) equivalente a 50g de cloro activo por litro con 2 gotas de detergente 7X-0-matic (Flow Laboratories) que ayuda a disminuir la tensión superficial de los tejidos, mejorando así el contacto entre el tejido y el agente esterilizante. Una vez transcurrido el tiempo, se elimina la solución desinfectante mediante tres lavados sucesivos (2, 5 y 10 minutos, respectivamente) con agua destilada estéril.

3.2.2. Germinación

Las semillas esterilizadas (apartado 3.2.1) se transfieren a recipientes de vidrio de 105 mm x 95 mm con medio de cultivo MG (ver apartado 3.3.2). Los recipientes, son sellados con film y se mantienen en oscuridad a 28°C hasta la germinación de las semillas, periodo que oscila entre 24 y 48 horas.

Después de la nascencia, es decir, el momento en que emerge la radícula, se trasladan a la cámara de cultivo. La cámara tiene 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. Obtención de plantas axénicas

Los ápices meristemáticos se cultivan en medio MB3 (ver apartado 3.3.2) manteniendo la polaridad del explante. A los pocos días aparecen las primeras raíces, lo que promueve el desarrollo del ápice y de las primeras hojas tras 20-25 días.

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 los reguladores de crecimiento en el medio. Las primeras letras del medio hacen referencia a los reguladores empleados, en general una auxina: N = ácido naftalenacético (NAA), I = ácido indolacético (IAA); o una citoquinina: B = 6-benciladenina (6-BA), K = kinetina (Kin), Z = zeatina (Z), rZ= ribóxido de zeatina (rZ), mT= meta-topoline (mT). A las letras le siguen una serie de dígitos separados por una barra que indica la concentración del regulador en mg/L.

3.3.2. Composición de los medios de cultivo

a) Medio de cultivo para germinación

Para la germinación de las semillas se utilizó el medio MG. Este medio de cultivo está compuesto por la solución mineral MS (Duchefa Biochemie), 10 g/L de sacarosa y, como agente gelificante, 9 g/L de agar "Marisé", polisacárido con menor fuerza de gel que permite visualizar el crecimiento bacteriano debido a su alta transparencia. El pH del medio se ajustó a 5,7 con KOH y HCl. Los medios de cultivo se esterilizaron por calor húmedo en autoclave, a 115º C durante 30 minutos.

b) Medio de cultivo para la inducción de morfogénesis

Todos los medios de cultivo encaminados a inducir morfogénesis están compuestos por una solución mineral MS, 30 g/L de sacarosa, 10 mL/L de 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, añadiéndose a cada medio concentraciones concretas de los diferentes reguladores de crecimiento.

Para evaluar la morfogénesis se han utilizado 6 medios de cultivo con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento: IB 0.2/2.5, NB 0.05/2.5, IZ 0.2/1.0, IrZ 0.2/1.0, IKZ 0.2/2.0/1.0, IBZ 0.2/2.0/1.0 e ImT 0.2/1.0.

c) Medio de cultivo para el enraizamiento de ápices

El medio de cultivo empleado para enraizar ápices es el MB3 (composición en el apartado 3.3.2b).

d) Medio de cultivo para la elongación de brotes

Para la elongación de los brotes se emplea como base el medio MB3 suplementado con 0.01 mg/L de ácido NAA y 0.1 mg/L de 6-BA (NB 0.01/0.1).

3.4. Evaluación de la respuesta morfogenética

3.4.1. Inducción de organogénesis a partir de cotiledones y ápices

Transcurridas entre 48 y 78 horas tras la germinación, las plántulas se encuentran en el estadio ontogénico seleccionado (estado 2-3) para la extracción de los explantes de cotiledón, estadio en el que las plántulas todavía presentan los cotiledones unidos de un color verde crema. En trabajos anteriores, se corroboró que, para la inducción de organogénesis adventicia en líneas de melón, estos estadios presentan mejor calidad morfogenética, incluso resultando fundamental en algunos casos.

Para la extracción de los explantes de cotiledón, se seleccionan las plántulas mejor desarrolladas y, trabajando en cabina de flujo laminar, se procede a seccionar con el bisturí. En

primer lugar, se separan los cotiledones del ápice, separando a continuación los dos cotiledones, que serán escindidos por la mitad, distinguiendo entre sección proximal (la más cercana al ápice) y distal (la más alejada). Así, se obtienen 4 secciones por plántula genótipicamente idénticas. Al desear obtener miniexplantes, cada sección, a su vez, se secciona por la mitad. En total, de cada plántula se obtienen 8 miniexplantes de cotiledón (figura 3).

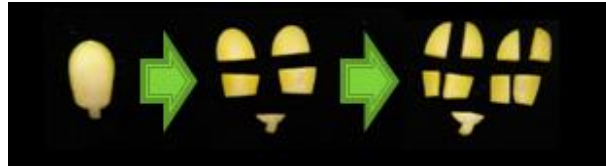


Figura 3. Detalle del corte de los explantes de cotiledón y ápice.

Obtenidos los explantes de cotiledón, se colocan sobre el medio con el envés (cara inferior de la hoja opuesta al haz) en contacto directo con el medio, previamente distribuido en placas petri. Al finalizar el cultivo se precinta la placa con Parafilm y se incuba. Las condiciones de incubación son las descritas en el apartado 3.2.2., donde se detallan las características de la cámara de cultivo.

Por lo que respecta a los ápices obtenidos al escindir los cotiledones, se cultivan en otra placa petri sobre los mismos medios de cultivo indicados anteriormente.

3.4.2 Inducción de organogénesis a partir de hojas

Para evaluar la morfogénesis en microexplantes de hoja se emplea el medio de cultivo IBZ (0.2/2.0/1.0), es decir, medio que contiene MB3 y como reguladores 0.2 mg/L de IAA, 2.0 mg/L de 6-BA y 1.0 mg/L de Zeatina.

A partir de las plantas axénicas obtenidas en el apartado 3.2.3, trabajando en la cabina de flujo laminar se procede a la selección de hojas jóvenes de color verde intenso con la ayuda de bisturí y pinzas. En primer lugar, se realizan numerosos cortes en dirección transversal al peciolo de la hoja. Una vez se han obtenido estos explantes alargados, se vuelven a seccionar cada uno de ellos en cuadrados de aproximadamente 2 x 2 mm (figura 4), colocándolos sobre el medio de cultivo con el envés en contacto directo con el mismo. Se sellan las placas con film y se cultivan en las mismas condiciones indicadas en el apartado 3.2.2.

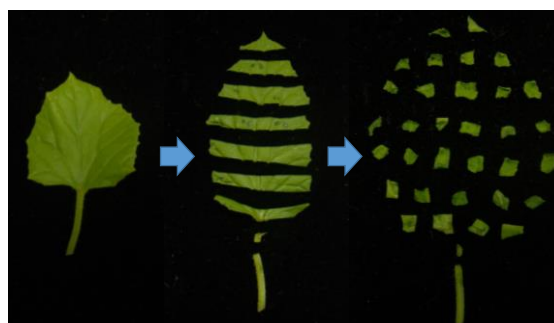


Figura 4. Detalle del corte de hoja.

3.5. 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 50 mm de diámetro. Se añaden 2 gotas de tampón de extracción de núcleos (Partec, Münster, Germany) y 800 µL de una solución que contiene 1 mg/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 366 nm. 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.

3.6. Variables evaluadas en los experimentos de morfogénesis

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

También se han utilizado dos índices: el índice de crecimiento desorganizado (índice CD), que trata de reflejar mediante un valor numérico el grado de crecimiento de un callo desorganizado, y el índice de crecimiento organogénico (índice ORG) que también, mediante un valor numérico, refleja el crecimiento de estructuras organogénicas. La estimación cualitativa de los índices CD y ORG a cada uno de los explantes se resume en la figura 5. Para la exposición de los resultados se ha calculado la media \pm error estándar.



Figura 5. Índices CD y ORG utilizados para estimar el crecimiento desorganizado y organizado de los callos.

3.7. 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

4.1. Evaluación de la tasa de germinación y de la calidad de la semilla

Antes de iniciar cualquier experimento en condiciones de cultivo *in vitro*, es necesario asegurarse de que el material de partida se encuentra libre de contaminación. En este sentido, la aparición de contaminación endógena, ya sea fúngica o bacteriana, puede repercutir negativamente sobre la respuesta del material de partida. Por ello, el primer experimento consistió en la evaluación de la calidad de las semillas de melón que se iban a utilizar en este trabajo. Tras el proceso de esterilización (ver apartado 3.2.1. de Materiales y Métodos), se evaluó la tasa de germinación útil (i.e. semilla de calidad), la aparición de episodios de contaminación endógena y la frecuencia de germinación aberrante. La evaluación se realizó tras 48 horas de incubación en oscuridad sobre un medio de germinación (ver apartado 3.3.2a de Materiales y Métodos).

Tabla 2. Porcentaje de semilla de calidad, tasa de contaminación endógena y germinación aberrante en diferentes líneas de melón.

	% semilla de calidad	% semilla contaminada	% semilla aberrante
PST5	96,64 ± 1,65	0,00 ± 0,00	3,36 ± 1,65
MGO	74,79 ± 3,98	0,00 ± 0,00	5,04 ± 2,01
BL	80,00 ± 3,81	20,00 ± 3,81	0,00 ± 0,00
I102	72,92 ± 4,54	10,42 ± 3,12	8,33 ± 2,82

Respecto a la tasa de germinación, los mejores resultados se obtuvieron en la línea PST5 (tabla 2). Las tasas de germinación de la línea BL y de la línea I102 fueron algo menores, probablemente debido a los problemas de contaminación endógena (tabla 2, figura 6).

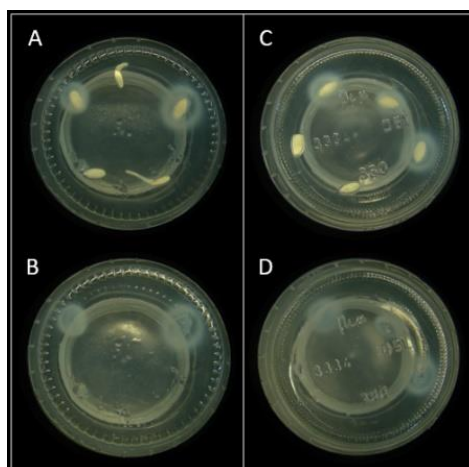


Figura 6. Detalle de contaminación endógena en semillas de la línea I102 tras 48h en oscuridad. A y C) Botes con semillas. B y D) Después de ser retiradas.

En el caso de la línea MGO no se detectaron problemas de germinación endógena, pero un porcentaje considerable de semillas no germinó. Además, se pudo comprobar que algunas semillas de las líneas en las líneas PST5, I102 y MGO exhibían germinación aberrante. Con todo, el porcentaje de semilla de calidad fue suficientemente alto como para poder abordar los diferentes experimentos del trabajo.

4.2. Caracterización de los distintos estados ontogénicos

El objetivo de este segundo experimento fue la identificación de los distintos estadios ontogénicos de las plántulas de melón en condiciones de cultivo *in vitro*. El conocimiento de los diferentes estadios ontogénicos permite conocer el tiempo requerido para que la plántula alcance el estadio más adecuado para llevar a cabo la inducción del proceso de morfogénesis. En general, en melón, el estadio 1 (figura 7) se observa a las 48 horas, coincidiendo con el momento de la germinación o emergencia de la radícula. En el estadio ontogénico 2 (72 horas después de la esterilización), parte del hipocótilo ha emergido de la semilla. En los estadios 3-4 (4-6 días después de la germinación) los cotiledones de plántula comienzan a virar a color verde, hasta alcanzar un verde intenso, pero manteniendo los cotiledones unidos hasta el estadio 5-6 (8 días tras la germinación). Por último, en el estadio 7-8 las plántulas presentan los cotiledones abiertos y un mayor número de raíces. Teniendo en cuenta que la germinación y el desarrollo de cada plántula puede variar entre las diferentes líneas, es importante realizar este estudio previo antes de iniciar los diferentes experimentos. Sobre la base de los trabajos previos realizados en el laboratorio, se decidió que el estadio ontogénico 2-3 era el más adecuado a la hora de obtener una buena respuesta morfogenética en explantes de cotiledón. Por lo que respecta a las líneas de melón de este trabajo, el estadio 2-3 se alcanza a los 3-4 días de la esterilización de la semilla.

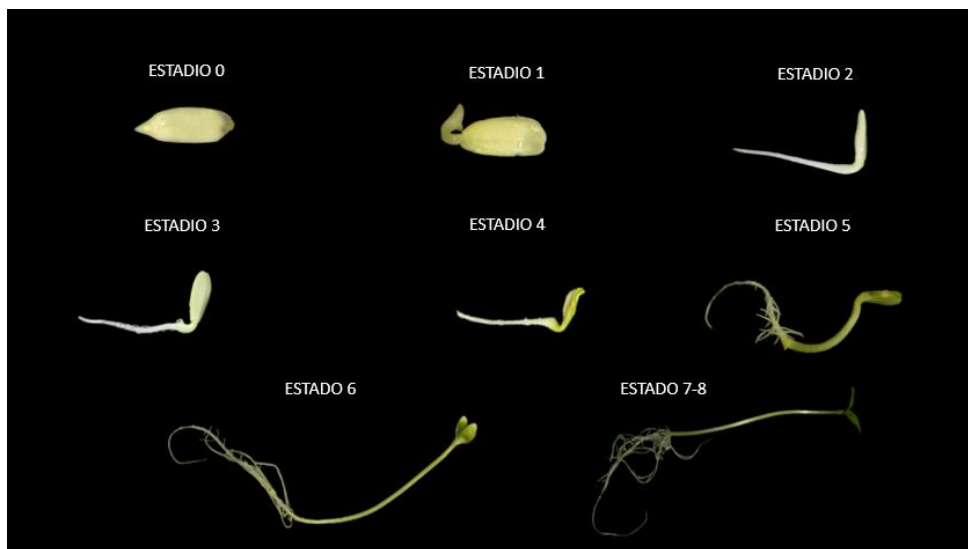


Figura 7. Estadios ontogénicos de las plántulas de melón de la línea PST5.

4.3. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogenética en melón

El objetivo del tercer experimento fue evaluar el efecto de dos tipos de auxinas (i.e. ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA)) sobre la morfogénesis. Se emplearon dos tipos de explantes, a saber, cotiledón y ápice caulinar. Puesto que en estudios anteriores se observó que la 6-benciladenina (6-BA) es la citoquinina que promueve mayor respuesta

morfogenética en explantes de cotiledón de melón (Albalat, 2016), empleamos los medios IB (0.2/2.5) y NB (0.05/2.5) (ver apartado 3.3. de Materiales y Métodos).

Los resultados se evaluaron en tres fases sucesivas: 1) Fase de inducción del callo organogénico a los 25 días de cultivo de los explantes. Transcurrido este periodo, se evaluó el índice de crecimiento desorganizado (índice CD) y el índice de desarrollo organogénico (índice ORG), así como el porcentaje de explantes que habían dado lugar a yemas y/o brotes. Destacar que, solo los explantes que habían desarrollado estructuras organogénicas se transfirieron a medio fresco. 2) Fase de desarrollo del callo organogénico a los 25 días de haber subcultivado las estructuras organogénicas. Transcurrido este periodo, se evaluaron los mismos parámetros que en la fase 1), y los callos organogénicos, se transfirieron a un medio de desarrollo y elongación de brotes (ver Materiales y Métodos, apartado 3.3.2). 3) Fase de regeneración de plantas a los 25 días de haber transferido los callos organogénicos al medio de elongación, se evalúa la cantidad de brotes que presenta cada uno de los callos.

4.3.1. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogenética en cotiledón

Se emplearon explantes de cotiledón de las 2 líneas comerciales (PST5 e I102) y de las dos líneas tradicionales (MGO y BL). Como se puede ver en la tabla 3, a los 25 días de cultivo, los explantes de cotiledón desarrollaron estructuras organogénicas en las cuatro líneas evaluadas, siendo sensiblemente mejor el medio IB en comparación con el NB (figura 8). En todos los casos, el índice CD es menor en todas las líneas evaluadas utilizando el IAA como fuente de auxina, lo que podría ser relevante a la hora de abordar un experimento de transformación genética. Conviene indicar que en todas las líneas se observaron porcentajes elevados de explantes con yemas. Por lo que respecta al número de explantes que desarrollaron brotes tras 25 días de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron en la línea MGO, en la que se registraron porcentajes del 32% utilizando NB y alrededor del 43% en IB (tabla 3).

Tabla 3. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón en las diferentes líneas de melón (25 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	NB	2,07 ± 0,16 (ab)	1,52 ± 0,10 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	3,57 ± 2,43 (c)
	IB	1,50 ± 0,14 (cd)	1,64 ± 0,09 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	3,57 ± 2,43 (c)
I102	NB	2,34 ± 0,13 (a)	1,02 ± 0,09 (c)	100,00 ± 0,00 (a)	0,00 ± 0,00 (c)
	IB	1,25 ± 0,18 (d)	1,09 ± 0,07 (bc)	98,21 ± 0,02 (ab)	0,00 ± 0,00 (c)
MGO	NB	1,57 ± 0,15 (c)	1,59 ± 0,09 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	32,14 ± 8,71 (b)
	IB	1,24 ± 0,13 (d)	1,64 ± 0,11 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	43,65 ± 9,46 (a)
BL	NB	2,00 ± 0,15 (b)	1,14 ± 0,08 (bc)	98,21 ± 1,75 (ab)	0,00 ± 0,00 (c)
	IB	1,52 ± 0,19 (cd)	1,25 ± 0,10 (b)	96,43 ± 2,43 (b)	0,00 ± 0,00 (c)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. Materiales y Métodos.

A los 50 días de cultivo se observó que en las líneas PST5, MGO e I102, los explantes cultivados en medio IB presentaban un porcentaje de brotes mayor que los explantes cultivados en medio NB, donde se promovió un mayor crecimiento desorganizado (tabla 4). Respecto a las otras líneas, el porcentaje de explante con brote de la línea BL fue significativamente menor, lo que parece estar relacionado con una menor conversión de yema a brote, sobre todo si tenemos en cuenta que esta línea exhibió una elevada organogénesis durante los 25 primeros días.

Tabla 4. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón en las diferentes líneas de melón (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	NB	2,75 ± 0,13 (a)	2,08 ± 0,19 (cd)	100,00 ± 0,00 (a)	41,67 ± 14,23 (c)
	IB	2,31 ± 0,21 (abc)	2,46 ± 0,14 (bc)	100,00 ± 0,00 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
I102	NB	2,10 ± 0,28 (bcd)	2,50 ± 0,17 (bc)	100,00 ± 0,00 (a)	60,00 ± 15,49 (bc)
	IB	0,80 ± 0,20 (e)	2,80 ± 0,13 (ab)	100,00 ± 0,00 (a)	80,00 ± 12,65 (ab)
MGO	NB	2,50 ± 0,17 (ab)	2,80 ± 0,13 (ab)	100,00 ± 0,00 (a)	90,00 ± 9,49 (ab)
	IB	1,60 ± 0,22 (d)	3,00 ± 0,00 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
BL	NB	2,70 ± 0,21 (ab)	1,30 ± 0,15 (e)	100,00 ± 0,00 (a)	10,00 ± 0,00 (d)
	IB	1,80 ± 0,33 (cd)	1,70 ± 0,21 (de)	100,00 ± 0,00 (a)	10,00 ± 9,49 (d)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. Materiales y Métodos.

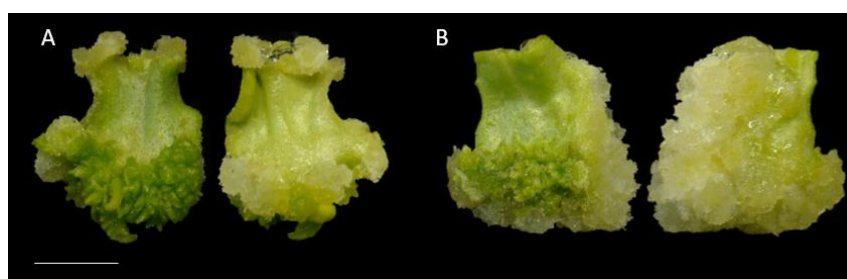


Figura 8. Explantes de cotiledón (haz y envés) de la línea MGO tras 25 días de cultivo en medio IB (A) y NB (B). Escala de barras: 1 cm.

Sobre la base del número de explantes que desarrollan brotes y el índice de crecimiento desorganizado (tabla 4), se puede concluir que el medio IB es mejor que el NB para la inducción de respuesta organogénica en explantes de cotiledón.

4.3.2. Efecto del tipo de auxina sobre la respuesta morfogénica en ápices

A la hora de emplear los ápices como explante primario para generar callos organogénicos, es importante que el desarrollo apical sea inhibido. En este sentido, el empleo de reguladores de crecimiento, principalmente citoquininas, resulta imprescindible. En el caso

de no inhibirse la dominancia apical, la planta se desarrollará con normalidad, dando lugar a un único brote por ápice.

Del mismo modo que en el apartado anterior, el objetivo de este experimento fue evaluar qué efecto podría tener el empleo de distintas auxinas (AIA y ANA) sobre la formación tanto de callo desorganizado como de estructuras organogénicas. Para ello, se cultivaron ápices de las 4 líneas de melón y, a los 50 días de cultivo, se vio que el medio NB promovía mayor crecimiento desorganizado mientras que el medio IB favorecía el crecimiento organogénico. Así, en la línea MGO, el porcentaje de brotes regenerados en medio IB fue del 90% mientras que en el medio NB fue del 60% (tabla 5). En ambos medios se inhibió la dominancia apical y se promovió la formación de callo organogénico (figura 9).



Figura 9. Explantes de ápice de la línea MGO. A) Inhibición de dominancia apical en los medios IB y NB y B) Desarrollo normal del ápice en medio MB3. Escala de barras: 1 cm.

Tabla 5. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	NB	1,25 ± 0,18 (ab)	0,92 ± 0,15 (cd)	75,00 ± 12,50 (ab)	83,33 ± 10,76 (a)
	IB	1,00 ± 0,15 (abc)	1,50 ± 0,17 (ab)	78,57 ± 10,97 (ab)	92,86 ± 6,88 (a)
I102	NB	1,33 ± 0,19 (ab)	1,50 ± 0,15 (ab)	100,00 ± 0,00 (a)	75,00 ± 12,50 (a)
	IB	1,00 ± 0,21 (abc)	1,64 ± 0,13 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	85,71 ± 9,35 (a)
MGO	NB	1,50 ± 0,22 (a)	1,50 ± 0,17 (ab)	100,00 ± 0,00 (a)	60,00 ± 15,49 (ab)
	IB	0,80 ± 0,13 (bc)	1,50 ± 0,17 (d)	100,00 ± 0,00 (b)	90,00 ± 9,49 (c)
BL	NB	0,73 ± 0,15 (c)	1,13 ± 0,13 (bc)	100,00 ± 0,00 (a)	33,33 ± 12,17 (b)
	IB	0,64 ± 0,17 (c)	1,43 ± 0,14 (ab)	100,00 ± 0,00 (b)	42,86 ± 13,22 (b)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

En conjunto, los resultados de ambos experimentos nos permiten concluir que el AIA promueve menor desarrollo de callo desorganizado y parece mejorar la respuesta organogénica a partir de explantes de cotiledón y ápice.

4.4. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogenética

El objetivo de este cuarto experimento fue evaluar, en combinación con AIA, el efecto de diferentes citoquininas sobre la morfogénesis en distintos tipos de explantes de melón. Los diferentes medios ensayados en este experimento fueron el medio IZ (0.2/1.0), IrZ (0.2/1.0), IKZ (0.2/2.0/1.0) e IBZ (0.2/2.0/1.0) (ver apartado 3.3.1 de Material y Métodos).

4.4.1. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogenética en cotiledón

A los 25 días de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron en el medio IBZ (tabla 6). En los otros medios de cultivo apenas se observaron eventos de morfogénesis (figura 10), a excepción de la línea I102, en la que se obtuvo una buena respuesta morfogenética en todos los medios de cultivo. En esta línea, los mejores resultados de inducción de respuesta organogénica (explantes con yema) se obtuvieron en el medio IBZ, al contrario de lo que ocurrió con el número de explantes con brote (tabla 6). Estos resultados sugieren que la combinación de 6 BA y zeatina resulta eficiente para la inducción de respuesta organogénica, pero para la conversión de yema a brote parecen ser mejores otras combinaciones.

Tabla 6. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón (25 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	IZ	0,45 ± 0,10 (ef)	0,02 ± 0,02 (e)	1,60 ± 1,54 (f)	1,56 ± 1,53 (c)
	IrZ	0,91 ± 0,12 (c)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,73 ± 0,12 (cd)	0,02 ± 0,02 (e)	1,56 ± 1,54 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	2,03 ± 0,13 (a)	1,09 ± 0,09 (b)	96,77 ± 2,21 (a)	0,00 ± 0,00 (c)
I102	IZ	0,54 ± 0,11 (e)	0,32 ± 0,08 (f)	28,57 ± 7,98 (e)	10,71 ± 5,37 (a)
	IrZ	0,34 ± 0,09 (g)	0,70 ± 0,07 (d)	69,64 ± 7,12 (c)	14,29 ± 4,27 (b)
	IKZ	0,95 ± 0,11 (c)	0,54 ± 0,09 (e)	53,57 ± 0,09 (d)	28,57 ± 8,40 (b)
	IBZ	2,21 ± 0,10 (a)	0,96 ± 0,05 (c)	94,64 ± 4,19 (a)	0,00 ± 0,00 (c)
MGO	IZ	0,22 ± 0,11 (fg)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,50 ± 0,13 (def)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,40 ± 0,10 (efg)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	1,73 ± 0,14 (b)	1,48 ± 0,12 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	10,00 ± 6,43 (b)
BL	IZ	0,15 ± 0,07 (g)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,57 ± 0,10 (de)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,52 ± 0,08 (de)	0,00 ± 0,00 (e)	0,00 ± 0,00 (f)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	1,66 ± 0,14 (b)	1,07 ± 0,09 (bc)	83,93 ± 6,93 (b)	0,00 ± 0,00 (c)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

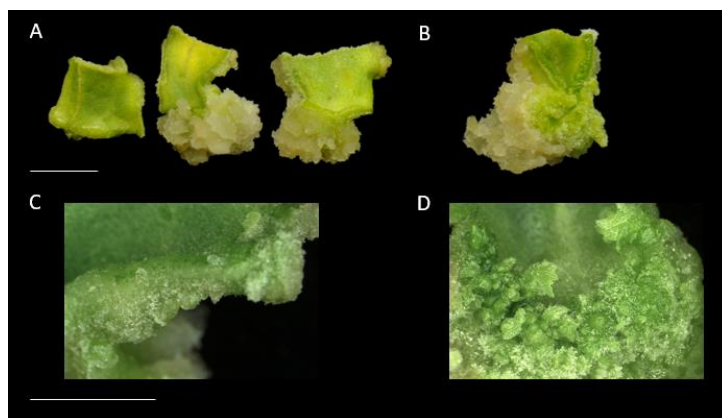


Figura 10. Explantes de cotiledón de la línea PST5 (de izq. a dcha.) en los medios IZ, IrZ e IK (A) y en el medio IBZ (B). Detalle de explantes de cotiledón tras 25 días en medio IZ (C) e IBZ (D). Escala de barras: 1 cm (A y B), 5 mm (C y D).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, en las líneas PST5, MGO y BL se decidió transferir al mismo medio sólo los explantes que habían sido cultivados en el medio IBZ. Respecto a la línea I102, se transfirieron a medio fresco la mitad de los explantes procedentes de IBZ al mismo medio fresco (IBZ) siguiendo la ruta de todos los ensayos, pero dado el alto porcentaje de explantes que presentaban brotes tras el primer cultivo en IKZ, se transfirieron parte de los explantes provenientes de IBZ a medio IKZ para ver si este medio favorecía una mayor conversión de las yemas presentes en brotes que la ruta convencional. Los mejores resultados se obtuvieron en las líneas PST5 e I102 (tabla 7).

Tabla 7. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	IBZ	$2,37 \pm 0,17$ (ab)	$1,89 \pm 0,19$ (b)	$100,00 \pm 0,00$ (a)	$68,42 \pm 10,66$ (bc)
	IKZ*	$2,75 \pm 0,13$ (a)	$2,58 \pm 0,14$ (a)	$100,00 \pm 0,00$ (a)	$75,00 \pm 12,50$ (b)
I102	IBZ	$1,69 \pm 0,35$ (c)	$2,77 \pm 0,12$ (a)	$100,00 \pm 0,00$ (a)	$53,85 \pm 13,83$ (bc)
	IBZ	$1,89 \pm 0,21$ (bc)	$2,56 \pm 0,15$ (a)	$100,00 \pm 0,00$ (a)	$100,00 \pm 0,00$ (a)
MGO	IBZ	$2,86 \pm 0,14$ (a)	$1,07 \pm 0,13$ (c)	$92,86 \pm 6,88$ (b)	$28,57 \pm 12,07$ (d)

Inducción previa durante 25 días en IBZ. Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

Por último, se determinó el número de brotes que se podían individualizar a partir de cada callo organogénico. Para ello, los callos organogénicos se cultivaron en medio FCu (ver apartado 3.3.2. de Materiales y Métodos) durante 25 días. Respecto al número medio de brotes que elongan en el medio FCu en la línea I102, los mejores resultados se obtienen en callos que se han inducido en medio IBZ (tabla 8). Respecto a las diferentes líneas, los mejores resultados se obtuvieron en las líneas PST5 y MGO (tabla 8).

Tabla 8. Elongación de brotes en Fcu en las distintas líneas de melón (75 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Nº brotes/ explante
PST5	FCu	1,86 ± 0,40
I102	FCu*	0,70 ± 0,15
I102	FCu	1,22 ± 0,14
MGO	FCu	1,60 ± 0,19
BL	FCu	0,90 ± 0,28

*Cultivo previo en IKZ

El experimento permitió concluir que en estas líneas se puede obtener una elevada respuesta organogénica en medios que combinen benciladenina y zeatina.

4.4.2. Efecto del tipo de citoquinina sobre la respuesta morfogenética en ápice

A los 25 días de cultivo, los mejores resultados se obtuvieron en el medio IBZ (tabla 9), al igual que se observó empleando cotiledón como explante de partida. Además, conviene indicar que el medio IBZ fue el único que promovió inhibición completa de la dominancia apical y desarrollo de estructuras organogénicas (yemas), tanto en la zona apical como en la zona de corte.

Tabla 9. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (25 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)
PST5	IZ	0,13 ± 0,13 (e)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,13 ± 0,13 (e)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,50 ± 0,19 (de)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	0,63 ± 0,18 (cde)	1,63 ± 0,18 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
I102	IZ	1,00 ± 0,22 (bcd)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,88 ± 0,13 (cd)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,57 ± 0,20 (cde)	0,43 ± 0,20 (c)	42,86 ± 18,70 (b)
	IBZ	2,25 ± 0,37 (a)	1,00 ± 0,00 (b)	100,00 ± 0,00 (a)
MGO	IZ	0,63 ± 0,18 (cde)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,50 ± 0,27 (de)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	0,50 ± 0,27 (de)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	1,50 ± 0,19 (b)	1,50 ± 0,19 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
BL	IZ	0,71 ± 0,18 (cde)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IrZ	0,25 ± 0,16 (e)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IKZ	1,00 ± 0,22 (bcd)	0,00 ± 0,00 (d)	0,00 ± 0,00 (c)
	IBZ	1,13 ± 0,23 (bc)	1,13 ± 0,13 (b)	100,00 ± 0,00 (a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. Materiales y Métodos.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió continuar el ensayo exclusivamente con los explantes cultivados en medio IBZ. Estos se transfirieron a medio fresco (mismo medio IBZ) y los resultados se evaluaron a los 25 días. Se observó que, salvo en la línea BL, en todos los explantes se habían desarrollado brotes (tabla 10).

Tabla 10. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con brotes (%)
PST5	IBZ	1,71 ± 0,13 (a)	1,57 ± 0,14 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
I102	IBZ	1,00 ± 0,15 (b)	1,71 ± 0,16 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
MGO	IBZ	1,71 ± 0,16 (a)	1,79 ± 0,11 (a)	100,00 ± 0,00 (a)
BL	IBZ	1,07 ± 0,16 (b)	1,86 ± 0,10 (a)	78,57 ± 0,11 (a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

Este experimento nos permite concluir que las citoquininas evaluadas, a saber, ribósido de zeatina, quinetina y zeatina, a las concentraciones ensayadas, no inhiben por sí solas la dominancia apical (figura 11 A, B y C). Sin embargo, la combinación de 6-benciladenina y zeatina permite inhibir la dominancia apical y generar callos organogénicos a partir de los cuales se pueden desarrollar múltiples brotes (figura 11 D y E). Esta metodología podría ser útil para la micropropagación de esta especie.

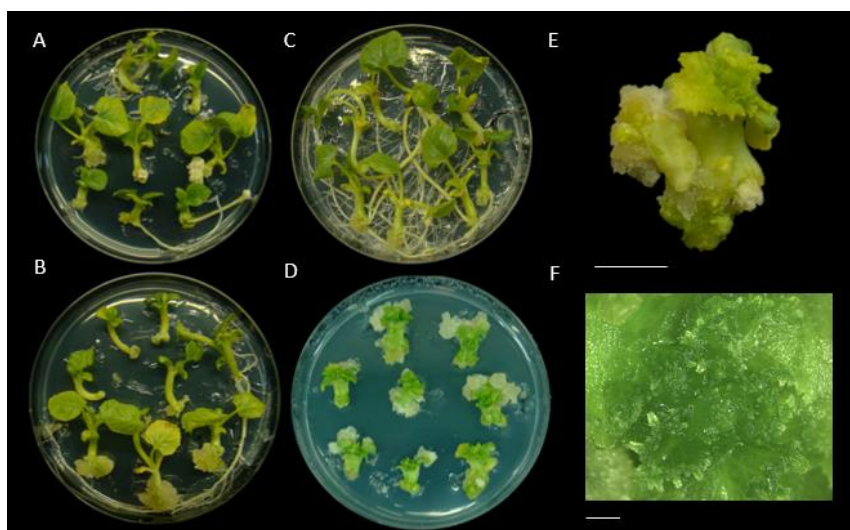


Figura 11. Cultivo de ápices de la línea MGO en A) IKZ, B) IrZ y C) IZ, donde no se inhibió el desarrollo Apical y en el medio IBZ donde sí se inhibió (D y E). F) Detalle de las yemas formadas en el ápice. Escala de barras: 1 cm (E), 1mm (F).

4.5. Empleo de microexplantes de hoja para la regeneración de plantas

La hoja resulta muy interesante debido a su mayor tamaño en comparación con el cotiledón, lo que permite obtener un mínimo de 25 explantes a partir de cada hoja, es lo que denominamos microexplantes. Además, cada planta axénica presenta un número considerable de hojas (mínimo 5-6 por planta) frente a los 2 cotiledones que tiene una plántula. Por ello, la regeneración a partir de este tipo de explante resultaría clave en el caso de disponer de poca semilla y/o tener problemas de contaminación. Por tanto, el objetivo de este experimento fue evaluar la viabilidad de los microexplantes de hoja para la inducción de morfogénesis en las distintas líneas. Sobre la base de los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se utilizó el medio IBZ para el cultivo de microexplantes de hoja. El experimento se realizó con hoja joven, es decir, se utilizaron las 2-3 primeras hojas desarrolladas por debajo del ápice.

Como se puede ver en la tabla 11, las cuatro líneas ya presentaban una gran respuesta morfogénica a los 25 días. Por lo que respecta a PST5 y MGO, se observó que más del 56% de los explantes desarrollaron yemas. En las líneas I102 y BL los resultados fueron mejores, con valores que alcanzaban el 76% de explantes con yema.

Tabla 11. Inducción de la morfogénesis a partir de microexplantes de hoja de las diferentes líneas de melón en IBZ (25 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

	PST5	I102	MGO	BL
Explantes con yemas (%)	56,73 ± 3,44	76,06 ± 3,11	59,89 ± 3,58	76,22 ± 3,32

Se seleccionaron los 40 mejores explantes de cada línea y se cultivaron otros 25 días en el mismo medio (i.e. IBZ). Los resultados de la tabla 12 muestran que a los 50 días prácticamente la totalidad de los explantes de las 4 líneas habían desarrollado yemas. Destacó el cultivar I102 con un 47,5% de explantes con brotes a los 50 días (tabla 12). En el resto de las líneas evaluadas la media fue significativamente menor, oscilando entre un 10% (BL) y un 20% (PST5).

Tabla 12. Inducción de la morfogénesis a partir de micro-explantes de hoja de las diferentes líneas de melón en IBZ (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher).

	PST5	I102	MGO	BL
Explantes con yemas (%)	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	95,00 ± 3,45
Explantes con brotes (%)	20,00 ± 6,32	47,50 ± 7,90	17,50 ± 6,01	10,00 ± 4,74

En conjunto, los resultados indican que, en estas líneas, la combinación de 6-BA y zeatina permite la inducción de morfogénesis en micro-explantes de hoja (figura 12). Además, el experimento nos ha proporcionado evidencias que indican que el empleo de este tipo de explante resulta muy adecuado para obtener una respuesta morfogénica de calidad partiendo de pocas plantas de partida.

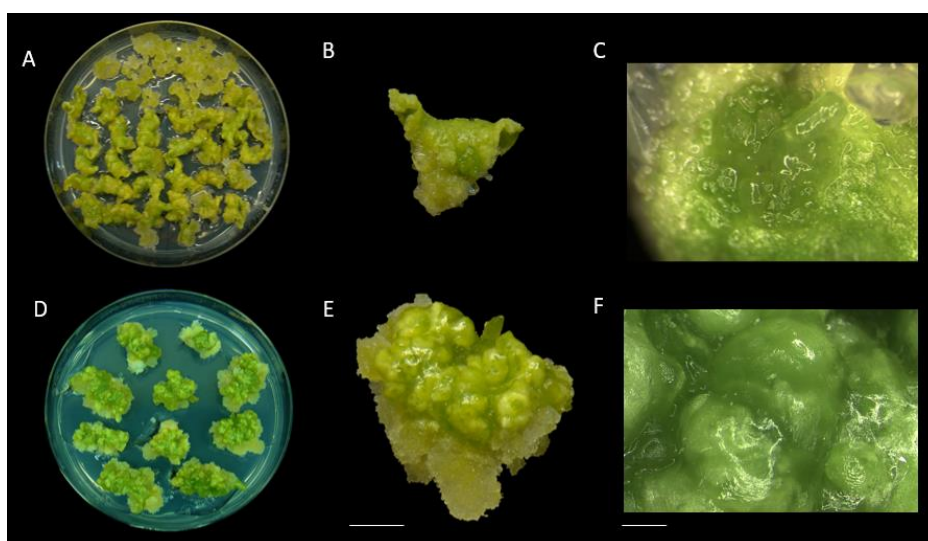


Figura 12. Microexplantes de hoja de la línea BL. A y B) en IBZ tras 25 días de cultivo, D y E) tras 50 días de cultivo. Detalle de las yemas observadas tras 25 días de cultivo (C) y tras 50 días (F). Escala de barras: 5 mm (B y E), 1 mm (C y F).

4.6. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en melón

El meta-topoline (mT) es una citoquinina que, en algunas especies, se ha empleado como alternativa a la 6-Benciladenina. Además, se trata de un regulador de crecimiento que permite el enraizamiento de ápices cuando se emplea a ciertas concentraciones. El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica de distintos explantes de melón en las líneas PST5 y MGO. Estas líneas fueron seleccionadas por su elevada respuesta morfogénica en los anteriores experimentos. Del mismo modo que en los medios evaluados en el anterior experimento, la fuente de auxinas fue el ácido indolacético (0,2 mg/L). En este caso, el ácido indolacético se combinó con mT a una concentración de 1 mg/L.

4.6.1. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en cotiledón

Tras 25 días de cultivo, los resultados revelaron que la aptitud morfogénica de estas dos líneas de melón es excelente (tabla 13). En efecto, todos los explantes desarrollaron yemas y, más de un 69% de los explantes había desarrollado brotes. Además, la formación de callo desorganizado disminuyó considerablemente (tabla 13).

Tabla 13. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de cotiledón de las diferentes líneas de melón en ImT (25 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)	Explantes con brotes (%)
PST5	ImT	0,84 ± 0,13 (a)	1,71 ± 0,13 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	69,64 ± 8,02 (a)
MGO	ImT	0,50 ± 0,12 (b)	1,68 ± 0,15 (a)	100,00 ± 0,00 (a)	70,00 ± 9,95 (a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. de Materiales y Métodos.

Los explantes con brote se transfirieron a medio FCu (ver apartado 3.3.2. de Materiales y Métodos) para promover su elongación. Como se puede ver en la tabla 14, se obtuvieron de media en torno a 2 brotes por explante en ambas líneas.

Tabla 14. Elongación de brotes en Fcu en las distintas líneas de melón (50 días). Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Nº brotes/explante
PST5	FCu	2,00 ± 0,33 (a)
MGO	FCu	1,80 ± 0,29 (a)

Este experimento nos permitió concluir que el meta-topoline podría ser una alternativa adecuada al uso de la 6-Benciladenina para inducir morfogénesis en melón. Como corolario, en el medio de cultivo suplementado con mT se desarrollan múltiples eventos de morfogénesis a lo largo del explante con un reducido crecimiento de callo desorganizado, a diferencia de lo que ocurre en otros medios que generan muy buena respuesta (i.e. IBZ), en los que los eventos de morfogénesis se encuentran más localizados en determinadas zonas del explante y compiten con un crecimiento más o menos profuso de callo desorganizado (figura 13).

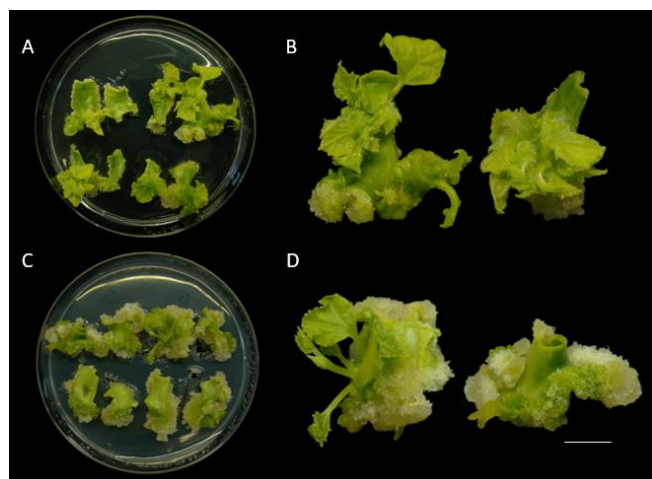


Figura 13. Explantes de cotiledón de la línea MGO tras 25 días de cultivo. A y B) en el medio ImT, C y D) en el medio IBZ. Escala de la barra: 1 cm.

4.6.2. Efecto del meta-topoline sobre la respuesta morfogénica en ápice

Tras 25 días de cultivo en el medio suplementado con meta-topoline, se pudo comprobar que la concentración de hormona que se había utilizado no era adecuada para inhibir la dominancia apical y generar la formación de un callo organogénico en la base del tallo que se encontraba en contacto con el medio de cultivo (tabla 15, figura 14). Aunque el experimento se prolongó otros 25 días (tabla 16), no se observó el desarrollo de nuevas estructuras organogénicas similares a las que habíamos observado en el medio IBZ con este mismo tipo de explante.

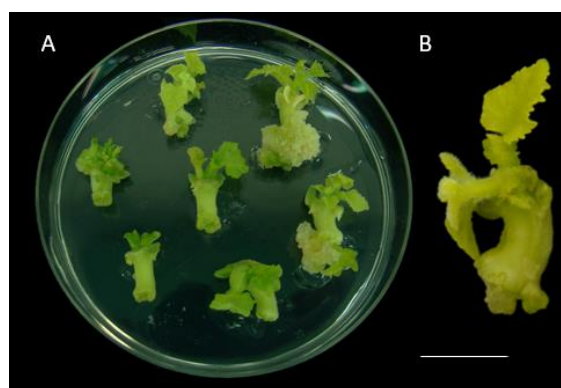


Figura 14. Ápices de PST5 en medio ImT. A) Placa completa con explantes y B) Detalle de un explante. Escala de barras: 1 cm.

Tabla 15. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (25 días) Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)
PST5	ImT	0,29 ± 0,18 (a)	0,71 ± 0,18 (a)	71,45±17,07 (a)
MGO	ImT	0,38 ± 0,26 (a)	0,63 ± 0,18 (a)	62,50±17,12 (a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6. materiales y Métodos.

Tabla 16. Inducción de la morfogénesis a partir de explantes de ápice de las diferentes líneas de melón (50 días) Para cada parámetro, letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$; test de Fisher)

Línea	Medio	Índice CD	Índice ORG	Explantes con yemas (%)
PST5	ImT	0,67 ± 0,19 (a)	0,83 ± 0,11 (a)	83,33 ± 0,11 (a)
MGO	ImT	0,80 ± 0,20 (a)	0,60 ± 0,16 (a)	60,00 ± 0,15 (a)

Notas: Índice CD = índice de crecimiento de callo desorganizado (0 a 3). Índice ORG = índice de crecimiento de callo organogénico (0 a 3), ver apartado 3.6 de Materiales y Métodos.

Por tanto, sobre la base de los resultados obtenidos en ápices, el empleo de esta hormona no resultaría adecuado como vía para generar brotación adventicia en este tipo de explante. No se descarta, en cualquier caso, realizar otros experimentos en los que se incremente la concentración de esta hormona o se combine con otras que han dado buenos resultados en los experimentos que se han realizado en el contexto de este trabajo (i.e. 6, BA o zeatina).

4.7. Análisis del nivel de ploidía en plantas regeneradas a partir de cotiledón

En este último experimento se quiso determinar qué porcentaje de plantas de melón regeneradas en alguno de los apartados anteriores había sufrido cambios numéricos, es decir, cambios en el nivel de ploidía. La determinación del nivel de ploidía se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Se analizaron no menos de 15 plantas regeneradas a partir de cotiledón de las líneas PST5 y MGO. Además, se quiso comparar si había diferencias entre el número de plantas diploides y tetraploides regeneradas en medio suplementado con meta-topoline (apartado 4.6.1) o con 6-Benciladenina (apartado 4.4.1), habida cuenta de que la inducción de la respuesta morfogénica ocurre de manera diferente (i.e. en medio con 6, BA se forma callo desorganizado durante la etapa de inducción). Como se puede ver en la tabla 17, el porcentaje de plantas diploides y tetraploides no parece guardar relación con la citoquinina utilizada para la inducción de la respuesta organogénica.

Tabla 17. Análisis del nivel de ploidía de plantas regeneradas en experimentos de morfogénesis.

Línea	Medio	Plantas diploides (%)	Plantas tetraploides (%)
PST5	IBZ	57,69 ± 9,67	42,31 ± 9,67
	ImT	61,11 ± 11,49	38,89 ± 11,49
MGO	IBZ	45,83 ± 10,17	54,17 ± 10,17
	ImT	35,29 ± 11,59	64,71 ± 11,59

5. Discusión

5.1. Importancia de la calidad de la semilla y de la caracterización del estadio ontogénico

Las condiciones de cultivo *in vitro* requieren partir de material aséptico para poder llevar a cabo los experimentos deseados. Para ello, es necesario poner a punto protocolos de desinfección que permitan obtener material vegetal libre de contaminación fúngica y/o bacteriana. Por otra parte, podemos encontrarnos semillas con germinación aberrante que dan lugar a plántulas cuyos explantes tienen menor potencial morfogénico que los de las plántulas que han germinado adecuadamente.

Por lo que respecta a este trabajo, la semilla ha sido el material partida para la obtención de plántulas a partir de las cuales se han obtenido los distintos tipos de explante (i.e. cotiledones, ápices y hojas). Por lo tanto, el empleo de un protocolo de desinfección eficiente ha resultado clave para obtener plántulas libres de contaminación. En las líneas PST5 y MGO se obtuvieron plántulas libres de contaminación y porcentajes de germinación entorno al 96% y 74%, respectivamente. Sin embargo, en las líneas BL e I102 se observó contaminación bacteriana (entre un 10-20% de las semillas). El conocimiento de esta problemática permite calcular adecuadamente el número de semillas de partida para alcanzar el número mínimo de explantes requeridos para llevar a cabo un determinado experimento, o desechar la línea en cuestión si la tasa de contaminación era muy elevada.

Por otro lado, el estadio ontogénico del material de partida en cucurbitáceas tiene una influencia determinante sobre la cantidad y calidad de la respuesta morfogénica. En sandía, Dong & Jia (1991) observaron diferencias en el número de yemas por explante de cotiledón en función de la edad del mismo. En este trabajo, los autores indican que en explantes de cotiledón de hasta 7 días se diferencian múltiples brotes, pero en los cotiledones de más de 7 días no aparece más de una yema-ápice por explante. En este sentido, la mayor tasa de regeneración de los explantes jóvenes de cotiledón podría estar relacionada con un menor número de células poliploides, respecto a los cotiledones de plantas de estadios ontogénicos más avanzados que presentan mayor número de células poliploides.

Pérez Sanjuán (1999) evaluó la aptitud organogénica de distintas líneas de pepino utilizando diferentes tipos de explante de plántulas de 7 días. En ningún caso obtuvo respuesta morfogénica. A la vista de estos resultados, realizó un nuevo experimento utilizando, en este caso, explantes de plántulas de 2-3 días. En cotiledón obtuvo unas frecuencias de explantes con yema que oscilaban entre el 10% y el 70% en función de la línea utilizada, llegando a la conclusión de que la edad del explante resulta limitante a la hora de obtener respuesta morfogénica en líneas de pepino.

En melón, el estadio ontogénico del explante de partida también tiene efectos negativos sobre su capacidad morfogénica. Soriano (2012) evaluó la organogénesis de diferentes líneas de melón a partir de explantes de cotiledón procedentes de plántulas de 7 a 18 días en diferentes medios de cultivo. Aunque con la mayor parte de los medios no consiguió que los explantes formasen callos organogénicos, en algunos de los medios ensayados obtuvo respuestas que iban del 5% al 50% de explantes con estructuras morfogénicas.

En estudios recientes realizados en el grupo, Albalat (2016) se observó que los explantes de cotiledón de melón cantalupo en estadios ontogénicos 2-3 eran los más adecuados para generar respuesta morfogénica. Por las razones anteriormente expuestas, en este trabajo se han utilizado explantes cotiledonarios en estadio ontogénico 2-3 de diferentes líneas de melón que presentan un creciente interés para el cultivo ecológico con el fin de evaluar su respuesta morfogénica. Además, también se han evaluado otros tipos de explante, como por ejemplo hoja y ápice, en el mismo estado de desarrollo ontogénico como alternativa en los casos en los que el número de plántulas de calidad (sin contaminación o germinación aberrante) fuera escaso.

5.2. Efecto de la composición del medio de cultivo a la hora de obtener respuesta morfogénica

La respuesta morfogénica es consecuencia de la interacción de múltiples factores, siendo la composición del medio de cultivo uno de ellos. En relación con los componentes del medio, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento pueden ser determinantes en la obtención de la respuesta morfogénica. En los trabajos realizados con explantes de cotiledón de pepino por Gambley & Dodd (1990) quedó de manifiesto que las citoquininas quinetina (K; 2 a 5 mg/l), isopenteniladenina (2iP; 1 a 5 mg/l) y benciladenina (BAP; 0,5 a 1 mg/l) daban lugar a altas frecuencias de callos con brotes cuando se utilizaban como únicos reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Sin embargo, cuando los medios contenían la auxina ácido indolacético (IAA) se inhibía la formación de brotes y aumentaba el crecimiento de callo. En una especie silvestre de la familia de las cucurbitáceas (*Citrullus colocynthis*), Dabauza (1995) observó que la utilización de BA como único regulador de crecimiento era suficiente para estimular la organogénesis en explantes de cotiledón. Posteriormente, comprobaron que la adición de NAA (ácido naftalenacético) al medio de cultivo tenía consecuencias negativas sobre la regeneración de brotes. De forma similar, Srivastava *et al* (1989) comprobaron el efecto pernicioso de NAA sobre la regeneración de brotes en explantes procedentes de cotiledón de sandía, y concluyeron que la sola presencia de BAP en el medio de cultivo era suficiente para promover la regeneración de brotes.

Por otro lado, en experimentos realizados con explantes de distinta procedencia (cotiledón, hoja, hipocotilo y tallo), García-Sogo (1990) comprobó notables diferencias en la capacidad organogénica de estos explantes, siendo siempre los callos derivados de explantes de cotiledón los que exhibían mayor aptitud morfogénica. En pepino, Msikita *et al* (1990) observaron que la mayor tasa de regeneración a partir de cotiledones ocurría en los medios que contenían o bien 2 mg/l de BAP y 0,3 mg/l de NAA, o bien 4 mg/l de BAP y 0,3 mg/l de NAA. Experimentos similares realizados por Ali *et al* (1991c) con 6 líneas de pepino en medios que contenían NAA y BAP indicaron que las frecuencias de regeneración eran variables dependiendo del genotipo en cuestión. Da Silva (1999) también observó que el efecto del medio de cultivo era dependiente del genotipo. Los mejores resultados en las líneas 'Amarelo', 'Cantaloup Charentais' y 'Eldorado' se obtuvieron en un medio que contenía 1,5 mg/l de IAA y 6,0 mg/l de K. Melara & Gatica (2009) señalaron que, con independencia del genotipo estudiado, el

porcentaje de brotes regenerados a partir de callos procedentes de explantes de cotiledón de 3 días es mayor en los medios que combinan como reguladores de crecimiento indolacético y benciladenina.

Basándonos en la experiencia que tiene el grupo sobre regeneración de plantas *in vitro* de melón y en la bibliografía descrita, en este trabajo se quiso comparar el efecto de diferentes auxinas (i.e. IAA y NAA) en combinación con 6, BA sobre la morfogénesis de cotiledones y ápices. En ambos tipos de explante, los resultados obtenidos indicaron que en ambos medios se alcanzan porcentajes de explantes con yemas muy elevados (cerca del 100%) a los 25 días de cultivo. Conviene indicar que, en general, el crecimiento desorganizado suele ir en detrimento del crecimiento organizado, por lo que los resultados que hemos observado parecen coherentes. En este sentido, en cotiledones se observaron diferencias entre las 4 líneas evaluadas ya que el porcentaje de callos con brotes tras 50 días de cultivo fue mayor en el medio suplementado con IAA con BAP. Además, en este medio se obtuvo menor desarrollo de callo desorganizado en todas las líneas. En ápices, las diferencias en cuanto a la formación de callo desorganizado son escasas, sin embargo, se obtiene un mayor porcentaje de explantes con brotes en medio con IAA. En definitiva, en las líneas evaluadas en este proyecto, la combinación de IAA y 6, BA conduce a mejores resultados que la combinación de NAA y 6, BA.

En este trabajo también se ha evaluado el efecto de diferentes citoquininas sobre la respuesta morfogénica. En este contexto, Selvaraj *et al* (2006) reportaron que la combinación de benciladenina (8,88 μM) y zeatina (2,5 μM) genera una elevada respuesta morfogénica a partir de explantes de hipocótilo. Sin embargo, los mismos autores señalaron en otro trabajo publicado un año más tarde (Selvaraj *et al*, 2007) que en explantes de cotiledón, la máxima inducción de callo organogénico se obtiene utilizando una combinación de naftalenacético (2,69 μM) y benciladenina (4,44 μM). En este trabajo se ha comparado la respuesta en medios suplementados con IAA como fuente de auxina, y zeatina (Z), ribósido de zeatina (rZ), kinetina más zeatina (K + Z) y 6-benciladenina más zeatina (BA + Z) como fuentes de citoquinina. Hemos podido comprobar que, en cotiledón, las combinaciones de IAA con Z, rZ o K + Z no generan apenas respuesta morfogénica. Sin embargo, en el medio con IAA y BA + Z se obtiene una elevada respuesta morfogénica, tanto a los 25 días de cultivo (i.e. explantes con yema) como a los 50 días (desarrollo de brotes). En la línea I102, en el medio suplementado con IAA + K + Z, se observó el desarrollo de brotes en un considerable número de explantes (i.e. 28%) a los 25 días de cultivo, mientras que en el medio suplementado con IAA + B + Z aún no se habían desarrollado estas estructuras. Sin embargo, tras el subcultivo de los explantes provenientes de IBZ en los dos medios, se vio que los subcultivados en medio IBZ se alcanzaron porcentajes de explantes con brotes elevados (i.e. 75%), mientras que los subcultivados en el medio suplementado con IAA + K + Z alcanzaban porcentajes de explantes con brotes más discretos (i.e. 53%). Estos resultados ponen en evidencia que lo más importante no es cómo de prematura es la inducción de brotes a partir de un explante sino más bien el número inicial de yemas que se inducen y que posteriormente van a dar lugar a brote, y en este sentido el medio suplementado con IAA + B + Z condujo significativamente a un número mayor de yemas.

Por lo que respecta al cultivo de ápices en estos mismos medios, solo se observa inhibición de la dominancia apical y formación de callo organogénico en el medio suplementado con BA y Z, en el que se observa la inducción de yemas en todos los explantes. Este medio de cultivo podría ser útil para la micropropagación de estas líneas utilizando como explante de partida brotes con ápice caulinar.

El meta-topoline (mT) es una citoquinina aromática natural que fue aislada por primera vez a partir de las hojas del chopo canadiense (*Populus x canadensis*) y que ha sido propuesta como alternativa a la BA (Strnad *et al*, 1997). Recientemente, Lata *et al* (2016) ha descrito que el mT promueve la formación de múltiples brotes y el enraizamiento *in vitro* de cáñamo (*Cannabis sativa*) a bajas concentraciones (2 μ M). Efectos similares fueron descritos por Werbrouck *et al* (1996) en lirio (*Spathiphyllum floribundum*), quienes observaron que las plantas enraizadas *in vitro* con mT producían un mayor número de raíces durante el periodo de aclimatación. En ciruelo (*Prunus domestica*), Gentile *et al* (2014) describieron que las plantas regeneradas con mT exhibían mayor porcentaje de enraizamiento y mayor número de raíces de longitud superior en comparación con las regeneradas con BA. De forma similar, Westhuizen (2014) describió que utilizando mT a bajas concentraciones (0,2 mg/L) se pueden enraizar brotes de distintas especies de Eucaliptus con menores incidencias de hiperhidratación en comparación con lo que ocurre empleando otras citoquininas. Generalmente, la aparición de tejidos hiperhidratados aumenta al incrementar la concentración de las citoquininas presentes en el medio de cultivo y, en este sentido, la BA es una de las citoquininas que promueve mayor hiperhidratación de tejidos. Bairu *et al* (2007) reportó que el cultivo de ápices en medio con mT da lugar a una mayor tasa de multiplicación y un buen enraizamiento en Aloe poliphylla.

No se ha encontrado bibliografía que describa el empleo del meta-topoline (mT) para la inducción de morfogénesis en melón. En este proyecto se han evaluado las dos líneas de mayor respuesta morfogénica (PST5 y MGO) en medios suplementados tanto con mT como con BA+Z. Se ha visto que en cotiledones, ya a los 25 días, se desarrollan brotes en el medio con mT, lo que no ocurre con una frecuencia tan alta en el medio con BA+Z. Por otro lado, también se ha podido observar que en el medio con mT se desarrollan más eventos de organogénesis por explante que en el medio con BA+Z, donde la organogénesis se encuentra más localizada en una determinada zona del explante. Además, se ha comprobado que la formación de callo desorganizado en el medio de cultivo con mT es significativamente menor, lo que, en parte, favorece el desarrollo de estructuras morfogénicas. Por tanto, el empleo de mT en estas líneas de melón se convierte en una excelente alternativa al uso de la BA.

5.3. Importancia del tipo de explante para la obtención de respuesta morfogénica

Según Moreno *et al* (1985), uno de los factores que más influye en la respuesta morfogénica es el tipo de explante. Estos autores demostraron que, en función de la fuente de material vegetal, los resultados pueden ser muy distintos. En sus experimentos con segmentos de hipocótilo y cotiledón, observaron que la frecuencia de callos con brotes en explantes procedentes de cotiledón era muy alta, mientras que los explantes procedentes de hipocótilo apenas originaban algunos brotes. Srivastava *et al* (1989) obtuvieron resultados similares en sandía. En este caso, aunque consiguieron la regeneración de plantas a partir de callos de hipocótilo, los resultados más interesantes siempre los obtuvieron con explantes procedentes de cotiledón. En experimentos realizados con explantes de distinta procedencia (cotiledón, hoja, hipocótilo y tallo), García-Sogo (1990) comprobó notables diferencias en la capacidad organogénica de estos explantes, siendo siempre los callos derivados de explantes de cotiledón los que exhibían mayor aptitud morfogénica. En los trabajos realizados con los mutantes de melón 'Yellow Green' y 'Halo', Orts *et al* (1986) observaron estructuras organizadas en los explantes de hipocótilo y tallo del cultivar 'Yellow Green' con una frecuencia muy alta (100%), pero estas estructuras no dieron lugar en ningún caso a la formación de brotes. Sin embargo, el estudio morfogénico en explantes de cotiledón y hoja reveló la diferenciación de brotes con unas frecuencias del 13,1% y 14,7% respectivamente. Punja *et al* (1990) obtuvieron

frecuencias de regeneración que oscilaron entre el 0% y el 75% en explantes de cotiledón de melón y entre el 0% y el 38% en explantes de hoja. Da Silva (1999) también comprobó que los callos derivados de cotiledón propiciaban mejor respuesta que los de hoja en las cinco líneas de melón que estudió. En trabajos más recientes también se ha reportado la misma tendencia. Así, Nuñez Pelanius *et al* (2007) indicaron que los explantes de cotiledón de melón Galia generan mayor morfogénesis que los que derivan de hipocótilo y hoja. En definitiva, son varios los autores que coinciden en que los cotiledones son la mejor fuente de material vegetal para realizar estudios morfogenéticos (Wehner & Locy, 1981; Moreno *et al*, 1985; Cade *et al*, 1990). Con todo, Yadav (1996) indicó que, posiblemente, la cantidad de brotes que se obtienen a partir de hoja de melón puede ser considerablemente mayor que la que se obtiene a partir de cotiledón; lo que supone una gran ventaja cuando se dispone de poca semilla.

En este trabajo se han utilizado explantes de cotiledón y ápice para determinar qué combinaciones de reguladores de crecimiento resultan más adecuadas tanto para la inducción de morfogénesis como para la regeneración de plantas. Tras determinar que, con independencia de la línea, los mejores resultados se obtenían en los medios ImT e IBZ, se decidió realizar el estudio con microexplantes de hoja joven. Sin embargo, debido a limitaciones de tiempo, solo se pudo estudiar la respuesta morfogenética en el medio IBZ. Habitualmente, de un cotiledón se suelen extraer dos explantes, uno distal y uno proximal. Empleando hoja se pueden obtener en torno a 25 explantes. Este tipo de aproximaciones, si resultan válidas, son especialmente interesantes ya que permiten amplificar la posibilidad de obtener regenerantes a partir de un escaso número de plantas de partida. Los experimentos realizados permitieron comprobar que, por lo que respecta a melón, los microexplantes de hoja se pueden emplear para amplificar la respuesta organogénica. En efecto, en torno al 80% de los explantes dio lugar a estructuras organogénicas en las líneas I102 y BL, lo que quiere decir que se pueden obtener resultados similares a los que se consiguen de la forma habitual, pero con muchos menos explantes de partida, y por lo tanto se requieren menos plantas de partida. Tras el subcultivo, se obtuvieron tasas de regeneración de estructuras organogénicas en torno al 47% en la línea I102 y algo menores en el resto de las líneas, en torno 10-20%. Pese a que los resultados parecen ser más pobres si se comparan con los obtenidos en cotiledones, conviene indicar que de una sola hoja se pueden obtener 25 explantes, mientras que en un cotiledón apenas dos explantes, lo que tiene la enorme ventaja de amplificar la capacidad morfogenética a partir de un número reducido de plantas. Este aspecto es de especial interés cuando se dispone de un escaso número de semillas (i.e. semillas de enorme valor), cuando la calidad de la germinación es deficiente y tan sólo en un porcentaje reducido de las semillas da lugar a plántulas de calidad o cuando las semillas adolecen de graves problemas de contaminación, y sólo unas pocas se esterilizan adecuadamente. Por tanto, si parte de los microexplantes generan estructuras organogénicas, se podrían regenerar muchas plantas a partir de un reducido número de plantas de partida.

5.4. El nivel de ploidía de las plantas regeneradas *in vitro*

La poliploidía es uno de los cambios somaclonales que aparecen con mayor frecuencia en las plantas regeneradas *in vitro*. La aparición de poliploides de plantas regeneradas *in vitro* puede deberse a dos causas. La principal causa de este fenómeno es la regeneración a partir de células tetraploides preexistente en el tejido vegetal de partida (mixoploidía). La otra causa a la que puede deberse la obtención de plantas tetraploides es a los procesos de endorreproducción o endomitosis. En este ámbito, 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, parte 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 absoluta certeza de que realmente sean tetraploides, lo que implica un trabajo adicional para corroborar que la progenie obtenida es triploide. Por el contrario, utilizando plantas tetraploides regeneradas *in vitro* como parentales se puede tener la seguridad de que la progenie que se obtiene es de naturaleza triploide. 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 melón. Por otro lado, la determinación del nivel de ploidía en plantas regeneradas en medios con mT o BA parece indicar que la tasa de variantes numéricas es más dependiente de la variedad que del regulador de crecimiento empleado. Con todo, la metodología que se describe en este trabajo de investigación también es útil para abordar otras aplicaciones derivadas del cultivo *in vitro*, como, por ejemplo, la transformación genética. En este sentido, empleando explantes de cotiledón de 2-3 días se han obtenido aproximadamente un 50% de plantas diploides en dos líneas. En definitiva, estos resultados indican que el método de regeneración que se describe en este trabajo de investigación es útil tanto para la generación de poliploides como para la regeneración de plantas transgénicas de naturaleza diploide.

6. Conclusiones

La evaluación de diferentes requerimientos culturales y morfogenéticos relacionados con la inducción de organogénesis adventicia en dos líneas tradicionales [i.e. Melón Amarillo de Onteniente (MGO) y Blanco del Perelló (BL)] y dos líneas comerciales [i.e. Cantalupo Vendrantais (I102) y Piel de sapo (PST5)] de melón que se emplean para el cultivo ecológico, ha revelado lo siguiente:

1. La combinación de ácido indolacético y benciladenina, aunque también su combinación con zeatina, generan una elevada respuesta morfogenética y promueven el desarrollo de un gran número de brotes por explante.
2. El cultivo de ápices en un medio suplementado con 6 benciladenina inhibe la dominancia apical y genera callos con un elevado potencial morfogenético.
3. El cultivo de cotiledones en un medio suplementado con meta-topoline promueve la formación de múltiples brotes a las pocas semanas. Los explantes cultivados en este medio reducen significativamente la formación de callo desorganizado a favor de un desarrollo organizado.
4. A partir de microexplantes de hoja de planta axénica se obtiene una muy buena respuesta organogénica, aunque menor que la que se obtiene a partir de explantes de cotiledón. Con todo, la enorme cantidad de explantes que se obtiene a partir de una sola hoja justifica plenamente su empleo, especialmente cuando se dispone de poca semilla de partida.

7. Bibliografía

- ADELBERG JW, RHODES BB, SKORUPSKA HT & BRIFGES WC; 1994. Explant origin affects the frequency of tetraploid plants from tissue cultures of melon. *HortScience*, 29(6), pp:689-692.
- ALBALAT PERAITA V; 2016. Sistemas de alto rendimiento en la generación in vitro de melón y pepino. (<http://hdl.handle.net/10251/76819>).
- ALI N, SKIRVIN RM & SPLITTSTOESSER; 1991c. Regeneration of *Cucumis sativus* from cotyledons of small explants. *HortScience*, 26 (7): 925.
- BAIRU MW, STIRK WA, DOLEZAL K, VAN STADEN J; 2007. Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topoline and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 90, 15-23.
- BORDÁS M, MONTESINOS MC, DABAUZA M, SALVADOR A, ROIG LA, SERRANO R, MORENO V; 1997. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL 1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* 6, pp:41-50.
- CADE RM, WEHNER TC & BLAZICH FA; 1990. Effect of explant age and growth regulator concentration on adventitious shoot formation from cucumber cotyledonary tissue. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (13): 14-17.
- CHAUX CL, Y FOURY CL; 1992. *Productions Legumieres*. Editorial Lavoisier París. Tomo 3, pp: 303-360.
- COMITÉ D'AGRICULTURA ECOLÒGICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA (<http://www.caecv.com/que-es-la-agricultura-ecologica/>)
- DA SILVA SOUZA A; 1999. Respuesta cultural y orfogenética de explantes y protoplastos de diversos cultivares de melón y primeros resultados en torno a la hibridación somática. *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus*. Thunberg Matsumura & Nakai. Tesis doctoral Universidadpolitécnica de Valenica, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos.
- DABAUZA M; 1995. Selección y caracterización de híbridos somáticos *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis anguria* L. var. *Longipes*, *Cucumis melo* L. (+) *Cucumis myriocarpus* Naud. Y *Cucumis melo* L. (+) *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. 272p
- DEBEJAUJON I & BRANCHARD M; 1992. Induction of somatic embryogenesis and caulogenesis from cotyledon and leaf protoplast derived colonies of melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports*, 12 (1), pp: 37-40.
- DONG JZ & JIA SR; 1991. High efficiency plant regeneration from cotyledons of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). *Plant Cell Reports*, v.9, pp: 559-562

- ESQUINAS-ALCAZAR, GULICK JT & GULICK JP; 1983. Genetic resources of Cucurbitaceae: a global report. International Board for Plants Genetic Resources, Rome.
- EZURA H & OOSAWA K; 1994. Ploidy of somatic embryos and the ability to regenerate plantlets in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell Reports*, 14 (2/3), pp: 107-111.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2017 (<http://faostat.fao.org>).
- GAMBLEY RL & DODD WA; 1990. An *in vitro* technique for the production de novo of multiple shoots in cotyledon explants of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20(3): 177-183.
- GARCÍA-SOGO B; 1990. Morfogénesis en cultivo in vitro de melón; regeneración de plantas con alta eficacia a partir de células y protoplastos. Tesis Doctoral. Valencia, España: Universidad de Valencia. Facultad de ciencias biológicas. 337p.
- GENTILE A, GUTIÉRREZ MJ, MARTINEZ J, FRATTARELLI A, NOTA P, CABONI E; 2014. Effect of meta-topolin on micropropagation and adventitious shoot regeneration in *Prunus* rootstocks. *Plant Tissue Culture and Organ Culture* 118, pp: 373-381.
- GÓMEZ-GUILLAMÓN ML, CAMERO R & GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ JJ; 1997. El melón en invernadero. *Compendios de Horticultura*, 10. Ediciones de Horticultura SL, pp: 67-77.
- HANDRO W & 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.
- Harlan JR, Wet JMJ, Stemler ABL; 1997. Origin of Africa plant domestication. In: *The origin of agriculture and crop domestication*. A.B. Damania *et al.* (Eds.). ICARDA, IPGRI, FAO e UC/GRCP.
- HOOSAIN M, RAHMAN SM, ISLAM R & JOADER OI; 1993. High efficiency plant regeneration from petiole explants of *Carica papaya* L. through organogenesis. *Plant Cell Reports*, 13: 99102.
- JAIN K & MORE TA; 1992. In vitro regeneration in *Cucumis melo* cv. Pusa Madhuras. *Cucurbit Genetics Cooperative*, (15): 62-64.
- JEFFREY C; 1990. *Systematic of the Cucurbitaceae: An overview in biology and utilization of the Cucurbitaceae* (DM Bates, RW Robinson y C Jeffrey, eds.) Cornell University Press, Ithaca, USA.
- KATHAL R, BHATNAGAR SP & BHOJWANI SS; 1994. Plant regeneration from the callus derived from root explants of *Cucumis melo* L. cv. Pusa Sharbati. *Plant Science*, 98(1/2), pp: 137-142.
- KERJE T; 2003. *Descriptors for melon (Cucumis melo, L.)*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- KIRKBRIDE JH; 1993. *Biosystematic monograph of the genus Cucumis (Cucurbitaceae)*. Parkway Publishers, 159 p., Boone, North Carolina, USA.
- LARKING PJ & SCOWCROFF WR; 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures form plant improvement. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 60(4), pp: 197-214.

- LATA, HEMANT & CHANDRA, SUMAN & TECHEN, NATASCHA & A. KHAN, IKHLAS & ELSOHLY, MAHMOUD; 2016. In vitro mass propagation of *Cannabis sativa* L.: A protocol refinement using novel aromatic cytokinin meta-topolin and the assessment of eco-physiological, biochemical and genetic fidelity of micropropagated plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 3. 10.1016/j.jarmap.2015.12.001.
- LÁZARO A, FERNÁNDEZ IC, BORRERO MJ, CABELLO F, LÓPEZ-SESÉ A, GÓMEZ GUILLAMÓN ML, PICÓ B; 2016. Agromorphological genetic diversity of Spanish traditional melons. *Genetic resources and crop evolution* (ISSN: 0925-9864).
- LITZ RE & JARRET RL; 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Roca WM; Mroginski LA (eds.). *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, parte A, cap. 7, pp: 143-172.
- MÁRMOL J; 2007. Cultivo intensivo del melón. Hojas divulgadoras Núm. 21-25 HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- MÁRMOL J; 2008. Cultivo intensivo de melón. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación.
- MAROTO JV; 1995. Botánica, fisiología y adaptabilidad del melón. *El cultivo del melón*. Fundación Cultural Caja Rural de Valencia, pp: 13-17.
- MATHEWS H, SCHOPKE C, CARCAMO R, CHAVARRIAGA P, FAUQUET C & BEACHY RN; 1993. Improvement of somatic embryogenesis and plant recovery in cassava. *Plant Cell Reports*, 13, pp: 328-333.
- MELARA MV & GATICA ARIAS AM; 2009. Effect of BAP and IAA on shoot regeneration in cotyledonary explants of Costa rica malon genotypes. *Agronomía Costarricense* 33 (1): 125-131. ISSN: 0377-9424.
- MORENO V, GARCÍA-SOGO M, GRANELL I, GARCÍA-SOGO B & ROIG LA; 1985. Plant regeneration from calli of melon (*Cucumis melo* L. cv. 'Amarillo oro'). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5, pp: 139-146.
- MSIKITA W, SKIRIVIN RM, JUVIK JA, SPLITTSTOESSER WE & ALI N; 1990. Regeneration and flowering *in vitro* of 'Burpless Hybrid' cucumber cultured from exiced seed. *HortScience*, 25 (4): 474-477.
- NEGRI V, BECKER H, ONNELA J, SARTORI A, STRJERU S & LALIBERTÉ B; 2000. A first inventory o fon-farm conservation and management activities in Europe including examples of formal and informal sector cooperation. In: Laliberté *et al.* ECP/GR In situ and on farm conservation network report of a task force on wild species conservation in genetic reserves and a task force on on farm conservation and management, Joint Meeting 18-20 May, Isola Polvese, Italy.
- NÚÑEZ-PALENIUS HG, CANTLIFFE DJ, HUBER DJ, CIARDI J & KLEE H; 2006. Transfromation of muskmelon 'Galia' hybrid parental line (*Cucumis melo* L. var. *reticulatos* Ser.) with an antisense ACC oxidase gene. *Plant Cell Rep*, 25, pp: 198-205.
- NÚÑEZ-PALENIUS HG, FEBRES VJ, OCHOA-ALEJO N, KLEE HJ & CANTLIFFE DJ; 2007. Effect of explant source on regeneration and genetic transfromation efficiency in Galia melon (*Cucumis melo* L.) male and female parental lines. Horticultural Sciences Department. IFAS. University of Florida, Gainesville, FL 32611, USA.

- ORTS MC, ROCHE MV, SALVADOR A, GARCÍA-SOGO B, ROIG LA & MORENO V; 1986. Características culturales y morfogénicas de dos mutantes recesivos de melón: 'Yellos-Green' y 'Halo'. Actas de II Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, vol. II, pp: 861-869. Córdoba, España.
- PÉREZ-SANJUAN A; 1999. Estudio de las primeras etapas del proceso de transformación genética en pepino mediante co-cultivo con *Agrobacterium tumefaciens*. Trabajo Final de Carrera. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- PUNJA ZK, ABBAS N, SARMENTO GG & TANG FA; 1990a. Regeneration of *Cucumis sativus* var. *sativus* and *C. sativus* var. *hardwickii*, *C. melo*, and *C. metuliferus* from explants through somatic embryogenesis and organogenesis. Influence of explant source, growth regulator regime and genotype. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21 (2), pp: 93-102.
- SELVARAJ N, VASUDEVAN A, MANICKAVASAGAM M & GANAPATHI A; 2006. *In vitro* organogenesis and plant formation in cucumber. *Biologia Plantarum* 50(1): 123-126.
- SELVARAJ N, VASUDEVAN A, MANICKAVASAGAM M, KASTHUTITENGAN S & GANAPATHI A; 2007. High frequency shoot regeneration from cotyledon explants of cucumber via organogenesis. *Scientia Horticulture* 112 (2007) 2-8.
- SILBERSTEIN L, KOVALSKI I, HUANG R, ANAGOSTOU K, JAHN JM, PERL-TREVES R; 1999. Molecular variation in melon (*Cucumis melo* L.) as revealed by RFLP and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 79, pp: 101-111.
- SORIANO B; 2012. Morfogénesis *in vitro* y obtención de plantas transgénicas de melón (*Cucumis melo* L.). Universidad de Almería, Escuela Superior de Ingeniería, departamento de biología vegetal y ecología.
- SRIVASTAVA DR, ANDRIANOV VM & PIRUZIAN ES; 1989. Tissue culture and plant regeneration of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad. cv. Melitopolski). *Plant Cell Rep.* 83300-302.
- STRAND M, HANUS J, VANEK T, KAMINEK M, BALLANTINE JA, FUSSELL B & HANKE DE; 1997. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*Populus x canadensis* Moench., cv. Robusta). *Phytochemistry*, 45, pp: 213-218.
- TABEI Y, KANNO T & NISHIO T; 1991. Regulation of organogenesis and somatic embryogenesis by auxin in melon, *Cucumis melo* L. *Plant Cell Reports*, 10 (5), pp: 225-229.
- TRENTINI L; 1998. Origine e botanica del melone. *Supplemento a l'Informatore Agrario* 3:56.
- VAN DEN BULK RW, LÖFFLER HJM, LINDHOUT WH & KOORNNEEF M; 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. *Theoretical and applied Genetics* 80, pp: 817.
- WHENER TC & LOCY RD; 1981. In vitro adventitious shoot and root formation of cultivars and lines of *Cucumis sativus*. *HortScience* 16: 759.
- WERBROUCK SPO, STRNAD M, VAN O, NCKELEN HA & DEBERGH PC; 1996. Meta-topolin, an alternative to benzyladenine in tissue culture. *Physiologia Plantarum* 98, pp: 291-297.
- WESTHUIZEN AVD, 2014. The use of meta-topolin as an alternative cytokine in the tissue culture of *Eucalyptus species*. *Acta Horticulture* 1055, pp: 25-28.
- YADAV RC, SALEH MT & GRUMET R; 1996: High frequency shoot regeneration from leaf explants of muskmelon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 45(3), pp: 207-214.

ZAPATA M, CABRERA P, BAÑON S, ROTH P; 1989. El melón. 174 p. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid

ZAPATA M; 1989. La comercialización del melón: Evolución histórica y proceso actual. Horticultura 46, pp: 16-23.