

RESUMEN

En el contexto del programa de mejora genética que se lleva a cabo en el IVIA, en esta tesis se han desarrollado una serie de herramientas que implementen el programa y permitan aumentar la eficacia del mismo. En primer lugar, se ha estudiado la diversidad genética de la colección de germoplasma del IVIA, por medio de marcadores moleculares tipo microsatélites, ya que los recursos fitogenéticos son la principal herramienta de la mejora. Combinando 3 tipos de análisis: Análisis Factorial de Correspondencia, método de agrupamiento Bayesiano y UPGMA se ha determinado la estructura poblacional de la colección. Se han obtenido 5 subpoblaciones relacionadas con los orígenes de las accesiones. Las distancias genéticas obtenidas y los análisis de agrupación sugieren que las accesiones introducidas en la cuenca mediterránea procederían de Asia. Por otra parte, se han obtenido 3 subpoblaciones formadas por accesiones de origen europeo que demuestran la alta diversificación varietal y la adaptación de la especie en los países mediterráneos a pesar de su tardía introducción en Europa. También el análisis de los alelos de compatibilidad ha aportado información sobre el movimiento de germoplasma y ha contribuido a conocer los grupos de intercompatibilidad dentro de la colección. La información genética generada complementa la fenotípica obtenida previamente por el IVIA y será de gran ayuda en la planificación de los futuros cruzamientos del programa.

Otra herramienta biotecnológica para implementar el programa de mejora ha sido la puesta a punto de técnicas para aumentar la diversidad basada en genotipos con diferentes niveles de ploidía. Por una parte, se ha utilizado la mutagénesis química con colchicina y posterior selección *in vitro* con el objetivo de obtener poliploides, de gran interés en níspero, ya que puede dar lugar a variedades con frutos de mayor tamaño (tetraploides) o frutos sin semilla (triploides). Se obtuvieron poliploides estables sumergiendo las semillas sin germinar en una solución de colchicina, dos triploides ($3x$) posiblemente ya presentes en el lote de semilla híbrida de partida, y un tetraploide ($4x$). El nivel de ploidía se determinó primero mediante citometría de flujo, y los resultados se confirmaron posteriormente por conteo cromosómico en hoja, ápice radicular, y evaluación morfológica.

Por otro lado, con la finalidad de obtener haploides y doble-haploides (DH), se ha estudiado la capacidad de inducción de embriogénesis gametofítica en ambos tipos de gametos, masculinos (cultivo de microsporas aisladas y anteras) y femeninos

(partenogénesis *in situ* inducida por polen irradiado). La producción de líneas puras mediante técnicas biotecnológicas en una única generación, es especialmente útil en especies de largo periodo intergeneracional como el níspero. Los genotipos haploides permiten obtener individuos homocigotos en un solo paso, facilitan estudios genéticos, alineamiento de secuencias y explotar el vigor híbrido. En los experimentos de cultivo de microsporas aisladas se consiguió inducir callogénesis en diversas accesiones de la especie, siendo el primer paso hacia la respuesta morfogénica. El cultivo de anteras ha dado lugar a una plántula triploide ($3x$), posiblemente debido a una duplicación cromosómica espontánea durante el proceso de regeneración, y ha permitido demostrar que es posible la inducción de embriogénesis en níspero aunque hay muchos factores que influyen en la respuesta. Mediante partenogénesis *in situ* con polen irradiado con rayos gamma, y posterior rescate y cultivo de embriones *in vitro* ha sido posible obtener cuatro plantas haploides. El nivel de ploidía se determinó primero mediante citometría de flujo, los resultados se confirmaron posteriormente por conteo cromosómico en hoja.