

# UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

INSTITUTO BIOMOLECULAR DE MEDIOS  
CELULARES Y PLANTAS

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS



## ***REGENERACIÓN DE CALABACÍN (CUCURBITA PEPO L.) MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO***

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO: Sergio Asins Alepuz

TUTOR: Dr. Alejandro Atarés Huerta

PRIMER COTUTOR: Dr. Vicente Moreno Ferrero

*Curso académico 2015/2016*

*Valencia, Septiembre de 2016*





**Título:** Regeneración de calabacín (*Cucurbita pepo* L.) mediante técnicas de cultivo *in vitro*

**Resumen:** El cultivo *in vitro* engloba un conjunto de técnicas que permite la multiplicación (micropropagación), el saneamiento (cultivo de meristemos y microinjerto) y la mejora genética (obtención de haploides, aprovechamiento de la variación somaclonal, fusión de protoplastos, transformación genética,...) de prácticamente todas las especies vegetales de interés agronómico. Para llevar a cabo todo este tipo de técnicas es necesario disponer de metodologías que permitan la regeneración de plantas a partir de diferentes tipos de explantes. En nuestro grupo hemos trabajado con especies pertenecientes a la familia de las solanáceas (tomate) y de las cucurbitáceas (melón, pepino y sandía) y queríamos comenzar a trabajar con una especie como calabacín (*Cucurbita pepo* L.).

El presente Trabajo Fin de Grado se ha centrado en establecer una metodología que permita la inducción de organogénesis directa y la regeneración de plantas a partir del cultivo *in vitro* de explantes primarios de calabacín. Para ello, se ha partido de semillas de tres líneas diferentes. A estas semillas se le ha eliminado la cubierta, se han esterilizado y se han cultivado en medio de germinación para que en pocos días desarrollen plántulas. A partir de estas plántulas se han obtenido los distintos explantes que se han utilizado en el trabajo: cotiledón, hipocótilo y ápice meristemático. Se ha conseguido regenerar brotes a partir de los tres genotipos evaluados en diferentes medios de cultivo. Los brotes regenerados se han individualizado y tras su enraizamiento y aclimatación se han conseguido plantas con un crecimiento normal en condiciones de cultivo *in vivo*.

**Palabras clave:** Calabacín - Cultivo *in vitro* – Morfogénesis

**Autor:** Sergio Asins Alepuz

**Localidad y fecha:** Valencia, septiembre de 2016

**Tutor:** Dr. Alejandro Atarés Huerta

**Primer cotutor:** Dr. Vicente Moreno Ferrero

**Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG/M:** Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc).

**Title:** Regeneration of zucchini (*Cucurbita pepo* L.) by *in vitro* plant tissue culture techniques

**Summary:** Plant tissue culture includes a set of techniques that virtually allows the multiplication (micropropagation), sanitation (meristem culture and micrografting) and genetic improvement (production of haploid plants, use of somaclonal variation, protoplast fusion, genetic transformation,...) all plant species of agronomic interest. To carry out all these techniques is necessary to have methodologies that allow the plants regeneration from different types of explants. We have worked with species belonging to the family Solanaceae (tomato) and Cucurbitaceae (melon, cucumber and watermelon) and wanted to start working with a species like zucchini (*Cucurbita pepo* L.).

This Project has focused on establishing a methodology for direct induction of organogenesis and plant regeneration from plant tissue culture of zucchini primary explants. For this purpose, we have worked with seeds from three different varieties. The cover of the seeds was removed, then the seeds were sterilized and cultured in germination medium to develop seedlings. From these seedlings we have obtained different explants: cotyledon, hypocotyl and meristem apex. The regenerated shoots from the three genotypes have been individualized. After their rooting and acclimatization plants have been achieved normal growth in the greenhouse.

**Keywords:** Zucchini – Plant tissue culture - Morphogenesis

# Índice

<b>1.- Introducción</b>	1
1.1.- Taxonomía y características morfológicas del calabacín	1
1.2.- Usos alimenticios y el valor nutricional del calabacín	3
1.3.- La importancia económica del cultivo del calabacín	4
1.4.- El cultivo del calabacín	6
1.5.- La mejora genética del calabacín	7
1.6.- El cultivo <i>in vitro</i> : fundamentos y sus aplicaciones en el calabacín	9
1.7.- La regeneración de plantas <i>in vitro</i> : fundamentos y sus aplicaciones en el calabacín	10
<b>2.- Objetivos</b>	12
<b>3.- Aspectos metodológicos</b>	13
3.1.- Material vegetal	13
3.2.- Medios de cultivo	13
3.3.- Esterilización	13
3.4.- Recipientes de cultivo	14
3.5.- Condiciones de cultivo	14
3.6.- Trabajo en la cabina de flujo laminar	14
<b>4.- Procedimiento experimental</b>	16
4.1.- Fase de implantación	16
4.2.- Crecimiento de las plántulas	16
4.3.- Evaluación de la capacidad de regeneración	17
4.4.- Elongación, enraizamiento y aclimatación de las plantas	18
<b>5.- Resultados y discusión</b>	20
5.1.- Fase de implantación	20
5.2.- Crecimiento de las plántulas	20
5.3.- Evaluación de la capacidad de regeneración	22
5.4.- Elongación, enraizamiento y aclimatación de las plantas	26
<b>6.- Conclusiones</b>	29
<b>7.- Bibliografía</b>	30
<b>Anexos</b>	31

# Índice de figuras

- Figura 1:** Planta de calabacín
- Figura 2:** Flores y frutos de calabacín
- Figura 3:** Producción de calabazas y calabacines por país en 2013
- Figura 4:** Rendimiento de calabazas y calabacines por país en 2013
- Figura 5:** Producción de calabazas y calabacín en España
- Figura 6:** Cultivo del calabacín en un invernadero de Almería
- Figura 7:** Cabina de lujo laminar y superficie de trabajo con instrumental
- Figura 8:** Explantes de calabacín para experimentos de regeneración adventicia al inicio del cultivo
- Figura 9:** Planta de calabacín recién aclimatada
- Figura 10:** Desarrollo inicial de plántulas de calabacín procedentes de semillas esterilizadas cultivadas en medio de germinación
- Figura 11:** Fenotipo de explantes de cotiledón e hipocótilo de calabacín cultivados durante 30 días en medio suplementado con 2,4-D y Tidiazuron
- Figura 12:** Explantes de calabacín empleados en el experimento de regeneración
- Figura 13:** Fenotipo de explantes de cotiledón, hipocótilo y ápice de calabacín cultivados durante 30 días en medio NP 30 10
- Figura 14:** Regeneración de ápices y brotes a partir de un explante de ápice meristemático de la variedad 2 cultivado durante 40 días en medio IKB 05 20 20
- Figura 15:** Formación de callo desorganizado a partir de explantes de hipocótilo de la variedad 2 cultivado durante 40 días en medio IKB 05 20 20
- Figura 16:** Regeneración de un brote adventicio a partir de un explante de cotiledón de la variedad 1 tras 45 de cultivo en IB 05 20
- Figura 17:** Brote adventicio regenerado a partir de un explante de cotiledón de la variedad 1 tras 15 días de cultivo en NBCu
- Figura 18:** Brotes de calabacín recién enraizados tras 10 días en medio de enraizamiento
- Figura 19:** Planta de calabacín proveniente de cultivo *in vitro* y cultivada en el invernadero.

## Índice de tablas

**Tabla 1:** Composición nutritiva de 100 g de fruto de calabacín

# 1.- Introducción

## 1.1.- Taxonomía y características morfológicas del calabacín

Las cucurbitáceas son una familia de plantas originarias en su mayor parte de América. La familia Cucurbitaceae es una de las más amplias y diversas. Los últimos estudios indican que contiene un total de 130 géneros y unas 800 especies. Las de mayor importancia económica son: el melón (*Cucumis melo* L.), el pepino (*Cucumis sativus* L.), la sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), la esponja vegetal (*Luffa acutangula* (L.) Roxb. y *Luffa aegyptiaca* Mill), el chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y la alcayota (*Cucurbita ficifolia* Bouché). El calabacín pertenece a la especie *Cucurbita pepo* en la que se distinguen tres subespecies: la subespecie *fraterna* (que no tiene variedades cultivadas), la subespecie *ovifera* (con variedades silvestres y cultivadas) y la subespecie *pepo* que sólo tiene variedades cultivadas entre las que se encuentran el calabacín (Paris y Maynard, 2008).

El calabacín (*Cucurbita pepo* L.) es una planta herbácea (Figura 1). Se trata de una planta de crecimiento limitado y porte rastrero. El sistema radicular está constituido por una raíz principal axonomorfa, que alcanza un gran desarrollo en relación con las raíces secundarias, las cuales se extienden superficialmente. Pueden aparecer raíces



**Figura 1:** Planta de calabacín. Fuente: Wikipedia.

adventicias en los entrenudos de los tallos cuando se ponen en contacto con tierra húmeda. Sobre el tallo principal se desarrollan tallos secundarios que se atrofian si no se realiza una poda para que ramifique a dos o más brazos. La planta puede alcanzar un metro o más de altura, dependiendo de la variedad comercial. Posee entrenudos cortos de los que parten las hojas, flores, frutos y numerosos zarcillos. La hoja es palmeada, de limbo grande con cinco lóbulos pronunciados de margen dentado. El haz no tiene pelos y el envés es áspero y está recubierto de fuertes pelos cortos y puntiagudos a lo largo de los nervios foliares. Las hojas están sostenidas por pecioloos fuertes y alargados, recubiertos con fuertes pelos rígidos.

Aunque actualmente su fruto se emplea como alimento, algunos estudios indican que el primer uso que se le dio a esta especie fue el consumo de sus semillas comestibles



(Paris, 1989). Sin embargo, con la domesticación, se obtuvieron genotipos con frutos más grandes, amiláceos y menos amargos. Como las restantes especies del género *Cucurbita*, hay que ubicar su origen en el continente americano donde se han encontrado las muestras más antiguas de este cultivo.

La floración normalmente es monoica, por lo que en una misma planta coexisten flores masculinas y femeninas. Éstas son solitarias, vistosas, axilares, grandes y acampanadas. El cáliz es zigomorfo (presenta un sólo plano de simetría) y consta de cinco sépalos verdes y puntiagudos. La corola es actinomorfa y está constituida por cinco pétalos de color amarillo. La flor femenina se une al tallo por un corto y grueso pedúnculo de sección irregular pentagonal o hexagonal, mientras que en las flores masculinas (de mayor tamaño) dicho pedúnculo puede alcanzar una longitud de hasta 40 centímetros. El ovario de las flores femeninas es ínfero, tricarpelar, trilobular y alargado. Los estilos, en número de tres, están soldados en su base y son libres a la altura de su inserción con el estigma, éste último dividido en dos partes. Las flores masculinas poseen tres estambres soldados.



**Figura 2:** Flores y frutos de calabacín.  
Fuente: Wikipedia.

El fruto (Figura 2) es un pepónide carnoso, sin cavidad central, de color variable, liso, estriado o reticulado. El fruto maduro contiene numerosas semillas y no es comercializable debido a la dureza del epicarpio y a su gran volumen. Las semillas, que también son comestibles, son de colores blanco-amarillento, ovals, alargadas, puntiagudas, lisas y con un surco longitudinal paralelo al borde exterior. Sus dimensiones son 15 mm de longitud, 6-7 mm de anchura y 1-2 mm de grosor. El fruto se recoge manualmente, dependiendo del cultivar y de la temperatura, tras 45-65 días desde el inicio de la floración. Los frutos con valor comercial son de 15 a 18 cm de longitud y un peso de 200 a 250 gramos. En ese estado las semillas

todavía no han empezado a crecer y a endurecerse. Por tanto las semillas inmaduras de estos frutos son blandas, delgadas y con brillo (Maroto, 2002).

## 1.2.- Usos alimenticios y el valor nutricional del calabacín

Existen pruebas de que el fruto del calabacín ya era consumido por los egipcios y, más tarde, por griegos y romanos. Sin embargo, fueron los árabes quienes extendieron su cultivo por las regiones mediterráneas, donde se convirtió en un alimento de consumo habitual en la Edad Media. En las zonas del norte de Europa, el inicio de su consumo fue más tardío y no tuvo lugar hasta la II Guerra Mundial. Hasta hace poco tiempo, el calabacín era una hortaliza de producción estacional que estaba muy presente en las dietas veraniegas, ya que se cultivaba entre julio y noviembre. Actualmente, los nuevos sistemas de producción y la mejora genética de las variedades cultivadas han permitido que podamos disfrutar de su consumo durante todo el año.

El fruto completo es comestible, ya sea crudo o cocinado, sin la eliminación de las semillas ni del tejido externo. Esto es posible gracias a que la recolección se hace antes de que el fruto alcance su madurez. La principal forma de consumo de su fruto es frito con aceite, aunque pueden ser empleados también en sopas, confituras, cremas, empanados, rellenos y como guarnición de pescados y carnes. Es un excelente primer plato ligero, pues, aunque rico en elementos nutritivos, es poco calórico.

Gracias a la composición del fruto de calabacín su consumo representa una buena fuente de sales minerales, principalmente potasio. Hay que destacar también su elevado contenido en vitamina C y folatos. Es un alimento de bajo aporte calórico, idóneo para incluir en la dieta de personas con exceso de peso debido a su bajo aporte calórico (17 kcal/100g), bajo índice glucémico (15) y su moderado nivel de saciedad (Tabla 1).

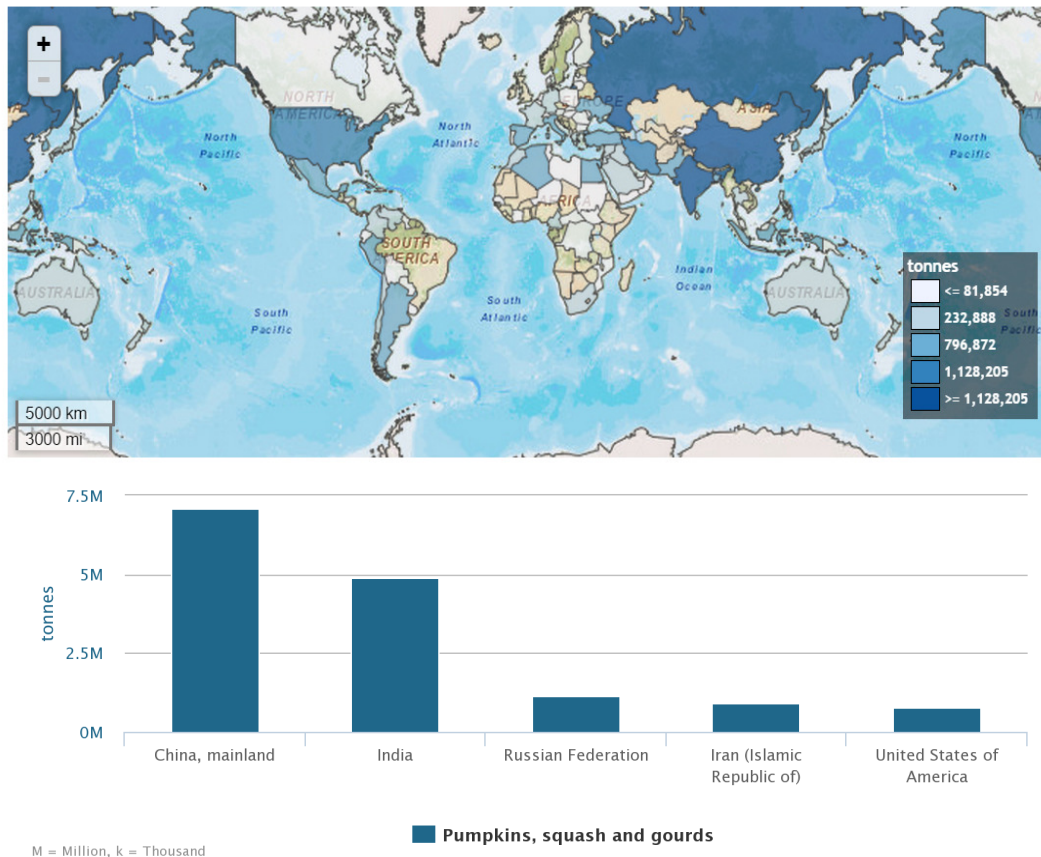
**Tabla 1:** Composición nutritiva de 100 g de fruto de calabacín. Fuente: USDA Agricultural Research Service National Nutrient Database (Basic Report: 11477, Squash, summer, zucchini, includes skin, raw).

Agua	94,79 g	Potasio	236 mg	Vit. A	10 µg
Proteína	1,21 g	Calcio	16 mg	Vit. C	17,9 mg
Grasa Total	0,32 g	Hierro	0,37 mg	Folato	24 mg
Glúcidos	3,11 g	Magnesio	18 mg		
Fibra	1,00 g				
Azúcares	2,11 g			Valor energético	17 kcal

Recientemente, se han comenzado a consumir otras partes de la planta. Las flores del calabacín son un producto con cada vez más aceptación que suelen comerse crudas en ensaladas o cocinadas con otras verduras. Además, las semillas son ricas en ácidos grasos vegetales, proteínas, vitaminas del grupo B y constituye una buena fuente de selenio y zinc, además de Omega 3 y Omega 6. También son un buen antioxidante por su elevado contenido en vitamina E (carotenos).

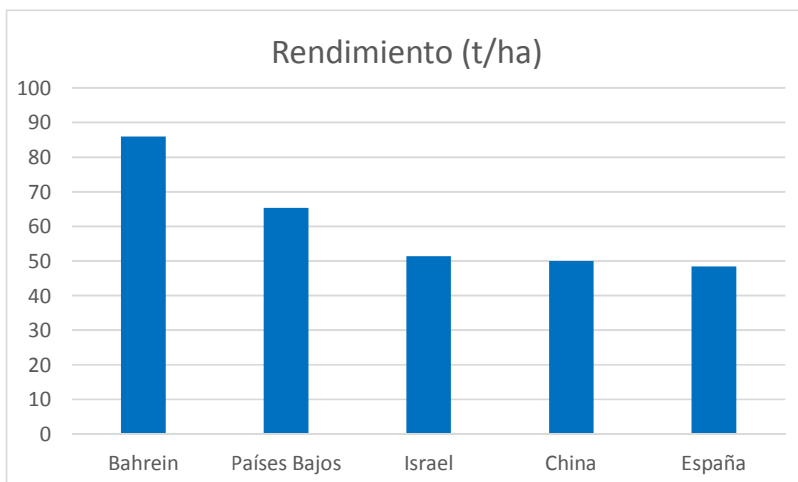
### 1.3.- La importancia económica del cultivo del calabacín

En 2013 se produjeron en el mundo 24.5 millones de toneladas de calabazas y calabacines (FAOSTAT, 2015). Es difícil obtener datos de superficie y de producción de calabacín por países, ya que la mayoría de ellos incluyen en las estadísticas oficiales a los calabacines junto con otras especies de calabazas. Los cinco países con mayor producción a nivel mundial de estas especies son: China, India, Rusia, Irak y U.S.A. (Figura 3).



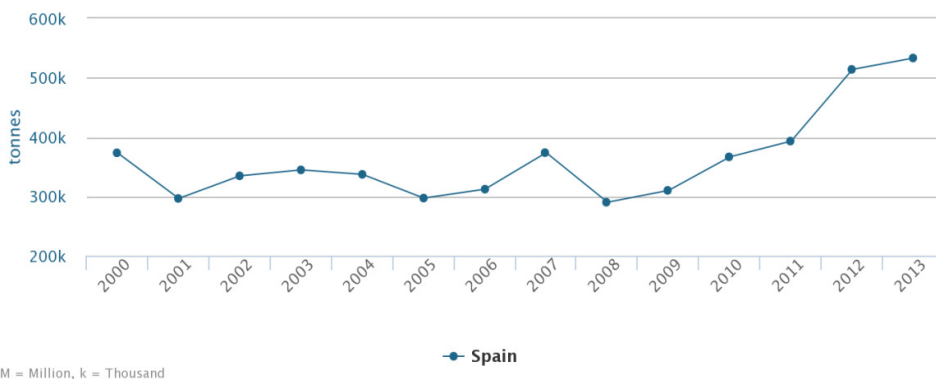
**Figura 3:** Producción de calabazas y calabacines por país en 2013. Fuente: Departamento de Estadística de la FAO.

España se encuentra en el noveno puesto a nivel mundial y segundo en Europa con una producción de 533.200 t (FAOSTAT, 2015). Aunque nuestro país no tiene gran cantidad de superficie dedicada a este cultivo, fundamentalmente en Andalucía, Cataluña y la Comunidad Valenciana (MAGRAMA, 2015), ocupa el quinto lugar entre los países que obtiene un mayor rendimiento en la producción de calabazas y calabacines, después de Bahrein, Holanda, Israel y China (Figura 4).



**Figura 4:** Rendimiento de calabazas y calabacines por país en 2013. Fuente: Departamento de Estadística de la FAO.

Si nos centramos en España, se puede comprobar que la producción española de calabaza y calabacín ha experimentado un importante ascenso en los últimos años fundamentalmente debido al aumento de su cultivo bajo invernadero, el cual representa el 80% de la superficie total (7.900 ha) (Figura 5).



**Figura 5:** Producción de calabazas y calabacín en España. Fuente: Departamento de estadística de la FAO.

Como se ha visto, año tras año se están incrementando las producciones de calabacín en España. Del total de hortalizas exportadas, el calabacín representa entre el 4 y el 6% del volumen total, lo que en estos últimos años supone alrededor de 100.000 t. Almería, con un rendimiento medio de 48.000 kg/ha y con el 90% de la superficie que se cultiva bajo invernadero, dirige su producción, principalmente, a la exportación (MAGRAMA, 2015).

## 1.4.- El cultivo del calabacín

El cultivo de calabacín se inicia con la germinación de las semillas directamente en el campo o con el trasplante de plántulas obtenidas en empresas especializadas. En



**Figura 6:** Cultivo del calabacín en un invernadero de Almería. Fuente: Wikipedia

nuestro país, la mayor parte del cultivo se hace bajo invernadero para obtener una producción a lo largo de todo el año y con una buena calidad (Figura 6). Los sistemas de producción en invernadero son similares a los indicados para otras cucurbitáceas. La densidad de plantación varía entre 1,5 plantas/m<sup>2</sup> en cultivo normal y 2 plantas/m<sup>2</sup> en cultivo entutorado. Su cultivo se suele realizar en enarenados o en cultivo hidropónico sobre sacos de fibra de coco, perlita o lana de roca.

Se considera una planta con menores requerimientos térmicos que el melón y el pepino. Su cero vegetativo es 8°C, el intervalo térmico para germinar es 21 – 35°C y la temperatura óptima de crecimiento puede situarse entre los 18 y 24°C.

Cuando se cultiva calabacín en invernadero uno de los problemas que se presenta es el deficiente cuajado de los frutos. Una de las causas es la no coincidencia en el desarrollo y apertura de las flores masculinas y femeninas. Por eso es habitual el empleo de sustancias que favorezcan el cuajado. También son frecuentes los problemas de plagas y enfermedades. Uno de los que causan más problemas son las virosis transmitidas por pulgones, por lo que el combate de estos hemípteros es fundamental para mantener el estado sanitario de las plantaciones. La utilización de tratamientos fitosanitarios junto con el uso de variedades de calabacín con cierta tolerancia a diferentes virosis resultan eficaces para prevenir y minimizar estos daños (Maroto, 2006).

Con todo esto, en buenas condiciones de cultivo al aire libre se pueden obtener entre 30 y 50 t/ha, mientras que en el cultivo en invernadero los rendimientos pueden alcanzar e incluso rebasar las 100 t/ha. La recolección de calabacín se efectúa cuando los frutos todavía no han alcanzado su desarrollo definitivo, es decir, de 15 a 18 cm de longitud y entre 200 y 250 g. La manipulación de los calabacines, una vez recolectados, debe ser muy cuidadosa, puesto que la piel de los frutos es muy sensible a todo tipo de heridas. La conservación de los calabacines se puede realizar entre 0 y 4°C de temperatura y a una humedad relativa del 85 – 90%, condiciones en las que puede ser almacenado sin problemas entre dos y seis meses.



## **1.5.- La mejora genética del calabacín**

El mejoramiento vegetal no es un nuevo concepto. El ser humano, desde los inicios de la agricultura, ha ido mejorando y seleccionando plantas, eligiendo aquellas con mayores rendimientos, con frutos de mayor tamaño o individuos con una menor susceptibilidad a factores bióticos o abióticos. Los métodos intuitivos dieron paso a otros basados en mayores conocimientos sobre la biología y la genética. Más recientemente, disponemos de nuevos métodos que permiten conseguir los mismos objetivos en menos tiempo o lograr productos imposibles de conseguir por los métodos de mejora tradicionales.

### **La domesticación**

Todas las variedades de especies vegetales dedicadas actualmente para la alimentación han sido obtenidas mediante métodos de mejora genética. Si nos remontamos en el tiempo, el primer paso que se dio para poder utilizar especies vegetales silvestres en la agricultura se denomina domesticación. Una especie domesticada es aquella que se cultiva en un ambiente confinado, parcial o totalmente, y que ha sufrido una profunda modificación a partir de la especie silvestre de la que deriva, con el fin de hacerla más útil para los seres humanos, quienes controlan su reproducción y crecimiento. La domesticación de las plantas se llevó a cabo utilizando los mecanismos básicos del proceso evolutivo en el propio provecho de los humanos. Se basó en la observación y experiencia sobre el material vegetal y se emplearon métodos muy sencillos como la selección de los individuos que presentaban las mejores características como parentales de la siguiente generación.

Este proceso tuvo consecuencias positivas para los seres humanos ya que permitía la obtención de alimentos de forma predecible, el almacenamiento de excedentes para épocas de carestía y los primeros procesos de transformación de alimentos. A nivel genético, supuso la modificación de ciertos caracteres (e.g. producción, calidad) y la supresión de mecanismos que confieren mayor aptitud reproductiva pero que son desfavorables para el ser humano (e.g. la selección de aquellas plantas que mantenían la semilla en la espiga permitió aumentar de forma significativa la producción de grano en las gramíneas). En su conjunto se produjo una reducción drástica de la variabilidad genética ya que solamente se cultivaban aquellas variedades con mejores características para el ser humano.

El calabacín fue domesticado a partir de sus ancestros en el noroeste de México y Texas. Las variedades domesticadas difieren de las formas salvajes por tener frutos más grandes, con menos semillas y menos amargos. Además, la carne de la fruta es menos fibrosa y la corteza presenta diferentes colores que no están presentes en sus ancestros (Paris, 1989).

## **La mejora clásica**

A partir de los conocimientos sobre la reproducción vegetal y los trabajos de Mendel, que permitieron establecer las bases de la genética, se pudo avanzar en los procesos biológicos que intervienen en la mejora vegetal. El manejo de técnicas de hibridación y selección, así como el aprovechamiento de las mutaciones espontáneas o inducidas por tratamientos mutagénicos, han permitido el alcance de logros significativos en prácticamente todas las especies de interés agronómico. Aunque inicialmente estas técnicas las hacían los mismos agricultores, desde hace varias décadas la obtención de nuevas variedades está en manos de las empresas de semillas, donde estas técnicas se realizan de forma sistemática y con unos objetivos perfectamente definidos.

Como en otras muchas especies hortícolas, los modernos cultivares de calabacín son variedades híbridas obtenidas a partir de cruces entre líneas puras. Los principales objetivos que se persiguen en la obtención de estas nuevas variedades son:

- Mayor productividad y calidad.
- Precocidad más acusada.
- Resistencia a enfermedades, como el oídio, las virosis, etc.
- Ausencia de amargor en la carne de los frutos.
- Color de la pulpa.

Pese a los grandes logros conseguidos con estas metodologías existen una serie de problemas con los que se tienen que enfrentar. El primero sería la gran cantidad de recursos materiales y tiempo que hace falta emplear para obtener una nueva variedad. Con estas estrategias es habitual necesitar entre 8 y 10 generaciones de cruces y retrocruces para obtener una variedad de interés comercial. En cada generación es necesario cultivar una gran cantidad de plantas y analizar sus características para decidir los parentales de la siguiente generación. Además, la variabilidad genética que se puede utilizar es la que tiene los materiales con los que se puede hibridar sexualmente la especie cultivada.

## **La mejora biotecnológica**

La mejora biotecnológica permite la utilización de tecnologías de biología molecular y celular como los marcadores moleculares, herramientas genómicas y las diferentes técnicas de cultivo *in vitro* para la mejora genética de una especie de interés agronómico como, en este caso, el calabacín. Un marcador molecular es cualquier fragmento de ADN variable en secuencia o tamaño entre individuos o poblaciones y que se han constituido en herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética. Los marcadores genéticos han de presentar dos características:

- 1) La disponibilidad de una técnica que lo detecte (morfológica, bioquímica o molecular).
- 2) La existencia de un polimorfismo (basado en una diferencia genética entre dos individuos o poblaciones).

Los marcadores moleculares se han utilizado para realizar estudios filogenéticos, estudios de diversidad genética e identificación varietal (Paris *et al.*, 2003). Sin embargo, la aplicación que ha tenido más impacto en la mejora genética de múltiples especies ha sido la selección asistida por marcadores. Esta técnica permite seleccionar plantas con buenas combinaciones de genes de forma temprana. Por tanto, los programas que utilizan los marcadores moleculares se benefician de un importante ahorro de tiempo y medios materiales ya que se puede anticipar las características de una planta en estadios tempranos de su desarrollo. En el calabacín hay algunos ejemplos de empleo de esta estrategia para acortar los plazos de mejora (Ferriol *et al.*, 2003)

Por otro lado, las técnicas de cultivo *in vitro* como la obtención de plantas transgénicas, el método haplodiploide, el aprovechamiento de la variación somaclonal o la hibridación interespecífica pueden alcanzar objetivos inabordables por los métodos de mejora tradicionales o ayudar a lograrlos en menos tiempo.

### **1.6.- El cultivo *in vitro*: fundamentos y sus aplicaciones en el calabacín**

El cultivo de tejidos de plantas engloba un conjunto de técnicas cuya finalidad es la multiplicación de plantas (micropropagación), el saneamiento (cultivo de meristemos y microinjerto) o la mejora genética (por ejemplo, la transformación genética). El cultivo *in vitro* ha tenido y tiene en los tres campos un gran impacto, permitiendo obtener contribuciones significativas al avance de la ciencia y siendo una herramienta indispensable en la agricultura moderna.

El cultivo de tejidos permite la producción y propagación de material vegetal mediante la micropropagación de plantas. En muchas especies de plantas ornamentales esta técnica ha sustituido a otros métodos de multiplicación vegetativa por su eficacia y la calidad de las plantas obtenidas. Como una aplicación relacionada con la micropropagación se pueden destacar la conservación de germoplasma en especies con dificultad para la obtención de semillas.

Las plantas obtenidas mediante el cultivo *in vitro* tienen, en general, un mejor estado sanitario que las obtenidas por métodos de propagación vegetativa tradicionales (injerto, esqueje,...). Además, se han puesto a punto técnicas como el cultivo de meristemos y el microinjerto que han permitido la obtención de material sano a partir de plantas infectadas con diferentes microorganismos, incluidos los virus. Algunos cultivos, especialmente los árboles frutales, se han saneado mediante esta técnica y



se han podido obtener plantas sanas a partir de individuos afectados por virosis como la tristeza de los cítricos.

Por otra parte, se han desarrollado diferentes metodologías basadas en el cultivo *in vitro* que han permitido la mejora genética de múltiples especies vegetales. Se puede conseguir el aumento de la variabilidad genética mediante el aprovechamiento de la variación somaclonal, la variación genética inducida por el cultivo de tejidos. El rescate de embriones a partir de cruces con otras especies nos permite la superación de algunos problemas de incompatibilidad sexual y, como consecuencia, la posibilidad de explotar otras fuentes de variabilidad genética. La hibridación somática es una herramienta muy importante para el mejoramiento de cultivares a través de la producción de híbridos interespecíficos e intergenéricos. La técnica utiliza la fusión de protoplastos de dos parentales diferentes para conseguir la regeneración de plantas híbridas. Mediante el método haplo-diploide podemos producir líneas puras a partir de plantas con cierto nivel de heterocigosis en un periodo de tiempo relativamente corto. La estrategia consiste en un primer paso en el que se obtienen plantas haploides mediante el cultivo de microsporas, anteras, óvulos u ovarios y un segundo paso en el que se duplica la información genética de las plantas obtenidas. De esta forma, se dispone de una metodología alternativa a las autofecundaciones repetidas para conseguir líneas puras. Por último, la transformación genética permite la transferencia controlada de uno o pocos genes que pueden añadir alguna característica deseable a las plantas transgénicas. Esta técnica tiene un gran potencial para el mejoramiento genético de cultivares élite ya que se puede introducir una nueva característica a un genotipo previamente mejorado sin modificar el resto de características.

### **1.7.- La regeneración de plantas *in vitro*: fundamentos y sus aplicaciones en el calabacín**

Para poder utilizar todas las aplicaciones del cultivo *in vitro* de plantas es necesario disponer de protocolos que permitan regenerar plantas enteras a partir de células o grupos de células de diferentes tejidos de la planta. La regeneración *in vitro* se puede conseguir a través de dos vías, la organogénesis (axilar o adventicia) y la embriogénesis somática, siendo ambas influidas por la percepción de las fitohormonas, la división celular y la desdiferenciación para adquirir competencia morfogénica, iniciación de órganos y su posterior desarrollo. La organogénesis adventicia es un proceso morfogénico de tipo unipolar que permite la formación de yemas adventicias y brotes (caulogénesis) a partir de explantes sin meristemos preexistentes. Mediante la embriogénesis somática se consigue la formación de embriones similares a los zigóticos a partir de células presentes en órganos como las hojas, cotiledones o hipocótilos.

Para el desarrollo de metodologías que permitan la regeneración de un material concreto y poder aplicar las técnicas de mejora biotecnológicas antes descritas, se recurre a abordajes empíricos en los que se van modificando distintos factores hasta

encontrar una combinación que ofrezca el resultado deseado. La elección del tipo de explante es un factor importante para obtener la respuesta morfogénica deseada. Un caso paradigmático es el que se refiere a la obtención de plantas transgénicas de un gran número de especies de cereales, hasta hace no mucho consideradas como recalcitrantes. El éxito en este caso se basó principalmente en la elección adecuada de un explante de partida, el escutelo, donde se encuentra un tipo celular que es susceptible de ser transformado y capaz de regenerar una nueva planta. Sin embargo, el factor más ampliamente estudiado es la combinación de los componentes del medio de cultivo: macronutrientes, micronutrientes, azúcar, vitaminas y, sobre todo, el tipo y concentración de los reguladores del crecimiento. Este abordaje, basado en el ensayo y error, aunque a veces ha sido criticado por su falta de elegancia, resulta tremendamente efectivo y con esta estrategia se han obtenido magníficos resultados en el desarrollo tanto de metodologías como de aplicaciones relacionadas con el cultivo *in vitro* que están siendo utilizadas actualmente por un gran número de grupos de investigación y empresas de todo el mundo.

En la bibliografía se encuentran pocos trabajos donde se haya conseguido la regeneración *in vitro* de plantas de calabacín. Anthakrishnan y colaboradores (2003) establecieron un protocolo de regeneración con tres variedades comerciales (True French, Ma'yan y Goldi) en el que consiguieron una tasa de regeneración del 63% en explantes de cotiledón y una tasa de regeneración del 88% en explantes de cotiledón con segmentos de hipocótilo de 1mm después de 30 días de cultivo en un medio MS con  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de 6-benciladenina.

Prosad y colaboradores (2007) desarrollaron un protocolo de regeneración para dos cultivares comerciales de calabacín (Bulum y Rumbo) usando explantes de cotiledón e hipocótilo vía organogénesis indirecta. En dicho experimento, se usaron medios con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y Tidiazurón (TDZ). En el medio con  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D se observó una elevada inducción de callo morfogénico en los explantes de hipocótilo (86%). Con el medio con  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  de TDZ se consiguió la máxima tasa de regeneración (85%) y el número más elevado de brotes formados (6,89) después de cuatro semanas del cultivo de los explantes.

Tras estos ejemplos es de destacar un aspecto clave en los trabajos de cultivo *in vitro*, la gran influencia del genotipo utilizado en la respuesta final frente a determinadas condiciones. Dicho en otras palabras, el material vegetal empleado influye en gran medida en el resultado obtenido en estos experimentos. Por tanto, a partir de este análisis bibliográfico y de la experiencia previa del grupo de investigación en especies de la misma familia, se diseñan los primeros experimentos de nuestro trabajo con el objetivo final de disponer de un protocolo de regeneración eficaz y reproducible en calabacín.

## 2.- Objetivos

El objetivo de este trabajo es poner a punto un método de regeneración mediante organogénesis adventicia en calabacín que nos permita abordar en un futuro diferentes técnicas de cultivo *in vitro* como la de transformación genética. Este objetivo principal se puede desglosar en diferentes aspectos:

- a) Establecer las mejores condiciones para la esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas a partir de semillas de calabacín.
- b) Desarrollar un método de regeneración ajustando el medio de cultivo, el tipo y la edad del explante utilizado.
- c) Establecer las condiciones que permitan el enraizamiento de los brotes obtenidos y la aclimatación de éstos para poder cultivar las plantas regeneradas en condiciones de cultivo *in vivo*.

## **3.- Aspectos metodológicos**

### **3.1.- Material vegetal**

En este trabajo se han utilizado tres variedades de calabacín cedidas amablemente por la Dra. María Belén Picó del COMAV (Centro de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana).

### **3.2.- Medios de Cultivo**

En los experimentos realizados en este trabajo se utiliza un medio de cultivo compuesto de sales minerales, sacarosa y vitaminas, al que se le añaden concentraciones variables de distintos reguladores del crecimiento (auxinas y citoquininas). Las concentraciones de estos compuestos varían en función del material, del tipo de explante que se utiliza y de la respuesta que se pretende conseguir. La nomenclatura de los medios de cultivo alude al tipo y concentración de los reguladores de crecimiento. Así, por ejemplo, el medio NB 05 10, contiene 0.5 mg/L de ácido naftalenacético y 1 mg/L de 6-benciladenina.

Los componentes básicos de los medios de cultivo son los siguientes:

- Sales minerales: MS (Murashige y Skoog, 1962)
- Sacarosa: 30 g/L
- Inositol: 100 mg/L
- Tiamina clorhídrica: 1 mg/L

El resto de componentes de los medios se enumeran en el Anexo 1. Una vez se tienen todos los componentes mezclados en disolución acuosa, se ajusta el pH a 5.7 mediante KOH y HCl. Seguidamente, se añade el agente gelificante: 8 g/L de Agar industrial (Pronadisa®), se funde con ayuda de un microondas y se distribuye en los recipientes correspondientes.

### **3.3.- Esterilización**

En cualquier protocolo de cultivo *in vitro* es necesario trabajar sin contaminaciones. Para ello se realizan una serie de protocolos que permiten mantener las condiciones axénicas. Los medios de cultivo se esterilizan en el autoclave, con un ciclo de 121°C durante 20 minutos. El instrumental, pinzas y bisturí, que se utiliza para manejar el material vegetal, se esteriliza mediante flameado. Para ello se sumerge en etanol y se prende con un mechero para eliminar cualquier contaminante.

Por último, también es necesario eliminar los contaminantes superficiales que hay en el material vegetal. Para ello es necesario poner a punto un protocolo de esterilización, en nuestro caso, de semillas de calabacín.

### 3.4.- Recipientes de cultivo

Los recipientes de cultivo empleados son de vidrio y sus dimensiones varían en función del material vegetal y del tipo de explante que se cultiva en ellos. Su denominación y características principales son las siguientes:

- **Tubos de ensayo:** empleados para la germinación de semillas. Sus dimensiones son de 35 mm de diámetro, 200 mm de altura y se les añade 10 mL de medio. El tapón empleado es de plástico. Se cultiva una semilla por tubo para minimizar las pérdidas por contaminación.
- **Placa Petri:** empleados para el cultivo de explantes. Sus dimensiones son de 90 mm de diámetro, 20 mm de altura y se les añade 25 mL de medio. Se utiliza para cultivar los explantes de cotiledón, hojas, ápices meristemáticos y ápices cortados longitudinalmente en los primeros experimentos.
- **Botes tipo 1:** Sus dimensiones son de 75 mm de diámetro, 80 mm de altura y se les añade 40 mL del medio de cultivo. Se cierran con tapas de plástico translúcidas y se cultivan seis explantes por bote. Generalmente, son empleados para subcultivar los explantes cultivados en placas Petri, aunque se pueden usar también para implantar explantes de ápices.
- **Botes tipo 2:** Sus dimensiones son de 90 mm de diámetro y 120 mm de altura y se les añade 60 mL del medio. Van cerrados con tapas de plástico translúcidas y se pueden cultivar entre uno y cinco explantes en función de su tamaño. Se emplean para la elongación y enraizamiento de los brotes obtenidos a partir de los explantes de cotiledón y ápices meristemáticos.

### 3.5.- Condiciones de cultivo

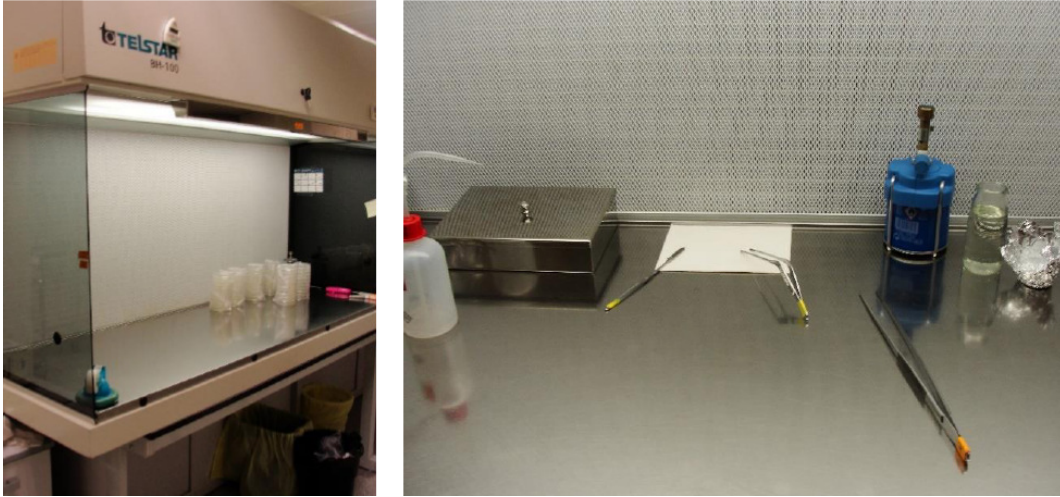
En todos los experimentos se han utilizado las mismas condiciones de incubación proporcionadas por la cámara de cultivo:

- Temperatura:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Humedad relativa: no se controla la humedad ambiental
- Fotoperiodo: 16 horas luz / 8 horas oscuridad
- Intensidad luminosa: luz proporcionada por tubos fluorescentes GRO-LUX con una intensidad luminosa de  $70 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$

### 3.6.- Trabajo en las cabinas de flujo laminar

Una cabina de flujo laminar es un equipo que dispone de un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro HEPA o ULPA y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de más de 0.1 micras. Este tipo de equipos se fabrican en forma prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo. Para trabajar directamente sobre el material

vegetal, y sin contaminarlo, se precisan herramientas de acero inoxidable tales como bisturís y pinzas de diferentes tamaños (Figura 7).



**Figura 7:** Cabina de flujo laminar y superficie de trabajo con instrumental.

En la cabina de flujo laminar, siempre debe haber una superficie estéril, en nuestro caso es papel de filtro esterilizado en el autoclave, para trabajar con el material vegetal sobre él y no sobre la superficie de la cabina. Antes de trabajar en la cabina de flujo se procede a limpiar minuciosamente la zona de trabajo con etanol. El aprendizaje de unos hábitos de trabajo adecuados en estas técnicas es necesario para reducir las posibilidades de contaminar el experimento.

## **4.- Procedimiento experimental**

### **4.1.- Fase de implantación**

En la fase de implantación se deben eliminar los contaminantes que hay en la superficie del material vegetal, sin dañar su crecimiento. En este trabajo todos los experimentos se han comenzado con la implantación de semillas en medio de germinación. Para ello se requiere una preparación de las semillas, la cual incluye el pelado y la esterilización.

Para que la semilla germine mejor quitamos su cubierta tras dejarla en agua una hora para que se ablande. Una vez peladas, se procede a esterilizar las semillas sumergiéndolas en una disolución al 50% de lejía comercial con unas gotas de Tween 20 (un agente tensoactivo que mejora el contacto entre el material vegetal y la disolución esterilizante). Las semillas permanecen durante 30 minutos en esta disolución. Tras ese tiempo se pasan por tres botes con agua destilada estéril en los que permanecen 5, 10 y 15 minutos. Tras estas series de agua se han eliminado los restos de lejía y el material ya está listo para su cultivo en condiciones axénicas.

Para la implantación se utilizan gradillas con cuarenta y ocho tubos de ensayo con medio de germinación (sales minerales MS con 10 g/L de sacarosa), en los que se añade una semilla por tubo. En esta fase del cultivo es imprescindible mantener las condiciones de esterilidad de los utensilios de trabajo y trabajar adecuadamente en las cámaras de flujo laminar para no contaminar las semillas. Los tubos de ensayo se dejan en una cámara de cultivo con oscuridad y a una temperatura de 28°C para favorecer la germinación. Al cabo de un día, cuando han emitido la radícula, se pasan las semillas a condiciones de fotoperiodo. Tras unos días de cultivo se evalúa la presencia de contaminación y el número de semillas germinadas.

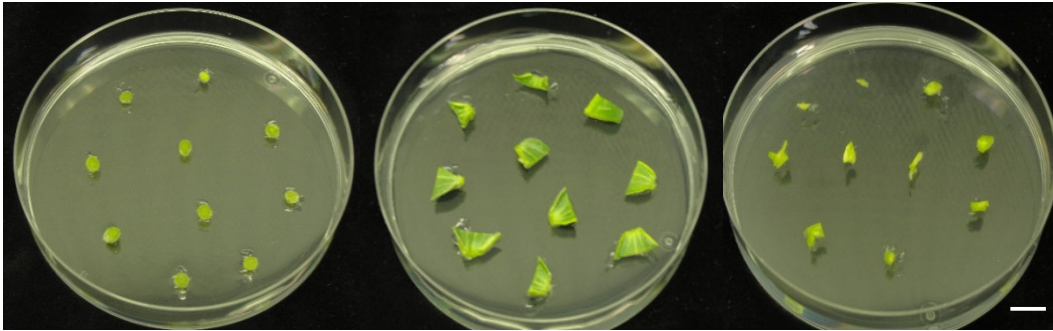
### **4.2.- Crecimiento de las plántulas**

Tras la germinación de la semilla las plántulas van a pasar por distintos estados del desarrollo que es preciso definir para poder establecer en cuál de ellos los explantes ofrecen una mejor respuesta cuando los cultivemos en diferentes medios y condiciones. Este trabajo es muy importante ya que no tenemos experiencia previa de esta especie en el grupo de investigación. Se registra de forma diaria cuáles son los cambios que sufren las plántulas de calabacín desde el día 0 (cuando las semillas se siembran en el medio de germinación) hasta que los cotiledones son de color verde y están comenzando a separarse uno del otro. En este estado de desarrollo es en el que se ha obtenido una mejor respuesta en otras especies cucurbitáceas con las que se trabajó previamente en el grupo de investigación.

### 4.3.- Evaluación de la capacidad de regeneración

Los explantes empleados en las técnicas de cultivo *in vitro* se pueden separar en dos grupos: los que tienen meristemos preexistentes y aquellos que no presentan ningún tipo de estructura meristemática. Dentro del primero se incluyen los explantes de ápices meristemáticos. En este caso lo que se pretende es obtener una regeneración axilar, es decir, que la planta se forme a partir de los meristemos presentes en el explante o aprovechar la capacidad de regeneración adventicia que tienen las células cercanas a estos meristemos. Dentro del segundo grupo, los que no tienen ningún meristemo preexistente, se encuentran los explantes de hipocótilo, de cotiledón o de hoja. En este caso, de la única forma que se puede regenerar una planta es mediante una regeneración adventicia, es decir, la formación de nuevas estructuras meristemáticas ya sea por la ruta organogénica o por la embriogénica.

En este trabajo se han empleado explantes de cotiledón, de hipocótilo y explantes de ápice meristemático (Figura 8).



**Figura 8:** Explantes de calabacín para experimentos de regeneración adventicia al inicio del cultivo. Hipocótilo (Izquierda), cotiledón (centro) y ápice meristemático cortado longitudinalmente (derecha). La barra representa 1 cm.

Los explantes se cultivan en los medios de regeneración distribuidos en placas Petri o en botes tipo 1. Se distribuyen 10 explantes en cada placa. En el caso de los explantes de cotiledón se cultivan con el envés en contacto con el medio mientras que los otros dos tipos de explante se cultivan con la zona de corte en contacto con el medio. En cada experimento se manejaban 50 plántulas de la que se obtenían 600 explantes entre cotiledones, hipocótilos y ápice meristemático. Se incuban en las cámaras de crecimiento con fotoperiodo.

Se llevó un registro del desarrollo de los explantes en las placas. Se evaluaba cuántos de ellos desarrollaban callo desorganizado, embriones, yemas y brotes viables. El callo desorganizado surge a partir del crecimiento y división activa de células desdiferenciadas que se forman a partir de las zonas de corte de los explantes. A partir de estos callos se pueden desarrollar embriones somáticos o yemas, donde algunas células se organizan en nuevas estructuras meristemáticas. Si las yemas siguen creciendo dan lugar a ápices en las que se ve la presencia de hojas y posteriormente brotes, una estructura en la que la formación de un tallo elongado



permite que se separe del callo organogénico para enraizarlo y obtener así una planta entera.

En cuanto a los medios de cultivo empleados, se comenzó probando con los medios que mejores resultados habían dado en los trabajos publicados con anterioridad. En concreto, se realizó un primer experimento en el que se probaron dos medios que habían dado buen resultado para obtener plantas mediante organogénesis a partir de explantes de cotiledón e hipocótilo (Anejo 1). Posteriormente se amplió el estudio con seis medios diseñados en función de resultados previos del grupo en la regeneración mediante embriogénesis de otras cucurbitáceas (Anejo 1). Por último, se llevó a cabo un último experimento en el que se amplió tanto el número de medios de cultivo, se probaron diez diferentes (Anejo 1) y, además, se realizó con dos variedades más (variedad 2 y variedad 3) a parte de la que se había probado hasta ese momento.

#### **4.4.- Elongación, enraizamiento y aclimatación de las plantas**

Tras la regeneración de un brote es necesario disponer de un método de elongación y enraizamiento para obtener un brote con suficiente tamaño y, posteriormente, una planta entera. Además, debido a las diferencias en las condiciones ambientales en las que crece la planta, también es necesario desarrollar un método de aclimatación que nos permita cultivar una planta en condiciones *in vivo* a partir de material que se ha desarrollado *in vitro*. A continuación, se detallan estas metodologías.

##### **Elongación**

Tras la regeneración de los brotes, se subcultivan a un medio de elongación (NBCu) para que aumenten su tamaño y puedan enraizar con mayor facilidad. Este medio se ha empleado previamente en especies de la misma familia (melón, calabaza y pepino).

##### **Enraizamiento**

Se necesita disponer de un medio en el que los brotes regenerados desarrollen una planta *in vitro* gracias al crecimiento de raíces adventicias. Cuando el brote ya ha alcanzado un buen tamaño, se pasa a un medio de enraizamiento que, en este caso, fue un medio básico suplementado con una auxina, 0,1 mg/L de ácido indolacético. Este medio es el que se emplea de forma rutinaria en el laboratorio para enraizar y funciona con múltiples especies tanto hortícolas como ornamentales. El cultivo se realiza en la cámara en condiciones de fotoperiodo.

Además, si se quiere mantener estas plantas regeneradas en condiciones axénicas durante varios meses o incluso años, teniendo en cuenta que la planta acaba ocupando todo el espacio disponible y consumiendo el medio de cultivo, es imprescindible realizar subcultivos sucesivos cada tres o cuatro semanas en los que se va clonando el material vegetal. La clonación de las plantas se realiza cortando las yemas axilares o los ápices meristemáticos y cultivándolos en el mismo medio de enraizamiento. De este modo se puede mantener una planta sin alterar su genotipo y,

además, este proceso nos puede servir para obtener varias plantas idénticas al material de partida.

### **Aclimatación**

La aclimatación es necesaria porque las plantas cultivadas *in vitro* crecen en unas condiciones ambientales diferentes a las que se dan en cultivo *ex vitro* donde van a tener más luz, menos humedad, menor disponibilidad de nutrientes y presencia de patógenos y plagas. Si las plantas se pasaran directamente de cultivo *in vitro* a una maceta probablemente no aguantarían el estrés que supondría todos estos cambios. Por ello, es necesario un paso intermedio, que permita a la planta adaptarse poco a poco a las condiciones del cultivo *in vivo*. A este proceso transitorio se le denomina aclimatación.

Para aclimatar las plantas de calabacín se extraen del bote con cuidado y se enjuagan las raíces para eliminar el agar. Una vez hecho esto se pasa cada planta a una maceta con una mezcla de turba y perlita estéril previamente humedecida y se tapa con un vaso de plástico transparente para evitar que se deshidrate (Figura 9).



**Figura 9:** Planta de calabacín recién aclimatada. La barra representa 1 cm.

El vaso se puede retirar al cabo de unos días cuando se compruebe que tras su eliminación la planta ya no sufre síntomas de desecación y marchitez.

## **5.- Resultados y discusión**

Se exponen a continuación los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

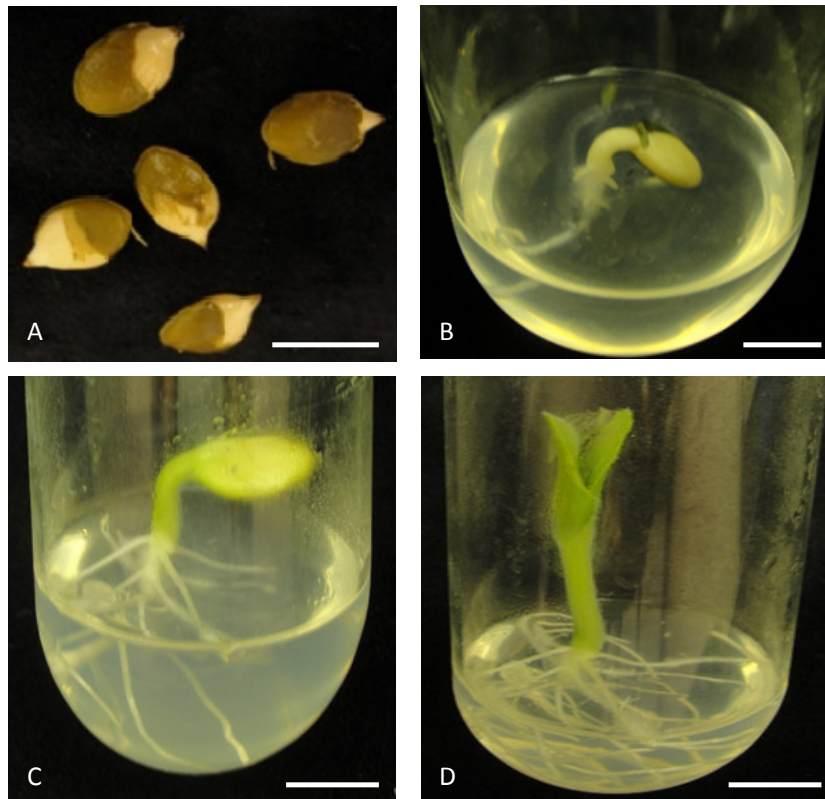
### **5.1.- Fase de implantación**

El material de partida de todos los experimentos de este trabajo eran semillas de calabacín de tres variedades diferentes. A lo largo del desarrollo de este trabajo se han realizado seis esterilizaciones de semillas. En los experimentos realizados no se ha observado problemas importantes con la contaminación y germinación de las semillas. La presencia de semillas contaminadas fue esporádica, siempre menor del 5%. Además, las tres variedades empleadas presentaban una tasa de germinación superior al 80%.

Con estos resultados se ha conseguido totalmente el objetivo propuesto ya que con el método de esterilización llevado a cabo la tasa de contaminación es prácticamente nula y la tasa de germinación está en valores por encima del 80%. Es importante resaltar la importancia de disponer, como en este caso, de semillas de buena calidad para este tipo de experimentos donde la ausencia de esterilidad hace que se tenga que eliminar el material contaminado y, por tanto, perder todo el trabajo que se había hecho hasta ese momento.

### **5.2.- Crecimiento de las plántulas**

Una vez se tienen establecidas las condiciones para obtener una buena cantidad de plántulas axénicas, el poner a punto un protocolo de regeneración de plantas a partir de explantes primarios requiere conocer el desarrollo del material de partida. Como en el laboratorio no se había trabajado con esta especie anteriormente, se hizo un primer estudio sobre el desarrollo de la plántula en los primeros días tras su germinación. El día en el que se siembran las semillas y se cultivan en oscuridad se considera día 0. Durante el cultivo en oscuridad se va controlando el material hasta ver que las semillas emiten su radícula. En ese momento, suele ser el día 1 del cultivo, se pasan las gradillas con las semillas a la cámara con fotoperiodo para que complete su desarrollo durante los siguientes días (Figura 10).



**Figura 10:** Desarrollo inicial de plántulas de calabacín procedentes de semillas esterilizadas cultivadas en medio de germinación. A: semillas peladas y preparadas para ser esterilizadas en el día 0. B: plántula con la raíz emergida antes de pasar a condiciones de fotoperiodo. C: plántula con los cotiledones unidos. D: plántula con los cotiledones separados. La barra representa 1 cm.

Un día después de la esterilización y de su siembra en medio de germinación la mayoría de las semillas han germinado. La primera parte de la planta que se desarrolla es la raíz que emerge de la parte más estrecha de la semilla, donde se encuentra el embrión. Un día después (Día 2) se comienzan a desarrollar las raíces secundarias y el hipocótilo inicia su crecimiento. Posteriormente (Día 3) los cotiledones ya han comenzado a adquirir una coloración verdosa. Por último, el Día 4 es cuando los cotiledones que ya tienen un color verde intenso comienzan a separarse.

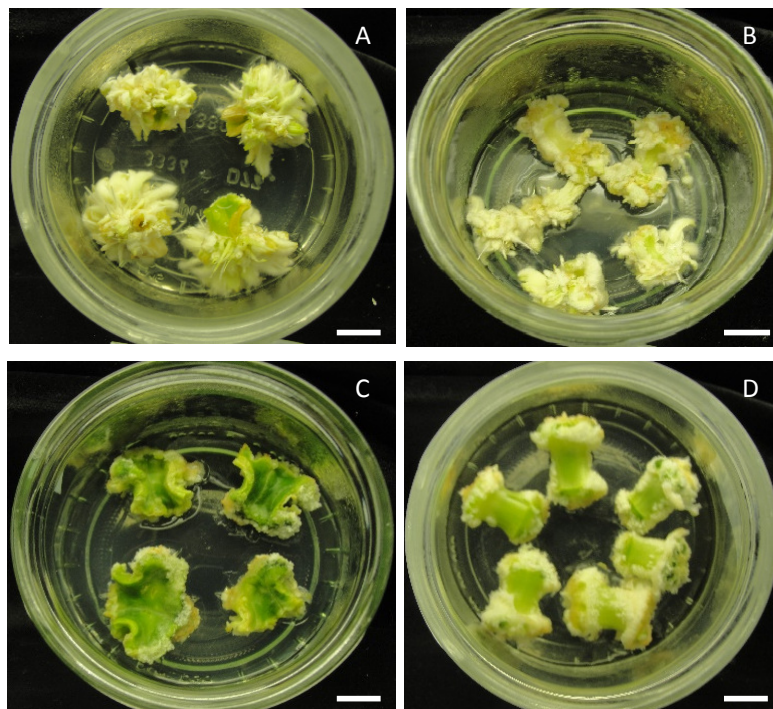
Se elige el estado ontogénico de cotiledones verdes comenzando a separarse como el más adecuado para obtener los explantes por dos motivos. En algún trabajo de otros grupos (Stipp *et al.*, 2012) se observa que en este mismo estado ontogénico se obtienen los mejores explantes para regenerar plantas de calabacín mediante organogénesis adventicia. Además, en investigaciones previas del grupo en especies similares se ha comprobado que la manipulación de tejido excesivamente joven suele ser más complicada y, si por el contrario, se deja que las plántulas sigan desarrollándose se corre el riesgo de que los explantes tengan una caída en su capacidad de regeneración de brotes.

### 5.3.- Evaluación de la capacidad de regeneración

En este apartado es donde se ha realizado el mayor esfuerzo y número de experimentos.

#### Experimento 1: organogénesis con la variedad 1

En este experimento, se utilizan explantes de cotiledón e hipocótilo que se cultivan en dos medios diferentes, uno al que se le adiciona ácido 2,4-diclorofenoxiacético y otro con Tidiazuron. Como primer dato positivo se pudo comprobar que los explantes no sufrían algunos de los problemas habituales en cultivo *in vitro* como la hiperhidratación (acumulación excesiva de agua por parte de los tejidos cultivados) o la oxidación polifenólica (reacción de los explantes que tiene como consecuencia la formación de sustancias fenólicas que pueden inhibir su desarrollo). Sin embargo, no se observó la formación de estructuras organogénicas en ninguno de los explantes cultivados. Lo que se observó es la formación general de un callo desorganizado en la zona de la corte de los explantes del que, en algunas ocasiones, emergían algunas raíces (Figura 11).



**Figura 11:** Fenotipo de explantes de cotiledón (izquierda) e hipocótilo (derecha) de calabacín cultivados durante 30 días en medio suplementado con 2,4-D (arriba) y Tidiazuron (abajo). La barra representa 1 cm.

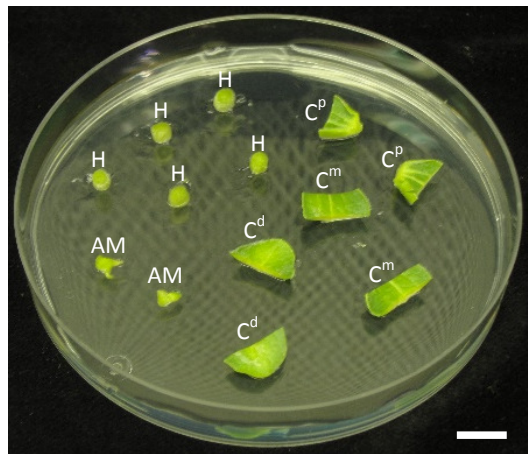
Este resultado es un claro ejemplo de la enorme influencia que tiene el genotipo del material vegetal en la respuesta que se obtiene en cualquier técnica de cultivo *in vitro*. En este caso, el resultado observado es totalmente diferente al que se vio en la publicación que trabajaban con estos medios y con estos tipos de explantes pero en el



que se utilizaban variedades comerciales que son diferentes a la que empleamos nosotros. A partir de este resultado se diseñó el siguiente experimento en el que se probaron seis medios diferentes con una composición que, en otras especie de la familia de las cucurbitáceas con las que habíamos trabajado previamente en el grupo, se pudo regenerar plantas mediante la ruta embriogénica (García-Sogo, 1990).

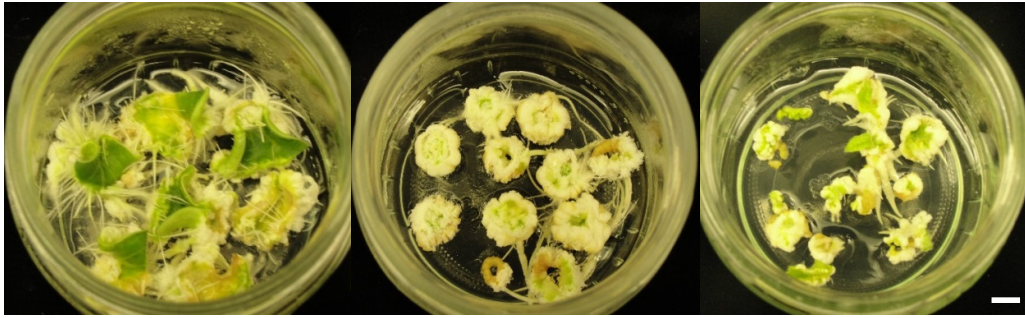
## Experimento 2: embriogénesis con la variedad 1

Los medios empleados en este caso fueron medio básico al que se le añadían combinaciones de una auxina (ácido indolacético, ácido naftalenacético o ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y una citoquinina (6-benciladenina o 2-isopenteniladenina) (Anejo1). En este caso se utilizaron tres tipos de explante: rodajas de hipocótilo (H), ápices meristemáticos cortados longitudinalmente (AM) y explantes de cotiledón (C). Dentro de estos últimos, se realizaron dos cortes perpendiculares al eje del cotiledón y se diferenció entre explante proximal (el más cercano al ápice), medio y distal (el más alejado del ápice) (Figura 12).



**Figura 12:** Explantes de calabacín empleados en el experimento de regeneración. H: Hipocótilo. AM: Ápice meristemático. C<sup>p</sup>: Cotiledón proximal. C<sup>m</sup>: Cotiledón medio. C<sup>d</sup>: Cotiledón distal. La barra representa 1 cm.

En estas condiciones de cultivo los explantes de cotiledón y de hipocótilo no fueron capaces de regenerar ninguna planta. En todos los medios empleados se formaba un callo desorganizado que derivaba en estructuras similares a raíces. Una posible explicación a esto es que se hubiera formado algún embrión con alteraciones en el meristemo apical. En ese caso, lo que se ve es la presencia de raíces pero no se puede obtener una planta entera como se pretende (Figura 13).



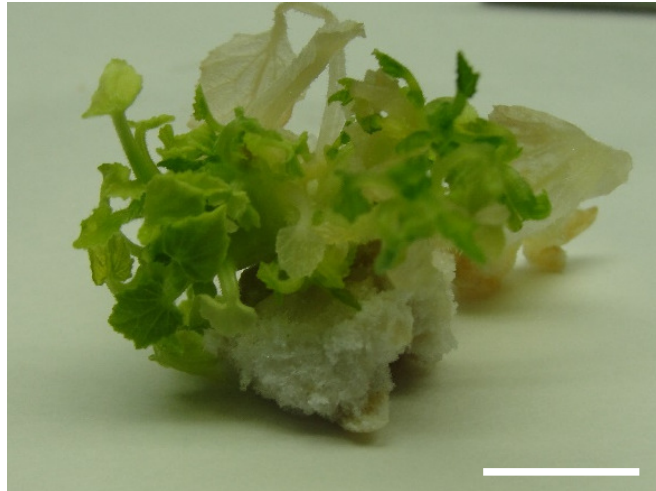
**Figura 13:** Fenotipo de explantes de cotiledón (izquierda), hipocótilo (centro) y ápice meristemático (derecha) de calabacín cultivados durante 30 días en medio NP 30 10. La barra representa 1 cm.

En el caso del cultivo de los ápices meristemáticos se observó que a partir de dos de los explantes cultivados emergía un brote. Este brote provenía del desarrollo del meristemo apical presente en el explante de partida por lo que no se contabilizó como un evento de regeneración adventicia.

### **Experimento 3: organogénesis con tres variedades**

Como en el segundo experimento tampoco se tuvo éxito en la regeneración de plantas a partir de los explantes utilizados, se hizo un último intento ampliando el número de medios, se probaron diez medios diferentes, y el número de variedades, añadiendo dos más a la que se había estado utilizando hasta el momento. De nuevo se recurre a la experiencia previa en especies relacionadas con el calabacín para diseñar diez medios de cultivo diferentes con el objetivo de regenerar plantas mediante la formación de yemas, ápices y brotes, es decir, por la ruta organogénica. Se utilizan los mismos tipos de explante que en el experimento anterior.

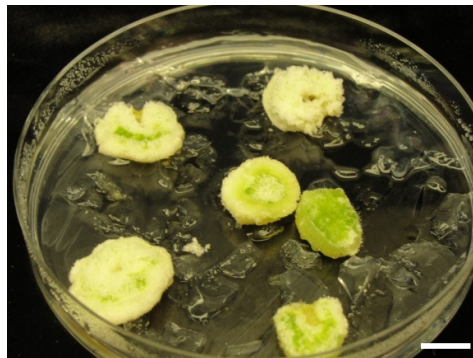
En cuanto al resultado obtenido con explantes de ápice meristemático hay que destacar que se pudieron regenerar plantas de los tres genotipos analizados. Los medios que mejores respuestas ofrecen a la generación de brotes en los explantes de ápice meristemático son los medios IB 05 20, NB 02 20 e IKB 05 20 20. Algunos de estos explantes mostraban un crecimiento similar al visto en el experimento anterior, es decir, el desarrollo de un único brote probablemente formado a partir del meristemo apical preexistente en el explante de partida. Sin embargo, en este caso, también se observó en algún explante la formación de un callo organogénico del que emergían distintas estructuras organogénicas (Figura 14).



**Figura 14:** Regeneración de ápices y brotes a partir de un explante de ápice meristemático de la variedad 2 cultivado durante 40 días en medio IKB 05 20 20. La barra representa 1 cm.

La utilización de explantes con meristemas preexistentes no es la mejor alternativa si se quiere estar seguro de que la regeneración es adventicia y las plantas obtenidas no provienen del crecimiento de dichos meristemas. Este aspecto es clave en técnicas como la transformación genética. Para obtener una planta transgénica es necesario obtener una célula que haya integrado el fragmento de ADN que se pretende introducir y luego conseguir que, a partir de esa única célula, se regenere una nueva planta. En este caso, el método de regeneración que se utilice debe ser adventicio ya que cualquier tipo de regeneración axilar, a partir de meristemas preexistentes, no va a producir el resultado deseado. Por tanto, es importante para la aplicación de estos resultados en futuros trabajos, por ejemplo, de transformación genética, disponer de un método que permita la regeneración a partir de explantes sin meristemas preexistentes como son el cotiledón y el hipocótilo.

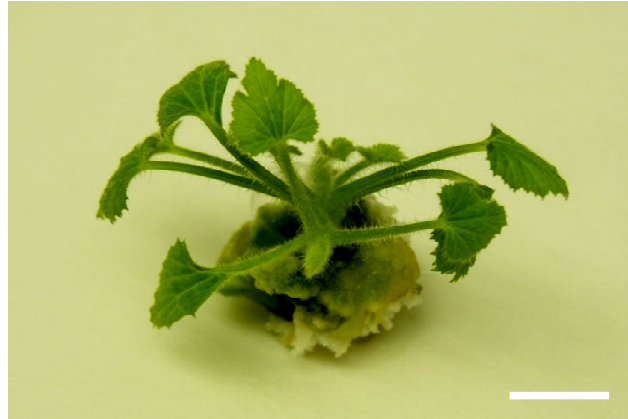
En las condiciones empleadas los explantes de hipocótilo presentaron una respuesta nula o la formación de un callo desorganizado que no produjo la regeneración de ninguna estructura organogénica (Figura 15).



**Figura 15:** Formación de callo desorganizado a partir de explantes de hipocótilo de la variedad 2 cultivado durante 40 días en medio IKB 05 20 20. La barra representa 1 cm.



Por último, en este experimento se ha conseguido la regeneración adventicia de plantas de calabacín a partir de explantes de cotiledón. La variedad que mejor resultado ha mostrado es la 1. A partir de las otras dos variedades, aunque dieron cierta respuesta morfológica, no fue posible obtener brotes. En la variedad 1 los medios que mejor resultado han dado son IB 05 20, IZ 05 10 y NB 02 20. En el medio IB 05 20, el que ha dado una mejor respuesta morfológica, se ha obtenido brotes a partir del 30% de los explantes cultivados. Además, de cada callo organogénico se obtenía un único brote por explante organogénico (Figura 16).



**Figura 16:** Regeneración de un brote adventicio a partir de un explante de cotiledón de la variedad 1 tras 45 días de cultivo en IB 05 20. La barra representa 1 cm.

En este experimento se vuelve a observar la influencia del genotipo en los resultados de un experimento de regeneración ya que con las mismas condiciones de medio de cultivo y tipo de explante sólo se ha conseguido regenerar brotes a partir de una de las tres variedades analizadas. Por otra parte, aunque la tasa de regeneración ha sido relativamente baja, en los trabajos revisados alcanza valores entre el 55% y el 90% (Ananthakirshnan *et al.*, 2003; Prosad *et al.*, 2006), es un buen punto de partida para seguir mejorando el método de regeneración en futuros trabajos.

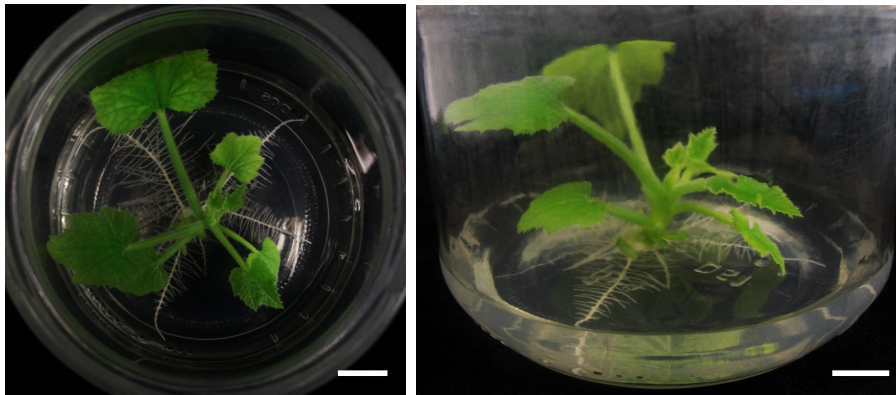
#### **5.4.- Elongación, enraizamiento y aclimatación de las plantas**

Una vez se forman los ápices o pequeños brotes en un explante primario, como se puede ver en las figuras 14 y 16, se deben subcultivar a un medio de elongación NBCu para que alcancen un mayor tamaño, se fortalezcan y, de esta forma, su enraizamiento sea más sencillo (Figura 17).



**Figura 17:** Brote adventicio regenerado a partir de un explante de cotiledón de la variedad 1 tras 15 días de cultivo en NBCu. La barra representa 1 cm.

Tras obtener unos brotes suficientemente crecidos, el siguiente paso consiste en su enraizamiento. En nuestras condiciones de cultivo se ha conseguido un buen enraizamiento adventicio en todos los brotes que hemos regenerado. Por tanto, esta fase del desarrollo no es un problema y se pueden conseguir plantas enteras tras unos pocos días en medio de enraizamiento (Figura 18).



**Figura 18:** Brotes de calabacín recién enraizados tras 10 días en medio de enraizamiento. La barra representa 1 cm.

El estudio del proceso de enraizamiento adventicio y la búsqueda de sus condiciones óptimas tiene gran importancia en especies leñosas ya que puede resultar altamente complicado o incluso prácticamente imposible. Sin embargo, el resultado que se ha obtenido con calabacín es similar al que observamos en otras especies herbáceas con las que se trabaja en el laboratorio en las que prácticamente todos los brotes son capaces de formar raíces adventicias.

Por último, al igual que ha pasado con el enraizamiento, la aclimatación de las plantas obtenidas tampoco ha supuesto ningún problema con la metodología utilizada. Las plantas son capaces de superar las diferencias entre el cultivo *in vitro* y el cultivo en invernadero e iniciar un desarrollo vegetativo normal (Figura 19).



**Figura 19:** Planta de calabacín proveniente de cultivo *in vitro* y cultivada en el invernadero. La barra representa 1 cm.

## 6.- Conclusiones

Después de la investigación llevada a cabo en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1.- Se ha puesto a punto una metodología de esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas de calabacín que nos permite disponer del material vegetal necesario para alcanzar los siguientes objetivos.

2.- Tras el estudio de diferentes medios de cultivo y tipos de explante se ha conseguido la regeneración de plantas a partir de ápices meristemáticos y de cotiledones. La mejor combinación de estos factores ha sido el cultivo de explantes de cotiledón en el medio IB 05 20. En estas condiciones se consigue la regeneración a partir del 30% de los explantes cultivados garantizando el origen adventicio de los mismos.

3.- Se ha podido elongar y enraizar sin problemas los brotes obtenidos en los experimentos anteriores. La aclimatación realizada a estas vitro-plantas permite su posterior cultivo en el invernadero.

En resumen, se han establecido las bases metodológicas que van a permitir abordar trabajos de transformación genética y otras técnicas de cultivo *in vitro* en esta especie.

## 7.- Bibliografía

- Ananthakirshnan G., Xia X., Elman C., Singer S., Paris H.S., Gal-On A., Gaba V. 2003. Shoot Production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Rep.* 21(8):739-46.
- FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database.
- Ferriol M., Picó B., Nuez F. 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet* 107: 271–282.
- 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.
- MAGRAMA. 2015. Anuario de estadística 2015 del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Maroto J.V. 2002. Horticultura Herbácea Especial. *Ediciones Mundi-Prensa*. España.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Paris H.S. 1989. Historical records, origins, and development of the edible cultivar groups of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Economic Botany* 43 (4): 423-443.
- Paris H.S. y Maynard D.N. 2008. Cucurbita. *The Encyclopedia of Fruits and Nuts*. Eds: Janick J. y Paull R.R.
- Paris H.S., Yonash N., Portnoy V., Mozes-Daube N., Tzuri G., Katzir N. 2003. Assessment of genetic relationships in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) using DNA markers. *Theor Appl Genet.* 106(6):971-978.
- Prosad S., Alam I., Anisuzzaman M., Sarker K.K., Sharmin S.A., Alam M.F. 2007. Indirect Organogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.) Turk J Agric For 31: 63-70
- Stipp L.C., Monteiro-Hara A.C., Mendes B.M. 2012. *In vitro* organogenesis of zucchini squash cv. Caserta. *Horticultura Brasileira* 30: 274-278.

## ANEXO

Medio básico	
Sales minerales	MS
Sacarosa	10 g/L
Inositol	100 mg/L
Tiamina Clorhídrica	1 mg/L

### Medios de organogénesis

IKZ 05 20 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
Kinetina	2 mg/L
Zeatina	1 mg/L

IZ 05 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
Zeatina	1 mg/L

IK 05 40	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
Kinetina	4 mg/L

IB 05 20	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
6-benciladenina	2 mg/L

IK 02 40	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.2 mg/L
Kinetina	4 mg/L

NB 02 20	
Medio básico suplementado con	
Ácido naftalenacético	0.2 mg/L
6-benciladenina	2 mg/L

IZ 02 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.2 mg/L
Zeatina	1 mg/L

D 1.0	
Medio básico suplementado con	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	1 mg/L

TDZ 1.0	
Medio básico suplementado con	
Tidiazurón	1 mg/L

ITdz 05 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
Tidiazurón	1 mg/L

ITdz 02 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.2 mg/L
Tidiazurón	1 mg/L

IKB 05 20 20	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.5 mg/L
Kinetina	2 mg/L
6-benciladenina	2 mg/L

### Medios de Embriogénesis

IB 20 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	2 mg/L
6-benciladenina	1 mg/L

IP 20 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	2 mg/L
2-isopenteniladenina	1 mg/L

DB 20 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2 mg/L
6-benciladenina	1 mg/L

DP 20 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	2 mg/L
2-isopenteniladenina	1 mg/L

NB 30 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido naftalenacético	3 mg/L
6-benciladenina	1 mg/L

NP 30 10	
Medio básico suplementado con	
Ácido naftalenacético	3 mg/L
2-isopenteniladenina	1 mg/L

### Medio de elongación de brotes

NBCu	
Medio básico suplementado con	
Ácido naftalenacético	0.01 mg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1 mg/L
6-benciladenina	0.1 mg/L

### Medio de enraizamiento

Medio de enraizamiento	
Medio básico suplementado con	
Ácido indolacético	0.1 mg/L