

Cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos

Pablo Aleza, José Juárez, María Hernández, Patrick Ollitrault y Luis Navarro

Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Crta. Moncada a Nàquera, Km. 5,
46113-Moncada, Valencia, España.
E-mail: aleza@ivia.es

La apomixis es un modo de reproducción asexual por semillas. La embriónia adventicia es el mecanismo apomíctico implicado en los cítricos, en los cuales a partir de células de la nucela se producen embriones adventicios, también llamados embriones nucelares, que son idénticos genéticamente a la planta madre. La mayoría de los genotipos de cítricos son apomícticos a excepción de los cidros, las zamboas, los clementinos y algunos mandarinos. Las semillas de los genotipos apomícticos de cítricos contienen un embrión de origen sexual y uno o varios embriones nucelares mientras que las semillas de los genotipos no apomícticos contienen un único embrión de origen sexual. Tradicionalmente a los genotipos apomícticos de cítricos se les denomina poliembriónicos y a los no apomícticos monoembriónicos, aunque en casos muy aislados se ha observado la producción ocasional de semillas con varios embriones de origen sexual en genotipos no apomícticos.

El cultivo de nucelas *in vitro* es una técnica utilizada en cítricos entre los años 60 y 80 por diferentes autores para la obtención de plantas nucelares libres de virus, ya que en cítricos la gran mayoría de los patógenos no se transmiten a través del proceso de embriogénesis. Mediante esta técnica regeneraron varias plantas a partir de una misma nucela en distintos genotipos no apomícticos de cítricos y se propuso dicha técnica válida para la obtención de plantas libres de virus de genotipos no apomícticos de cítricos, ya que suponían que las plantas obtenidas eran idénticas a la planta madre. No obstante, con frecuencia se obtuvieron plantas fenotípicamente diferentes de la planta original.

Para aclarar el origen genético de las plantas regeneradas a partir del cultivo de nucelas *in vitro* se realizaron hibridaciones controladas entre los genotipos no apomícticos clementina 'Clemenules' (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) y mandarino 'Fortune' (*C. clementina* x *C. tangerina*) como parentales femeninos y *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. 'Benecke' como parental masculino. Al cabo de 100 días después de la polinización se recolectaron los frutos y se extrajeron las semillas en condiciones asépticas. A estas se les eliminó el tegumento exterior e interior sin dañar la nucela y posteriormente se realizó una incisión

transversal en la nucela y se extrajo el embrión zigótico contenido en su interior. Las nucelas se cultivaron con la zona de la chalaza en contacto con el medio de cultivo, quedando la zona del micropilo alejada del mismo. El medio de cultivo estaba compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog, 50 g/L de sacarosa, 500 mg/L de extracto de malta, vitaminas de Murasighe y Tucker y 8 g/L de agar. Los embriones zigóticos extraídos de las semillas se cultivaron en el mismo medio de cultivo suplementado con 100 mg/L de myo-inositol, 0,02 mg/L de ácido α -naftalenacético y 1 mg/L de ácido giberélico. El cultivo se realizó en cámara de cultivo con una iluminación de 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Se obtuvieron 328 plantas procedentes del cultivo de nucelas y 131 procedentes del cultivo de embriones. La determinación del nivel de ploidía de las plantas obtenidas se realizó mediante citometría de flujo y el análisis genético se realizó con 29 marcadores microsatélites.

El análisis genético realizado permite concluir que todas las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de la nucela no son plantas de origen nucelar sino que son plantas híbridas. Estos resultados demuestran claramente que las suposiciones formuladas por diferentes autores respecto al origen nucelar de las plantas obtenidas por cultivo de nucelas *in vitro* de genotipos no apomícticos de cítricos no eran ciertas. Además los resultados obtenidos indican que en los genotipos no apomícticos de cítricos, lo que aparentemente sucede es que una vez se ha producido la fecundación, en algún momento del desarrollo de la ovocélula fecundada, se produce una fisión del embrión zigótico original produciéndose la formación de nuevos proembriones idénticos genéticamente. Probablemente el embrión zigótico original adquiere dominancia y por algún mecanismo desconocido impide el crecimiento del resto, de forma que en las semillas de los genotipos no apomícticos de cítricos sólo se observa normalmente un embrión que se desarrolla más que el resto. También podría ocurrir que alguno de los proembriones originados adquiera dominancia y comience a desarrollarse más que los demás. Este mecanismo es característico de la biología reproductiva de los genotipos no apomícticos de cítricos y no ha sido descrito anteriormente ni en cítricos ni, hasta donde nosotros sabemos, en otras especies vegetales.

