



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA  
ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR Y  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Máster en Biotecnología Industrial y  
Agroalimentaria

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**COLECCIONES PÚBLICAS DE RECURSOS  
FITOGENÉTICOS DE *Citrullus spp.***

Autora: Laura Del Grosso

Directores: Dr. Emilio Sarria Villada  
(Rijk Zwaan Ibérica S.A.)

Dr. Rafael Lozano Ruiz  
(Universidad de Almería)



Septiembre, 2013

**Firmado**



Laura Del Grosso

**V°B° Tutores**



Dr. Emilio Sarria Villada



Dr. Rafael Lozano Ruiz

# ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción General</b>	2
<b>A) El cultivo de la sandía</b>	2
I) Importancia actual del cultivo de la sandía	2
II) Origen botánico, taxonomía, usos y generalidades	2
III) Descripción morfológica y fisiológica del crecimiento y reproducción	3
<b>B) Bancos de Germoplasma</b>	6
I) La importancia de conservar los recursos filogenéticos y alternativas de conservación	6
II) Banco de Semillas	7
III) Operaciones básicas de un banco de germoplasma de semillas	8
<b>CAPÍTULO 1: Desarrollo de un protocolo para mejorar la germinación en genotipos de <i>Citrullus spp.</i></b>	12
<b>1. Introducción</b>	12
1.1. Latencia de las semillas	12
1.2. Tratamientos pre-germinativos	13
1.3. <i>Citrullus colocynthis</i> , un caso de latencia exógena	14
<b>2. Materiales y Métodos</b>	15
2.1. Material biológico	15
2.2. Preparación del material	15
2.3. Escarificación térmica	16
2.4. Germinación	16
2.5. Tratamiento estadístico de los datos	17
<b>3. Resultados y Discusión</b>	17
<b>CAPÍTULO 2: Detección de patógenos de cuarentena en genotipos de bancos de germoplasma de sandía y provenientes de colectas</b>	20

<b>1. Introducción</b>	20
1.1. Sanidad de las semillas y cuarentena vegetal	20
1.2. Transmisión de virus por semillas	20
1.3. Virus que afectan a cucurbitáceas	21
1.4. Método de diagnóstico: ELISA	22
<b>2. Materiales y Métodos</b>	23
2.1. Material biológico	23
2.2. Preparación del material	23
2.3. DAS ELISA	23
<b>3. Resultados y Discusión</b>	24
<b>CAPÍTULO 3: Descripción fenotípica de una colección de germoplasma de sandía de Rijk Zwaan Ibérica S.A.</b>	25
<b>1. Introducción</b>	25
<b>2. Materiales y Métodos</b>	25
2.1. Material biológico	25
2.2. Descriptores fenotípicos	26
<b>3. Resultados y Discusión</b>	28
3.1. Uniformidad de los genotipos	28
3.2. Reclasificación taxonómica	30
<b>Conclusiones generales</b>	32
<b>Bibliografía</b>	34

## RESUMEN

El Trabajo Fin de Máster que a continuación se presenta, en su modalidad *Practicum*, ha tenido como objetivo fundamental conocer la importancia de la variabilidad genética en los programas de mejora genética de plantas, así como adquirir capacidades relativas a la gestión de los recursos fitogenéticos. Con tal finalidad, he podido participar en actividades referidas a la gestión de colecciones de germoplasma públicas y privadas, a través de la multiplicación de semillas de entradas (genotipos) recalcitrantes, evaluación fitosanitaria del germoplasma y actividades de cuarentena vegetal, y caracterización fenotípica.

Para la multiplicación de semillas de *Citrullus colocynthis* de difícil germinación, provenientes de bancos de germoplasma públicos, se desarrolló y aplicó con éxito, un tratamiento pre-germinativo que consistió en la escarificación térmica de las semillas.

Todas las accesiones de sandía provenientes de bancos de semillas públicos germinadas y mantenidas en cuarentena, fueron sometidas a un control fitosanitario mediante DAS-ELISA, para la detección de SqMV, CGMMV y MNSV, previo trasplante para su multiplicación. Los resultados fueron negativos para todas las muestras.

Por último, los genotipos que fueron seleccionados para su multiplicación por semilla, se describieron fenotípicamente utilizando los descriptores aprobados por el International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI-FAO) y adaptados a las necesidades del programa de mejora de sandía de RIJK ZWAAN IBÉRICA S.A.

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## A) EL CULTIVO DE LA SANDÍA

### I) Importancia actual del cultivo de la sandía

El cultivo de la sandía se encuentra extendido prácticamente por todo el planeta ocupando 3, 6 millones de hectáreas que producen 9, 1 millones de toneladas (Faostat, 2009). El principal productor de sandía es China, seguido de Turquía, Irán y Estados Unidos, mientras que España es el primer productor de Europa y uno de los mayores exportadores de este fruto. El aumento en la producción fue el resultado de un aumento en la demanda, en las exportaciones y también en la productividad. Las exportaciones españolas han ido creciendo continuamente, habiendo sobrepasado las 300.000 toneladas. Este incremento en la exportación se debe básicamente a que países no productores tales como Alemania y Francia entre otros, se convirtieron en grandes consumidores.

En el año 2011 España destinó 350.834 hectáreas de superficie al cultivo de hortalizas, concretamente 114.143 de hectáreas cultivadas fueron hortalizas de fruta, donde la sandía representó un 12% (17.783 ha) produciendo casi 800.00 toneladas. Según los datos del anuario de estadística 2012, el 60% de esta sandía se produce en Andalucía siendo Almería la mayor productora, casi 5000 ha de superficie cultivadas en invernadero con un rendimiento de 300.000 toneladas. Prácticamente toda su producción se exporta generando sólo esta provincia alrededor de los 73 millones de euros.

### II) Origen botánico, taxonomía, usos y generalidades

Hay evidencias que conducen a establecer a África como su origen más probable. Sin embargo, existen muchos indicios de que éste fruto o bien llegó muy tempranamente a Asia o que en éste continente existió algún centro de origen o de diversificación de plantas taxonómicamente próximas. Su cultivo se extendió por el norte de África y el Próximo Oriente alrededor del IV milenio a.C. procedente de África central (Maroto *et al.*, 2002). En Lejano Oriente sin embargo, hay algunos autores que

señalan que su introducción como cultivo en China se produce en el siglo X, siendo éste país el mayor productor y consumidor del mundo (Levi *et al.*, 2001). Por el siglo XIII la sandía se cultiva en Europa y se introduce en Norte América en el siglo XVII (Jeffrey, 1975 y Whitaker y Davis, 1962 en Maroto *et al.*, 2002).

La sandía pertenece al género *Citrullus*, y desde el punto de vista económico es uno de principales géneros de Cucurbitaceae. Este género está compuesto por cuatro especies diploides: 1) *C. lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai, que se encuentra en climas tropicales y subtropicales de todo el mundo, donde se incluyen las sandías cultivadas (*C. lanatus* var. *lanatus*) y el llamado melón conservado (*C. lanatus* var. *citroides*) (Whitaker y Davis, 1962 y Whitaker y Bemis, 1976 en Levi *et al.*, 2005), 2) la tuerca o coloquintida, *C. colocynthis* (L.) Schard., 3) las especies perennes *C. ecirrhosus* Cogn. (Meeuse, 1962 en Levi *et al.*, 2005), y 4) la especie anual *C. rehmii* De Winter (DeWinter, 1990 en Levi *et al.*, 2005). Tanto *C. ecirrhosus* y *C. rehmii* son endémicos de las regiones desérticas de Namibia (Meeuse, 1962 en Levi *et al.*, 2005). Resultados de estudios morfológicos y citogenéticos revelan que las cuatro especies son compatibles entre ellas y se pueden efectuar cruza exitosas que deriven progenie (Juárez García, fecha desconocida).

De la sandía, se aprovecha principalmente sus frutos que son ricos en azúcar, muy refrescantes y de bajo valor calórico. De sus semillas, como de otras cucurbitáceas, puede extraerse un aceite comestible o de usos industriales rico en ácido linoléico (40-60%), oléico (10-20%) y palmítico (0-10%). Estas semillas pueden consumirse tostadas y son una buena fuente de proteínas y minerales (Robinson y Walters-Decker, 1997).

### **III) Descripción morfológica y fisiológica del crecimiento y la reproducción**

La sandía es una planta anual, con un sistema radicular superficial, aunque su raíz principal suele profundizar mucho. Los tallos se extienden rastreramente por el suelo y están recubiertos de pelos y provistos de zarcillos, estos tallos pueden desarrollarse más de 3 metros desde la base de la planta. Las hojas son pinnado partidas, divididas en 3-5 lóbulos redondeados, que a su vez también se componen de varios segmentos orbiculares, formando entalladuras pronunciadas. En el haz el limbo tiene una apariencia lisa, mientras que en el envés presenta un aspecto áspero recubierto de pilosidades (Maroto *et al.*, 2002)



Es una planta monoica y sus flores son pentámeras, amarillas, solitarias, pedunculadas y axilares. Las flores femeninas o postiladas presentan un ovario ínfero y estambres rudimentarios. Las flores masculinas poseen ocho estambres de igual longitud, formando cuatro grupos de estambres soldados por sus filamentos. La polinización es cruzada y entomófila.



Los frutos son bayas globulosas, oblongas o elipsoidales, en pepónide con la corteza de color verde uniforme (claro u oscuro), o con listas más claras, y la pulpa,



normalmente de color rojo o rosado (aunque algunas variedades son de pulpa amarilla o anaranjada). El tamaño de los frutos es muy variable y puede oscilar entre los 2 y 15 kg.



En cvs normales, aparecen semillas aplastadas de diversos colores (negro, blanco, marrón, etc.) y de gran tamaño y con una capacidad germinativa media de unos cinco años. Estas semillas se ubican irregularmente en la zona más interna de la pulpa, a diferencia de lo que ocurre en otras cucurbitáceas, por ejemplo el melón, en donde se concentran en la cavidad central de los frutos (Maroto *et al.*, 2002).



## **B) BANCOS DE GERMOPLASMA**

### **D) La importancia de conservar los recursos filogenéticos y alternativas de conservación**

La mejora genética vegetal ha logrado producir variedades exitosas, utilizando la enorme diversidad genética existente hasta obtener las mejores combinaciones de las características deseadas (resistencia a enfermedades, vegetales más sabrosos, atractivos o inclusive más saludables). Por lo que es casi una obviedad hablar de la importancia que implica la conservación de la variabilidad genética, ésta es la fuente de variabilidad natural que tienen los programas modernos de mejora para poder seleccionar las características deseables. Un ejemplo es PI-296341 FR, un genotipo de sandía proveniente de Sudáfrica, usado como fuente de resistencia genética a *Fusarium oxysporum f. sp. niveum*, FON, uno de los principales problemas fitosanitarios que presentan los cultivos de la sandía en la actualidad. La percepción de la erosión genética como un problema a escala planetaria no tuvo lugar hasta bien entrado el siglo XX. Las señales de alarma comenzaron a tomarse en serio a mediados de los años sesenta, al descubrirse que el alto ritmo de desplazamiento de variedades primitivas cultivadas por la introducción de nuevos cultivares estaba llevando a un rápido estrechamiento de la base genética de las especies cultivadas (Dodds, 1991; Maxted *et al.*, 1997). La toma de conciencia de esta situación determinó la puesta en marcha de medidas para la conservación de los recursos fitogenéticos.

Los recursos fitogenéticos están constituidos por colecciones de variedades cultivadas y variedades recién obtenidas, variedades en desuso, razas locales y primitivas, especies silvestres y estirpes genéticas especiales. Existen diversas posibilidades de conservación de estos recursos. Uno de los mejores sistemas de conservación *ex situ* son los bancos de germoplasma. En la actualidad, gran parte de estos bancos están destinados a la conservación de especies con interés agroalimentario. Los bancos de germoplasma pueden ser colecciones de semillas, de plantas vivas, de tejidos vegetales cultivados *in vitro*, de polen, o de ADN. Los bancos de germoplasma y las colecciones son sistemas de conservación *ex-situ* consistentes en un conjunto de diferentes accesiones o entradas de una especie (para designar a cada muestra diferente dentro de una colección se utiliza el término “entrada”, aunque es frecuente también el empleo del anglicismo “accesión”). Se consideran bancos de germoplasma a aquellas

colecciones de cierta envergadura, que sean referente de la especie y generalmente localizadas en organismos públicos, donde se garantice la continuidad y la disponibilidad para su investigación y uso.

La mayoría de los bancos de germoplasma tiene el mandato de distribuir germoplasma a los usuarios. Por lo general, las accesiones de germoplasma se distribuyen utilizando acuerdos de transferencia de materiales (ATM), que definen los términos y condiciones de uso, y las provisiones para compartir los beneficios que surjan del uso del germoplasma. En la primera reunión del Órgano Rector del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura, en junio del 2006, se formalizó un acuerdo estándar de transferencia de materiales (ATM estándar), que constituye un contrato uniforme para todos los intercambios de germoplasma de las especies incluidas en el Anexo I del Tratado. Éste incluye términos específicos que rigen el acceso y la distribución de beneficios, facilitando el intercambio de germoplasma en todo el mundo (Kameswara et al., 2007).

Existen alrededor de 1600 bancos de germoplasma, algunos de los más importantes son el banco del Instituto Vavilov, en San Petersburgo (N.I. Vavilov Institute of Plant Industry, VIR), el del Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), en Gatersleben, la red de información de los recursos de germoplasma (GRIN), del departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los del Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GICAI). En España existe el CFR (Centro de Recursos Filogenéticos) creado en 1993 como centro de conservación de colecciones base de semillas y como centro de documentación de los recursos fitogenéticos de la red, realizando además las actividades correspondientes a la gestión del germoplasma depositado.

## **II) Banco de Semillas**

Dentro de las alternativas que tienen los bancos de germoplasma para la conservación de los recursos fitogenéticos, la técnica más extendida es la de los bancos de semillas, esto es debido a la facilidad de almacenamiento y manipulación, pues en poco espacio pueden conservarse cantidades enormes de individuos vivos durante prolongados espacios de tiempo (Maxted *et al.*, 1997). Por un lado, las semillas son unidades adaptadas a la dispersión en el tiempo y, por tanto, capaces en la mayoría de

los casos de permanecer viables, de forma natural, durante largos períodos de tiempo (Chin, 1994). En segundo lugar, el pequeño tamaño de las semillas, unido a la posibilidad de que cada una de ellas posea una constitución genética diferente, asegura la conservación de una gran diversidad genética en un espacio reducido (Iriondo y Pérez, 1999). Normalmente los bancos están organizados en dos grandes colecciones: una primera de conservación a largo plazo, denominada colección base, y una segunda para el trabajo cotidiano del banco, la colección activa.

Aunque el almacenamiento en bancos de germoplasma está universalmente aceptado como parte integral de los programas de conservación de plantas silvestres, las muestras de semillas de plantas silvestres almacenadas en bancos de germoplasma suponen menos del 2 % del total de germoplasma almacenado, destinado esencialmente a plantas cultivadas (Astley, 1991 en Iriondo Alegría J.M., 2001).

Según las características de almacenamiento, las semillas se pueden clasificar como ortodoxas cuando resisten la desecación a contenidos de humedad bajos y el almacenamiento a temperaturas muy bajas, y las semillas recalcitrantes o sensibles a la desecación, que pierden viabilidad cuando se desecan por debajo de un límite crítico, habitualmente entre 12-30 % de contenido en humedad (Chin y Roberts, 1980 en Iriondo Alegría J.M., 2001). Existe una tercera categoría en la que las semillas pueden ser desecadas a contenidos de humedad similares a los de las semillas ortodoxas. Sin embargo, las semillas, una vez desecadas, se dañan al someterlas a bajas temperaturas y su viabilidad desciende rápidamente durante el almacenamiento, son las semillas intermedias (Ellis *et al.*, 1990<sup>a</sup> en Iriondo Alegría J.M., 2001). Por ello, la determinación del comportamiento de las semillas de una especie constituye un tema trascendental de cara a su conservación a largo plazo. La mayoría de las especies cultivables y forrajeras, y muchas especies arbóreas producen semillas ortodoxas. Las técnicas para conservar estas semillas se han venido perfeccionando durante varias décadas e incluyen el secado de las semillas hasta lograr un contenido de humedad bajo (3-7% de peso fresco, dependiendo de la especie) y el almacenamiento en recipientes herméticos, a bajas temperaturas, preferiblemente a -18 °C o incluso menos (FAO/IPGRI, 1994). Por el contrario, las especies con semillas intermedias o recalcitrantes no pueden mantenerse de esta.

### **III) Operaciones básicas de un banco de germoplasma de semillas**

Las principales actividades y procedimientos para el funcionamiento de un banco de germoplasma de semillas son prácticamente los mismos en todos los bancos y consiste básicamente en las siguientes actividades: adquisición del material ya sea por colecta *in situ* o por introducción, conservación propiamente dicha (condiciones de almacenamiento de semillas), monitoreo de la viabilidad, multiplicación y sanidad vegetal, caracterización, evaluación, documentación e intercambio.

El primer paso hacia la conservación *ex situ* de la diversidad cultivada es la recolección del germoplasma en áreas de conocida diversidad genética o mediante donaciones de otros centros. Para la incorporación de muestras a una colección *ex situ*, es necesario averiguar si está presente en ellas alguna plaga o enfermedad (Frison y Jackson, 1995 en Engels, 2007). Esto supondrá muchas veces emplear herramientas de diagnóstico o hacer una inspección exhaustiva de plantas provenientes de reservas de semilla para conservación y utilización.

Una vez se reciben las muestras en el banco de germoplasma, las semillas se registran y se incorporan a la colección, siempre y cuando cumplan con los estándares requeridos de cantidad y calidad, y con la información asociada a ellas. El procedimiento para integrar una accesión a un banco de germoplasma implica limpiar, determinar el contenido de humedad, secar, evaluar la viabilidad y empaçar.

En la descripción de las colecciones se distinguen normalmente dos aspectos: la caracterización y la evaluación. La caracterización tiene sobre todo un objetivo de identificación del recurso y se refiere principalmente a atributos cualitativos que pueden considerarse invariables por ser caracteres heredables que no dependen del ambiente. La evaluación persigue fundamentalmente determinar caracteres de interés agronómico que normalmente se ven influidos por las condiciones ambientales como la precocidad del fruto por ejemplo (Consejería de Agricultura y Pesca, 2012).

Todos estos datos no servirían de nada si no se dispone de un sistema de documentación eficaz que permita optimizar los resultados obtenidos para el resto de la comunidad científica o usuarios en general. La información asociada a los recursos fitogenéticos suele dividirse en las categorías siguientes:

- Datos de pasaporte: que incluyen los códigos de identificación de cada recurso inventariado y la información obtenida en la recolección.

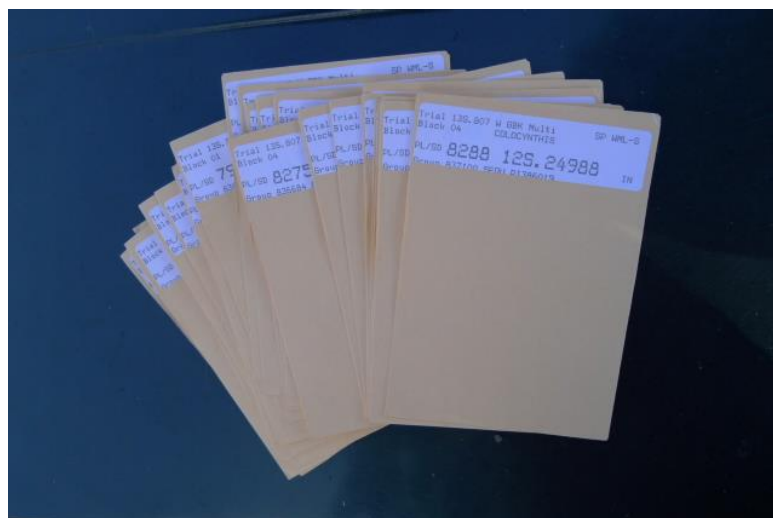
- Datos de gestión: que comprenden la información generada a lo largo de los procesos de conservación propiamente dicha (tamaño de las muestras, germinación, etc.) y de regeneración/multiplicación.

- Datos de caracterización / evaluación.

La transmisión eficaz de la información constituye la etapa final del proceso de documentación y contribuye de forma muy importante a promover la utilización del germoplasma

Los bancos de germoplasma son de vital importancia para las empresas de semillas debido a que contienen toda la diversidad genética que necesitan los especialistas para mejorar cierta variedad. Un ejemplo se manifiesta a lo largo de este trabajo desarrollado en la empresa RIJK ZWAAN IBÉRICA S.A. Esta empresa tiene como actividad principal la obtención y comercialización de nuevas variedades de especies hortícolas, sector en el que es líder. Para sus actividades de I+D cuenta con varios Centros de Investigación en el mundo, con especial presencia en España y otros países de la cuenca mediterránea. Sus semillas son vendidas en más de 100 países diferentes y dispone de instalaciones tecnológicamente punteras.

RIJK ZWAAN IBÉRICA S.A. introduce constantemente accesiones de distintos bancos de germoplasma públicos, para que estos genotipos puedan ser parte del banco de germoplasma privado de la empresa es de suma importancia que se garanticen ciertos requisitos, todos destinados a proteger la integridad de sus semillas.



Este trabajo se estructuró en tres capítulos, cada uno con una finalidad concreta. El objetivo en el capítulo 1 es el desarrollo de un protocolo que facilite la germinación de semillas latentes de *Citrullus colocynthis* para su posterior multiplicación y provenientes de bancos de germoplasma públicos. En el capítulo 2, el objetivo es la detección de patógenos de cuarentena en genotipos de bancos de germoplasma de sandía provenientes de colectas. Mientras que en el capítulo 3 el objetivo es la caracterización mediante descripción fenotípica de una colección de sandía de germoplasma de RIJK ZWAAN IBÉRICA S.A.

# CAPÍTULO 1: DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA MEJORAR LA GERMINACIÓN EN GENOTIPOS DE *CITRULLUS SPP.*

## 1. *Introducción*

### 1.1. Latencia y germinación de las semillas

El estado de **dormancia, latencia o letargo** es definido como la incapacidad de una semilla intacta y viable, de germinar bajo condiciones de temperatura, humedad y concentración de gases que serían adecuadas para la germinación. La latencia se establece durante la formación de la semilla, y posee una importante función que consiste en restringir la germinación en la planta madre antes de su dispersión en el campo. Además, se considera que la latencia es una adaptación que contribuye a la supervivencia del individuo, ya que restringe la germinación cuando los factores ambientales son desfavorables para el desarrollo de la plántula (Hartmann y Kester, 1988).

La intensidad de la latencia se encuentra influenciada por varios factores ambientales como ser la temperatura, la humedad y el ambiente gaseoso, y a medida que el grado de latencia disminuye se amplía el rango de condiciones ambientales que permiten la germinación. Por lo tanto, el grado de latencia dependerá de la procedencia de las semillas, el año de cosecha y variará incluso dentro de un mismo lote de semillas, de manera que en condiciones naturales, la emergencia de las plántulas ocurrirá a “pulsos” en un rango de espacio y de tiempo, favoreciendo el desarrollo de los nuevos individuos en ambientes ligeramente distintos, contribuyendo así las posibilidades de regeneración y supervivencia de la especie (Varela *et al.*, 2011)

Por definición, la germinación involucra todos aquellos procesos que comienzan con la absorción de agua por la semilla quiescente, y terminan con la elongación del eje embrionario. La señal visible de la finalización de la germinación es, en general, la emergencia de la radícula embrionaria a través de las cubiertas seminales, aunque en el ámbito de la producción es aceptado que la señal de la germinación suele tomarse como la visualización de la plántula viable emergiendo del suelo (Hatmann y Kester, 1988).



Existen distintos tipos de latencia que han sido estudiadas en profundidad y son las siguientes: a) latencia exógena (producida por la cubierta de las semillas), b) latencia morfológica o endógena, c) latencia interna (controlada en el interior de los tejidos), d) latencia combinada morfo-fisiológica (consiste en la combinación de subdesarrollo del embrión con mecanismos fisiológicos inhibidores fuertes) y e) latencia combinada exógena–endógena (se denomina así a las diversas combinaciones de latencia de la cubierta del pericarpio con latencia fisiológica endógena). (Hartmann y Kester, 1988; Willan, 1991). En este trabajo se describirá los tipos de latencia exógena.

### ***Latencia por la cubierta de las semillas o exógena:***

- *Latencia física.* Característica de un gran número de especies de plantas, en las cuales la cubierta seminal o secciones endurecidas de otras cubiertas de la semilla son impermeables. El embrión está encerrado dentro de una cubierta impermeable que puede preservar las semillas con bajo contenido de humedad durante varios años, aún con temperaturas elevadas.

- *Latencia mecánica.* En ésta categoría las cubiertas de las semillas son demasiadas duras para permitir que el embrión se expanda durante la germinación. Probablemente éste factor no es la única causa de la latencia, ya en la mayoría de los casos se combina con otros tipos para retardar la germinación.

- *Latencia química.* Corresponde a la producción y acumulación de sustancias químicas que inhiben la germinación, ya sea en el fruto o en las cubiertas de las semillas.

En la naturaleza, existen diversos factores externos que actúan para poner fin a la latencia como por ejemplo, la alternancia de calor y frío, la alternancia de condiciones húmedas y secas, el fuego, la ingesta por parte de animales y la acción de organismos del suelo. También está demostrado que en el mantenimiento o la interrupción de la latencia, actúan factores internos como las hormonas del crecimiento (por ejemplo, las giberelinas) (Hilhorst y Karssen, 1992). Pero muchísimas veces se acude a procedimientos artificiales para romper tal dormancia.

## **1.2. Tratamientos pre-germinativos**

Los tratamientos pre-germinativos son todos aquellos procedimientos artificiales necesarios para romper la latencia de las semillas. Los métodos pre-germinativos pueden actuar a un nivel fisiológico (como la estratificación, que se utiliza para romper la latencia fisiológica, y consiste en colocar las semillas entre estratos que conservan la humedad, comúnmente arena o bien turba o vermiculita, en frío o calor (Hartmann y Kester, 1988) o a un nivel físico, como es el caso de la escarificación.

### ***Escarificación***

Un gran número de especies no germinan debido a que la testa o cubierta seminal es dura e impide la entrada de agua (latencia física), y la semilla no germina al menos que esta sea escarificada. Así, la escarificación es cualquier proceso que rompa, raye, altere mecánicamente o ablande las cubiertas de las semillas para hacerlas permeables al agua y a los gases. Pueden ser escarificaciones químicas (normalmente por inmersiones de las semillas en ácido sulfúrico), físicas (generalmente por abrasión, es decir por desgaste con elementos abrasivos como gravilla o papel de lija) y térmicas (por inmersión de las semillas en agua caliente) (Sanabria *et al.*, 2001).

### **1.3. *Citrullus Colocynthis*, un caso de latencia exógena**

*Citrullus colocynthis* es una cucurbitacea típica del desierto. Es nativa de la cuenca del Mediterráneo y Asia, y se distribuye entre la costa occidental del norte de África, hacia el este a través del Sahara, Egipto hasta India y alcanza también a la costa norte del Mediterráneo y el mar Caspio. Crece también en los países del sur de Europa como en España y en las islas del archipiélago griego (Burkill, 1985).



Esta cucurbitacea tiene un enorme valor debido a sus diversas aplicaciones: es fuente de medicamentos, de sus semillas se obtienen aceites y proteínas y sobre todo, es usada como fuente de material genético en la mejora de cucurbitaceas, en especial como fuente de resistencia a enfermedades y a la sequía. Un ejemplo es su resistencia a la araña roja, se ha demostrado que la mejor fuente de resistencia a este ácaro es *Citrullus colocynthis* comparándola con otras especies del género *Citrullus* (Levi *et al.*, 2005).

La germinación es un momento crítico en el ciclo de vida de las plantas en general, y en particular, en plantas que viven en ambientes extremos, como es el caso de *C. colocynthis*. Sus semillas son pequeñas y están recubiertas de una fuerte cutícula y se ha demostrado que es la principal causa de su bajo poder germinativo (Koller *et al.* 1963). Varios métodos fueron usados para reducir la resistencia mecánica de la testa. Esto se intentó mediante escarificación química (inmersión en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por 4 hs.), remojo en acetona por 30 minutos, inmersión en agua hirviendo, inmersión en HCl al 10% o NaOH al 10 %, pero ninguno de estos métodos tuvo éxito dado que se vio involucrada la integridad del embrión (Koller *et al.*, 1963). Evidentemente el procedimiento más adecuado será el que menos afecte la viabilidad de la semilla.

En este capítulo se establece un protocolo que facilite la germinación de distintas variedades de semillas de *Citrullus colocynthis* mediante escarificación térmica.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Material biológico**

Entre los tantos genotipos de sandía provenientes de diferentes bancos públicos de semillas que entraron a Rijk Zwaan Ibérica S.A. en el 2013, 29 de ellos, todos pertenecientes a la especie *Citrullus colocynthis*, se trataron de semillas pequeñas, recubiertas de una fuerte cutícula que impide la germinación por sí mismas y fueron las que se sometieron a un tratamiento pre-germinativo. Los genotipos restantes se sembraron paralelamente y de forma natural. Entre ellos se encontraron los controles, que fueron representados por variedades de semillas de fácil, media y difícil germinación.

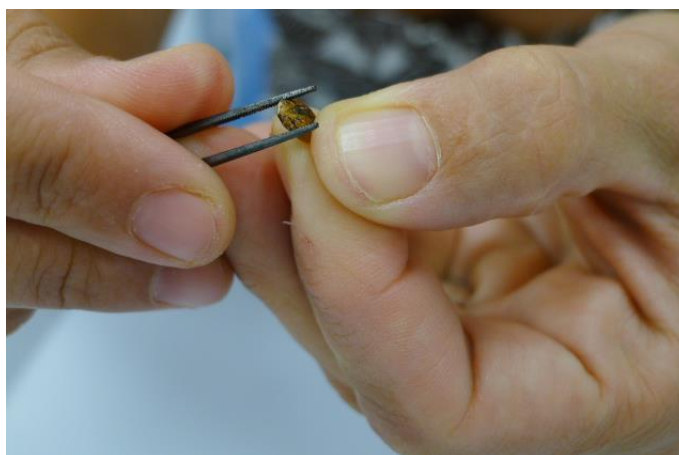
## **2.2. Preparación del material**

Los materiales utilizados en este protocolo fueron frascos de vidrio, pinzas, termómetro, turba, vermiculita, bandejas de germinación y cámara de germinación tipo fitotron. Todo el material utilizado se esterilizó mediante autoclave, a 90°C durante veinte minutos.

## **2.3. Escarificación térmica**

Para poder disminuir la dureza de la testa, las semillas de los 29 genotipos se sometieron a un tratamiento de escarificación térmica.

Diez semillas de cada genotipo se introdujeron en frascos de vidrio y se cubrieron de agua destilada a una temperatura de 44°C, los frascos se taparon con papel de aluminio para evitar la pérdida de calor dejando las semillas inmersas durante treinta minutos. Transcurrido este tiempo, a cada una de las semillas ya reblandecidas, se les presionó con una pinza a la altura de la radícula hasta que sus puntas abrieron.



## **2.4. Germinación**

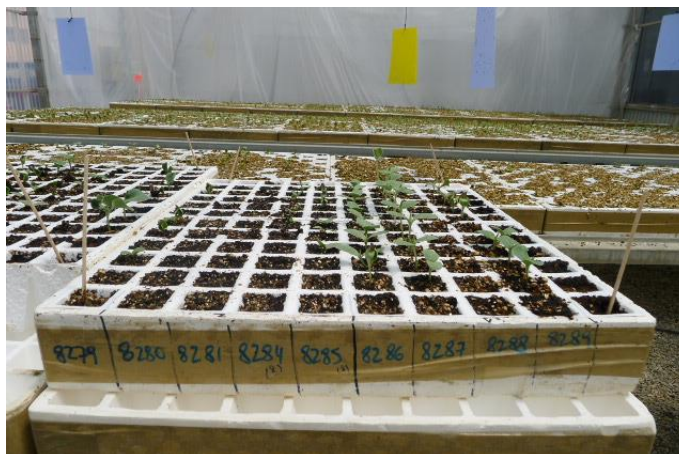
Para la germinación, se utilizaron bandejas de polispam con celdas de 4 centímetros de profundidad respectivamente rotuladas. Se cubrieron de turba y a cada celda se le hizo un pequeño orificio donde se colocaron las semillas con las puntas previamente abiertas a unos dos centímetros de profundidad. Las semillas ya sembradas se cubrieron

con vermiculita y las bandejas se introdujeron envueltas en un plástico, en una cámara germinación tipo fitotron hasta que las primeras semillas comenzaran a germinar a 28°C.

Una vez germinadas las semillas, las bandejas se trasladaron a un invernadero de cuarentena. El porcentaje de germinación se midió dos veces, a los 9 y 20 días. El porcentaje de germinación se midió tanto para semillas sometidas a escarificación y para los genotipos controles.

### 2.5. Tratamiento estadístico de los datos

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó una prueba binomial con una  $p$  (0,05) utilizando el programa Genstat.



### 3. Resultados y Discusión

Para el análisis de los resultados se seleccionaron 3 genotipos de *C. colocynthis* con distintos grados de dificultad para germinar, debido a que estos fueron representativos del resto. Estos genotipos, desde ahora llamados E (easy), M (medium) y D (difficult) fueron los comparados con los controles.

En el gráfico 1 y 2, se muestran los resultados obtenidos a partir de la aplicación del protocolo de escarificación térmica de semillas de *Citrullus colocynthis*.

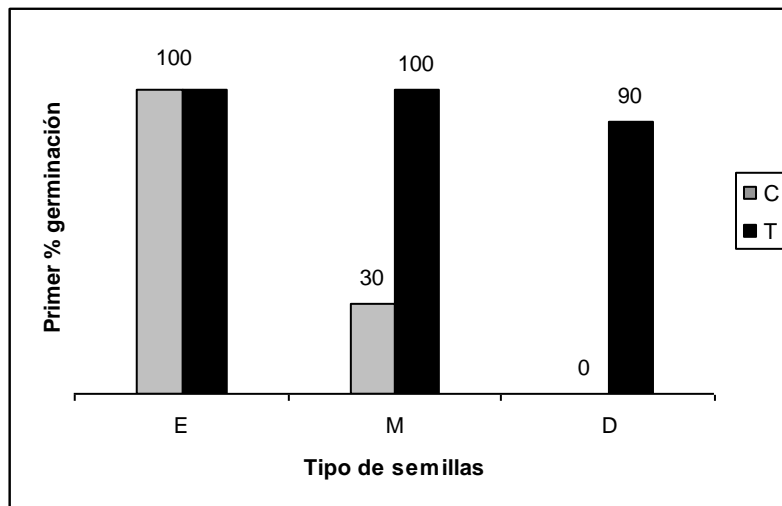


Gráfico 1: Porcentajes de germinación a los nueve días en semillas escarificadas térmicamente (T) y semillas normales (C). Las letras E, M y D hacen referencia a la dificultad natural de germinación de las semillas (E: easy; M: médium; D: difícil).

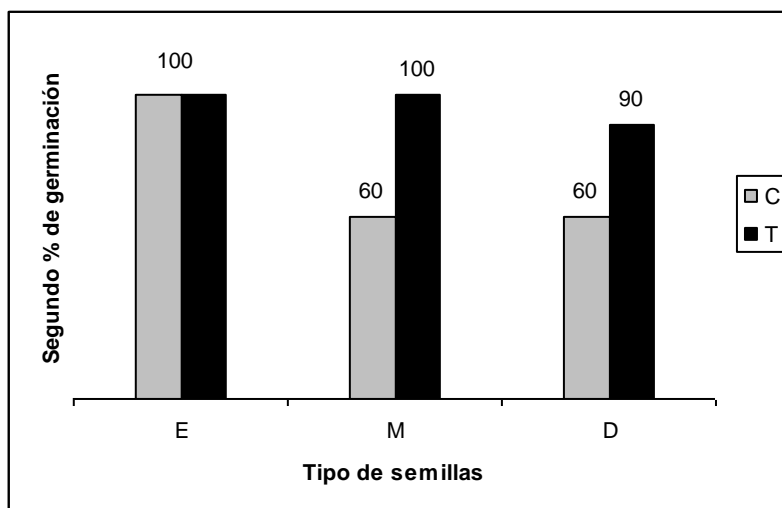


Gráfico 2: Porcentajes de germinación a los veinte días.

Se observa que el tratamiento de escarificación fue efectivo. Las diferencias fueron significativas en los genotipos M y D. En las semillas de fácil germinación no se observaron diferencias pero el porcentaje de germinación en las semillas de mediana y difícil germinación fue mayor en semillas escarificadas y además la germinación se adelantó en estas semillas.

Todas las semillas tratadas de mediana dificultad germinaron mientras que sólo el 60 % de las semillas controles lo hicieron. En el caso de las semillas difíciles de germinar

se observa una menor diferencia, el 90 % de las semillas escarificadas germinaron contra un 60 % de las semillas controles. Sin embargo se puede observar que la germinación en las semillas tratadas se adelantó, alcanzando su máximo porcentaje de germinación posible a los nueve días.

En muchos casos, la principal diferencia puede residir no tanto en el total final de semillas que germinan sino en la velocidad de la germinación, (Bonner *et. al.*, 1974 y Forrest, 1964).

Hay muy poca información acerca de tratamientos pre-germinativos en *Citrullus spp.* A pesar de que la germinación en *C. colocynthis* fue estudiada en profundidad, hasta el momento, no se había desarrollado un procedimiento claro para romper la cubierta de las semillas en *C. colocynthis* y de este modo facilitar la germinación. El protocolo establecido en este trabajo es de muy fácil y rápida aplicación, sus costos son prácticamente nulos y sobre todo, no compromete la viabilidad de la semilla. Esta especie es un gran recurso que tienen los mejoradores de cucurbitáceas y la posibilidad de que sus semillas germinen con rapidez, y sobre todo de manera uniforme garantiza la producción de semillas (y plantines) necesarios para cualquier programa de mejora.

## **CAPÍTULO 2: DETECCIÓN DE PATÓGENOS DE CUARENTENA EN GENOTIPOS BANCOS DE GERMOPLASMA DE SANDÍA Y PROVENIENTES DE COLECTAS.**

### **1. *Introducción***

#### **1.1. Sanidad de las semillas y cuarentena vegetal**

La sanidad de las semillas se refiere al estado de enfermedad de una muestra de semillas y a la presencia o ausencia de organismos y plagas que causan enfermedades (Albrechtsen, 2005). Los patógenos y plagas comunes transmitidos a través de las semillas son cuatro tipos de organismos que perjudican a una gran variedad de cultivos. Estos son los hongos, bacterias, virus e insectos y los métodos para su detección varían según el organismo y el portador (Kameswara, 2007).

Con frecuencia, los cultivos se infectan con una variedad de patógenos comunes transmitidos a través de las semillas, que pueden no ser visibles o reconocidos con facilidad durante la colecta. Los inóculos transmitidos en la semilla reducen la longevidad en almacenamiento y ocasionan germinación o establecimiento en campo deficientes. Los inóculos transmitidos en la semilla también propician enfermedades en el campo, reduciendo el valor de los cultivos. El intercambio de semillas infectadas puede facilitar la dispersión de enfermedades y plagas de una región a otra. Los bancos de germoplasma deben verificar que las semillas destinadas a conservación estén libres de enfermedades y plagas transmitidas a través de las semillas (Kameswara, 2007) y en este sentido, la cuarentena vegetal es fundamental.

#### **1.2. Transmisión de virus por semillas**

En la actualidad alrededor del 20% de los virus conocidos de las plantas se transmiten a través de la semilla. La transmisión a través de la semilla constituye uno de los factores más importantes en el desarrollo epidémico de algunos virus. Las semillas infectadas dan origen a plántulas que representan una fuente de inóculo inicial temprana, que además se halla uniformemente distribuido. Las plantas infectadas



constituyen reservorios a partir de los cuales ocurre la dispersión secundaria del virus lo cual sucede por transmisión mecánica o mediante vectores (Mena, 2010).

Como regla general, sólo aquellos virus capaces de infectar el embrión se transmiten por semillas a la próxima generación. Una notable excepción es la familia de los *tobamovirus* que no penetran en el embrión pero son lo suficientemente estables como para sobrevivir sobre las semillas y poder infectar a la descendencia (Albrechtsen, 2005).

### **1.3. Virus que afectan a cucurbitáceas**

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el cultivo de cucurbitáceas es el de las enfermedades, en particular, las causadas por virus. Entre los virus descritos en España se encuentran el Squash mosaic virus (SqMV), el Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) y el Melon necrotic spot virus (MNSV) (Luis-Arteaga, 1994).

#### ***SqMV: Squash mosaic virus***

Una de las enfermedades más importantes en cucurbitáceas es la causada por el virus del mosaico de la calabaza, SqMV. Se transmite principalmente por semilla y posteriormente por vía mecánica. Produce bandeado de venas, mosaico, manchas cloróticas más o menos intensas, deformación y filimorfismo en hojas de forma grave. Sobre los frutos ocasiona protuberancias que impiden su comercialización, mosaico fuerte y deformación, sobre todo en el calabacín, los síntomas en sandías son mucho más suaves. En España se ha citado en Andalucía y a lo largo de la Costa Mediterránea y afecta de manera notoria a los cultivos de sandía (Luis-Arteaga, 1994).

#### ***CGMMV: Cucumber green mottle mosaic virus***

El virus del mosaico moteado verde del pepino (CGMMV) se transmite por semilla y de forma mecánica con gran facilidad y afecta entre otros, a cultivares de sandía. Los síntomas más característicos producidos por este virus son un fuerte moteado verde y deformación de las hojas, pudiendo extenderse a los frutos. Mosaico más o menos intenso, posible bandeado de venas y reducción del crecimiento. En España también se ha citado en Andalucía (Luis-Arteaga, 1994).

#### ***MNSV: Melon necrotic spot virus***

La enfermedad causada por este virus es una de la más importante dentro de las cucurbitáceas. Esta enfermedad afecta a cultivos de sandía, melón, pepino y calabacín. Presenta una sintomatología totalmente diferente a la producida por otros virus. La constituye el denominado “colapso”, que consiste en el marchitamiento rápido que evoluciona hasta la muerte de la planta sin presentar los síntomas típicos de cribado.

Se transmite por semilla, pero su presencia y extensión está ligada a la presencia del hongo *Oplidium bornovanus* (Luis-Arteaga, 1994).

#### **1.4. Método de diagnóstico: ELISA**

Antes de comenzar a multiplicar las semillas provenientes de los distintos bancos de germoplasma es necesario tener la certeza de que éstas se encuentren libres de patógenos. Existen técnicas específicas para detectar infecciones virales, al igual que para detectar y erradicar otras enfermedades en varias especies vegetales. Un ejemplo es el uso de la técnica de ELISA (del inglés: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assays.), una valiosa herramienta para la detección de virus y/o diagnóstico de enfermedades en plantas (Rangel, *et al.* 2006). Su aplicación en puntos clave del sistema de producción garantizan el óptimo estado fitosanitario de las accesiones adquiridas (ya sean por colectas *in situ* o provenientes de otros países). Esta técnica de inmunodetección emplea antígenos ó anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario (antígeno o anticuerpo) a nivel de distintos fluidos biológicos. Hay una variedad de formatos de ELISA disponibles. El más común es el que se llama un DAS ELISA (doble anticuerpo tipo sandwich) y utiliza anticuerpos unidos a una placa para capturar los antígenos de interés. Para detectar el antígeno atrapado se utiliza un conjugado de enzima-anticuerpo que se detecta mediante una reacción colorimétrica provocada por el agregado de sustrato.

Existe una enorme variedad de anticuerpos específicos de virus de cucurbitáceas y ninguno de ellos reacciona de forma cruzada (Aghia, 2008).

En este capítulo, todos los genotipos de sandía provenientes de bancos de germoplasma públicos que entraron a Rijk Zwaan en el 2013, fueron sometidos a un control fitosanitario mediante DAS-ELISA, para la detección de SqMV, CGMMV y MNSV, previo trasplante para su multiplicación.

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1. Material biológico**

Las muestras analizadas fueron hojas jóvenes y correspondieron a los genotipos germinados y mantenidos en cuarentena. Se recolectaron diez hojas de las diez plantas por genotipo y se colocaron en una bolsa zipper que se conservó en la nevera hasta su procesamiento (antes de las 24 hs. Desde su recolección). Se hicieron tres repeticiones (una para cada virus).

### **2.2. Preparación del material**

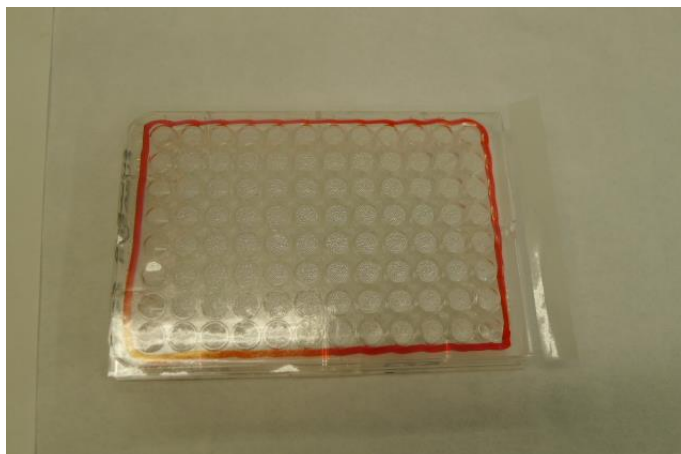
Las muestras fueron molturadas antes de la introducción en las placas tapizadas para ELISA. Para la molturación, se colocaron las muestras en una placa y a cada pocillo se le agregó una pequeña esfera de acero y 0,5 ml. de buffer de extracción. Se selló y se colocó en el mortero por un minuto. Se centrifugó por dos minutos.

Para el tapizado de las placas se usaron anticuerpos policlonales (Immuno Stripe SqMV, ImmunoStripe CGMMV y el kit ELISA MNSV) específicos de cada virus de la marca comercial Agdia .

### **2.3. DAS ELISA**

Se colocó 100 ul de las muestras ya molturadas en placas tapizadas a 4°C durante 8 horas. Para el tapizado de placas se colocó 125 ul/pocillo de solución tapiz (buffer más anticuerpo específico) y se dejó a 4°C durante ocho horas. Pasadas las 8 horas en frío, se lavaron las y se agregó el conjugado (anticuerpo específico del virus + enzima (fosfatasa alcalina) y se llevo a horno a 37°C por tres horas. Transcurrido este tiempo, se lavaron nuevamente las placas y se añadió 125 ul de sustrato. Las placas se dejaron 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Los resultados colorímetros fueron cuantificados con un espectrofotómetro de la marca TECAN.

En cada test, se usó como control positivo, una muestra de una planta que se sabía que estaba infectada.



### ***3. Resultados y Discusión***

Esta vez, el diagnóstico utilizando la técnica DAS-ELISA reveló resultados negativos para los tres virus analizados (SqMV, CGMMV y MNSV).

Cuando una planta es infectada por un virus, se infecta de por vida y la infección normalmente resulta en pérdidas en los cultivos. Alrededor del 90% de los cultivos alimentarios son propagados por semillas y las pérdidas económicas causadas por patógenos transmitidos por éstas son de gran importancia (Albrechtsen, 2005). Por otro lado, a pesar de los estrictos controles de sanidad que tienen las semillas de bancos públicos, tanto a su ingreso como a su salida, existe información a cerca semillas contaminadas cuya procedencia eran entidades públicas (Steiner, 1997).

Por todo esto, se debe disponer de un estricto conjunto de medidas de diagnóstico y control, para evitar no solo las posibles infecciones de los cultivos sino también, la introducción de nuevos virus. De todas formas, hoy en día estos procedimientos que se aplican para garantizar la sanidad de las semillas son bastantes confiables, tanto los bancos públicos como las casas de semillas han logrado limitar la presencia de virus en sus colecciones dada la rigurosidad de los protocolos establecidos. Sin embargo frecuentemente se detectan virus en distintos cultivares y las consecuencias son alarmantes. Esto pone de manifiesto, que el desarrollo de cultivares resistentes sería de gran beneficio para la industria de las semillas (Providenti, 2005).

# **CAPÍTULO 3: DESCRIPCIÓN FENOTÍPICA DE UNA COLECCIÓN DE GERMOPLASMA DE SANDÍA DE RIJK ZWANN IBÉRICA S.A.**

## **1. *Introducción***

La caracterización de las accesiones, consiste en determinar la expresión de los caracteres de muy alta heredabilidad, que van desde características morfológicas hasta proteínas de la semilla, incluyendo los marcadores moleculares. Estos caracteres permiten también distinguir, de modo fácil y rápido, los fenotipos y agrupar en forma sencilla las accesiones, así como comprobar la autenticidad de muestras homogéneas; todo esto se hace, frecuentemente, según los criterios que aplican los mejoradores y otros usuarios del germoplasma (Engels, 2007).

En el ámbito de los recursos fitogenéticos se utiliza el término “**descriptor**” para definir cada una de las unidades de datos. La utilización de descriptores estandarizados entre instituciones diferentes es un aspecto esencial para facilitar el intercambio de información y el desarrollo de bases de datos regionales o mundiales (Consejería de Agricultura y Pesca, 2012). El IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) ha realizado una amplia labor en este sentido al desarrollar y publicar listas de descriptores para una gran cantidad de especies.

En este capítulo, se describen fenotípicamente los genotipos de sandía que finalmente fueron multiplicados por RIJK ZWANN IBÉRICA S.A., provenientes de bancos de germoplasma públicos que ingresaron en el año 2013.

## **2. *Materiales y Métodos***

### **2.1. *Material biológico***

La descripción fenotípica se hizo para los 93 genotipos provenientes de la colección americana GRIN USDA. Por cada genotipo se evaluaron 6 plantas.

## 2.2. Descriptores fenotípicos

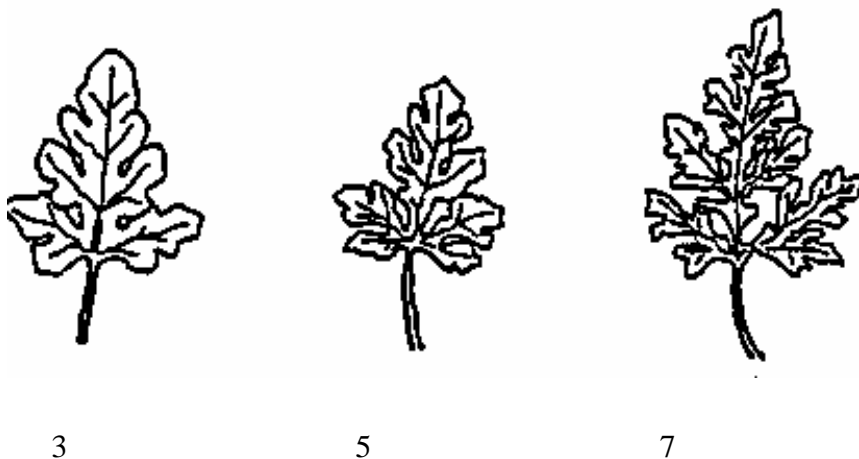
Los descriptores utilizados estuvieron basado en los publicados por IPGRI para sandías cultivadas (lista de descriptores para Cucurbitaceas: [http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/www.ecpgr.cgiar.org/NW and WG UPLOADS/Cucurbits\\_DescriptorLists.pdf](http://www.ecpgr.cgiar.org/fileadmin/www.ecpgr.cgiar.org/NW_and_WG_UPLOADS/Cucurbits_DescriptorLists.pdf)), adaptados a las necesidades del programa de mejora de sandía de RIJK ZWANN IBÉRICA S.A.

Los genotipos se caracterizaron a 3 niveles: 1) Planta, 2) Floración y 3) Fruto. En todos los casos se observó primeramente la uniformidad en cada genotipo.

### *Nivel 1:* Planta

- Hoja. Las observaciones se hicieron en al menos 10 hojas.

a) Se medio el grado de lobulación. 3: débil, 5: intermedio, 7: fuerte, pudiendo valorarse también lobulaciones intermedias entre estos valores.



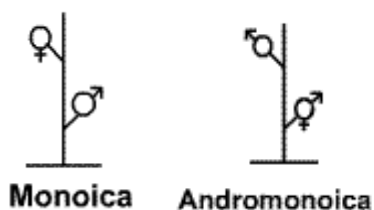
b) Forma de hoja: Lanceolada (L), Triangular (T), Redonda (R).

c) Color de hoja: 3 (verde claro), 5 (verde intermedio), 6 (verde oscuro).

- Tallo: longitud de entrenudos. 3 (menos de 15 cm.), 5 (15 cm.), 7 (más de 15 cm.).

*Nivel 2:* Floración: Las observaciones se hicieron en todas las flores de la planta.

Se clasificaron como plantas monóicas, cuando en el mismo pie se encontraron flores masculinas y femeninas, y plantas andromonóicas, cuando en el mismo pie se encontraron flores masculinas y hermafroditas.



**Nivel 3:** Fruto: Las observaciones se hicieron en todos los frutos de la planta.

Para los caracteres mensurables, se usó una escala gradual de números impares que hacen referencia a la intensidad con la que se expresa el carácter en cuestión. Se evaluaron 10 caracteres a saber:

- Forma de fruto: Redondo (R), Elongado (E) y Elíptico (e),
- Tipo corteza: Sugar Baby (SB), Charleston Gray (ChG), Crimson Sweet (CS) y Tiger Stripe (TS).
- Color de fondo: El color de fondo se clasificó usando la letra en mayúscula del color acompañada por el número que le corresponda según su intensidad.
- Color secundario: El color secundario hace referencia al color de las manchas de la corteza en el caso de tenerlas, y se clasificó de la misma forma que el color de fondo.
- Grosor corteza: en cm.
- Color de la pulpa: la pulpa se clasificó con letras R y Y acompañadas por números. Las letras hacen referencia al color de la pulpa (R, red; Y, yellow) y los números hacen referencia a la intensidad del color.
- Tamaño de semillas: Small (S), Medium (M), Large (L), Extra Large (XL) y Extra Extra Large (XXL).

- Color semillas: Negras (N), Marrones (M), Pálidas (P), Muy Pálidas (XP).

### **3. Resultados y Discusión**

#### **3.1. Uniformidad de los genotipos**

La descripción fenotípica de la colección muestra una alta uniformidad de los genotipos, dado que sólo cuatro de las 93 entradas segregaron en más de tres caracteres. Esta uniformidad revela un alto grado de homocigosis, una característica deseada desde el punto de vista de la mejora. A los mejoradores no les interesa un genotipo segregante dado que se requiere mucho esfuerzo y sobre todo tiempo para fijar un carácter.

A continuación, se detallan las observaciones realizadas en los distintos niveles de la planta:

**Nivel 1:** Planta: en este nivel, de los 93 genotipos, solo en 6 se observa segregación en el grado de lobulación. Un 85 % de los genotipos fue representado por hojas de tipo 5 mientras que el resto fue mayoritariamente 7.

**Nivel 2:** Flor: En el momento de la evaluación, el 73% de los genotipos observados no se pudo caracterizar debido a la ausencia de flor. Para los genotipos que presentaron flores en el momento de caracterización, se observó que el 96% fueron plantas monóicas, observándose uniformidad dentro de cada genotipo.



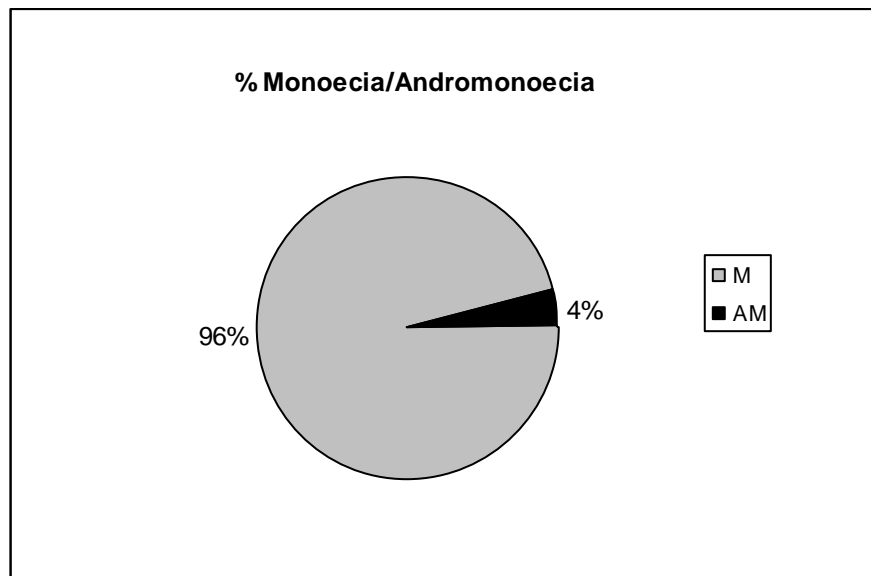


Gráfico 1: Porcentaje de plantas monóicas (M) y andromonóicas (AM).

**Nivel 3: Fruto:** De los 93 genotipos, 73 mostraron uniformidad a este nivel.

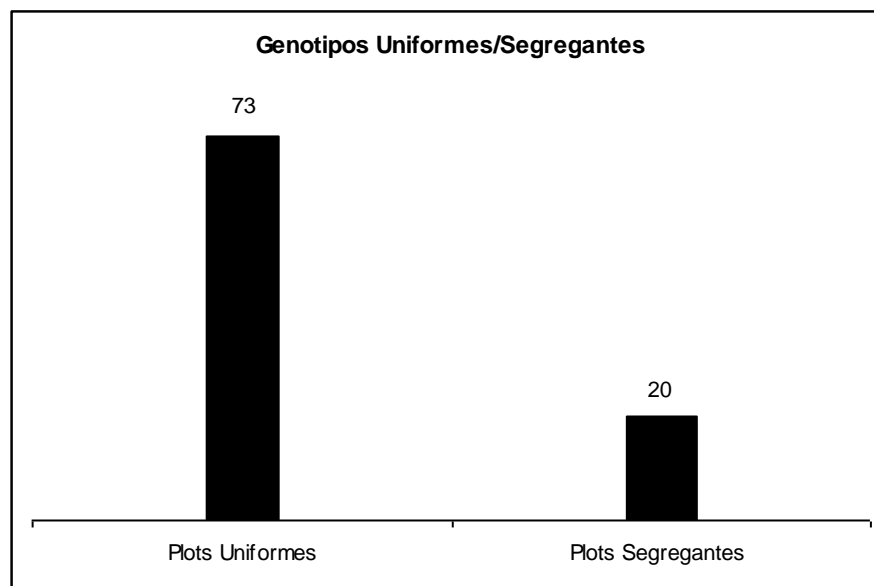


Gráfico 2: Cantidad de genotipos uniformes y segregantes.

Para el fruto los datos analizados correspondieron a los siguientes caracteres: tipo de corteza, color de la pulpa y color de las semillas.

- Tipo de corteza: Los más representados fueron los tipos Crimson Sweet (34 genotipos de esta clase) y Sugar Baby (29 genotipos.). El tipo Charleston Gray se observó en 20 genotipos mientras que Tiger Stripe sólo en 10.

- Color de la pulpa: 55 genotipos presentaron pulpa roja, mientras que 32 genotipos mostraron pulpa blanca. Los 6 genotipos restantes fueron amarillos.

- Color de las semillas: 33 genotipos presentaron semillas color marrón, mientras que en 15 genotipos sus semillas fueron negras. El resto de genotipos fue representado por semillas pálidas, muy pálidas y por semillas blancas con anillo negro, y pálidas con tip negro.

Los 20 genotipos que segregaron en uno o varios caracteres, lo hicieron predominantemente en el tipo de corteza, en el color de la semilla y el color de la pulpa. Estos caracteres también son los que mostraron mayor variabilidad entre los distintos genotipos.

### **3.2. Reclasificación taxonómica**

En este caso, las descripciones fenotípicas que se hicieron para la caracterización de la colección, también sirvieron para reflejar la clasificación dudosa de ciertas accesiones. Según el banco de donde provenían estas semillas, un banco de germoplasma público, cuatro genotipos correspondían a *C. lanatus* var. *lanatus* y dos a variedades de *C. colocynthis*. Nuestras observaciones recaen en que los supuestos genotipos *C. lanatus* var. *lanatus* son en realidad *C. lanatus* var. *citroides* mientras que los supuestos *C. colocynthis* son variedades de *C. lanatus*. Hay rasgos claros que identifican a las distintas variedades de *C. lanatus* y también entre las especies *C. lanatus* y *C. colocynthis*. *C. lanatus* var. *lanatus* tiene carne roja y dulce, sus semillas varían en color y tamaño y sus hojas se dividen normalmente en 3 o 4 pares de lóbulos. *C. lanatus* var. *citroides* tiene carne blanca o verde variando ampliamente en el contenido de azúcar y sus semillas pueden ser de diversos colores (rojo, verde, etc). Sus hojas suelen ser profundamente lobuladas. *C. colocynthis* tiene carne blanca y amarga y sus semillas son pequeñas con una cubierta muy dura (Levi *et al.*, 2012). Otra característica distintiva de *C. lanatus* var. *citroides* es que normalmente sus frutos son bastante pequeños y poseen un tipo de corteza muy característico (tipo piel de serpiente). Los genotipos mal clasificados se reclasificaron.

Encontrarse con estos inconvenientes suele ser común debido a la antigüedad de las colectas y los cambios que ha ido sufriendo la taxonomía.

A pesar de los estrictos controles existentes en la gestión de germoplasma en las instituciones públicas, a veces se comenten “pequeños errores” que podrían ocasionar grandes consecuencias. La identificación equívoca de accesiones provenientes de bancos de germoplasma suele ser un error frecuente (Yeater *et al.*, 2004). Estos errores pueden ocurrir durante la manipulación de las semillas o en la regeneración de las semillas mediante contaminación cruzada (Steiner *et al.*, 1997) o inclusive en el etiquetado inicial de la semilla (van de Wouw *et al.*, 2011).

Es necesario poder confiar en la autenticidad de las accesiones, las “sorpresas” en un programa de mejoramiento pueden significar retrasos importantes en las variedades que se quieran obtener generando grandes pérdidas, por lo que los bancos de germoplasmas deben prestar especial atención a las necesidades de revisar las clasificaciones taxonómicas de sus recursos.

Se debe mencionar que la caracterización del germoplasma en instituciones privadas a veces difiere de las estandarizadas. Esto tiene que ver con las necesidades que cada programa de mejoramiento demande. Sin embargo, es interesante señalar que la frontera entre los conceptos de evaluación y caracterización de germoplasma es muy difusa, pues en la naturaleza los caracteres y genes a que se enfoca cada una de estas aproximaciones analíticas constituyen un continuo que comprende desde herencia monogénica hasta la altamente poligénica, con amplias variaciones en el grado de heredabilidad (Varela y Olán, 2009)

Cualquier avance ya sea de rendimiento, resistencia a plagas, calidad o características deseables en las variedades actuales proviene de cruzamiento o selección realizada por agricultores o mejoradores sobre la base de recursos genéticos, silvestres o mejorados de todo el mundo. Los bancos de germoplasma preservan esta variabilidad necesaria por lo que es imprescindible disponer de un riguroso conjunto de medidas que impliquen a productores, técnicos, empresas de semillas, administraciones e investigadores, para minimizar los errores en la cadena de producción y distribución de las semillas.

## CONCLUSIONES GENERALES

Durante el desarrollo de este trabajo se puso de manifiesto la importancia de optimizar ciertos procedimientos claves dentro del complejo sistema de mantenimiento, producción y distribución de los bancos de germoplasma públicos. Cualquier error cometido pueden tirar por la borda todo el esfuerzo, los recursos y el tiempo empleado para obtener una variedad mejorada.

Mi estancia en Rijk Zwaan Ibérica me ha permitido ampliar los conocimientos adquiridos hasta el momento en el contexto del Máster de Biotecnología Agroalimentaria de la Universidad de Almería en el que actualmente estoy matriculada, además de adquirir y aplicar nuevas habilidades de trabajo en equipo. Mi formación abarco tres ejes primordiales dentro de la empresa.

Mi paso por el laboratorio de biología celular, me permitió desarrollar un método efectivo para aumentar la germinación en variedades de *C colocynthis*, además de la adquisición de nuevas habilidades de trabajo. Cuando la latencia es leve, el efecto de un tratamiento pre-germinativo puede ser sólo marginal pero en casos de una latencia más pronunciada, existen claros beneficios que se derivan de estos tipos de tratamientos (ahorro de semilla, período predecible y concentrado de trasplante y una densidad más uniforme). Además de contribuir en la producción de plántulas (y semillas), los **tratamientos pre-germinativos** aceleran el proceso natural de germinación y esto es de un enorme valor en cualquier programa de mejora.

Mi estancia en el laboratorio de fitopatología me permitió formarme en cuanto a los procedimientos que se aplican para garantizar la sanidad de las semillas, algo fundamental en la cadena de producción.

Por otro lado, la caracterización fenotípica de los genotipos de sandía no solo me permitió adquirir experiencia en campo, sino también me permitió ver las diferencias que existen entre los distintos genotipos (uniformidad/segregación) y los imprevistos que pueden acontecer en la multiplicación de semillas provenientes de distintos bancos públicos.

La eficaz realización de todos estos procesos es vital a la hora de evaluar los recursos disponibles de una colección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Agdia. 2008. DAS ELISA.
- Albrechtsen, S.E., 2005. Testing Methods For Seed-transmitted Viruses: Principles and Protocols. ISBN 0 85 199016 9. 288 pp.
- Bonner, F. T., *et al.*, 1974. Presowing treatment of seed to speed germination. Pp. 126-135, in Seeds of woody plants in the United States (C. S. Schopmeyer, ed.). USDA-Forest Serv. Agric. Handb., 450: 1-883.
- Burkill, H.M. 1985. The useful plants of west tropical Africa. vol. 1. 2nd ed. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
- Chin H.F. 1994. Seedbanks: conserving the past for the future. Seed Science and Technology 22, 385-400.
- Consejería de Agricultura y Pesca. 2012. Libro blanco de los Recursos Fitogenéticos con riesgo de erosión genética de interés para la Agricultura y la Alimentación en Andalucía (Borrador).
- Dodds J.H., 1991. In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources. Chapman & Hall, London, 240 pp.
- Engels J.M.M., 2007. Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma.. Bioversity Internacional. ISBN 978-92-9043-767-3.
- Food and Agricultural Organization. 1994. IPGRI.
- Food and Agricultural Organization. 2008. FAOSTAT
- Forrest, W.G., 1964. The Effect of Pretreatment on Germination of Slash Pine Seed. Research Note N° 14. Forestry Commission of N.S.W.
- Hartmann, H. y Kester, D. 1988. Propagación de Plantas. México D.F. Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. 760 pp.

- Hilhorst, H.W.M. & Karssen, C.M. 1992. Seed dormancy and germination: The role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulators*, 11: 225-238.
  
- Iriondo J.M., Pérez C., 1999. Propagation from Seeds and Seed Preservation. En: *A Colour Atlas of Plant Propagation and Conservation*. Bowes, B.G. (ed.), Manson Publishing, London, pp. 46-57.
  
- Iriondo J.M. 2001. Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* Vol. 16 (1).
  
- Juárez García, B. (Genetista Titular para América, Europa y Medio Oriente). Fecha desconocida (post. 2003). Programa de Mejoramiento Genético. Seminis Vegetable Seeds Inc.
  
- Kameswara Rao, N. *et al.*, 2007. Manual para el Manejo de Semillas en Bancos de Germoplasma. 2007. Bioersivity Internacional
  
- Koller D., Poljakoff A., Berg A., Diskin T., 1963. Germination regulating mechanisms in *Citrullus colocynthis*. *American Journal of Botany* 50, 597-603.
  
- Levi, A., C.E. Thomas, A.P. Keinath, and T.C.Weohner. 2001a. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrulluscolocynthis*) accessions. *Genet. Res. Crop Evolut.* 48:559–566.
  
- Levi, A., López, R., Merle Shepard, B., Simmons, A.M., Jackson D. M., 2005. Sources of Resistance to Two-spotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae) in *Citrullus* spp. *HortScience* 40(6):1661–1663.
  
- Levi, A., Wechter, P., Thies, J.A., Ling, K.S., Reddy, U.K., Xu, Y., Guo, S., Zhang, X., 2012. Genetic, genomics and breeding of Cucurbits. CRC Press. ISBN 9781578087662.
  
- Luis-Arteaga M., 1994. Enfermedades producidas por virus. En: Díaz-Ruíz JR, García-Jiménez J., eds. *Enfermedades de las Cucurbitáceas en España*. Monografías no. 1 de la Sociedad Española de Fitopatología. Agropubli, S.L. (*PHYTOMA-España*), p. 73–91.

- Maroto Borrego, J.V., Gómez, A.M., Pomares García, F. 2002. El cultivo de la sandía. MUNDI-PRENSA LIBROS, S.A. ISBN 9788484760719.
- Maxted N., Ford-Lloyd B.V., Hawkes J.G. 1997. Complementary Conservation Strategies. En Plant Genetic Conservation. The *In Situ* Approach. Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., Hawkes, J.G., ed. Chapman & Hall, London, pp. 15-39.
- Mena, A.J.D., 2010. Virus fitopatógenos. Departamento de protección vegetal Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Avance Anuario de Estadística 2012.
- Rangel, E., Schmid, A., Centeno, F., 2006. Implementación de la técnica de ELISA para la detección de virus y otros patógenos en plantas en Venezuela Revista Digital Del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela N° 10.
- Robinson RW, Decker-Walters DS. 1997. Cucurbits. Crop Production Science in Horticulture. New York Cab. International. 226 p.
- Sanabria, D; Silva, R; Oliveros, M; & Barrios, R; 2001. Escarificación química y térmica de semillas subterráneas de *Centrosema rotundifolium*. Revista Bioagro 13(3):117-124.
- Steiner A.M., Ruckenbauer P., Goecke E. 1997. Maintenance in genebanks, a case study: contaminations observed in the Nurnberg oats of 1831. Genetic Resources and Crop Evolution., 44: 6, 533-538.
- van de Wouw, M., van Treuren, R., van Hintum, T., 2011. Authenticity of Old Cultivars in Genebank Collections: A Case Study on Lettuce. Crop Sci. 51:736–746.
- Varela, A. Olán, M. 2009. Utilización de los Recursos Filogenéticos.
- Varela, S., Arana, V., 2011. Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. Serie técnica: “Sistemas Forestales Integrados” Área Forestal - INTA: Cuadernillo N° 3: Marzo de 2011 ISSN: 1853-4775.



- Whitaker, T.W. and Davis G.N., 1962. Cucurbits botany, cultivation and utilization. Interscience. Publ., Inc., New York.

- Willan, R. L., 1991. Guía de Manipulación de Semillas Forestales con especial referencia a los Trópicos. Centro de Semillas Forestales de DANIDA. Estudio FAO MONTES 20/2. 510 pp.

- Yeater, K.M., Bollero G.A., Bullock D.G., and Rayburn A.L., 2004. Flow cytometric analysis for ploidy level differentiation of 45 hairy vetch accessions. Ann. Appl. Biol. 145:123–127.