

IDENTIFICACIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN UNIONES DE CALLO PERAL/MEMBRILLERO DURANTE ESTADOS TEMPRANOS DEL DESARROLLO

P. Irisarri, P. Errea, A. Pina

Unidad de Hortofruticultura, CITA de Aragón. Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza.

Palabras clave: células apoptóticas, compatibilidad, *in vitro*, interacción patrón/variedad, túnel

INTRODUCCIÓN

El estudio de la compatibilidad de injerto con las variedades de mayor interés comercial es un criterio de selección indispensable, siendo la compatibilidad de injerto con el máximo número posible de variedades uno de los objetivos más importantes dentro de los programas de mejora de patrones para frutales (Llácer, 2005). La interacción incompatible entre patrón y variedad ha sido atribuida a varios factores, entre ellos la discontinuidad vascular, la formación discontinua de plasmodesmos, problemas en el reconocimiento celular, estrés oxidativo, etc (Pina y Errea, 2005; Aloni et al., 2010). Recientes estudios histológicos han revelado que el retraso en la diferenciación de elementos traqueales (TE) en uniones incompatibles peral/membrillero está asociado con un descenso en la actividad de la muerte celular programada (MCP) en la zona de unión (Espen et al., 2005). En plantas, la MCP es un mecanismo esencial que regula varios procesos fisiológicos durante el desarrollo de la planta, incluyendo reproducción, germinación, formación de parénquima, diferenciación de los elementos traqueales (ET), elementos cribosos y senescencia. Con el fin de profundizar en los mecanismos celulares que intervienen en la formación del injerto, el objetivo principal de este trabajo ha sido la identificación de muerte celular programada durante los procesos de crecimiento y diferenciación celular que tienen lugar en la zona de unión patrón/variedad en las primeras fases del desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha establecido '*in vitro*' tejido de callo de peral (*Pyrus communis* L.) de los cultivares 'Conferencia' ('Co') y 'William' ('Wi'), y de membrillero (*Cydonia oblonga* Mill. clon 'BA29'). A partir de este tejido se realizaron las siguientes combinaciones como se describe en Pina y Errea (2008): homoinjertos (Co/Co, Wi/Wi, Ba29/Ba29), heteroinjertos (Co/Ba29, Wi/Ba29) compatible e incompatible, respectivamente. Los tres genotipos sin unir y sometidos a herida sirvieron como controles. Para la observación al microscopio de las distintas combinaciones se siguió el proceso de fijación 10 y 21 días después de la unión, seguido de un proceso de deshidratación del material e inclusión en parafina según Johansen (1940). Posteriormente, las muestras fueron cortadas transversalmente con un microtomo (Mod.1130/Biocut; Reichert-Jung, Alemania, Heidelberg). Las secciones se desparafinaron, rehidrataron y lavaron para posteriormente teñirlas con la técnica de DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega, USA). La especificidad de la tinción TUNEL de células apoptóticas fue confirmada haciendo controles positivos y negativos. Se determinó el número de células apoptóticas en cuatro áreas elegidas aleatoriamente en la zona de unión en tres experimentos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las combinaciones de diferentes genotipos que se establecen mediante el injerto producen una amplia gama de diferentes interacciones fisiológicas, bioquímicas y anatómicas durante su desarrollo que pueden desembocar en incompatibilidad de la combinación. En este estudio se

ha analizado la muerte celular programada por reacción TUNEL en las primeras etapas del desarrollo de uniones de callo de compatibilidad conocida. Se detectaron células apoptóticas en homo y heteroinjertos a lo largo del desarrollo de la unión a 10 y 21 días, lo que indica que estas células se someten a muerte celular programada en estados tempranos del desarrollo de la unión. A pesar de que todas las combinaciones mostraron células apoptóticas en la zona de unión, los resultados obtenidos han puesto de manifiesto un mayor número de células que contienen núcleos TUNEL positivos en la superficie de contacto de las combinaciones compatibles frente a las incompatibles 10 días después de la unión. Así mismo, se observó un mayor número de células totales en ambos tipos de combinaciones en comparación con las muestras control y las muestras sometidas a herida a los 10 días, lo que sugiere una buena proliferación celular cuando se establece una unión. Este estudio, también reveló una disminución significativa del índice apoptótico a 21 días respecto a 10 días. Estos resultados confirmarían otros estudios en que se observó que una diferenciación limitada de los elementos traqueales en heteroinjertos incompatibles se asociaba con una disminución de la actividad en procesos de muerte celular programada (Espen et al., 2005). Por lo tanto, los principales acontecimientos relacionados con el proceso de muerte celular programada se producen en combinaciones de peral/membrillero durante la segunda semana después del establecimiento de la unión.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por los proyectos INIA n° RTA2009-00128-00-00 y RTA2012-00097-00-00.

REFERENCIAS

- Aloni, B., Cohen, R., Karni, L., Aktas, H. y Edelstein, M. 2010. Hormonal signaling in rootstock–scion interactions. *Scientia Hort.* 127:119–126.
- Espen, L., Cocucci, M. y Sacchi, G.A. 2005. Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts. *Tree Physiol.* 25:1419–1425.
- Johansen, D.A. 1940. *Plant microtechnique*. New York, USA: Mc Graw Hill.
- Llácer, G. 2005. Problemática actual de la mejora genética de frutales en España. *ITEA.* 101:364–372.
- Pina, A. y Errea, P. 2005. A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. *Scientia Hort.* 106:1–11.
- Pina, A. y Errea, P. 2008. Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase gene expression in response to *in vitro* callus unions of *Prunus* spp. *J. Plant Physiol.* 165:705–714.