



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Máster en Mejora Genética Vegetal

Estudio de la osmolalidad interna y del medio en el cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus*

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autor: Antonio Calabuig Serna

Director: José María Seguí Simarro

Curso 2017 - 2018

València, septiembre 2018

Títol: Estudi de l'osmolalitat interna i del medi en el cultiu *in vitro* de micròspores de *Brassica napus*

Resum:

Existeixen diversos factors que determinen la inducció de l'androgènesi en el cultiu de micròspores aïllades. Entre estos factors es troben: el fons genètic, les condicions de la planta donant, l'estadi de desenvolupament de les micròspores o les condicions de cultiu *in vitro*. Entre estes últimes, el context osmòtic al qual es veuen sotmeses les cèl·lules en cultiu podria tindre un paper important, com se sap que ocorre en altres sistemes de cultiu *in vitro* i *in vivo*. No obstant, este aspecte no ha sigut estudiat encara. En este sentit, l'objectiu del present treball és estudiar per primera vegada l'evolució de l'osmolalitat interna de les micròspores i del medi en cultius *in vitro* de micròspores de colza (*Brassica napus*). En primer lloc, es va determinar el mètode d'homogeneïtzació de les micròspores més eficient mitjançant l'avaluació de tres mètodes prèviament aplicats a altres materials vegetals. Posteriorment, es va utilitzar este mètode per tal d'analitzar l'osmolalitat interna de les micròspores fresques de colza, així com l'evolució de l'osmolalitat interna de les micròspores i del medi en diferents punts del progrés dels cultius de micròspores aïllades.

Mitjançant la comparació dels diferents mètodes d'homogeneïtzació es va concloure que els valors d'osmolalitat de les micròspores fresques depenen de mètode utilitzat per a extraure el contingut intracel·lular. Entre els diferents mètodes provats, l'aplicació de cicles de fred-calor és el més efectiu, ja que els valors mitjans d'osmolalitat obtinguts són significativament superiors i, per tant, ofereixen un major poder de discriminació entre mostres. Pel que fa a l'estudi de l'osmolalitat de les micròspores fresques de colza, es va observar que no existeixen diferències significatives entre els valors d'osmolalitat de les micròspores en diferents estadis de desenvolupament. Finalment, es va concloure que les micròspores corresponents als intervals corresponents als intervals que més responen mantenen l'osmolalitat interna de forma molt més estable que aquells que responen menys, que acaben igualant les osmolalitats interna i externa a dia 7. És a dir, existeix una clara relació proporcional entre el manteniment de l'osmolalitat interna i la resposta embriogènica.

Título: Estudio de la osmolalidad interna y del medio en el cultivo *in vitro* de microsporas de *Brassica napus*

Resumen:

Existen diferentes factores que determinan la inducción de la androgénesis en el cultivo de microsporas aisladas. Entre estos factores se encuentran: el fondo genético, las condiciones de la planta donante, el estadio de desarrollo de las microsporas o las condiciones de cultivo *in vitro*. De entre éstas últimas, el contexto osmótico al que se ven sometidas las células en cultivo podría tener un papel importante, como se sabe que ocurre en otros sistemas de cultivo *in vitro* e incluso *in vivo*. Sin embargo, esto no ha sido todavía estudiado. En este sentido, el objetivo del presente trabajo es estudiar por primera vez la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en cultivos *in vitro* de microsporas de colza (*Brassica napus*). Para ello, en primer lugar se determinó el método de homogeneización de las microsporas más eficiente mediante la evaluación de tres métodos previamente aplicados a

otros materiales vegetales. Posteriormente, se usó este método para analizar la osmolalidad interna de las microsporas frescas de colza, así como la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en diferentes puntos a lo largo de la progresión de cultivos de microsporas aisladas.

Mediante la comparación de los distintos métodos de homogeneización se concluyó que los valores de osmolalidad de las microsporas frescas dependen del método usado para la extracción del contenido intracelular. De entre los diferentes métodos probados, la aplicación de ciclos frío-calor es el más efectivo, ya que los valores medios de osmolalidad obtenidos son significativamente superiores y, por tanto, ofrece un mayor poder de discriminación entre muestras. En cuanto al estudio de la osmolalidad de las microsporas frescas de colza, se observó que no existen diferencias significativas entre los valores de osmolalidad de las microsporas en diferentes estadios de desarrollo. Por último, se concluyó que las microsporas correspondientes a los intervalos que más responden mantienen su osmolalidad interna de forma mucho más estable que los que responden menos, que acaban igualando las osmolalidades interna y la externa a día 7. Es decir, existe una clara relación proporcional entre el mantenimiento de la osmolalidad interna y la respuesta embriogénica.

Title: Study of internal osmolality and media osmolality in *Brassica napus in vitro* microspore cultures

Abstract:

There are several factors affecting the induction of androgenesis in microspore culture, such as the genetic background, donor plant conditions, developmental stage of the microspores, or *in vitro* culture conditions. Among *in vitro* culture conditions, the osmotic context of cultured cells could play an important role, as it happens in other *in vitro* and *in vivo* culture systems. However, this has never been studied before during microspore embryogenesis. In this sense, the objective of the present work is to determine the osmotic changes in both the internal osmolality of microspores and the osmolality of the *in vitro* culture medium in rapeseed (*Brassica napus*) microspore culture. First, an efficient method to homogenize microspores was determined by testing three methods previously applied to other plant materials. Then, we used this method to analyze the internal osmolality of freshly isolated microspores and of *in vitro* cultured microspores and their corresponding culture medium at different stages during culture progression.

By comparing different homogenization methods, we concluded that osmolality values of freshly isolated microspores depend on the homogenization method used to extract the intracellular content. Among all the tested methods, the application of several cold-hot cycles is the most effective, because osmolality values were significantly superior to the other methods. Thus, this method would provide more discrimination capacity among samples. Regarding the study of freshly isolated microspores osmolality, no differences between the osmolality values of the consecutive microspore stages of development were observed. Finally, it was concluded that microspores from intervals with more response are more prone to maintain their internal osmolality in a more stable way than microspores with less response, whose intern osmolality equals media osmolality at day 7. In other words, there is a clear and

proportional relationship between the maintenance of internal osmolality of microspores and the embryogenic response.

Agraïments

Este TFM ha costat sang, suor i llàgrimes, i sincerament no tenia massa ganes d'escriure agraïments. Però, he fet un pensament i he decidit que, per això mateixa que ha costat d'acabar, és de justícia esmentar a totes les persones que m'han donat el seu suport durant estos dos anys.

En primer lloc, he de donar les gràcies a la meua família, pel seu suport incondicional en tots els sentits. També a les meues amigues, en especial a Gonzalo, per traure'm de casa quan més ho necessitava.

A més a més, vull donar les gràcies al professorat que ens ha format durant estos dos anys en la millora genètica de plantes, ells han fet que pague la pena estudiar este màster. Gràcies també als meus companys de classe, en especial a Patricia i Bernat, per compartir amb mi tants moments d'estudi i d'esbarjo.

D'altra banda, vull dedicar unes línies a les meues companyes de laboratori: Alba, Alberto, Eva, Mireia, Claudia, Rosa, Patri i en especial a Carol. Gràcies per ajudar-me sempre que ho he necessitat i guiar-me en els moments difícils, treballar colze a colze amb gent vàlida com ells ha sigut un plaer. Finalment, gràcies a José María Seguí per donar-me l'oportunitat d'iniciar-me en la meua carrera investigadora, una possibilitat que no contemplava fins que vaig arribar a este laboratori.

Índice

1. Introducción	2
1.1. La colza	2
1.1.1. Taxonomía	2
1.1.2. Origen y domesticación	3
1.1.3. Importancia económica	4
1.2. Importancia de los híbridos en la mejora genética vegetal	5
1.3. Métodos de obtención de los híbridos	6
1.4. Haploides y dobles haploides	6
1.4.1. Importancia y utilidad de los haploides y los dobles haploides	6
1.4.2. Métodos de obtención de los haploides y dobles haploides	7
1.4.3. Ventajas de la androgénesis	9
1.5. Métodos para inducir la embriogénesis de microsporas	9
1.6. Papel de la osmolalidad en los cultivos de microsporas	10
2. Objetivos	13
3. Materiales y métodos	14
3.1. Material vegetal	14
3.2. Instrumental para la medida de la osmolalidad	14
3.3. Puesta a punto del método de homogeneización de microsporas	14
3.3.1. Extracción de microsporas frescas de berenjena	15
3.3.2. Homogeneización con pistón y microesferas	16
3.3.3. Homogeneizador eléctrico	17
3.3.4. Homogeneización por ciclos de frío-calor	17
3.4. Medida de la osmolalidad de microsporas frescas de colza	18
3.5. Cultivos de microsporas de colza	18
3.6. Medida de la osmolalidad de las microsporas y del medio de cultivo en cultivos de colza	21
3.7. Análisis estadísticos	21
4. Resultados y discusión	22
4.1. Puesta a punto del método de homogeneización de microsporas	22
4.2. Medida de la osmolalidad de microsporas frescas de colza	25
4.3. Relación los valores de osmolalidad y la respuesta a la inducción del cultivo	26
5. Conclusiones	32
6. Bibliografía	33

1. Introducción

1.1. La colza

1.1.1. Taxonomía

La colza (*Brassica napus* L.) es una planta perteneciente al género de las Brásicas. Se trata de una especie alógama facultativa y se cultiva como planta anual o bienal. Su clasificación taxonómica (USDA, 2018) es la siguiente:

Reino: Plantae – Plantas

Subreino: Tracheobionta – Plantas vasculares

Superdivisión: Spermatophyta – Plantas con semilla

División: Magnoliophyta – Plantas con flores

Clase: Magnoliopsida – Dicotiledóneas

Subclase: Dilleniidae

Orden: Capparales

Familia: Brassicaceae / Cruciferae

Género: *Brassica* L.

Especie: *Brassica napus* L. – colza

La colza constituye el principal cultivo oleaginoso de Europa. Además, el género *Brassica* comprende otras especies de gran interés económico, como el nabo (*B. rapa rapa*), la coliflor (*B. oleracea botrytis botrytis*), el repollo (*B. oleracea capitata capitata*) o el brócoli (*B. oleracea botrytis itálica*).

La relación filogenética de la colza con el resto de especies del género *Brassica* se explica mediante el triángulo de U (Nagaharu, 1935) (**Figura 1**).

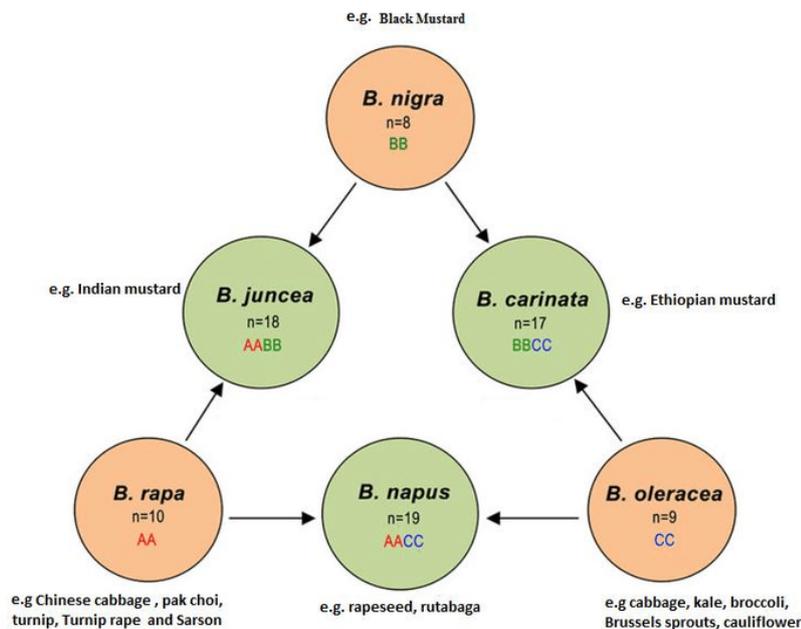


Figura 1. Descripción de las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Brassica* (Menamo, 2012).

En este triángulo se observa el origen de las especies anfiploides *B. juncea*, *B. carinata* y *B. napus* a partir de la combinación de los genomas diploides de las especies *B. rapa*, *B. oleracea* y *B. nigra* (Allender y King, 2010).

Dentro de la especie *Brassica napus* encontramos tres subespecies: *B. napus* subsp. *oleifera* (la colza), *B. napus* subsp. *rapifera* (el colinabo) y *B. napus* subsp. *pabularia* (el nabicol). En cuanto a la nomenclatura cabe destacar un aspecto interesante: en muchas ocasiones, debido a la importancia económica de *B. napus oleifera* respecto a las otras dos subespecies, para nombrar la colza se utiliza la forma *B. napus* omitiendo la referencia a su subespecie.

1.1.2. Origen y domesticación

El origen de la colza se ubica hace unos 7.500 años, fruto de una hibridación entre los genomas de *B. rapa* y *B. oleracea* (Chalhoub *et al.*, 2014). En la década de 1930 algunos autores propusieron la idea de que el origen de dicha hibridación era un cruzamiento espontáneo entre *B. rapa* y *B. oleracea* en las costas del Mediterráneo, al ser esta zona la región donde ambas especies se distribuyen en la naturaleza de forma solapante. Sin embargo, esta hipótesis fue rechazada por otros investigadores, ya que la presencia de las especies silvestres relacionadas con *B. rapa* en la Península Ibérica se circunscribe únicamente a zonas concretas de Catalunya. Actualmente se acepta la idea de que la colza no apareció en su forma salvaje en la naturaleza si no que fue fruto de un escape espontáneo en un ambiente cultivado. Las primeras referencias de la especie como cultivo aparecen a principios del siglo XVII (Gómez-Campo y Prakash, 1999).

No obstante, la colza no alcanzó una importancia económica reseñable como cultivo oleaginoso hasta hace unos cuarenta años. Esto fue debido, principalmente, a la presencia de ciertos compuestos nutricionalmente indeseables en las semillas de colza utilizadas para la extracción de aceite. Estas contienen en su composición más de un 40% de ácido erúico, un

ácido graso relacionado con el desarrollo de ciertas enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, las semillas contienen más de 100 μmol por gramo de materia seca de glucosinolatos, unas moléculas azufradas que limitan el uso de la torta que queda tras la extracción del aceite como forraje ya que disminuyen su palatabilidad (Rahman, 2013).

1.1.3. Importancia económica

Como se ha comentado en el epígrafe anterior, la colza ha adquirido verdadera importancia económica como cultivo oleaginoso a partir del desarrollo de variedades con contenidos reducidos de ácido erúxico y glucosinolatos. Hasta ese momento el cultivo de *Brassica napus* se centraba en las formas tuberosas como el nabicol para consumo humano o en el aprovechamiento de las hojas para consumo animal (Allender y King, 2010).

En la actualidad, las variedades “Canola” de colza suponen la tercera fuente más importante de aceite vegetal del mundo (**Tabla 1**) (FAOSTAT, 2018). El término “Canola” se usa para designar aquellas variedades que poseen menos de un 2% de ácido erúxico en aceite y un máximo de 30 $\mu\text{mol/g}$ de glucosinolatos en la torta de semilla tostada (Afzal *et al.*, 2018).

Tabla 1. Datos de producción mundial de aceite de los principales cultivos oleaginosos en 2014 (FAOSTAT, 2018).
Datos ordenados según la producción total.

Materia prima	Producción de aceite (t)
Palma	57.328.872
Soja	45.704.551
Colza	25.944.831
Girasol	15.848.036
Semillas de palma	6.602.838
Semillas de algodón	5.036.141
Cacahuete	5.031.479
Maíz	3.189.137
Coco	3.106.474
Oliva	3.050.390
Sésamo	1.634.327
Semillas de lino	686.498
Cártamo	100.751

Según los datos más recientes de la FAO, en 2016 se produjeron 68,8 millones de toneladas de colza a nivel mundial, siendo Canadá el primer país productor con 18,4 millones de toneladas (**Tabla 2**) (FAOSTAT, 2018).

Tabla 2. Datos del área cosechada, el rendimiento y la producción de colza de los 10 principales países productores (FAOSTAT, 2018).

País	Área cosechada (ha)	Rendimiento (hg/ha)	Producción (t)
Canadá	7.990.300	23.057	18.423.600
China	7.614.535	20.069	15.281.624
India	5.762.000	11.796	6.797.000
Francia	1.550.720	30.489	4.727.961
Alemania	1.325.700	34.545	4.579.600
Australia	2.357.000	12.490	2.944.000
Polonia	826.946	26.837	2.219.270
Reino Unido	579.000	30.656	1.775.000
Estados Unidos	686.440	20.448	1.403.650
República Checa	392.991	34.584	1.359.125

Por su parte, el aceite de colza ocupa la novena posición dentro de los productos más producidos a nivel global con un valor de 25,9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2018).

1.2. Importancia de los híbridos en la mejora genética vegetal

La mejora genética vegetal comprende el conjunto de tecnologías con base científica usadas para la manipulación genética de las plantas dirigida hacia objetivos económicos. Entre estas herramientas útiles para el desarrollo de nuevas variedades vegetales se encuentra la explotación de la heterosis (o vigor híbrido).

La heterosis es un fenómeno natural en el cual la descendencia híbrida obtenida a partir de dos parentales genéticamente distintos posee características fisiológicas y funcionales superiores a las de sus progenitores. El primero en describir el fenómeno de la heterosis fue el investigador Shull (1948) y desde entonces ha sido utilizada ampliamente en la mejora de cultivos de gran importancia económica como el maíz (*Zea mays*), la remolacha (*Beta vulgaris*), el sorgo (*Sorghum bicolor*), la cebolla (*Allium cepa*), la berenjena (*Solanum melongena*), el tomate (*Solanum lycopersicum*), el pimiento (*Capsicum*), el arroz (*Oryza sativa*), el algodón (*Gossypium hirsutum*), el girasol (*Helianthus annuus*) o la colza (*Brassica napus*) (Stuber, 1994; Fu *et al.*, 2014).

El fenotipo de los individuos híbridos se debe a interacciones entre diferentes *loci* que dan lugar al fenómeno de superioridad respecto a los parentales. El vigor híbrido que muestra la descendencia de un cruce entre dos líneas puras se puede explicar en base a las diferentes componentes de la varianza genética: la varianza aditiva, la dominante y la epistática. Se han llevado a cabo algunos estudios en arroz con la finalidad de discernir cuáles de las tres componentes genéticas contribuyen en mayor medida a la heterosis. Estos estudios indican que las interacciones epistáticas entre diferentes *loci* y las relaciones de superdominancia poseen un mayor efecto sobre el vigor híbrido que las relaciones de dominancia entre alelos del mismo locus (Li *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001). También se ha estudiado el grado de contribución de las diferentes componentes genéticas a la heterosis en especies hortícolas como la colza (Radoev *et al.*, 2008). En este caso se concluye que el mayor efecto sobre el vigor híbrido viene dado por las relaciones de tipo epistático, de dominancia y superdominancia.

Los efectos de la heterosis se suelen traducir en mejor adaptabilidad de los híbridos, en una mayor uniformidad y tolerancia mejorada a estreses bióticos y abióticos, lo que repercute en un aumento del rendimiento de los cultivos. Esta mejora del rendimiento ha comportado un incremento del mismo de un 3,5 a un 15% en trigo (*Triticum spp.*), un 11% en cebada (*Hordeum vulgare*), un 55% en arroz (*Oryza sativa*), un 47% en judía (*Phaseolus vulgaris*) y un 200% en los cultivos oleaginosos de *Brassica* (Kim y Zhang, 2017).

1.3. Métodos de obtención de los híbridos

Los híbridos se obtienen a partir del cruce de líneas puras, es decir, variedades homocigóticas para todos los *loci* de su genoma. Debido a las ventajas anteriormente comentadas respecto al rendimiento que poseen los híbridos, la mayoría de programas de mejora actuales están basados en líneas puras. Tradicionalmente, estas líneas puras son fruto de sucesivas generaciones de autofecundación. Una vez obtenidas las líneas puras se estudian sus características y se ensaya la aptitud combinatoria general y/o específica con otros genotipos de interés. Finalmente, el proceso de obtención de líneas puras útiles puede durar entre once y trece años, lo que conlleva elevados costes económicos (Yan *et al.*, 2017). Sin embargo, con el desarrollo de protocolos para la obtención de dobles haploides (DHs), se ha abierto la posibilidad de desarrollar líneas totalmente homocigóticas para todos los *loci* en una sola generación, lo que supone un ahorro económico y temporal considerable (Forster y Thomas, 2005).

Es importante asegurar que el cruce entre las dos líneas puras para obtener los individuos híbridos se lleve a cabo de forma eficiente, lo que implica evitar autopolinizaciones de las líneas puras parentales. Por ello, en muchas especies se desarrollan líneas androestériles para ser usadas como parental femenino (Kim y Zhang, 2017). Entre los métodos de androesterilidad más usados se encuentra la androesterilidad citoplasmática o esterilidad citoplasmática masculina (CMS) y la esterilidad génica masculina (GMS). La androesterilidad citoplasmática se basa en la interacción de genes mitocondriales y nucleares que determinan la fertilidad o esterilidad del individuo. La esterilidad génica masculina se basa en las condiciones ambientales que rodean al individuo durante su crecimiento. Estas condiciones provocan la expresión o represión de factores epigenéticos relacionados con la fertilidad masculina inhibiéndola o activándola (Chen y Liu, 2014).

1.4. Dobles haploides

Los haploides (Hs) son plantas esporofíticas que poseen el número cromosómico correspondiente al gameto de la especie. Cuando un individuo haploide sufre una duplicación de su genoma pasa a denominarse doble haploide (DH). Actualmente es posible obtener individuos haploides y DHs induciendo la embriogénesis de las células precursoras de los gametos *in vitro*. Mediante este proceso se pueden desarrollar individuos homocigotos para todos sus *loci* a partir de los gametos de un parental heterocigoto (Germanà, 2011b).

1.4.1. Importancia y utilidad de los haploides y los dobles haploides

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, la principal aplicación de los DHs en cuanto a la producción de semilla híbrida radica en la rapidez con la que se pueden desarrollar

líneas puras. Sin embargo, los haploides y los DHs también constituyen una herramienta útil en diversos campos de la investigación básica. Este es el caso del uso de poblaciones de DHs para la cartografía genética de caracteres como la producción o la calidad, de gran importancia agronómica y difíciles de abordar mediante otras vías. En este sentido, también se han usado poblaciones DHs para estudios de ligamiento y estimas de fracciones de recombinación (Seguí-Simarro, 2010a).

Por otra parte, mediante la obtención de DHs a partir de una planta transgénica hemicigota es posible obtener plantas transgénicas totalmente homocigotas. Es decir, si en cierto individuo transformado únicamente se ha insertado la copia del gen de interés en uno de los cromosomas (individuo hemicigoto), mediante la obtención de DHs a partir de sus microsporas se desarrollan individuos con la copia del gen de interés en ambos alelos. Además, una gran ventaja de los individuos DHs es que son autoperpetuables, ya que su descendencia obtenida mediante autofecundación posee su misma identidad genética. Al no verse afectados por los efectos de dominancia, los DHs constituyen una herramienta útil para la detección de mutaciones recesivas (Seguí-Simarro, 2010b). Por último, los DHs también se han usado para desarrollar poblaciones sintéticas, estimar valores aditivos o aptitudes combinatorias específicas (Snape, 1989).

1.4.2. Métodos de obtención de los haploides y dobles haploides

La totipotencia es la capacidad que poseen los organismos vegetales para expresar cualquier parte de su genoma. Esta característica permite a las células vegetales diferenciadas desviarse de su ruta de desarrollo original. Entre estas rutas alternativas se encuentran las vías de regeneración de nuevos individuos a partir de órganos vegetativos (organogénesis) o la vía embriogénica (embriogénesis), a partir de la cual una célula se divide simétricamente para desarrollarse como lo haría un embrión sexual. Estos procesos también pueden darse en los gametofitos femeninos o masculinos o en las células precursoras de los mismos, como es el caso de las microsporas. En estos casos, los nuevos individuos desarrollados serán DHs si han duplicado su genoma o haploides si no lo han hecho. En ocasiones para inducir la duplicación es necesario aplicar agentes a tal efecto, como puede ser el tratamiento con colchicina. La colchicina inhibe la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico, lo cual impide la correcta separación de los cromosomas durante la mitosis generando una célula con el genoma duplicado (Seguí-Simarro, 2010b).

La *ginogénesis* es el proceso por el cual se obtiene un individuo haploide a partir del gametofito femenino no fecundado. Esta vía ha sido usada en especies como la remolacha azucarera o la cebolla, en las que otras técnicas de obtención de DHs no han funcionado. Para inducir la embriogénesis se cultivan óvulos inmaduros del saco embrionario para inducir el desarrollo de un individuo haploide. Este individuo proviene en la mayoría de los casos de la célula huevo, aunque en otras ocasiones el embrión se desarrolla a partir de células antipodales o sinérgidas. La *ginogénesis* también puede inducirse mediante la aplicación de polen mentor. Este polen mentor puede provenir de una especie sexualmente incompatible o puede haber sido irradiado previamente para ser desactivado. De este modo el gametofito femenino recibe los estímulos necesarios para iniciar el desarrollo ginogénico en ausencia de fecundación (Seguí-Simarro, 2010b).

En contraposición a la *ginogénesis*, la *androgénesis* es el proceso por el cual se desarrolla un individuo proveniente de un núcleo de origen masculino. En este caso el gametofito masculino en estadio inmaduro se desvía de la ruta gametofítica original e inicia el desarrollo embriogénico (**Figura 2**) (Seguí-Simarro, 2010a).

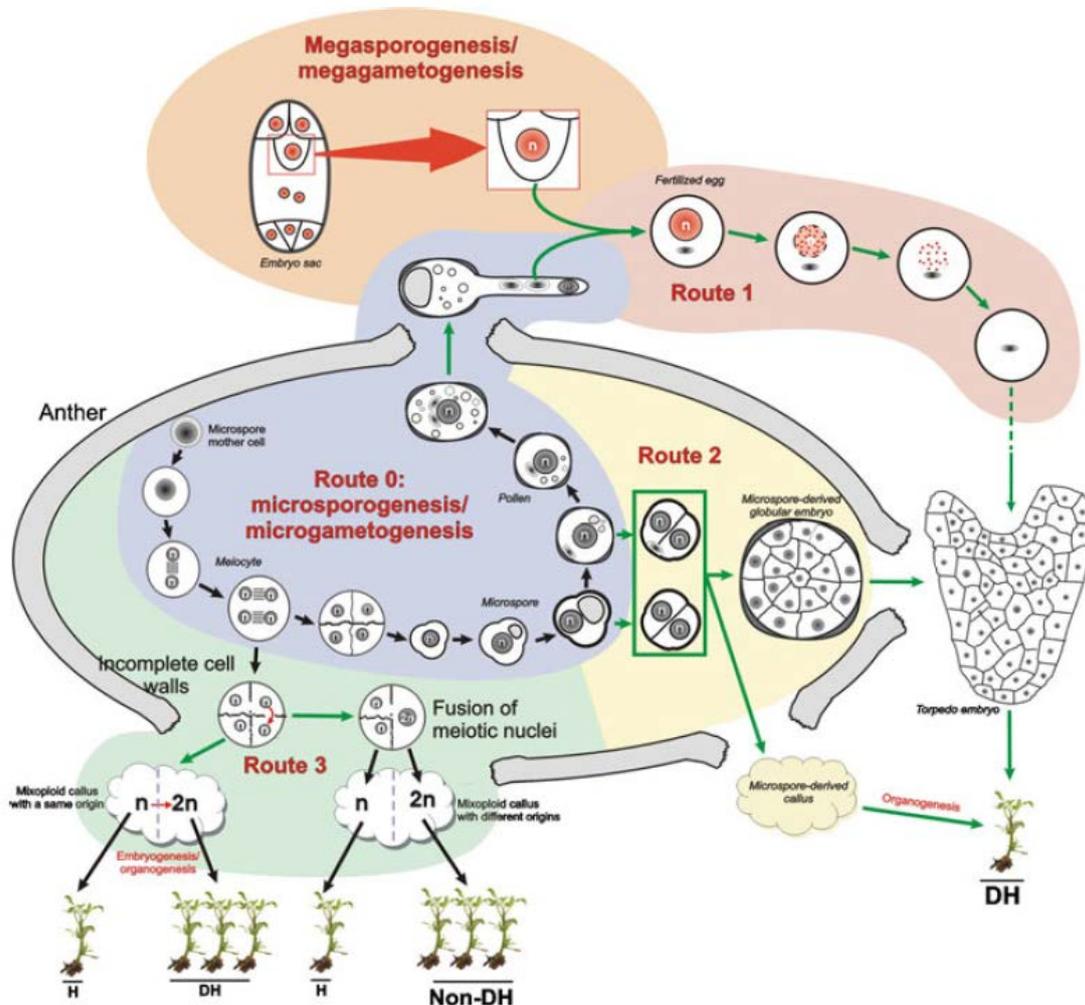


Figura 2. Distintas rutas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora o polen (ruta 0) hacia la androgénesis. La ruta 1 implica la desactivación del genoma de la célula huevo una vez ocurrida la fecundación. La ruta 2 ilustra la embriogénesis o en algunos casos calogénesis a partir de microspora vacuolada o polen bicelular joven. La ruta 3 ilustra la formación de dobles haploides, a partir de la organogénesis sobre callos derivados de meiocitos (Seguí-Simarro, 2010b).

Tal y como se ilustra en la figura anterior, existen tres posibles vías que pueden dar lugar a un individuo androgénico: la inactivación del núcleo femenino en un cigoto unicelular tras la fecundación (Ruta 1); la regeneración de embriones o de callos procedentes de microsporas vacuoladas o polen bicelular joven (Ruta 2) o la inducción de calogénesis a partir de meiocitos (Ruta 3). De estas tres rutas, la primera y la tercera son altamente infrecuentes y por ello están menos documentadas. La Ruta 1 fue la primera descrita, hace cerca de 60 años, por darse de forma espontánea en la naturaleza en algunas especies. Sin embargo, desde entonces poco más se ha avanzado al respecto. Por otra parte, la Ruta 2, conocida como embriogénesis de microsporas, es la más estudiada de todas.

En la embriogénesis de microsporas se aplica un estrés a la microspora para provocar el abandono de la ruta gametofítica e inducir el inicio de la embriogénesis. Esto puede producirse mediante el cultivo de anteras conteniendo a las microsporas o directamente mediante el cultivo de microsporas aisladas (Seguí-Simarro, 2010a).

1.4.3. Ventajas de la androgénesis

De entre todos los métodos de obtención de haploides y DHs la androgénesis es el más eficaz. Esto se debe a tres razones principales. En primer lugar, existen protocolos para la inducción de la embriogénesis puestos a punto en un gran número de especies. Además, puesto que en cada yema se desarrollan un elevado número de microsporas, la probabilidad de obtener DHs en un cultivo es mayor que en el resto de métodos. Por último, en la androgénesis un número elevado de individuos duplica su genoma espontáneamente, en el sentido de que no es necesario aplicar tratamientos adicionales para inducir dicha duplicación. Es decir, la tasa de obtención directa de DHs es más elevada que en los demás métodos. Este último punto supone una ventaja importante, ya que en algunos casos la frecuencia de duplicación espontánea es tan alta que se puede evitar tener que aplicar tratamientos posteriores con compuestos como la colchicina para inducir la duplicación del genoma de los individuos haploides obtenidos (Parra-Vega, 2015).

A pesar de que existen protocolos puestos a punto para un gran número de especies, aún existen algunas en las que la eficiencia de dichos protocolos sigue siendo baja. Este es el caso de algunas solanáceas como el tomate, la berenjena o el pimiento (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Las especies en las que sí se han desarrollado protocolos eficientes para la obtención de DHs son algunas plantas modelo como la colza, el tabaco o la cebada (Palmer y Keller, 2005).

1.5. Métodos para inducir la embriogénesis de microsporas

La inducción de la embriogénesis de microsporas se puede llevar a cabo mediante dos técnicas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas (Seguí-Simarro, 2010a).

El cultivo de anteras es la técnica más sencilla para la inducción de la embriogénesis de microsporas (Guha y Maheshwari, 1964). Consiste en la escisión de yemas de la planta donante, la selección de las yemas en el estadio de desarrollo adecuado para la inducción de la embriogénesis, su desinfección y la posterior puesta en cultivo de las anteras (Germanà, 2011a). Este método supone una serie de ventajas, ya que durante los primeros estadios de proliferación de las microsporas el tejido de la antera aporta sustancias que favorecen el crecimiento de estructuras embriogénicas. Por otra parte, la complejidad técnica del proceso de puesta en cultivo es menor que los demás métodos. Sin embargo, el cultivo de anteras posee algunos inconvenientes. Entre ellos, el más destacable sería la posible aparición de estructuras regenerantes a partir del tejido somático de la antera. Este fenómeno supone un problema, ya que en caso de desarrollarse embriones somáticos diploides sería necesario un análisis molecular posterior para poder diferenciarlos de los embriones DHs regenerados a partir de las microsporas (Seguí-Simarro, 2010a).

Como posible solución a este problema se dispone de otro método para la inducción de embriogénesis de microsporas: el cultivo de microsporas aisladas. Este método consiste en la

extracción de las microsporas de las anteras y su puesta en cultivo líquido. La técnica necesaria para establecer esta clase de cultivos es más exigente que en caso del cultivo de anteras, sin embargo, el control sobre el efecto del medio de cultivo en la inducción de la androgénesis es mayor, ya que se evita el efecto incontrolable de las estructuras de la antera sobre el desarrollo de las microsporas (Ferrie y Caswell, 2011). En las especies en las que el cultivo de microsporas aisladas está puesto a punto la eficiencia en la respuesta de los cultivos es mayor que en el cultivo de anteras (Seguí-Simarro, 2010a). No obstante, puesto que las microsporas se encuentran en contacto directo con el medio de cultivo, existen un conjunto de factores que afectan de forma importante a la inducción de la embriogénesis y deben ser tenidos en cuenta. Estos factores pueden agruparse en tres grupos según su naturaleza (Seguí-Simarro, 2010a):

- a) Las condiciones de la planta donante: de entre todas las características de la planta donante, el genotipo de la planta es el factor más importante en cuanto a la inducción de la androgénesis. La dotación genética de la especie y de la variedad determinan en gran medida el grado de la recalcitrancia del individuo a la respuesta y por tanto la facilidad o no para obtener haploides o DHs a partir de él. Existen cultivares de alta y de baja respuesta, y esta característica es heredable por sus descendientes. También se han estudiado otros factores relativos a la planta donante que afectan a la inducción de la embriogénesis, como la edad de la planta (la pérdida de potencial androgénico a medida que envejece) o la influencia de las condiciones de crecimiento (temperatura, fotoperiodo...) (Seguí-Simarro, 2010b).
- b) Las condiciones de aislamiento e inducción de la microspora: en este sentido, la característica más determinante es el estadio de desarrollo en el que se encontraba la microspora al ser aislada y puesta en cultivo. En general, la fase de desarrollo más proclive a la inducción de la embriogénesis es la de transición entre el final de la microsporogénesis y el inicio de la microgametogénesis, que correspondería a los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular joven (Seguí-Simarro, 2010b).
- c) Las condiciones de cultivo: el último de los factores determinantes para la inducción de la androgénesis de microsporas es el entorno que las rodea cuando son puestas en cultivo. Es decir, el ajuste de componentes del medio de cultivo (macronutrientes, micronutrientes, fitohormonas...), las condiciones de luz y temperatura o la densidad de microsporas tienen un efecto clave en la evolución de la microspora hacia un embrión (Seguí-Simarro, 2010b). Además, recientemente se ha observado que la presión osmótica del medio también podría tener un efecto sobre la respuesta a la androgénesis de microsporas (Asif, 2013).

1.6. Papel de la osmolalidad en los cultivos de microsporas

Existen diferentes pretratamientos usados para inducir la androgénesis de microsporas, como los basados en temperatura, los cambios en el pH del medio o los tratamientos mediante estrés osmótico (Asif, 2013).

La osmolalidad de una disolución se define como el número de osmoles por kg de disolvente, siendo un osmol la cantidad de soluto no disociado cuya presión osmótica corresponde a un mol. La osmolalidad es proporcional a la presión osmótica, es decir, la presión necesaria para

interrumpir el movimiento pasivo de agua a través de una membrana semipermeable a favor de su gradiente de concentración. La osmolalidad se expresa en miliosmoles por kilogramo ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$) y se diferencia de la osmolaridad en que esta última viene definida como el número de osmoles por litro de disolución ($\text{mOsm}\cdot\text{l}^{-1}$) (Erstad, 2003). En la naturaleza, la osmolalidad interna de las células vegetales suele ser superior a la del medio que las rodea, lo que provoca un flujo de agua desde el exterior hacia el interior de las células. La pared celular actúa como una estructura de soporte a la membrana celular para evitar que éste tráfico de agua hacia el interior acabe rompiendo la célula. Esta acumulación de agua gracias a la acción de la pared celular es la responsable de la turgencia de las células vegetales. Por otra parte, si una célula vegetal fuese introducida en un medio hipertónico se produciría un flujo de agua hacia el exterior de la célula que podría acabar con su muerte por deshidratación (plasmólisis), sin que la acción de la pared celular pudiera evitarlo (Meyer, 1938; Dainty, 1963; Kramer y Boyer, 1995). En este sentido, la aplicación de medios de pretratamiento con altos valores de osmolalidad han sido utilizados como agentes estresantes para la inducción de la androgénesis en cultivos de anteras y de microsporas aisladas (Zhou *et al.*, 1991; Hoekstra *et al.*, 1993).

Algunos estudios han demostrado que el uso de concentraciones crecientes de manitol en el pretratamiento de cultivos de anteras de cebada aumenta el número de DHs regenerados (Cistué *et al.*, 1994; Jacquard *et al.*, 2006). También se han aplicado pretratamientos de estrés osmótico en cultivos de microsporas aisladas con resultados positivos en diferentes especies. Este es el caso del trigo con la adición de polietilenglicol (Ayed *et al.*, 2010) o con la adición de manitol (Asif *et al.*, 2014), en cuyo caso aumentan las estructuras de tipo callo desarrolladas. Por otra parte, se han aplicado estreses osmóticos en combinación con choques eléctricos en leguminosas, en concreto en la especie modelo *Medicago truncatula*, obteniendo un mayor rendimiento en el desarrollo de callos a partir de microsporas (Ochatt *et al.*, 2009). En *Phaseolus vulgaris*, una especie recalcitrante para la obtención de embriones somáticos, también se han usado tratamientos de estrés osmótico con sacarosa para inducir dicho proceso (Cabrera-Ponce *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de la existencia de estreses osmóticos para la inducción de la androgénesis de microsporas, son casi inexistentes los trabajos centrados en el estudio de la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en los cultivos de microsporas aisladas. Segarra-Martín (2017) estudió esta evolución en cultivos de microsporas aisladas de berenjena, pero los resultados de este trabajo no fueron concluyentes debido a la falta de un método eficiente de homogeneización de las microsporas y de extracción del contenido intracelular. No obstante, sí se puso a punto el uso del microsmómetro para la medida de la osmolalidad del contenido intracelular de las células vegetales provenientes de tejido de hoja. Además, se comprobó la efectividad de este aparato de medida para la determinación de la osmolalidad en diluciones obtenidas a partir de extractos intracelulares de hoja de berenjena.

En este sentido, el presente trabajo pretende retomar la puesta a punto de un método eficiente de homogeneización de las microsporas de berenjena y posteriormente estudiar la evolución de la osmolalidad interna y del medio en cultivos de microsporas aisladas de colza. De este modo, se pretende determinar los cambios en la osmolalidad del medio de cultivo y/o del interior de las microsporas (intracelular), con el fin de evaluar hasta qué punto las

diferencias, si las hay, podrían afectar a la inducción de la androgénesis en el cultivo *in vitro* de microsporas. En dicho caso, este estudio abriría las puertas a posibles modificaciones en el diseño de los medios de cultivo para tratar de minimizar dicho efecto.

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es estudiar por primera vez la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en cultivos *in vitro* de colza (*Brassica napus*). Para ello, los objetivos concretos a desarrollar son los siguientes:

- Determinar el método de homogeneización de las microsporas más eficiente de entre los diversos evaluados.
- Estudiar la osmolalidad interna de microsporas frescas de colza.
- Evaluar la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio de cultivo en cultivos de microsporas aisladas de colza.
- Comprobar hasta qué punto los cambios en la osmolalidad, en caso de haberlos, pueden afectar a la inducción de la androgénesis en el cultivo *in vitro* de microsporas.

3. Materiales y métodos

3.1. Material vegetal

En el presente trabajo se utilizaron plantas de berenjena y de colza. Las variedades de berenjena usadas para la puesta a punto del método de homogeneización fueron: Ecavi, una variedad híbrida F1 de la empresa Rijk Zwaan; Bandera, un híbrido F1 de la empresa Seminis y VCO 1 y VCO3, dos variedades híbridas F1 de la empresa Vilmorin. También se utilizaron plantas dobles haploides (DH44 y DH36) obtenidas anteriormente en nuestro laboratorio a partir del híbrido F1 Bandera.

Para las medidas de osmolalidad de microsporas frescas, los cultivos de microsporas y las posteriores medidas de la osmolalidad de microsporas y medio de cultivo se utilizó la línea doble haploide DH4079, de alta respuesta a la inducción de embriogénesis, obtenida a partir del genotipo de colza Topas.

3.2. Instrumental para la medida de la osmolalidad

Para la medida de las osmolalidades se utilizó el microsmómetro *Model 3320 Osmometer* de la empresa *Advanced Instruments, INC.* (**Figura 3**). Este instrumento permite la medida de la osmolalidad en $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ de 20 μl de muestra.



Figura 3. Microsmómetro *Model 3320 Osmometer* de la empresa *Advanced Instruments, INC.*

El sistema que utiliza el microsmómetro para el cálculo de la osmolalidad está basado en la temperatura de congelación de la solución a analizar. En base a dicha temperatura de congelación se infiere la concentración de solutos presentes en la muestra.

3.3. Puesta a punto del método de homogeneización de microsporas

Para la puesta a punto del método de homogeneización de microsporas de berenjena se compararon tres métodos distintos:

- La homogeneización mediante el machacado con pistón y microesferas de vidrio.

- La homogeneización utilizando un homogeneizador eléctrico.
- La homogeneización por ciclos de frío y calor.

En la evaluación de los diferentes métodos se utilizó como material vegetal microsporas frescas de berenjena.

3.3.1. Extracción de microsporas frescas de berenjena

La extracción de microsporas frescas de berenjena se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Corral-Martínez y Seguí-Simarro (2012) con algunas modificaciones. Se recogieron las yemas de las plantas de berenjena que mostraban un tamaño adecuado para la inducción de embriogénesis de las microsporas. Este tamaño suele darse cuando la flor aún está totalmente cerrada y cubierta por los sépalos (**Figura 4**). Las yemas se mantuvieron en tubos inmersos en hielo y se llevaron al laboratorio.



Figura 4. Tamaños adecuados de las yemas de berenjena para la inducción de la androgénesis de microsporas (señalados con las flechas).

El tamaño de las anteras está correlacionado con el estadio de desarrollo de las microsporas que contienen. Para inducir la androgénesis de microsporas los estadios de desarrollo adecuados son el de microspora vacuolada y polen bicelular joven (Salas *et al.*, 2012). Por ello, una vez en el laboratorio se abrieron las yemas y se comprobó con ayuda de un calibre que las anteras poseían el tamaño correcto para su uso. Para cada uno de los genotipos de berenjena se tuvieron en cuenta los rangos de longitud de anteras recogidos en la **tabla 3**.

Tabla 3. Rangos de tamaños de anteras adecuados para la inducción de microsporas correspondientes a cada genotipo.

Genotipo	Tamaño de antera (mm)
Ecavi	6,3-7,0
Bandera	5,7-6,5
VCO1	6,1-7,0
VCO3	5,2-5,8
DH44	5,9-6,4
DH36	5,2-5,9

Posteriormente, el conjunto de anteras seleccionadas se colocaron en un vaso de precipitados de 50 ml con agua destilada estéril y se machacaron con un émbolo de jeringuilla de 50 ml para extraer las microsporas. La disolución de agua con microsporas se pasó a tubos estériles de plástico de 15 ml a través de un filtro de nylon de 41 μm de tamaño de poro para eliminar restos celulares. Los tubos fueron centrifugados a 800 rpm durante 5 min a 4 °C en una centrífuga modelo 5804 R de la marca *Eppendorf* (radio del rotor: 17,5 cm). Se eliminó el sobrenadante, se recogió el precipitado de microsporas de cada uno de los tubos y se trasvasó a dos tubos cónicos de 1,5 ml. Se centrifugaron a 2 min a 8.000 rpm en una centrífuga modelo 5424 de la marca *Eppendorf* (radio del rotor: 7,3 cm), se retiró todo el sobrenadante con la ayuda de una pipeta y los dos tubos con el sedimento se congelaron en nitrógeno líquido para detener los procesos metabólicos de las células. A continuación, las muestras de microsporas frescas congeladas fueron sometidas a los distintos métodos de homogeneización.

Cada muestra estaba conformada por dos tubos cónicos de 1,5 ml por lo que uno de los tubos fue sometido al proceso de homogeneización correspondiente y el otro se conservó como testigo. Los tubos testigo se dejaron descongelar a temperatura ambiente. Cuando el sedimento estuvo totalmente descongelado los tubos se centrifugaron 5 min a 14.000 rpm. Se conservaron 20 μl de sobrenadante para posteriormente ser analizados en el microsmómetro.

3.3.2. Homogeneización con pistón y microesferas

Para la homogeneización con pistón y microesferas se usaron microesferas de sílice de 400 μm de la casa *VWR* y pistones (**Figura 5**).



Figura 5. Microesferas y pistón usados para la homogeneización.

El protocolo consistió en añadir aproximadamente 50 mg de bolitas de sílice al tubo cónico congelado y machacar con el pistón el sedimento hasta que el material adoptara una consistencia acuosa. Posteriormente, el tubo cónico fue centrifugado durante 5 min a 14.000 rpm para precipitar las microsporas y extraer el máximo del contenido celular. Se recuperó el sobrenadante y se conservaron 20 μl del mismo en un tubo de 2 ml. El contenido de cada tubo se insertó en el osmómetro para determinar su osmolalidad. Posteriormente se tomó una muestra de las microsporas machacadas para observarla al microscopio y determinar el porcentaje de microsporas rotas.

3.3.3. Homogeneizador eléctrico

En el caso del homogeneizador eléctrico se usó el modelo *RZR 2051control* de la marca *Heidolph* (Figura 6). En este caso el sedimento congelado de microsporas frescas se machacó durante un minuto a 800 rpm insertando el tubo cónico de 1,5 ml en el pistón rotatorio.



Figura 6. Homogeneizador eléctrico *RZR 2051control* de la marca *Heidolph*.

Del mismo modo que en el epígrafe anterior, el tubo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min, se recogió el sobrenadante para ser analizado en el osmómetro y se conservó una muestra de las microsporas para averiguar el porcentaje de rotura.

3.3.4. Homogeneización por ciclos de frío-calor

Por último, para la homogeneización por ciclos de frío y calor se usó un *block heater SBH130D* de la marca *Stuart* (Figura 7).



Figura 7. *Block heater* usado para la homogeneización por ciclos frío-calor.

En este caso las muestras se sometieron a cinco ciclos intercalados de frío-calor de 10 min de duración cada uno (calor-frío-calor-frío-calor). Para los ciclos de calor se programó el termobloque a 55 °C, para los ciclos de frío se utilizó un refrigerador a -20 °C. Tras los ciclos los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 min y se conservó el sobrenadante para ser analizado en el osmómetro.

3.4. Medida de la osmolalidad de microsporas frescas de colza

Para la extracción de microsporas frescas de colza se siguió el protocolo descrito por Corral-Martínez *et al.* (2018) con algunas modificaciones. Se recogieron las yemas de las plantas de colza y se conservaron en hielo. Una vez en el laboratorio se midieron las yemas con ayuda de una lupa estereoscópica equipada con un micrómetro. En el caso del genotipo DH4079 se seleccionaron las yemas en base a tres rangos de longitud: de 3 a 3,2 mm; de 3,2 a 3,4 mm y de 3,4 a 3,6 mm. Los intervalos no eran solapantes, cada uno de ellos incluía la cifra del extremo inferior y excluía la del extremo superior. La división en tres rangos se debe a que la correlación entre la longitud de las yemas y el estadio de desarrollo de las microsporas puede verse afectada por las condiciones ambientales en las que crece la planta donante. Para favorecer que entre las microsporas de una misma placa de cultivo exista la máxima homogeneidad en cuanto al estadio de desarrollo en el que se encuentran se dividen las yemas en los tres rangos de tamaño descritos, y las microsporas aisladas de estos tres rangos se cultivan en paralelo. De ellos, siempre habrá uno que tenga un mayor porcentaje microsporas/polen en las etapas idóneas para ser inducidas a embriogénesis. Ese rango será lógicamente el que proporcione un mayor número de embriones androgénicos.

Las yemas seleccionadas de cada uno de los intervalos fueron introducidas en tres vasos de precipitados de 50 ml diferentes. Tras añadirles agua destilada estéril, cada conjunto de yemas se machacó con un émbolo de jeringuilla de 50 ml para extraer las microsporas. Las soluciones con las microsporas se pasaron a tubos estériles de plástico de 15 ml a través de un filtro de nylon de 41 µm de tamaño de poro. Los tubos se centrifugaron durante 4 min a 4 °C y 800 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y el sedimento de cada uno de los tubos se conservó en tubos cónicos de 1.5 ml. Los tubos se centrifugaron 2 min a 8.000 rpm, se retiró todo el sobrenadante con la ayuda de una pipeta y el sedimento se congeló en nitrógeno líquido.

Las muestras de microsporas frescas de colza fueron sometidas a cinco ciclos de frío-calor tal y como se describe en el apartado **3.3.4**. En las muestras en las que el contenido de las microsporas liberado no alcanzó los 20 µl necesarios para ser introducidos en el microsmómetro se llevaron a cabo diluciones a partir del sobrenadante obtenido. Las diluciones consistieron en añadir agua destilada al volumen conocido de sobrenadante hasta alcanzar los 20 µl.

3.5. Cultivos de microsporas de colza

Para llevar a cabo los cultivos de microsporas de colza se siguió el protocolo descrito por Corral-Martínez *et al.* (2018) (**Figura 8**). Se recogieron las yemas de las plantas de colza y se mantuvieron en hielo hasta llegar al laboratorio. Una vez allí, las yemas se clasificaron por tamaños en los tres rangos descritos en el apartado **3.4** con el uso de la lupa estereoscópica y

el micrómetro. Los tres conjuntos de yemas se introdujeron en tres filtros de té distintos y se llevaron a la cabina de flujo laminar.

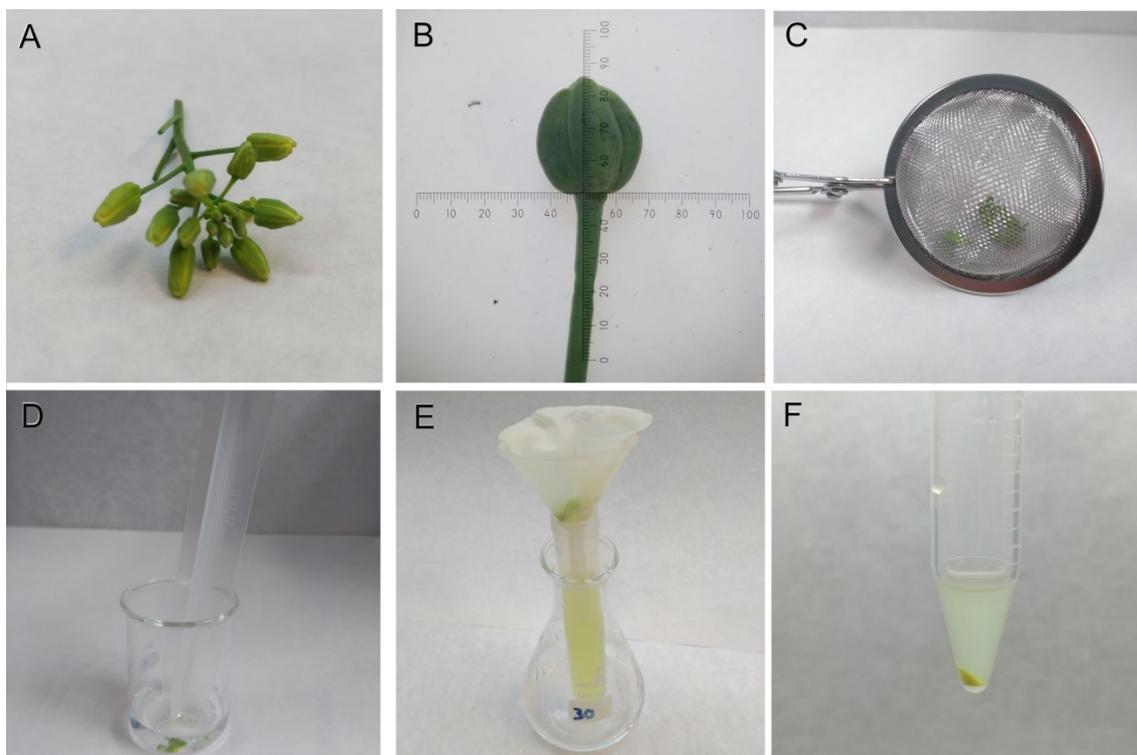


Figura 8. Procedimiento para la puesta en cultivo de microsporas de colza. (A) Inflorescencia de colza con las yemas cerradas. Es importante coger inflorescencias con yemas pequeñas (2-4 mm). (B) Yema de colza vista a la lupa estereoscópica. La medida de la yema se lleva a cabo usando la escala milimetrada del micrómetro y tomando como referencia la longitud de un sépalo. (C) Filtro de té utilizado en la esterilización con lejía para mantener juntas las yemas. (D) Machacado de las yemas en un vaso de precipitados con medio de cultivo usando el émbolo de una jeringuilla. (E) El filtro de nylon de 30 μm se coloca en un embudo esterilizado previamente en el autoclave. El Erlenmeyer sirve como soporte para el tubo cónico. (F) Suspensión final de microsporas en 1 ml (Corral-Martínez et al., 2018).

En la cabina de flujo laminar las yemas contenidas en los filtros fueron sometidas a un procedimiento de desinfección consistente en: 30 s sumergidas en una solución de etanol al 70%, 10 min en una solución de hipoclorito sódico 4 g/l y tres lavados consecutivos de 5 min cada uno en tres jarras diferentes con agua destilada estéril. Todas las soluciones de desinfección se mantuvieron a 4 °C para evitar la degradación del material vegetal.

Una vez desinfectadas, las yemas de cada rango fueron introducidas en tres vasos de precipitados de 50 ml por separado. Para la extracción de microsporas se utilizó un medio de aislamiento y lavado consistente en una solución de sacarosa al 13% (w/v) disuelta en agua destilada (pH 5.8). Se añadió medio de aislamiento a los vasos de precipitados y con un émbolo de jeringuilla de 50 ml se machacaron las yemas para extraer las microsporas. Las suspensiones se pasaron a través de filtros de nylon de 41 μm y fueron recogidas en tubos de plástico estériles de 15 ml. Los tubos fueron centrifugados a 800 rpm durante 4 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 ml de medio de aislamiento fresco para resuspender el sedimento. El proceso de centrifugación-lavado se repitió tres veces.

Después del último lavado se resuspendió el sedimento de microsporas en 1 ml de medio de aislamiento. Con una alícuota de 50 µl se calculó la concentración de microsporas usando la cámara Neubauer (Camacho-Fernández *et al.*, 2018). El volumen final del cultivo se ajustó añadiendo medio de cultivo (**Tabla 4**) hasta alcanzar una concentración de 40.000 microsporas/ml (Huang *et al.*, 1990).

Tabla 4. Composición del medio de cultivo NLN de microsporas aisladas para colza (mg/l).

Macroelementos	
Ca(NO ₃) ₂	500
KH ₂ PO ₄	125
KNO ₃	125
MgSO ₄	61
Microelementos	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
FeNaEDTA	36,7
H ₃ BO ₃	10
MnSO ₄ ·H ₂ O	18,95
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10
Vitaminas y aminoácidos	
D(+)-Biotina	0,05
Ácido fólico	0,5
L-Glutamina	800
Glutati3n (reducido)	30
Glicina	2
Myo-Inositol	100
Ácido nicotínico	5
Piridoxina HCl	0,5
L-Serina	100
Tiamina HCl	0,5
Sacarosa	130

El cultivo de microsporas se distribuyó en placas de 1 ml, 3 ml y 10 ml. Una placa de 1 ml se utilizó para calcular la viabilidad de las células a día 0 mediante la tinción con diacetato de fluoresceína (FDA). Se añadieron 5 µl de la solución de stock (0,2% de FDA en acetona) y se contaron el número de microsporas fluorescentes y el número de microsporas totales con ayuda del microscopio invertido (modelo *Axiovert 40 CFL* de la empresa *ZEISS*).

El resto de placas en las que se distribuyó el cultivo fueron selladas con parafilm e incubadas durante tres días en oscuridad a 35 °C. Tras el estrés térmico de tres días las placas se trasladaron a un fitotr3n a 25 °C en oscuridad.

3.6. Medida de la osmolalidad de las microsporas y del medio de cultivo en cultivos de colza

Para estudiar la evolución de la osmolalidad en el medio y en las propias microsporas a través del tiempo se recogieron cultivos a tres días diferentes: el mismo día de puesta en cultivo (día 0), justo después de finalizar el estrés térmico de tres días (día 3) y tras siete días de la puesta en cultivo (día 7), es decir, después de tres días de estrés térmico y cuatro en el fitotrón a 25 °C.

La recogida de cultivos consistió en trasvasar el contenido de las placas a tubos de plástico estériles de 15 ml con ayuda de pipetas Pasteur. Los tubos fueron centrifugados a 800 rpm durante 5 min. Posteriormente se guardó una alícuota del sobrenadante de los tubos, es decir, del medio de cultivo, para ser analizada en el microsmómetro. El resto de sobrenadante se desechó y el sedimento de microsporas de cada uno de los cultivos se trasladó a un tubo cónico de 1,5 ml. El tubo con el sedimento de microsporas fue centrifugado durante 2 min a 8.000 rpm y se retiró todo el sobrenadante. Los tubos conteniendo las microsporas fueron congelados en nitrógeno líquido.

En el caso de los cultivos a día 3 y día 7 se conservó una placa por cultivo para comprobar la viabilidad de las microsporas a día 3, es decir, justo después de los tres días de estrés térmico. La tinción con FDA para determinar la viabilidad se llevó a cabo del mismo modo que en el apartado **3.5**.

Además, se tomó una alícuota de 200 µl de los cultivos a día 3 y día 7 justo después de los tres días de estrés térmico para observar el número de divisiones. Los 200 µl fueron introducidos en un tubo cónico de 1,5 ml. El tubo fue centrifugado a 8.000 rpm 2 min y se retiró el sobrenadante. Al sedimento de microsporas se le añadieron 10 µl de una solución de DAPI de concentración 1,28 µg/ml. Las microsporas teñidas fueron observadas al microscopio invertido y se contaron el número de microsporas totales y el número de microsporas que presentaban divisiones.

Una vez congeladas, las muestras fueron sometidas a un proceso de homogeneización por ciclos de frío-calor tal y como se explica en el apartado **3.3.4**. En los casos en los que el sobrenadante obtenido no alcanzaba los 20 µl mínimos para su análisis en el microsmómetro se llevaron a cabo diluciones. Las diluciones consistieron en añadir agua destilada al volumen conocido de sobrenadante hasta completar los 20 µl necesarios para el análisis de la osmolalidad.

3.7. Análisis estadísticos

Para detectar diferencias significativas entre muestras los datos fueron sometidos a un análisis de la varianza (ANOVA). Por otra parte, para establecer posibles correlaciones entre los datos se utilizó un análisis de variable múltiple. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa informático *Statgraphics Centurion XVII*. En todos los casos se tomó como valor de significación estadística 0,05.

4. Resultados y discusión

4.1. Puesta a punto del método de homogeneización de microsporas

Para la puesta a punto del método de homogeneización de microsporas se extrajeron un total de 21 muestras de microsporas frescas, cada muestra compuesta por dos tubos cónicos de 1,5 ml. Para cada muestra uno de los tubos fue sometido a un proceso de homogeneización y el otro se dejó como testigo, tal y como se explica en el apartado de Materiales y métodos.

En primer lugar, se analizó si existían diferencias significativas entre los dos métodos mecánicos de homogeneización utilizados en cuanto al grado de rotura de las microsporas. Para ello se compararon los porcentajes de rotura calculados en la homogeneización mediante microesferas y pistón y mediante homogeneizador eléctrico. Los porcentajes de rotura se calcularon contando al microscopio invertido el total de microsporas presentes y cuántas de ellas estaban totalmente rotas (**Figura 9**). Este parámetro se tomó como estimador del número de microsporas rotas totales, teniendo en cuenta que en ocasiones las microsporas parcialmente rotas no se diferenciaban de las microsporas intactas.

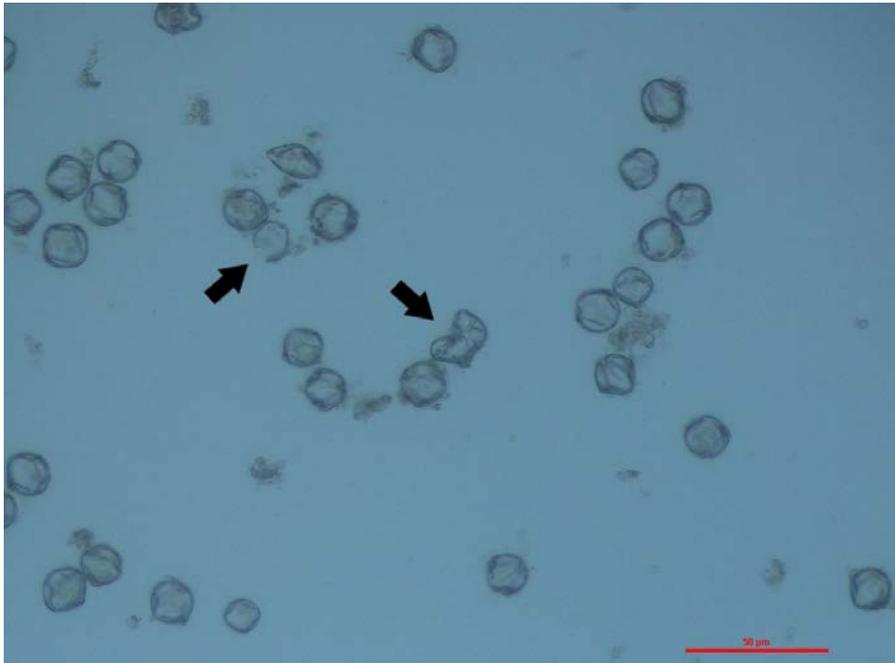


Figura 9. Muestra sometida a homogeneización con microesferas y pistón vista en contraste de fases. Señaladas con flechas las microsporas totalmente rotas contabilizadas. La barra de escala corresponde a 50 μm .

Se aplicó una transformación logarítmica a los datos de porcentaje de rotura para ajustarlos a una distribución normal y ser analizados mediante un test ANOVA. No se observaron diferencias significativas entre ambos métodos de homogeneización mecánicos para los datos de porcentaje de rotura transformados (**Figura 10**).

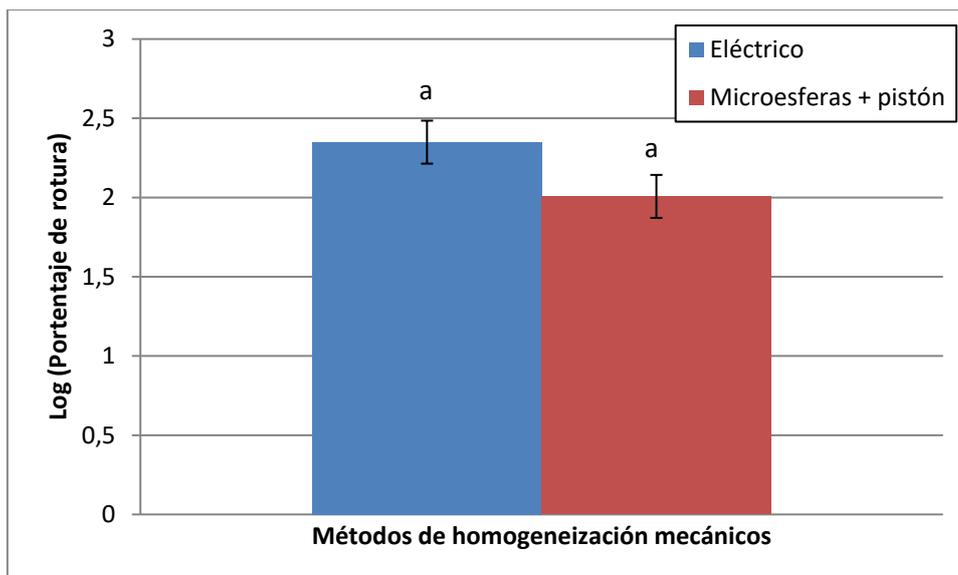


Figura 10. Valores medios del porcentaje de rotura transformados para cada uno de los dos métodos de homogeneización mecánicos utilizados con sus barras de error estándar y los grupos de significación según el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls.

Estos datos indican que el porcentaje de microsporas visiblemente rotas es similar en ambos tipos de homogeneización mecánica.

Por otra parte, se estudió si existía algún tipo de relación entre el grado de rotura de las microsporas y los valores de osmolalidad obtenidos en los métodos de homogeneización mecánicos. Para ello, los datos de osmolalidad y los datos de porcentaje de rotura transformados fueron incluidos en un análisis de variable múltiple para buscar posibles correlaciones entre los diferentes parámetros registrados. No se observó correlación significativa alguna entre el porcentaje de microsporas totalmente rotas y el valor de osmolalidad medido en cada muestra.

Esta falta de correlación podría deberse a la resistencia a la rotura que posee la capa de exina en la estructura más externa de la microspora. El contenido intracelular de las microsporas podría ser liberado a través de las aperturas que poseen en su cubierta sin ser necesaria la rotura completa de la microspora.

Posteriormente se compararon los valores de osmolalidad obtenidos en cada uno de los métodos de homogeneización mecánicos, en la aplicación de ciclos de frío-calor y en las muestras testigo (**Figura 11**).

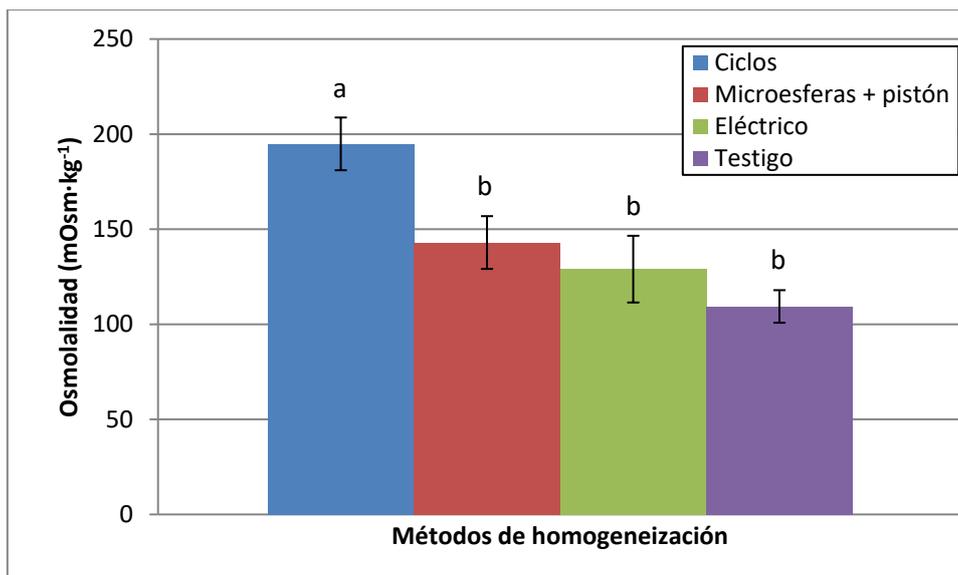


Figura 11. Valores medios de osmolalidad (mOsm·kg⁻¹) para cada uno de los métodos de homogeneización ensayados con sus barras de error estándar y los grupos de significación según el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls.

Las muestras homogeneizadas mediante la aplicación de ciclos frío-calor mostraban un valor medio de osmolalidad superior al de los otros métodos para un nivel de significación de 0,05. Sin embargo, no se apreciaban diferencias significativas entre las muestras testigo, las sometidas al homogeneizador eléctrico y las tratadas con microesferas y pistón.

Para comprobar que la diferencia significativa entre los valores medios de osmolalidad de los diferentes métodos no estuviese influenciada por el efecto sesión u otros factores aleatorios se compararon los valores medios de osmolalidad obtenidos en las muestras testigo para cada uno de los métodos de homogeneización (**Figura 12**).

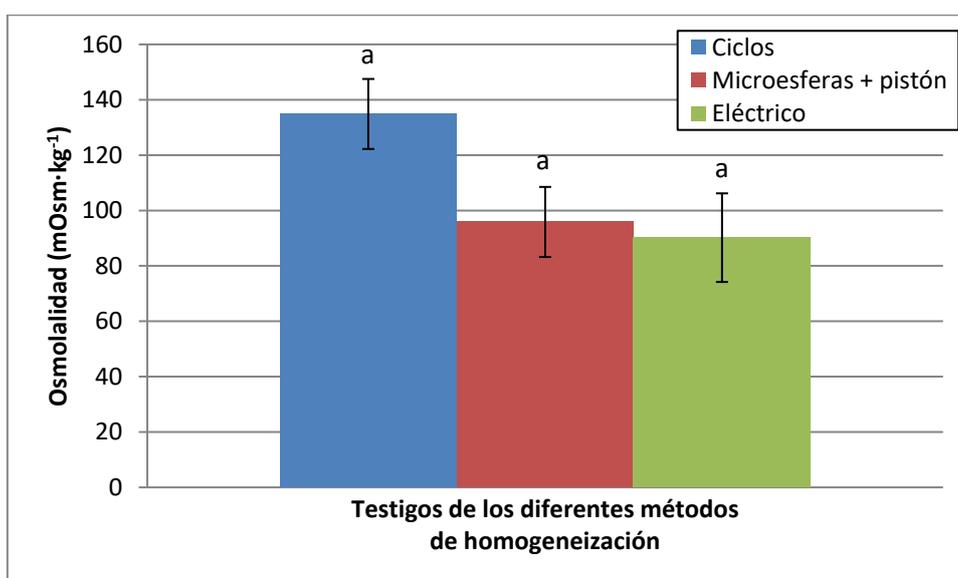


Figura 12. Valores medios de osmolalidad (mOsm·kg⁻¹) para cada uno de los testigos de los diferentes métodos de homogeneización ensayados con sus barras de error estándar y los grupos de significación según el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls.

Puesto que las diferencias que existían entre los valores medios de osmolalidad de las muestras testigo de los distintos métodos de homogeneización no eran significativas, se puede deducir que el valor medio de osmolalidad de las microsporas depende del método de homogeneización utilizado.

Una posible explicación para este fenómeno se basaría en la eficiencia de los métodos de aplicados para la extracción del contenido intracelular. De este modo, al descongelarse la muestra y aplicar el método de homogeneización pertinente, el contenido celular de las microsporas se disuelve en el volumen de agua residual que queda en el sedimento. Por tanto, cuanto más eficiente es el método de homogeneización aplicado más contenido intracelular es liberado por las microsporas, menor es el efecto de dilución del agua residual que queda en el sedimento y mayor es el valor de osmolalidad medido.

Con estos datos se concluyó que el método más efectivo para la homogeneización de las microsporas era la aplicación de ciclos frío-calor, ya que los valores medios de osmolalidad obtenidos son significativamente superiores y por tanto ofrece un mayor poder de discriminación entre muestras.

4.2. Medida de la osmolalidad de microsporas frescas de colza

Una vez determinado el mejor método de homogeneización, se procedió a la medición de la osmolalidad interna de las microsporas antes de su puesta en cultivo. Para ello, de cada uno de los tres rangos descritos en Materiales y métodos, se aislaron 15 muestras de microsporas para ser analizadas. Por tanto, cada una de las 15 muestras a analizar estaba formada por tres tubos cónicos conteniendo el sedimento de microsporas correspondiente a los tres rangos: 3,0-3,2; 3,2-3,4 y 3,4-3,6.

Tal y como se ha comentado en el apartado de Materiales y métodos, en las muestras en las que el volumen de contenido celular extraído tras la homogeneización de las microsporas no alcanzó los 20 μ l se analizaron al microsmómetro sus respectivas diluciones. A los valores obtenidos en el microsmómetro se les aplicó la inversa del factor de dilución utilizado en cada caso para obtener el valor real de osmolalidad.

Para comprobar la normalidad de los datos, se utilizó el test estadístico de Levene para la comparación de desviaciones estándar. Puesto que el p-valor obtenido fue menor que el nivel de significación de 0,05 se procedió a la transformación logarítmica de los datos. Una vez transformados, los datos se sometieron a un test ANOVA para la comparación de varianzas. En la **figura 13** se observan los valores medios de osmolalidad transformados para cada uno de los intervalos de tamaño de yema.

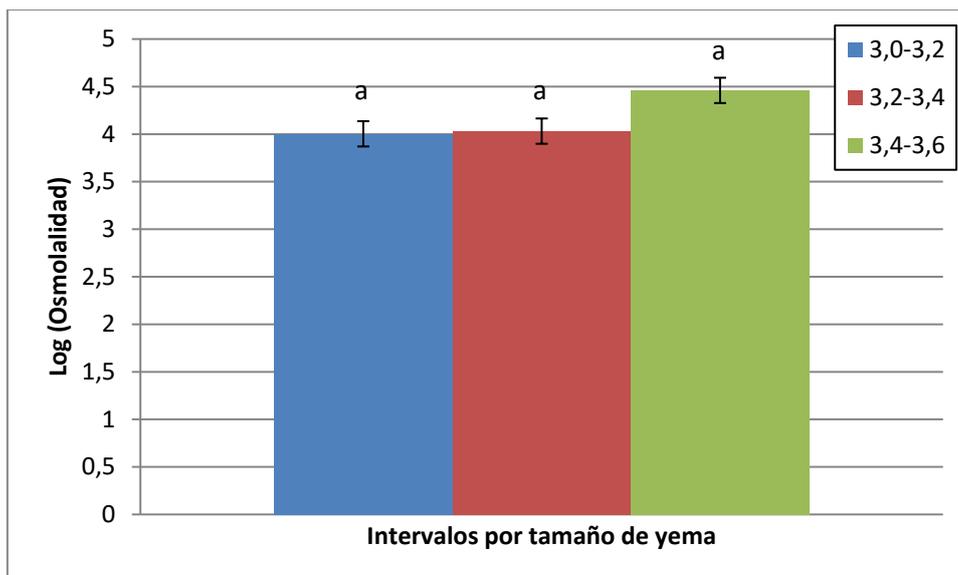


Figura 13. Valores medios de osmolalidad transformados para cada uno de los intervalos por tamaño de yema con sus barras de error estándar y los grupos de significación según el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls.

No se observaron diferencias significativas entre los valores medios de osmolalidad transformados para los distintos rangos de tamaño de yema. Puesto que la longitud de las yemas está correlacionada con el estadio de desarrollo de las microsporas que contienen, estos resultados indican que no existen diferencias significativas entre los valores de osmolalidad de las microsporas frescas en diferentes estadios de desarrollo.

4.3. Relación entre los valores de osmolalidad y la respuesta a la inducción del cultivo

Para estudiar los cambios en la osmolalidad de las microsporas y del medio a lo largo del cultivo de microsporas se llevaron a cabo un total de diez cultivos divididos en tres grupos que fueron recogidos a días 0 (inmediatamente tras su puesta en cultivo), 3 y 7. Cada uno de los cultivos estaba formado por placas de los tres rangos de tamaño en los que se dividieron las yemas seleccionadas.

Para los cultivos recogidos a día 3 y día 7, además de los valores de osmolalidad, se disponía de los datos de viabilidad a día 0 y 3 y del porcentaje de divisiones a día 3. Este último parámetro se tomó como indicativo de la respuesta del cultivo a la inducción de la androgénesis de microsporas. Con la finalidad de estudiar la posible relación entre todos los parámetros medidos se llevó a cabo un análisis de variable múltiple cuyos resultados se muestran en la **tabla 5**. Previamente, los datos de viabilidad a día 3 y de divisiones a día 3 fueron transformados para ajustarlos a una distribución normal. A los datos de viabilidad a día 0 no fue necesario aplicarles la transformación logarítmica puesto que se distribuían normalmente.

Tabla 5. Correlaciones de Pearson (r) entre los datos de osmolalidad de las microsporas, los datos de osmolalidad del medio, los porcentajes de viabilidad transformados y los porcentajes de divisiones transformados. Sombreadas las correlaciones significativas para un nivel de significación del 0,05.

	Osmolalidad del medio	% viabilidad a día 0	Log (% viabilidad a día 3)	Log (% divisiones a día 3)
Osmolalidad de las microsporas	r=-0,3344 p-valor=0,156	r=0,5889 p-valor=0,0125	r=0,7764 p-valor=0,001	r=0,6165 p-valor=0,0089
Osmolalidad del medio		r=0,1739 p-valor=0,4606	r=-0,2056 p-valor=0,383	r=-0,1153 p-valor=0,6247
% viabilidad a día 0			r=0,5782 p-valor=0,0142	r=0,4624 p-valor=0,0498
Log (% viabilidad a día 3)				r=0,8443 p-valor=0,0003

Como se observa en la tabla anterior, existen correlaciones significativas entre los valores de osmolalidad de las microsporas, el porcentaje de viabilidad a día 0, los datos transformados de viabilidad a día 3 y los datos transformados del porcentaje de divisiones a día 3. Los únicos datos que no se correlacionan de forma significativa con ningún otro son los valores de osmolalidad del medio. La correlación más alta es la que existe entre los datos de viabilidad a día 3 y los datos de divisiones a día 3. Esta correlación era esperable, ya que para dividirse las células necesariamente deben estar vivas. No obstante, la correlación existente entre los valores de osmolalidad de las microsporas y el porcentaje de divisiones a día 3, es decir, la respuesta a la inducción, también resultó ser bastante elevada.

Para profundizar en la relación entre la respuesta a la inducción y los valores de osmolalidad se analizó la influencia de los diferentes rangos de tamaño de yema en la respuesta de los cultivos. Como se ha explicado en Materiales y métodos, es conveniente delimitar tres rangos de tamaño de yemas para asegurar la homogeneidad de las microsporas en cultivo respecto a su estadio de desarrollo. Por ello, alguno de estos rangos tendrá más microsporas en la etapa adecuada para reprogramarse hacia embriogénesis y, por tanto, presentará más respuesta que los otros. La **figura 14** demuestra que, efectivamente, esto es lo que sucedió con nuestros cultivos, en los que se observaron diferencias significativas en la respuesta de los diferentes intervalos de tamaños de yemas, siendo el más grande (3,4-3,6 mm) el que mayor respuesta mostró.

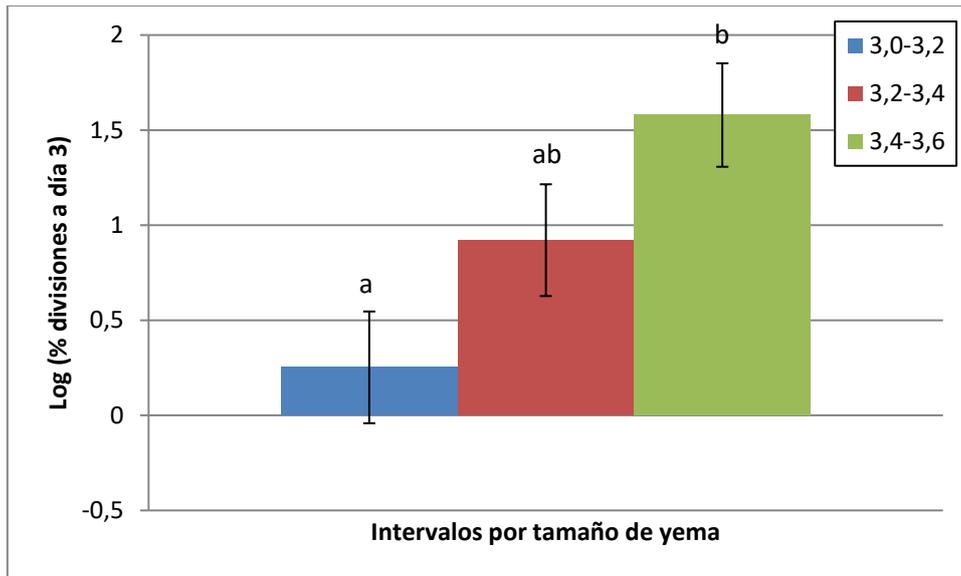


Figura 14. Valores medios de porcentajes de divisiones a día 3 transformados para cada uno de los intervalos por tamaño de yema con sus barras de error estándar y los grupos de significación según el test de comparación de medias de Student-Newman-Keuls.

En base a estos resultados se estudió la evolución de la osmolalidad interna de las microsporas y del medio en los distintos rangos de tamaño de yemas. Esta evolución se ilustra en las siguientes figuras.

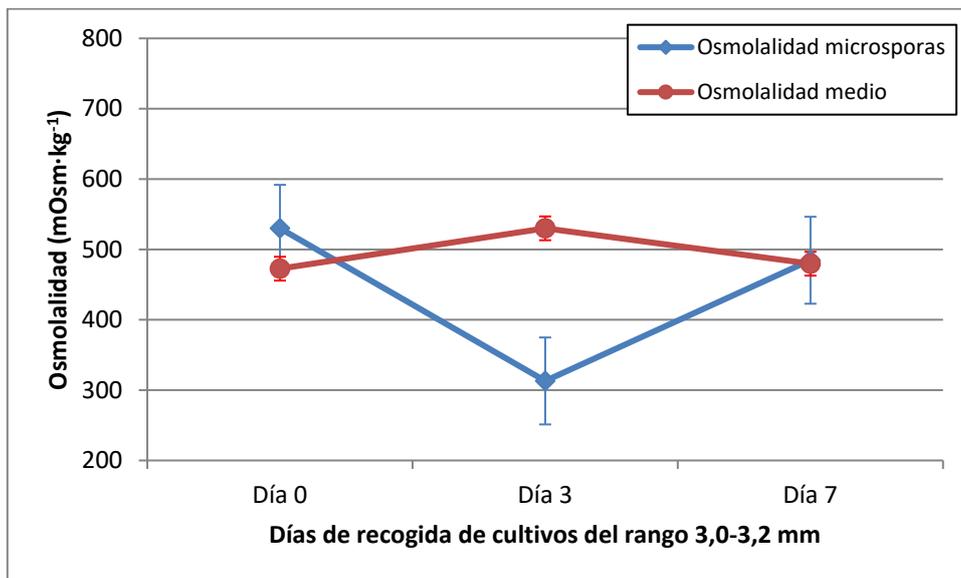


Figura 15. Evolución de los valores medios de osmolalidad interna de las microsporas y del medio en los cultivos de yemas de 3,0-3,2 mm.

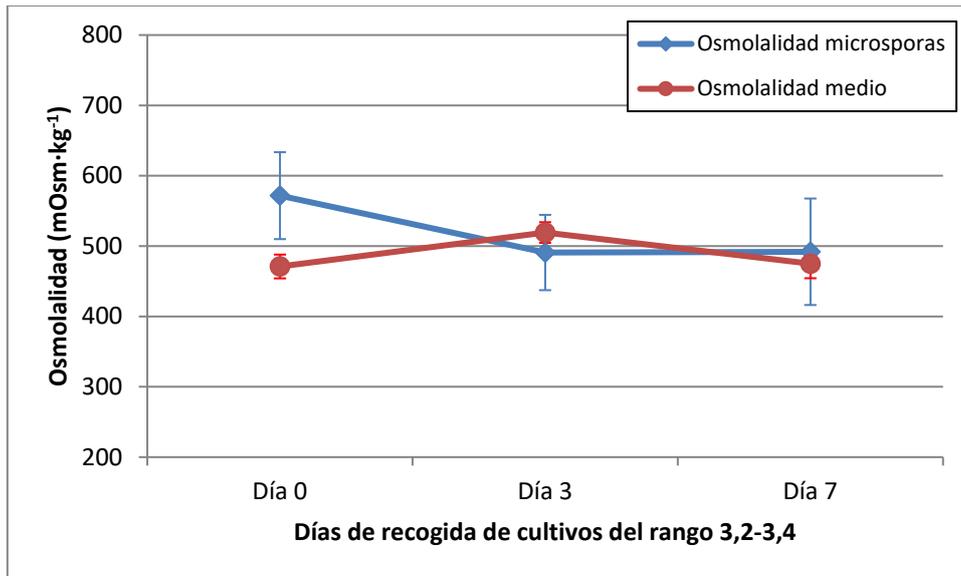


Figura 16. Evolución de los valores medios de osmolalidad interna de las microsporas y del medio en los cultivos de yemas de 3,2-3,4 mm.

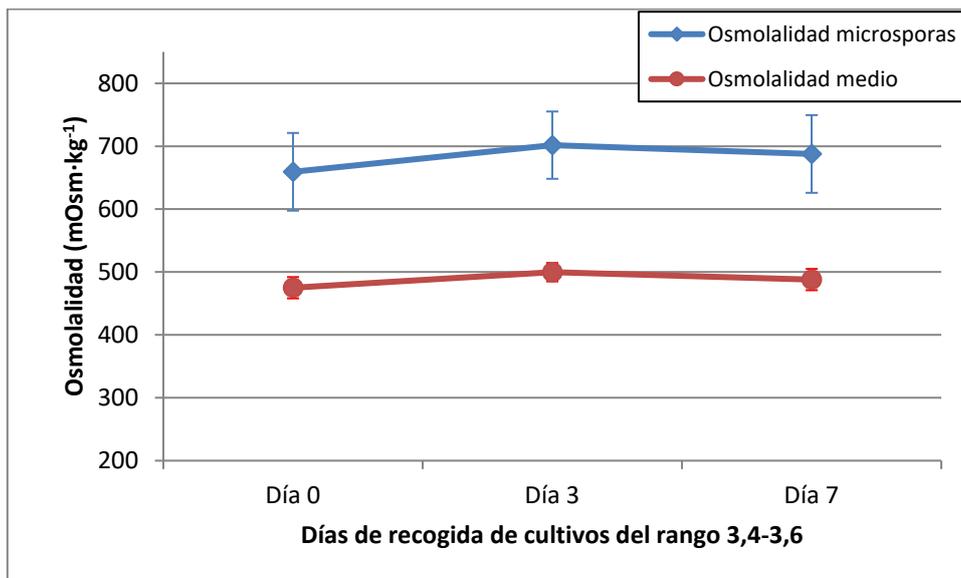


Figura 17. Evolución de los valores medios de osmolalidad interna de las microsporas y del medio en los cultivos de yemas de 3,4-3,6 mm.

Como se observa en las tres figuras anteriores, en todos los casos a día 0 la osmolalidad de las microsporas supera a la del medio, sin embargo, esta diferencia de osmolalidad aumenta conforme aumenta el tamaño de yemas, siendo la diferencia más alta la del intervalo de yemas de 3,4 a 3,6 mm. En este último caso, se puede observar en la **figura 17** que la osmolalidad del medio en los días 3 y 7 evoluciona de forma paralela a la de las microsporas, produciéndose en ambas osmolalidades un pequeño aumento a día 3 y un retorno a valores comparables a los iniciales a día 7. En los tres rangos de tamaño la evolución de la osmolalidad del medio parece seguir la misma dinámica en el tiempo y los valores son similares.

En los rangos de tamaño de yema de 3,0 a 3,2 mm (**figura 15**) y de 3,2 a 3,4 mm (**figura 16**), a día 3 se produce una disminución en la osmolalidad de las microsporas hasta llegar a situarse

por debajo del valor medio de osmolalidad del medio. Este descenso en la osmolalidad de las microsporas es más pronunciado en el caso del rango de tamaño más pequeño (**figura 15**), es decir, en el rango de tamaño que menos respuesta muestra a día 3. En estos dos rangos de tamaño se observa que a día 7 se produce un aumento de la osmolalidad de las microsporas, cuyos valores llegan a igualarse a los valores de osmolalidad del medio. En los rangos de tamaño de yema más pequeños aumenta el número de microsporas muertas a día 3, por lo que podría producirse una disminución pronunciada de la osmolalidad intracelular de las microsporas. Posteriormente, el medio de cultivo podría entrar por los poros de las microsporas muertas, lo que explicaría que día 7 los valores de osmolalidad intracelular se igualen con los valores de osmolalidad del medio.

A la vista de los datos se puede concluir que en el rango de tamaño de yemas que más respuesta se ha observado la osmolalidad de las microsporas se mantiene en el tiempo de forma independiente a la osmolalidad del medio, permaneciendo esta última siempre por debajo de la primera. Por otra parte, en los dos rangos de tamaño que menos respuesta han mostrado no se produce una evolución independiente de ambas osmolalidades, si no que se observa una disminución en los valores de osmolalidad de microsporas a día 3 y posteriormente un aumento a día 7 hasta llegar a igualarse con los valores de osmolalidad del medio. Además, los valores de osmolalidad del medio para los tres rangos de yema son similares en los tres días de recogida de cultivos, por tanto, si no hay cambios en el medio, difícilmente podrá haber una influencia de la osmolalidad del medio en el desarrollo de las microsporas conforme avanza el cultivo.

El medio de cultivo de microsporas de colza posee una concentración elevada de sacarosa (130 g/l) en un volumen muy superior al de todas las microsporas en él suspendidas, lo que provoca que los valores de osmolalidad sean muy altos. Además, no resulta esperable que la osmolalidad del medio cambie en el tiempo, ya que la alta concentración de sacarosa en el medio lo hace difícilmente modificable por las sustancias que pudieran verter las microsporas durante su puesta en cultivo.

Cabe tener en cuenta que los intervalos que más responden mantienen su osmolalidad interna de forma mucho más estable que los que responden menos, que acaban igualando la interna y la externa. Es decir, hay una clara relación proporcional entre el mantenimiento de la osmolalidad interna y la respuesta embriogénica. Además, esta relación es proporcional a la respuesta de cada intervalo. Esta relación podría deberse a la formación de algún tipo de estructura celular que ayudara a las microsporas inducidas a conservar su osmolalidad interna.

En este sentido, las microsporas del tercer rango, además de mostrar una mayor respuesta a la inducción, son las que se encuentran en un estadio de desarrollo más avanzado. Esto implica que las paredes naturales de las microsporas, es decir, la intina y la exina, pueden estar más completas que en los dos otros rangos de tamaño (Edlund *et al.*, 2004; Blackmore y Knox, 2016) y contribuir de este modo a una mayor resistencia frente a los efectos osmóticos. Además, durante los primeros días posteriores al establecimiento del cultivo de microsporas aisladas, el porcentaje de microsporas embriogénicas es bastante inferior respecto a otros tipos de estructuras presentes (microsporas muertas, que detienen su desarrollo, no inducidas...) (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Por ello, es importante tener en cuenta el posible

papel de la exina y la intina en el mantenimiento de los valores de osmolalidad interna, ya que las microsporas no embriogénicas constituyen una alta proporción de las microsporas totales presentes en el cultivo.

Sin embargo, existen otros tipos de estructuras en las microsporas embriogénicas que podrían jugar un papel osmoprotector. Parra-Vega *et al.* (2015) describieron la formación de una capa entre la intina y la membrana plasmática de las microsporas poco después de haber sido inducidas. Esta capa, conocida como capa subintinal, está formada por calosa, aparece en las paredes celulares recientemente formadas y es exclusiva de las microsporas embriogénicas. Según Parra-Vega *et al.* (2015), la formación de esta capa subintinal podría tener como función aislar a la microspora inducida de su entorno previamente a las primeras divisiones, permitiendo así iniciar el programa de desarrollo embriogénico en vez de continuar la ruta gametofítica. Este aislamiento del entorno que procura la capa subintinal podría ser parte de la causa de que las microsporas de los cultivos con una mayor respuesta sean capaces de mantener los valores de osmolalidad interna y no se igualen a los valores del medio. De hecho, la formación de capas de calosa bajo condiciones de estrés osmótico se ha observado en otros sistemas biológicos, como en los embriones cigóticos de *Eleutherococcus senticosus*. Tras ser sometidos a altas concentraciones de sacarosa y otros agentes osmóticos, algunas células epiteliales de estos embriones segregan capas de calosa similares a la capa subintinal. Posteriormente, estas células epiteliales inician el proceso de embriogénesis somática (You *et al.*, 2006).

5. Conclusiones

Las conclusiones derivadas de los resultados del presente trabajo pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Los valores de osmolalidad de las microsporas frescas de dependen del método de homogeneización aplicado. De entre los diferentes métodos probados, la aplicación de ciclos frío-calor es el más efectivo, ya que los valores medios de osmolalidad obtenidos son significativamente superiores y por tanto ofrece un mayor poder de discriminación entre muestras.
2. No existen evidencias estadísticamente significativas que indiquen diferencias entre los valores de osmolalidad de las microsporas frescas de colza en diferentes estadios de desarrollo.
3. Las microsporas correspondientes a los intervalos que más responden mantienen su osmolalidad interna de forma mucho más estable que los que responden menos, que acaban igualando las osmolalidades interna y la externa. Es decir, existe una clara relación entre el mantenimiento de la osmolalidad interna y la respuesta embriogénica. Además, esta relación es proporcional a la respuesta de cada intervalo.

6. Bibliografía

- Afzal, M., Alghamdi, S.S., Habib ur Rahman, M., Ahmad, A., Farooq, T., Alam, M., Khan, I.A., Ullah, H., Nasim, W. y Fahad, S. (2018). Current status and future possibilities of molecular genetics techniques in *Brassica napus*. *Biotechnology Letters* **40**, 479-492.
- Allender, C.J. y King, G.J. (2010). Origins of the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biol.* **10**, 54.
- Asif, M. (2013). Progress and opportunities of doubled haploid production. (Springer International Publishing).
- Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E. y Spaner, D. (2014). Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Pl.* **50**, 121-126.
- Ayed, O.S., De Buyser, J., Picard, E., Trifa, Y. y Amara, H.S. (2010). Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* **2**, 030-038.
- Blackmore, S. y Knox, R.B. (2016). *Microspores Evolution and Ontogeny: Evolution and Ontogeny*. (Academic Press).
- Cabrera-Ponce, J.L., López, L., León-Ramírez, C.G., Jofre-Garfias, A.E. y Verver-y-Vargas, A. (2015). Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma* **252**, 559-570.
- Camacho-Fernández, C., Hervás, D., Rivas-Sendra, A., Marín, M.P. y Seguí-Simarro, J.M. (2018). Comparison of six different methods to calculate cell densities. *Plant Methods* **14**, 30.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A.M. y Romagosa, I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Rep.* **13**, 709-712.
- Corral-Martínez, P., Camacho-Fernández, C. y Seguí-Simarro, J.M. (2018). Isolated microspore culture in *Brassica napus*. En *Plant Embryogenesis*, M. Bayer, ed (New York: Springer Science + Business Media), pp. In press.
- Corral-Martínez, P. y Seguí-Simarro, J.M. (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica* **187**, 47-61.
- Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I.A., Tang, H., Wang, X., Chiquet, J., Belcram, H., Tong, C. y Samans, B. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* **345**, 950-953.
- Chen, L. y Liu, Y.-G. (2014). Male Sterility and Fertility Restoration in Crops. *Ann. Rev. Plant. Biol.* **65**, 579-606.
- Dainty, J. (1963). Water relations of plant cells. En *Advances in Botanical Research* (Elsevier), pp. 279-326.
- Edlund, A.F., Swanson, R. y Preuss, D. (2004). Pollen and stigma structure and function: The role of diversity in pollination. *Plant Cell Suppl* **16**.
- Erstad, B.L. (2003). Osmolality and osmolarity: narrowing the terminology gap. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* **23**, 1085-1086.
- FAOSTAT. (2018). <http://faostat.fao.org> [last checked July 2018].
- Ferrie, A. y Caswell, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **104**, 301-309.
- Forster, B.P. y Thomas, W.T. (2005). Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breed Rev* **25**, 57-88.

- Fu, D., Xiao, M., Hayward, A., Fu, Y., Liu, G., Jiang, G. y Zhang, H.** (2014). Utilization of crop heterosis: a review. *Euphytica* **197**, 161-173.
- Germanà, M.A.** (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **104**, 283-300.
- Germanà, M.A.** (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep.* **30**, 839-857.
- Gómez-Campo, C. y Prakash, S.** (1999). 2 Origin and domestication. En *Developments in Plant Genetics and Breeding*, C. Gómez-Campo, ed (Elsevier), pp. 33-58.
- Guha, S. y Maheshwari, S.C.** (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* **204**, 497.
- Hoekstra, S., Vanzijderveld, M.H., Heidekamp, F. y Vandermark, F.** (1993). Microspore culture of *Hordeum vulgare* L. - The influence of density and osmolality. *Plant Cell Rep.* **12**, 661-665.
- Huang, B., Bird, S., Kemble, R., Simmonds, D., Keller, W. y Miki, B.** (1990). Effects of culture density, conditioned medium and feeder cultures on microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. Topas. *Plant Cell Rep.* **8**, 594-597.
- Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A.M., Sangwan, R.S., Devaux, P. y Clément, C.** (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Rep.* **25**, 375-381.
- Kim, Y.-J. y Zhang, D.** (2017). Molecular control of male fertility for crop hybrid breeding. *Trends Plant Sci.*
- Kramer, P.J. y Boyer, J.S.** (1995). *Water relations of plants and soils.* (Academic press).
- Li, Z.-K., Luo, L., Mei, H., Wang, D., Shu, Q., Tabien, R., Zhong, D., Ying, C., Stansel, J. y Khush, G.** (2001). Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics* **158**, 1737-1753.
- Luo, L., Li, Z.-K., Mei, H., Shu, Q., Tabien, R., Zhong, D., Ying, C., Stansel, J., Khush, G. y Paterson, A.** (2001). Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. II. Grain yield components. *Genetics* **158**, 1755-1771.
- Menamo, T.** (2012). Investigating Hormone Regulation and Sugar Storage during Tuber Development in Turnip Plants (*Brassica rapa*).
- Meyer, B.S.** (1938). The water relations of plant cells. *Bot. Rev.* **4**, 531-547.
- Nagaharu, U.** (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* **7(7)**, 389-452.
- Ochatt, S., Pech, C., Grewal, R., Conreux, C., Lulsdorf, M. y Jacas, L.** (2009). Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). *J. Plant Physiol.* **166**, 1314-1328.
- Palmer, C.E. y Keller, W.A.** (2005). Overview of haploidy. En *Haploids in crop improvement II*, C.E. Palmer, W.A. Keller y K.J. Kasha, eds (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 3-9.
- Parra-Vega, V.** (2015). Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza. En *Biotechnology* (Universitat Politècnica de València), pp. 258.
- Parra-Vega, V., Corral-Martínez, P., Rivas-Sendra, A. y Seguí-Simarro, J.M.** (2015). Induction of embryogenesis in *Brassica napus* microspores produces a callosic subintinal layer and abnormal cell walls with altered levels of callose and cellulose. *Front Plant Sci* **6**, 1018.
- Radoev, M., Becker, H.C. y Ecke, W.** (2008). Genetic analysis of heterosis for yield and yield components in rapeseed (*Brassica napus* L.) by QTL mapping. *Genetics*.
- Rahman, H.** (2013). Breeding spring canola (*Brassica napus* L.) by the use of exotic germplasm. *Canadian Journal of Plant Science* **93**, 363-373.

- Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J. y Seguí-Simarro, J.M.** (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica* **184**, 235-250.
- Segarra-Martín, E.** (2017). Estudio de la osmolalidad interna y del medio en cultivos in vitro de microsporas de berenjena. En COMAV (Valencia, Spain: Universitat Politècnica de València).
- Seguí-Simarro, J.M.** (2010a). Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. (Valencia, Spain: Editorial Universitat Politècnica de València).
- Seguí-Simarro, J.M.** (2010b). Androgenesis revisited. *Bot. Rev.* **76**, 377-404.
- Seguí-Simarro, J.M., Corral-Martínez, P., Parra-Vega, V. y González-García, B.** (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Rep.* **30**, 765-778.
- Seguí-Simarro, J.M. y Nuez, F.** (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol. Plant.* **134**, 1-12.
- Shull, G.H.** (1948). What Is "Heterosis"? *Genetics* **33**, 439-446.
- Snape, J.W.** (1989). Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. En Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops, A. Mujeeb-Kazi y L.A. Sitch, eds (Mexico y Filipinas: CIMMYT y IRRI), pp. 19-30.
- Stuber, C.W.** (1994). Heterosis in plant breeding. *Plant Breed Rev* **12**, 227-251.
- USDA, N.P.d.** (2018). <http://nracs.usda.gov> [last checked July 2018].
- Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., Hamblin, J. y Liu, C.** (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Front Plant Sci* **8**, 1786.
- You, X.L., Yi, J.S. y Choi, Y.E.** (2006). Cellular change and callose accumulation in zygotic embryos of *Eleutherococcus senticosus* caused by plasmolyzing pretreatment result in high frequency of single-cell-derived somatic embryogenesis. *Protoplasma* **227**, 105-112.
- Zhou, H., Zheng, Y. y Konzak, C.F.** (1991). Osmotic potential of media affecting green plant percentage in wheat anther culture. *Plant Cell Rep.* **10**, 63-66.