
Resumen

La embriogénesis derivada de microsporas es la ruta androgénica más empleada para la obtención de individuos dobles haploides (DHs), 100% homocigotos, que pueden ser utilizados como líneas puras. Este proceso es una alternativa biotecnológica a los programas clásicos de mejora que permite reducir el tiempo y los recursos necesarios para la obtención de híbridos comerciales. Gracias a los avances realizados en los últimos 30 años, hay determinadas especies que pueden ser consideradas modelo debido a la elevada eficiencia que presentan en la obtención de individuos DHs. Sin embargo, aun existen muchas especies, interesantes desde un punto de vista agrícola y comercial, que permanecen recalcitrantes a la embriogénesis de microsporas. Debido al elevado potencial biotecnológico de esta técnica es fundamental mejorar el proceso en este tipo de especies en las que la androgénesis no está puesta a punto. Para ello es esencial realizar estudios en los que se combine un enfoque más aplicado, tratando de conseguir las condiciones experimentales más adecuadas, y en paralelo, un enfoque más básico, orientado a investigar las bases de la reprogramación de las microsporas y de este modo, tener una mayor posibilidad de influir en el proceso. En esta Tesis se han empleado ambos enfoques, empleando la colza como especie modelo y el pimiento como especie recalcitrante a la androgénesis. En pimiento, el estudio de factores clave para la inducción de la androgénesis nos ha permitido optimizar un protocolo de cultivo de anteras aplicable a diferentes genotipos. Proponemos el uso combinado de la relación sépalo/yema (80-90% de la yema cubierta por los sépalos) junto con la pigmentación de las anteras (extremo apical morado) como marcadores morfológicos fiables y fáciles de medir para determinar qué yemas y anteras contienen las microsporas en su estadio idóneo para la inducción. También se ha demostrado que la presencia de callos de origen somático es más

dependiente de las condiciones de cultivo que del genotipo, lo cual nos ha permitido obtener un protocolo que reduzca la presencia de estos callos e incremente el número de embriones obtenidos.

En los estudios de investigación básica realizados con colza, el uso de la fijación por alta presión combinada con la criosustitución ha permitido observar cambios ultraestructurales en las microsporas inducidas nunca antes descritos. Se ha estudiado la arquitectura y composición de las paredes celulares que se forman *de novo* en las microsporas embriogénicas y se han observado paredes celulares incompletas y deformes que podrían estar favoreciendo fenómenos de fusión nuclear, que a su vez da lugar a la duplicación cromosómica típica de los DHs. Se ha comprobado que estas paredes presentan elevados niveles de calosa y ausencia de celulosa. También se ha estudiado la arquitectura de diferentes orgánulos presentes en las microsporas recién inducidas y se ha demostrado que los plastidios presentes en las microsporas embriogénicas actúan como plastolisomas. Estos estudios ultraestructurales han servido para extraer dos nuevos marcadores de embriogénesis: la presencia de calosa en las nuevas paredes y en las placas celulares en formación y plastolisomas que posiblemente actúen como parte de un mecanismo más general de limpieza del citoplasma, en paralelo a la reprogramación.