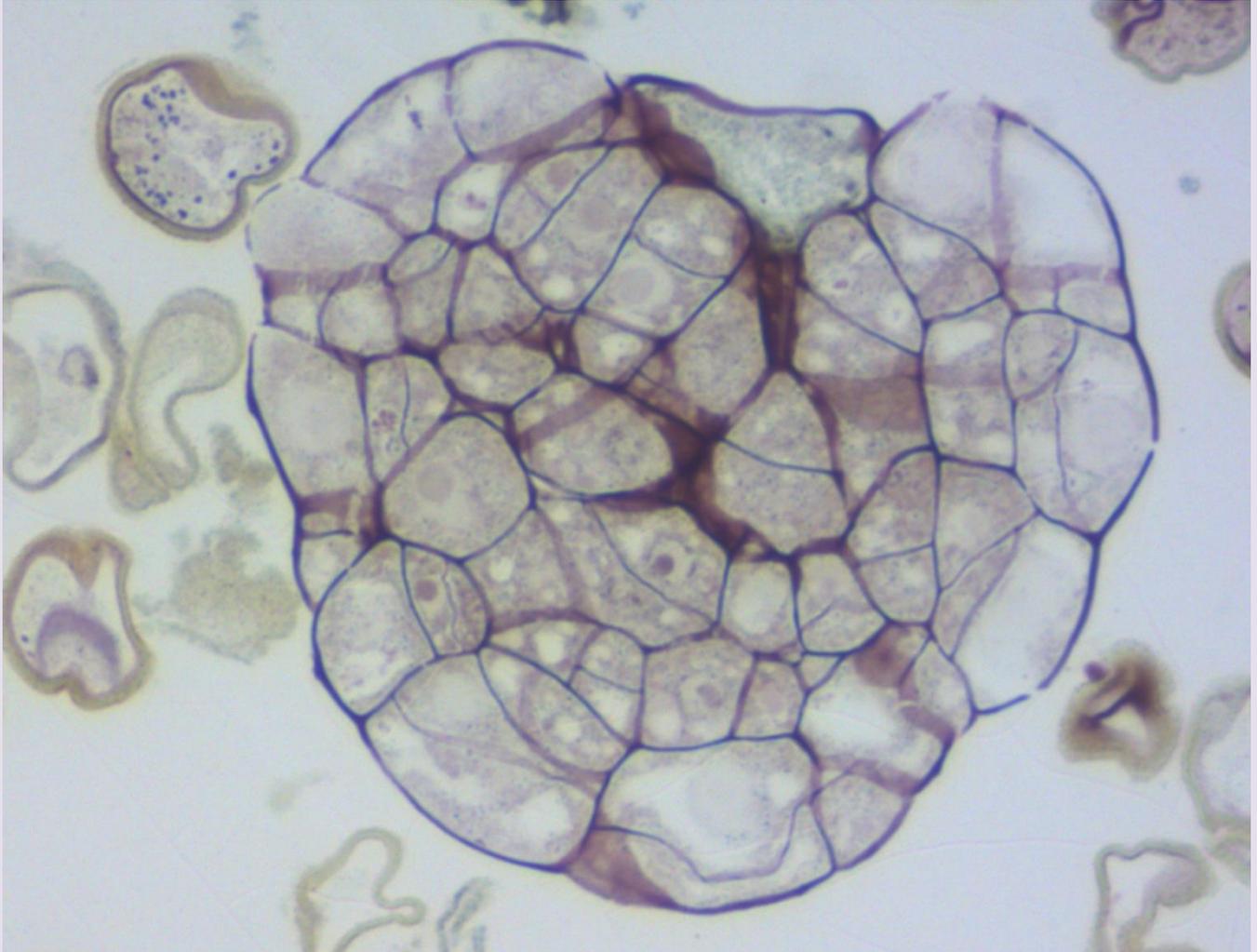


UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



**Caracterización de la transición de embrión
globular a corazón en embriones
androgénicos de berenjena**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA CURSO ACADÉMICO 2014-2015

AUTOR: D. EDGAR GARCÍA FORTEA

VALENCIA, 7 DE JULIO DE 2015

TUTOR: D. JOSE M^a SEGUÍ SIMARRO

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Dña. ALBA RIVAS SENDRA

TÍTULO: Caracterización de la transición de embrión globular a corazón en embriones androgénicos de berenjena.

ABSTRACT: Obtaining double haploid organisms is one of the main objectives of many agricultural companies as well as companies of genetic improvement. The cross between two pure lines allows getting hybrid, homozygous for all its characters. This type of organism presents some agronomic traits of great value, as for example hybrid vigor, greater resistance to different biotic and abiotic stress, homogeneity in crops... as well as some genetic features of great interest at the time of getting genetic maps and other studies.

Androgenesis is one of the ideal methods for obtaining pure lines and it presents obvious advantages over the traditional methods, enabling you to get these lines in less time and with fewer economic resources.

The Cell biology Lab of the COMAV (Universitat Politècnica de Valencia) has managed to develop different protocols for obtaining double haploids through androgenesis in various plant species. One of them is *Solanum melongena*.

The protocol in eggplant has allowed successfully obtaining pure lines, with an acceptable efficiency. But there is a critical point in the microspore development during in vitro culture. Once it has induced androgenesis in these microspores, it comes a point in the development of the embryo in which cells leave the pattern of embryogenic developing, giving rise to a set of undifferentiated cells, defined as callus. This study seeks understanding what is happening at the histological level in these cells and what are the factors that are diverting the embryo from its natural path.

Once it has been understood which processes are taking place in these cells, it could be studied how avoiding it, by this way the protocol will be optimized preventing the process of organogenesis induced in callus, getting double haploid plants directly from embryos.

RESUMEN: La obtención de organismos dobles haploides es uno de los objetivos principales de muchas empresas agroalimentarias así como en empresas de mejora genética. El cruce de dos líneas puras permite obtener descendientes híbridos, homocigotos para todos sus caracteres. Este tipo de organismos presenta unas características agronómicas de gran valor, como por ejemplo el vigor híbrido, mayor resistencia a diferentes estreses bióticos y abióticos, homogeneidad en las cosechas... así como unas características genéticas de gran interés a la hora de realizar mapas genéticos y otro tipo de estudios.

La androgénesis es uno de los métodos ideales para obtener líneas puras y presenta ventajas evidentes respecto a los métodos tradicionales, ya que permite obtener estas líneas en menor tiempo y con menos recursos económicos.

El laboratorio de Biología Celular del COMAV (Universitat Politècnica de València) ha conseguido desarrollar distintos protocolos para la obtención de dobles haploides mediante androgénesis en diversas especies vegetales. Una de ellas es *Solanum melongena*.

El protocolo en berenjena ha permitido con éxito obtener líneas puras, con una eficiencia aceptable. Pero existe un punto crítico en el desarrollo de las microsporas durante el cultivo in vitro. Una vez se ha inducido la androgénesis en estas, llega un punto en el desarrollo del embrión en el que las células abandonan el patrón de desarrollo embriogénico, dando lugar a un conjunto de células indiferenciadas, definido como callo. En este estudio se pretende comprender que está pasando a nivel histológico en estas células y que factores están desviando al embrión de su ruta natural.

Una vez comprendidos qué procesos están teniendo lugar en estas células, se podría estudiar cómo evitarlo, de modo que se optimizaría el protocolo evitando el proceso de organogénesis inducida en los callos, obteniendo plantas dobles haploides directamente de embriones.

KEY WORDS: Embryogenesis, Androgenesis, Starch, Lipids, Proteins, Iron, *Solanum melongena*.

PALABRAS CLAVE: Embriogénesis, Androgénesis, Almidón, Lípidos, Proteínas, Hierro, *Solanum melongena*.

ALUMNO: D. Edgar García Fortea

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, 7 de julio de 2015

TUTOR ACADEMICO: Prof. D. Jose M^a Seguí Simarro

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Dña. Alba Rivas Sendrá

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Jose María el haberme abierto las puertas de su laboratorio desde mi llegada a la UPV, gracias a el nunca me ha faltado una percha donde colgar mi bata y he tenido la oportunidad de descubrir el mundo de la biología celular y la microscopia, de aprender junto a su equipo las bases que algún día harán de mi un buen científico. Siempre ha confiado en mí y me ha dado la oportunidad de crecer, es algo por lo que le estaré siempre agradecido.

También quiero agradecerles a mis compañeros de laboratorio Patricia, Verónica, Alberto y Carolina toda la ayuda y conocimientos que me han brindado, así como su compañía y amistad en estos últimos años. Pero ha habido una persona sin la cual este trabajo no hubiese sido lo mismo, mi directora experimental Alba la cual ha estado siempre a mi lado, sacándome de los aprietos mas inesperados, encapsulando muestra codo con codo y sobre todo guiando mis alocados pasos siempre en la dirección correcta y poniendo sensatez cuando yo creía que todo estaba perdido. Gracias.

Ha habido personas que aunque no trabajen en un laboratorio, han jugado un papel fundamental en mi formación. Los mas importantes para mí han sido mis padres, los que han tenido que aguantar numerosas horas de explicaciones sobre la androgénesis y el maravilloso mundo de las berenjenas, y que además han sido mi apoyo tanto moral como económico en mi formación, sin ellos estas líneas que escribo no existirían. Papa, mama lo habéis hecho genial. Y como olvidarme en esta dedicatoria de mi hermano, que aunque es un ficha, también ha aportado su granito de arena en los ratos en los que se comportaba para dejarme dormir mi hora de siesta diaria. Y a todos y cada uno de mis familiares: yayos, tíos, primos...siempre me habéis transmitido fuerza y cariño en los buenos y en los malos momentos.

Y no podía dejarme a mis leones, Javi Peris, Javi Pecellin, Lluís, Aitor y Cristian. Ellos han sido los que han evitado que acabe volviéndome loco, obligándome a salir, a que la luz del sol rozara mi piel de vez en cuando o a desinhibiéndome para subir a los escenario y cantar a viva voz *Cadillac Solitario*. Y de esas personas que soportaron mis más severos silencios. Hablando de buenos amigos, ha habido otros con los que también he compartido penas (generadas principalmente por los exámenes de los lunes) y glorias, ellos son mis compañeros de clase Antón, Luis, Alex, El Mendi, Manu, Lluís C... Pero hay dos que especialmente han dejado huella en mi, Pablo y Marina, doy gracias al destino por haberos puesto en mi camino, espero que sigamos recorriéndolo juntos durante mucho tiempo.

No obstante, hay una persona que siempre ha estado muy orgullosa de mi, y para mi es un orgullo que lo esté. Mi yayo Manolo, mi ejemplo a seguir, un hombre luchador que no se vence ante las adversidades, respetuoso y respetado, sabio... y son tantos los adjetivos que tendré que dejarlo ahí, si no se me va la hoja en ellos. A ti va dedicado este trabajo yayo, gracias por haberme enseñado a leer cuando era pequeñito y a ser como tu a medida que iba creciendo. Gracias por seguir enseñándome, pues por más que pasen los años siempre tienes algo nuevo que transmitirme.

ÍNDICE

1	Introducción	1
1.1	La berenjena	1
1.1.1	Taxonomía	1
1.1.2	Origen	1
1.1.3	Importancia económica	2
1.2	Los híbridos en mejora vegetal	2
1.3	Importancia de los dobles haploides	3
1.3.1	Utilidad de los dobles haploides en mejora	3
1.3.2	Otras utilidades de los dobles haploides	3
1.3.3	Métodos de obtención	4
1.4	Androgénesis	5
1.4.1	Fundamentos de la androgénesis	5
1.4.2	Inducción de la androgénesis a partir de microsporas	6
1.4.2.1	Factores que afectan a la inducción	7
1.4.2.2	Metodologías de inducción	7
1.4.3	Ventajas e inconvenientes de la androgénesis	8
1.5	Androgénesis en berenjena	9
1.5.1	Cultivo de anteras	10
1.5.2	Cultivo de microsporas aisladas	10
2	Objetivos	12
3	Materiales y métodos	13
3.1	Material vegetal	13
3.2	Condiciones de cultivo de las plantas donantes	13
3.3	Cultivo de microsporas aisladas	13
3.3.1	Ensayos con hierro	15
3.4	Caracterización del proceso de desarrollo embriogénico	15
3.4.1	Fijación de muestra	16
3.4.2	Inclusión de muestra en Technovit 7100	16
3.4.3	Tinción con DAPI	17
3.5	Realización de cortes	18
3.6	Tinciones	18
4	Resultados y discusión	20
4.1	Caracterización del desarrollo embriogénico	20
4.2	Análisis de estructuras y tinciones	22
4.2.1	Estructuras internas	22
4.2.2	Presencia de almidón	24
4.2.3	Presencia de lípidos	27
4.2.4	Acumulación de proteínas	29
4.3	Efectos de distintas concentraciones de hierro en el cultivo de microsporas de berenjena	32
5	Conclusiones	38
6	Bibliografía	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la inducción de androgénesis a partir de microsporas	6
Figura 2. Proceso de extracción de microsporas aisladas	14
Figura 3. Encapsulación de muestras en Technovit 7100 resin	17
Figura 4. Caracterización del desarrollo embriogénico	21
Figura 5. Estructuras internas	24
Figura 6. Presencia de almidón	26
Figura 7. Control con semilla de colza	27
Figura 8. Presencia de lípidos	28
Figura 9. Acumulación de proteínas	31
Figura 10. Número de proembriones a los 7 días de cultivo, en función de la concentración de hierro en el medio	33
Figura 11. Resumen de las estructuras observadas a los 14 días de cultivo	34
Figura 12. Número de callos a los 30 días de cultivo en función de la concentración de hierro en el medio	35
Figura 13. Callos a los 30 días de cultivo en distintas concentraciones de hierro	35
Figura 14. Embrión cotiledonar a los 30 días de cultivo en la concentración de 3200 mM	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microlitros de stock dispensados al medio NLN para obtener las 6 concentraciones de hierro a estudiar	15
---	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA BERENJENA

1.1.1. Taxonomía

La berenjena (*Solanum melongena* L.) es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial, que pertenece a la familia *Solanaceae*. Es una planta plurianual cultivada como anual y dentro de las angiospermas, su clasificación taxonómica es la siguiente (Marín, 2008):

Clase: *Dicotyledoneae*

Subclase: *Lamiidae*

Superorden: *Solananae*

Orden: *Solanales*

Familia: *Solanaceae*

Subfamilia: *Solanoideae*

Tribu: *Solaneae*

Género: *Solanum*

Subgénero: *Leptostemonum*

Sección: *Melongena*

Serie: *Incaniformia*

Especie: *Solanum melongena* L

Dentro de la familia *Solanaceae*, el género *Solanum* es el más numeroso de todos. En él encontramos plantas herbáceas, arbustivas y arbóreas, en muchos casos espinosas. La especie *Solanum melongena* pertenece a uno de los grupos no tuberosos del género *Solanum*. Se trata de una especie diploide, con un número cromosómico $2n=24$.

1.1.2. Origen

La berenjena (*Solanum melongena* L.) probablemente provenga de la domesticación de *Solanum incanum*, una especie silvestre propia de las regiones ecuatoriales del Este de África y de Oriente medio. Las similitudes entre ambas especies son muchas, tanto a nivel morfológico como a nivel molecular, y es posible obtener híbridos fértiles entre ellas (Nuez *et al.*, 2002). Según las evidencias observadas, la berenjena fue domesticada en la región Indo-Birmana. La especie silvestre *S. incanum* no habitaba en esta zona, por lo que Lester y Hasan, 1991 sugieren que en el Neolítico, o incluso en el Paleolítico, el hombre la trajo desde Oriente Medio en sus desplazamientos. Una vez allí, mediante selección natural y artificial, estas plantas fueron evolucionando hasta convertirse en una planta cultivada. La selección en estas regiones, así como en muchas otras, dio lugar finalmente a los cultivares modernos. Al mismo tiempo, también se desarrollaron otras variedades espinosas.

Desde el Centro Indio de domesticación, considerado como centro primario, la berenjena se extendió a China y la Región Mediterránea, que se consideran centros secundarios de variación (Karihaloo y Gottlieb, 1995). Desde la zona Indo-Birmana y

con ayuda de los árabes, la berenjena se introdujo en la Península Ibérica a través de la ruta de la seda. A partir de los tipos introducidos por los árabes surgieron variedades locales adaptadas a diversas condiciones de la Península como consecuencia de la selección (tanto natural como artificial), la recombinación, la migración, la deriva genética y los cruzamientos espontáneos entre individuos de poblaciones diferentes (Prohens *et al.*, 2003). Finalmente, desde aquí se extendió al resto de Europa, y fue introducida en América tras su descubrimiento.

Trabajos realizados a nivel molecular afirman que la base genética de este cultivo es muy estrecha (Issiki *et al.*, 1998, Furini y Wunder, 2004, Behera *et al.*, 2006). Esto se explica por el hecho de que su región de origen potencial no es la misma en la que se encuentran la mayor parte de las plantas silvestres emparentadas con el cultivo. Por tanto, la aparición de los tipos cultivados hubo de tener lugar a partir de un número de individuos muy reducido y aislado reproductivamente.

1.1.3. Importancia económica

La berenjena es una hortaliza muy importante a nivel mundial, que se encuentra en la novena posición en cuanto a producción según los datos de la FAO de 2014. La producción mundial de berenjena se ha duplicado en los últimos 10 años debido al crecimiento de la producción en los tres principales países productores que son China, India e Irán (FAOSTAT 2014). España ocupa el decimosegundo puesto siendo el segundo país europeo más productor, por detrás de Italia. También es una de las hortalizas más cultivadas en España, donde ocupa la octava posición, por delante de las coles y otras crucíferas. A nivel nacional se ha experimentado un crecimiento desde el año 2002 tanto en términos de producción, como de área cosechada siendo Andalucía la mayor productora con 213.957 toneladas en el año 2012 según la FAO y una extensión de cultivo de 3002 hectáreas, seguida por Cataluña y la Comunidad Valenciana con 7.586 y 6.457 toneladas respectivamente.

1.2. LOS HÍBRIDOS EN MEJORA VEGETAL

La producción de híbridos revolucionó la industria de las semillas y sigue siendo uno de los principales métodos de la mejora vegetal debido a su elevada eficacia. Genera semillas híbridas de elevado valor comercial (Martín, 2002) y los híbridos ofrecen dos claras ventajas para el agricultor: alta homogeneidad y un elevado rendimiento en las cosechas.

Los híbridos presentan una extraordinaria homogeneidad en todas las fases del cultivo, debido a que las plantas son genéticamente idénticas entre sí, e idealmente heterocigotas para todos los *loci*. Su segunda característica, el alto rendimiento, es consecuencia del vigor híbrido o heterosis. Se trata de un fenómeno genético que ocurre como resultado de la heterocigosidad y se describe como el mayor porte y productividad que presentan los híbridos de la F1 respecto a la generación parental de los mismos. Dicha heterosis depende del valor de mejora y de la diversidad genética de los parentales que intervienen en el cruzamiento. Las condiciones ambientales también tienen mucha importancia en el desarrollo del híbrido. Un inconveniente que presentan los híbridos para el agricultor, es que descendencia (F2) es segregante y no mantiene las características deseables. No obstante, lo que es un inconveniente para el agricultor es un beneficio para las empresas productoras de semillas, ya que estos híbridos suponen unan patente física y aseguran que el agricultor comprará la semilla cada año (Cubero, 2003).

En el caso de especies hortícolas, los híbridos pueden obtenerse manualmente dado el elevado valor comercial del producto y el elevado número de semillas que se obtienen de cada cruce, al igual que en plantas de reproducción vegetativa, puesto

que una vez obtenido un solo individuo con caracteres favorables éste puede ser propagado asexualmente (Cubero, 2003). En el mercado existen excelentes híbridos de maíz (los más antiguos), sorgo, cebolla, tomate, pimiento, berenjena y coles, entre otras muchas especies.

Existe una serie de individuos o grupo de individuos, los cuales son homocigotos para todos sus caracteres, estos reciben el nombre de líneas puras y presentan una gran importancia en el campo de la genética, por sus aplicaciones en mejora y posteriores usos a nivel industrial ya que son la base en la producción de híbridos.

Las líneas puras se obtienen tradicionalmente por mejora genética clásica, mediante un mínimo de 7 u 8 ciclos de autofecundación y selección. Esto supone un tiempo considerable para lanzar un nuevo híbrido al mercado ya que el número de cultivos al año es reducido y los programas de mejora clásica pueden tardar entre 3 y 4 años. Afortunadamente, las técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro* permiten acelerar mucho este proceso mediante la obtención de dobles haploides.

1.3. IMPORTANCIA DE LOS DOBLES HAPLOIDES

Los dobles haploides son individuos homocigotos para todos sus *loci*, debido a que provienen de la duplicación del número de cromosomas gamético de los individuos haploides originados a partir de un único núcleo haploide (Germanà, 2006).

1.3.1. Utilidad e importancia de los dobles haploides en mejora

Las aplicaciones de los dobles haploides dependerán en gran medida del tipo de cultivar que pretende conseguirse, ya sea una línea pura, un híbrido, o una variedad sintética. Mediante el uso de líneas puras se puede incrementar la productividad de los cultivos. Como se ha visto anteriormente, dichas líneas generalmente son obtenidas mediante técnicas de autofecundación-selección basadas en la mejora clásica, con el elevado coste de recursos y tiempo que esta conlleva. El uso de dobles haploides reduce las 7-8 generaciones de autofecundación necesarias para obtener un genotipo homocigoto para todos sus *loci* a partir de un genotipo híbrido, ahorrando así mucho espacio, tiempo y dinero. Además, en el caso de variedades comerciales, la formación de dobles haploides puede generar directamente nuevos cultivares. La selección utilizando dobles haploides es más eficiente ya que facilita la fijación de alelos recesivos beneficiosos, así como la selección de caracteres cuantitativos, por la eliminación de los efectos de dominancia y la segregación dentro de las familias (Snape, 1989). En especies de polinización libre, los dobles haploides pueden ser utilizados como líneas parentales de una variedad sintética. Además, los dobles haploides son útiles para estimar los valores aditivos o la aptitud combinatoria general si son utilizados en cruces con otros materiales de interés (Snape, 1989).

1.3.2. Otras utilidades de los dobles haploides

Elaboración de mapas genéticos: Los mapas genéticos son una herramienta fundamental para el cartografiado de los caracteres, algo que es vital para la labor del mejorador (Forster *et al.*, 2007). Los dobles haploides han tenido un papel fundamental en la construcción de mapas genéticos de especies como la cebada, arroz, colza o trigo. Estos pueden autoperpetuarse por autofecundación, ya que mantienen las combinaciones de marcadores al ser homocigotos. Aunque en situaciones próximas a la segregación independiente sólo se obtienen estimaciones precisas de la fracción de recombinación con grandes tamaños muestrales (Nuez *et al.*, 2002), su contribución al cartografiado de marcadores genéticos llega a superar el 90% en algunas especies.

- Asociación de marcadores moleculares y caracteres fenotípicos: También son de gran utilidad para establecer asociaciones entre marcador y carácter por medio del “Bulked Segregant Analysis” (BSA). Se han empleado combinaciones de BSA y dobles haploides empleando selección asistida por marcadores para varios caracteres de mejora, principalmente en resistencias a plagas y enfermedades.

- Selección y detección de mutantes recesivos: La mutación inducida proporciona otro sistema para relacionar los genes con los fenotipos. Es importante que las poblaciones mutantes deriven de una línea pura (como un doble haploide) para evitar la detección de falsos positivos debido a la variación del material de partida. La obtención de dobles haploides también es útil para la utilización posterior de los mutantes seleccionados, ya que, al no verse afectado el fenotipo por relaciones de dominancia, los caracteres determinados por alelos recesivos pueden ser identificados fácilmente.

- Investigación genómica: Para la identificación de genes que controlan un determinado carácter, un método ampliamente utilizado es la búsqueda de ESTs (“Expressed Sequence Tags”, fragmentos del genoma que están siendo expresados en un determinado momento) y el cartografiado de su posición relativa respecto al carácter en cuestión. Los genes candidatos que son localizados en la misma posición pueden ser cartografiados físicamente utilizando genotecas BAC (genotecas de cromosomas bacterianos artificiales) y así verificar su asociación. Los dobles haploides juegan un papel muy importante en la integración de mapas genéticos y físicos, aportando precisión en la identificación de genes candidatos (Forster *et al.*, 2007).

- Transgénesis: Los dobles haploides son una poderosa herramienta para realizar un correcto proceso de transgénesis. Al transformar células haploides que posteriormente son sometidas a inducción de androgénesis se evita la presencia de hemicigotos, ya que el transgén será también duplicado al obtener el individuo doble haploide. De esta forma, se ahorra tiempo y recursos, obteniendo plantas transformadas con el transgén en ambos cromosomas homólogos.(Goedeke *et al.*, 2007, Seguí-Simarro, 2010b).

1.3.3. Métodos de obtención

Los dobles haploides pueden ser obtenidos a partir del gametofito masculino o del femenino (Dunwell, 2010). En algunas especies monocotiledóneas y en patata, ambas rutas pueden ser empleadas. Sin embargo, en la mayoría de las especies dicotiledóneas la elección se limita a una de las dos vías (Wedzony *et al.*, 2009). Los diferentes procedimientos para conseguir la obtención de individuos dobles haploides son los siguientes:

-Hibridación interespecífica: esta técnica consiste en la polinización entre gametos procedentes de especies sexualmente incompatibles, formándose de este modo un embrión por la fusión de los gametos masculino y femenino. Sin embargo, aparecen barreras de incompatibilidad post-cigótica que eliminan progresivamente los cromosomas del parental masculino, lo que da como resultado un embrión haploide con la dotación genética del gameto femenino. Al mismo tiempo, las células del endospermo se dividen con rapidez y también sufren eliminación cromosómica, lo que provoca el aborto en fases tempranas del desarrollo de la semilla, por lo que es necesario recurrir al rescate de embriones para producir la planta haploide. Es una técnica común en mejora del cereal y la patata (Wedzony *et al.*, 2009, Seguí-Simarro, 2010a).

-Ginogénesis: esta técnica consiste en la regeneración de un individuo haploide a partir de un gametofito femenino no fecundado. Las células haploides del gametofito

femenino (normalmente la célula huevo no fecundada) son estimuladas para desarrollar un embrión en un proceso similar a la partenogénesis. En este caso no se requiere la reprogramación del gametofito femenino, sino que sólo es necesario activar la ruta embriogénica sin llevar a cabo la fecundación. La técnica consiste en el cultivo *in vitro* de ovarios u óvulos inmaduros y no fecundados, de forma que se complete la maduración *in vitro* del saco embrionario, donde se desarrolla un embrión haploide. La ginogénesis también puede ser inducida utilizando polen irradiado (que ha perdido su capacidad de fecundación), con el que se poliniza el parental del cual se quieren obtener haploides ginogénicos. La ginogénesis es la técnica menos utilizada para producir dobles haploides debido a su baja eficiencia, y se utiliza mayoritariamente en especies en las que no se obtienen resultados suficientemente buenos mediante otras técnicas de obtención de Dobles haploides, como la cebolla, la remolacha, y en varias cucurbitáceas (Bohanec, 2009, Wei-ping *et al.*, 2009).

-**Androgénesis**: esta técnica permite la obtención de individuos haploides o dobles haploides mediante la regeneración *in vitro* de plantas a través de embriogénesis o callogénesis inducida partiendo del precursor del gametofito masculino, la microspora. Esta es la técnica de obtención de dobles haploides más profundamente estudiada y la que ha demostrado ser más efectiva (Wedzony *et al.*, 2009). Debido a su gran importancia, esta técnica se explica con mayor detalle en el apartado siguiente.

1.4. ANDROGÉNESIS

1.4.1. Fundamentos de la androgénesis

La androgénesis es el conjunto de vías biológicas que dan lugar a un individuo cuyo fondo genético proviene exclusivamente de un gameto masculino. Esta técnica está basada en el desvío o reprogramación de la ruta normal de desarrollo del gametofito masculino (microesporogénesis y microgametogénesis) hacia una nueva vía de desarrollo esporofítico (Seguí-Simarro, 2010b).

Hay tres rutas androgénicas que pueden originar individuos haploides o dobles haploides (Seguí-Simarro, 2010b):

-Desarrollo de un embrión haploide dentro del saco embrionario: el embrión se origina a partir de una célula huevo o cigoto donde el núcleo femenino ha sido inactivado o eliminado. Su aplicación práctica es nula, debido a su baja frecuencia (Seguí-Simarro, 2010b).

-Callogénesis derivada del meiocito: se basa en la obtención de callos haploides a partir de meiocitos. Esta ruta, también muy poco frecuente, está menos estudiada debido a que los meiocitos son células difíciles de utilizar en cultivo *in vitro* (Corral-Martínez *et al.*, 2010, Seguí-Simarro, 2010b).

-Embriogénesis o callogénesis derivada de microsporas: esta técnica consiste en la reprogramación de las microsporas, desviándolas de su ruta gametofítica hacia la embriogénesis o la callogénesis (Seguí-Simarro, 2010b). De los métodos de obtención de dobles haploides descritos anteriormente este es el más eficiente. Por ello es la técnica más utilizada para producir dobles haploides y es la empleada en este trabajo.

1.4.2. Inducción de la androgénesis a partir de las microsporas

La embriogénesis de microsporas fue descubierta de forma experimental hace casi 50 años (Guha y Maheshwari, 1964). En ella, la microspora se desvía de la ruta gametofítica y es inducida *in vitro* a formar un embrión o un callo haploide (figura 1). Para conseguir individuos haploides o dobles haploides mediante androgénesis hay dos pasos fundamentales a realizar *in vitro*: la inducción del proceso androgénico, y la regeneración de plantas a partir de los callos o embriones obtenidos. Finalmente, las plántulas obtenidas deben ser aclimatadas a las condiciones *ex vitro* (Wedzony *et al.*, 2009). Este trabajo se centrará en el estudio del proceso androgénico. Tras la exposición al tratamiento de inducción, las microsporas se desvían de su ruta gametofítica original (ruta azul en figura 4) para entrar en una de las siguientes rutas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b).

- Muchas microsporas detienen su crecimiento y/o se mueren (ruta morada figura 1).
- Algunas siguen un desarrollo similar a la maduración *in vivo* del polen, tras lo que finalmente se detienen y mueren (ruta rosa figura 1).
- Algunas microsporas que han sido inducidas generan estructuras multicelulares haploides tipo callo, que bajo condiciones adecuadas pueden originar plantas haploides/Dobles haploides a través del proceso de organogénesis (ruta verde figura 1).
- Otras microsporas inducidas sufren una serie de cambios que conducen a la formación de un embrión derivado de microspora, o MDE por sus siglas en inglés (*microspore-derived embryo*) (ruta amarilla figura 1).

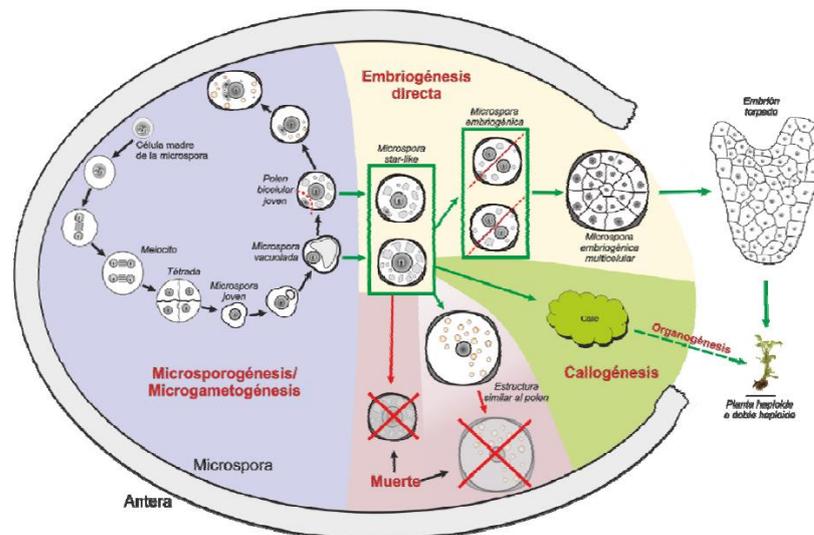


Figura 1. Esquema de la inducción de androgénesis a partir de microsporas. Adaptada de Seguí-Simarro y Nuez, 2008b.

Esta ruta alternativa del desarrollo de la microspora se puede inducir en diversas especies de angiospermas, tanto mono como dicotiledóneas, y gracias a ella se pueden regenerar plantas completas a través de embriogénesis haploide directa, o indirectamente a través de una fase intermedia de callo. Se obtendrán, por tanto, plantas haploides en las que se induce posteriormente la duplicación cromosómica (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a), o directamente dobles haploides por duplicación no inducida del genoma haploide. En ambos casos las plantas resultantes tienen un fondo genético proveniente exclusivamente de la planta donante y presentan homocigosis para el 100% de sus caracteres, es decir, constituyen líneas puras. Los dobles

haploides derivados de microsporas abren una nueva dimensión para la producción de líneas homocigotas debido a la gran cantidad de microsporas que se producen en una sola planta (Maraschin *et al.*, 2005a). Existen ya sistemas de producción de dobles haploides en más de 250 especies de interés agronómico, desde herbáceas como trigo, cebada, arroz, colza, tabaco o maíz (Maluszynski *et al.*, 2003) hasta leñosas como mandarino, naranjo amargo o alcornoque, entre otras (revisado en (Srivastava y Chaturvedi, 2008)), con eficiencia variable en los distintos cultivos.

1.4.2.1. Factores que afectan a la inducción

Hay una gran cantidad de factores que pueden afectar a la inducción de androgénesis, muchos de los cuales son todavía desconocidos (Datta, 2005). Los principales factores que se conocen dependen de la planta donante (genotipo, condiciones de cultivo y edad de las plantas), el estadio de desarrollo de la microspora y las condiciones del cultivo *in vitro* utilizadas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b).

En general, el genotipo es uno de los factores clave que controla la respuesta de la embriogénesis de las microsporas y los resultados obtenidos en el proceso son altamente dependientes de los genotipos utilizados. A parte de las diferencias entre especies, también se dan diferentes respuestas entre cultivares dentro de una especie, así como entre individuos dentro de un mismo cultivar (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). La capacidad de respuesta de un determinado genotipo viene referida tanto a la inducción de la célula haploide como a la posterior regeneración de la planta completa (Gémes-Juhasz *et al.*, 2006).

En cuanto a las condiciones de la microspora, para la mayoría de especies el estadio de desarrollo de la microspora óptimo para la inducción de la androgénesis es durante la transición de microspora vacuolada a polen bicelular joven, es decir, alrededor de la primera mitosis del polen (González-Melendi, 1996, Maraschin *et al.*, 2005a, Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). En esta etapa la microspora tiene mayor sensibilidad a la aplicación de tratamientos de inducción, ya que la célula se encuentra en un estado de proliferación y no de diferenciación completa (Dunwell, 2010).

Por otro lado, el tipo de medio de cultivo (líquido o sólido), la concentración y tipo de fuente de carbono y los reguladores de crecimiento aplicados, afectan en gran medida a la eficiencia de regeneración de embriones androgénicos (Wang *et al.*, 2000). Sin embargo, el factor exógeno más importante es la aplicación de un estrés que permita la reprogramación de las células y desvíe su ruta de desarrollo gametofítico hacia el desarrollo esporofítico. Los tipos de estrés más comúnmente utilizados son tratamientos con altas o bajas temperaturas, reducción de la fuente de carbono y adición de colchicina al medio de cultivo, pero también existen otras posibilidades como la irradiación con rayos gamma, centrifugación, reducción de la presión atmosférica, choque hipertónico o la adición al medio de cultivo de etanol, ácido abscísico o agentes feminizantes. Otros estreses que pueden dar buenos resultados, pero que han de ser probados para cada especie, son la subida del pH (8-8,5) durante cortos periodos, la adición de carragenatos al medio de cultivo y la adición de metales pesados, como el litio (Shariatpanahi *et al.*, 2006).

1.4.2.2. Metodologías de inducción

Desde un punto de vista técnico existen dos métodos para obtener individuos dobles haploides de origen androgénico a partir de microsporas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas.

- Cultivo de anteras: En este método se cultivan *in vitro* directamente las anteras sobre un medio sólido o semisólido, permaneciendo las microsporas dentro del saco

polínico. Es el método más universal para la producción de dobles haploides en plantas cultivadas y está puesto a punto en un mayor número de especies que el cultivo de microsporas aisladas. La inducción de androgénesis es más fácil de este modo, ya que la presencia del tejido de la antera en el medio de cultivo proporciona un ambiente más adecuado para el desarrollo de las microsporas (Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). Es conveniente tratar de conseguir una embriogénesis directa, para eliminar la fase de crecimiento desdiferenciado (callo) que puede promover la variación gametoclinal en los regenerantes (Forster *et al.*, 2007). Este método es más sencillo técnicamente que el cultivo de microsporas aisladas ya que requiere una menor manipulación del material vegetal. Sin embargo, la eficiencia de obtención de individuos completos suele ser menor y la mayoría de individuos obtenidos son haploides, por lo que es necesario aplicar tratamientos de duplicación artificial del genoma (Forster, Heberle-Bors *et al.* 2007).

- **Cultivo de microsporas aisladas:** consiste en aislar las microsporas de la antera y cultivarlas *in vitro* en medio líquido. Este método es más exigente, técnicamente hablando, y más complejo que el cultivo de anteras ya que requiere de técnicas adicionales como el filtrado o el centrifugado. Los medios de cultivo utilizados en este caso son también más complejos debido a la ausencia de tejido somático de la antera. A pesar de todo, el cultivo de microsporas aisladas tiene varias ventajas sobre el cultivo de anteras. Por un lado, al aislar las microsporas del resto de la antera se evita la formación de callos y embriones a partir del tejido somático de la antera y por lo tanto, la formación de regenerantes somáticos diploides (Forster *et al.*, 2007). Por otro lado, la eficiencia de obtención de dobles haploides suele ser mayor, y generalmente la duplicación cromosómica espontánea ocurre con mayor frecuencia que con el cultivo de anteras. Por último, al aislar las microsporas se evita la segregación incontrolada de sustancias producidas por el *tapetum* y otros tejidos de la antera, y por ello se puede conocer la composición exacta del medio de cultivo y controlar los factores que están influyendo en la androgénesis (Kim *et al.*, 2008). La obtención de individuos dobles haploides a partir de microsporas aisladas está puesta a punto en un número reducido de especies. Sin embargo, en aquellas especies donde ha sido puesto a punto, es el método por excelencia debido a su elevada eficiencia y a la reducción en el tiempo para obtener plantas haploides y/o Dobles haploides. Han llegado a desarrollarse protocolos para obtener dobles haploides en cultivos de microsporas de tabaco, colza, pimiento picante, patata, trigo, cebada y arroz (Forster *et al.*, 2007) (Seguí-Simarro, 2010a).

1.4.3. Ventajas e inconvenientes de la androgénesis

La androgénesis es la técnica de obtención de dobles haploides más ventajosa porque:

- Está puesta a punto en un mayor número de especies en comparación con la hibridación interespecífica y la ginogénesis.
- Su eficiencia a la hora de obtener dobles haploides es mucho mayor que con los otros métodos.
- Mediante androgénesis puede obtenerse un mayor porcentaje de individuos que duplican de forma espontánea su material cromosómico, de modo que puede no ser necesario duplicar el genoma haploide. Con la hibridación interespecífica y la ginogénesis siempre es necesario aplicar colchicina para duplicar el genoma.
- No es necesario que la floración esté sincronizada como en la hibridación interespecífica.

Pese a estas ventajas, en ocasiones la obtención de Dobles haploides mediante inducción de androgénesis puede no ser viable o aconsejable debido a algunas de las siguientes limitaciones:

- Especies recalcitrantes: aunque existen ya sistemas de producción de dobles haploides en más de 250 especies de interés agronómico, la eficiencia en la obtención de dobles haploides es todavía muy escasa (Touraev *et al.*, 2001, Palmer y Keller, 2005, Seguí-Simarro y Nuez, 2008b) excepto en especies modelo como colza, tabaco o cebada. Este hecho es aún más crítico en especies hortícolas de elevado interés agronómico como las solanáceas. De los cinco principales cultivos de solanáceas (pimiento, tabaco, patata, berenjena y tomate), sólo en el tabaco (Chupeau *et al.*, 1998, Touraev *et al.*, 2001) (Maluszynski *et al.*, 2003) y la patata (Rihova y Tupy, 1999) existen ya sistemas puestos a punto para obtener dobles haploides a partir de cultivos de anteras y de microsporas aisladas con una eficiencia aceptable. Sin embargo, el resto de solanáceas son consideradas recalcitrantes, pues aunque en algunos casos se han obtenido dobles haploides, todavía se está muy lejos de la eficiencia obtenida en tabaco o colza.

- Distorsiones en la segregación: en los procesos de androgénesis, se busca que la transmisión de los alelos de los individuos parentales hacia los descendientes dobles haploides sea realizada al azar, con el fin de lograr una máxima variabilidad que se traduzca en una alta eficiencia de los procesos de mejora. Se han detectado distorsiones en la segregación en especies como trigo, cebada, raigrás, arroz y maíz (Yamagishi *et al.*, 1996), que hacen que determinados grupos de alelos no se combinen de forma aleatoria entre sí, reduciendo la variabilidad en la descendencia. Estas distorsiones probablemente son atribuibles a marcadores ligados a genes implicados en el proceso de desarrollo gametofítico o en la fase de desarrollo esporofítico haploide (Dufour *et al.*, 2001).

- Malformaciones: la aparición de embriones con malformaciones es muy común en los procesos de androgénesis. Las malformaciones más comunes son las relacionadas con una formación deficiente del meristemo caulinar: cotiledones múltiples, soldados, etc. Pese a esto, una correcta puesta a punto de las condiciones del medio de cultivo en la fase de regeneración de embriones puede ayudar a reducir la tasa de embriones con malformaciones (Kim *et al.*, 2008, Seguí-Simarro, 2010a).

- Dificultad en la regeneración de plantas completas: en muchos casos, la regeneración de plantas completas a partir de callos o embriones androgénicos es un paso limitante en el proceso de obtención de haploides o dobles haploides. En berenjena, por ejemplo, no existe todavía un sistema verdaderamente eficiente de organogénesis a partir de callos androgénicos ni de germinación de los embriones androgénicos.

Otros problemas frecuentes son la aparición de aberraciones cromosómicas, la aparición de variación gametoclinal (o "androclonal") por mutaciones en el proceso de cultivo *in vitro* y la aparición de individuos heterocigotos, debido a la regeneración de plantas a partir de gametos no reducidos (2n).

1.5. ANDROÉNESIS EN BERENJENA

Los métodos utilizados para obtener plantas haploides en berenjena son el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas. De momento, no se ha descrito la aparición de partenogénesis espontánea que diera lugar a plantas haploides en berenjena (Rotino, 1996).

1.5.1. CULTIVO DE ANTERAS

Los primeros haploides en berenjena fueron obtenidos mediante cultivo de anteras por un grupo de investigación chino (Research-Group-of-Haploid-Breeding, 1978) y por Isouard *et al.*, 1979. Sin embargo, el trabajo de (Dumas de Vaultx y Chambonnet, 1982) estableció las bases para un protocolo reproducible para la producción de embriones haploides y la regeneración de plantas dobles haploides a partir de cultivo de anteras. En este protocolo, el método de inducción se basa en la aplicación de un tratamiento de estrés por altas temperaturas y en la aplicación de una concentración baja de 2,4-D y kinetina como reguladores de crecimiento, además de sacarosa y vitamina B12. Una vez que los embriones comienzan a desarrollarse y alcanzan el estado de torpedo, se transfieren a un medio carente de reguladores de crecimiento para asegurar una correcta germinación. Este método es la base de muchos protocolos usados con frecuencia en programas de mejora para la producción de líneas dobles haploides, adaptándolo a cultivares concretos. Actualmente ya han sido desarrolladas líneas puras dobles haploides de diversas variedades que pueden ser usadas en programas de mejora con diferentes objetivos.

Se ha demostrado que los dobles haploides pueden utilizarse para producir híbridos con mayor rendimiento (Sanguineti *et al.*, 1990), o como parentales resistentes a algunas enfermedades (Rizza *et al.*, 2002). Asimismo, se ha comprobado que el cultivo de anteras es una herramienta útil para volver al nivel diploide en híbridos tetraploides interespecíficos entre la berenjena y especies silvestres relacionadas (Rotino *et al.*, 2005). Para utilizar la obtención de dobles haploides en programas de mejora genética se necesita un alto número de plantas homocigotas, y que estas presenten una alta diversidad que permita a los mejoradores seleccionar características de interés entre ellas. Entre los dobles haploides obtenidos mediante cultivo de anteras se ha observado variabilidad tanto en caracteres cuantitativos (rendimiento, precocidad, altura de la planta, número y tamaño de los frutos...) como cualitativos (estructura de la planta, forma y color de los frutos, presencia de espinas...) lo que permite seleccionar líneas con caracteres de interés (Rotino, 1996).

1.5.2. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS

La obtención de plantas haploides y dobles haploides de berenjena mediante cultivo de microsporas aisladas fue descrita por (Miyoshi, 1996). Su autor no consiguió una embriogénesis directa, sino que regeneró plantas mediante organogénesis en callos desarrollados a partir de microsporas. Su método de inducción se basa en la aplicación de un estrés por alta temperatura y condiciones de ayuno, seguido de la incubación en un medio que contiene una baja concentración de ácido naftalenacético y de benciladenina a la misma concentración. Tras el trabajo de Miyoshi, Bal *et al.*, 2009 publicaron un método de inducción alternativo, mediante la aplicación de estrés por alta temperatura y manitol, con el que consiguieron inducir divisiones en microsporas aisladas de berenjena y obtener estructuras multicelulares, pero no obtuvieron callos ni embriones a partir de ellas. Hace poco, en nuestro laboratorio se consiguió mejorar la eficiencia de la inducción mediante la aplicación de diversos factores externos (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012). En este trabajo también se sugirió que se produce embriogénesis directa a partir de las microsporas aisladas.

Por tanto existen dos pasos limitantes en la obtención de organismos dobles haploides a partir de cultivos de microsporas aisladas de berenjena. En primer lugar, en los estadios más tempranos de la proliferación de las microsporas, estas se desarrollan para formar unas estructuras similares a embriones globulares, pero en vez de experimentar la transición de simetría radial a simetría bilateral típica de los embriones cigóticos, los supuestos embriones globulares androgénicos revierten a un estado indiferenciado formando estructuras de tipo callo. En segundo lugar, se

encuentra la dificultad en la regeneración organogénica de dichos callos para obtener plantas completas.

En nuestro grupo se ha trabajado ya en el segundo paso limitante obteniéndose resultados satisfactorios (Rivas-Sendra *et al.*, 2015). No obstante, la transición de los embriones globulares androgénicos, es un punto que todavía no ha sido estudiado y sigue siendo el principal problema en la elaboración de un protocolo eficaz para la obtención de individuos dobles haploides de berenjena. Por esa razón este trabajo se centra en el estudio del primer paso limitante, es decir, en el estudio de la transición de embrión globular a corazón, así como en el planteamiento de posibles soluciones a dicho paso limitante. Mediante la realización de un estudio a nivel histológico e histoquímico de las estructuras celulares se pretende, en primer lugar, esclarecer si dichas estructuras son embriones globulares propiamente dichos, y en segundo lugar, comprender mejor qué cambios están aconteciendo en el desarrollo de los mismos para que estos formen callos en vez de pasar al estadio de embrión corazón. En estudios previos de otras especies como *Datura innoxia* o *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1972) se consiguió facilitar esta transición aumentando la concentración de hierro en el medio de cultivo. Por esta razón planteamos la adición de hierro con el fin de comprobar si en berenjena también facilita la transición hacia embrión corazón.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar qué eventos histológicos acontecen en los embriones globulares androgénicos, con el fin de comprender por qué estos evolucionan hacia callos y no hacia embriones corazón, así como evaluar una posible solución para superar la transición de forma satisfactoria.

Para ello los objetivos concretos de este trabajo son:

Objetivo 1: Determinar y caracterizar el desarrollo de embriones androgénicos, y estudiar la histología de dichas estructuras para confirmar que se corresponden con embriones androgénicos.

Objetivo 2: Evaluar la influencia de distintas concentraciones de hierro en la transición de embrión globular a corazón en *S. melongena*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

En este estudio se utilizó la línea doble haploide de alta respuesta, DH36, desarrollada por el laboratorio de biología celular del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV).

3.2 CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS DONANTES

Las semillas se pusieron a germinar en placas Petri de 9 cm de diámetro en cámara de cultivo a 25°C, con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Cuando tuvieron dos hojas verdaderas se plantaron en semilleros de alveolos de 3x3 cm con Humin Sustrato N3, en los invernaderos del COMAV, dentro del Campus de Vera de la Universitat Politècnica de València. Más tarde se trasplantaron a macetas de 30 cm de diámetro con un sustrato de la marca Hortimix compuesto por una mezcla de turbas y otros componentes de origen vegetal. Los aportes nutricionales se realizaron por fertirrigación mediante riego por goteo, y durante todo el ciclo se utilizó luz natural, de forma que el fotoperiodo fue variable según la época del año. Las plantas fueron entutoradas y podadas regularmente para favorecer la captación de radiación solar y la aireación. Para favorecer la formación continua de yemas florales, las flores ya abiertas y los frutos cuajados se eliminaron de forma regular.

3.3 CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS

Se recolectaron manualmente las yemas florales (figura 2A) del invernadero, y se conservaron a 4°C. Para el genotipo DH36, el tamaño de antera óptimo oscila entre 5,2 y 5,7mm. Este intervalo contiene un mayor porcentaje de microsporas vacuoladas y polen bicelular joven, que son los estadios generalmente aceptados como los más adecuados para la inducción de la androgénesis (Touraev *et al.*, 2001, Seguí-Simarro y Nuez, 2008b, Seguí-Simarro, 2010a). Por tanto, se abrieron las yemas y se seleccionaron aquellas anteras con una longitud comprendida en dicho intervalo (figura 2B) para proceder a la extracción de las microsporas. A partir de este punto todos los pasos se realizaron en esterilidad y las soluciones empleadas se enfriaron previamente a 4°C para mantener el frío durante todo el proceso. Las anteras se esterilizaron por inmersión de 30 segundos en etanol al 70% seguida de inmersión en una solución de 4 g/l de hipoclorito sódico con unas gotas de Tween 20, y se hicieron 3 lavados de 2 minutos en agua destilada estéril (figura 2C). Tras un breve secado sobre un papel de filtro estéril, las anteras se depositaron en un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de agua destilada estéril y se machacaron con un émbolo de jeringuilla de 50 ml para liberar las microsporas. El contenido del vaso se filtró a un matraz de vidrio estéril de 100 ml a través de un filtro de nylon con poro de 41 µm de diámetro, por el que pasan las microsporas (que en los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular joven tienen un diámetro medio de 20 µm). Posteriormente el filtrado volvió a filtrarse del mismo modo pero esta vez empleando un filtro de nylon con poro de 11 µm (figura 2D), donde quedaron retenidas las microesporas. De este modo se reduce la cantidad de tejido proveniente de la antera. El filtro se lavó en un vaso de precipitados de 200 ml con agua destilada estéril (figura 2E), y la suspensión obtenida se distribuyó en 4 tubos de plástico estéril de 15 ml. La suspensión celular obtenida se centrifugó durante 3 minutos a 800 rpm en centrífuga Centrifriger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio y se desechó el sobrenadante (figura 2F). Las células depositadas se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril y se concentró el pellet de los cuatro tubos en uno solo. Se repitió el lavado dos

veces más para eliminar los residuos del tejido de las anteras, hasta completar un total de tres centrifugaciones. Tras la última centrifugación, el pellet se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril y se midió la concentración de células con un hemacitómetro de tipo Improved Neubauer (figura 2G). Las microsporas aisladas se diluyeron en agua destilada estéril hasta una concentración final de 500.000 microsporas/ml. Esta suspensión celular se plaqueó en placas Petri de 6 cm de diámetro (figura 2H) con un volumen de 3 ml en cada una y las placas se sellaron con Parafilm. Para inducir la androgénesis las microsporas en suspensión se incubaron en oscuridad a 35°C durante 3 días, sin aireación ni agitación (figura 2I).

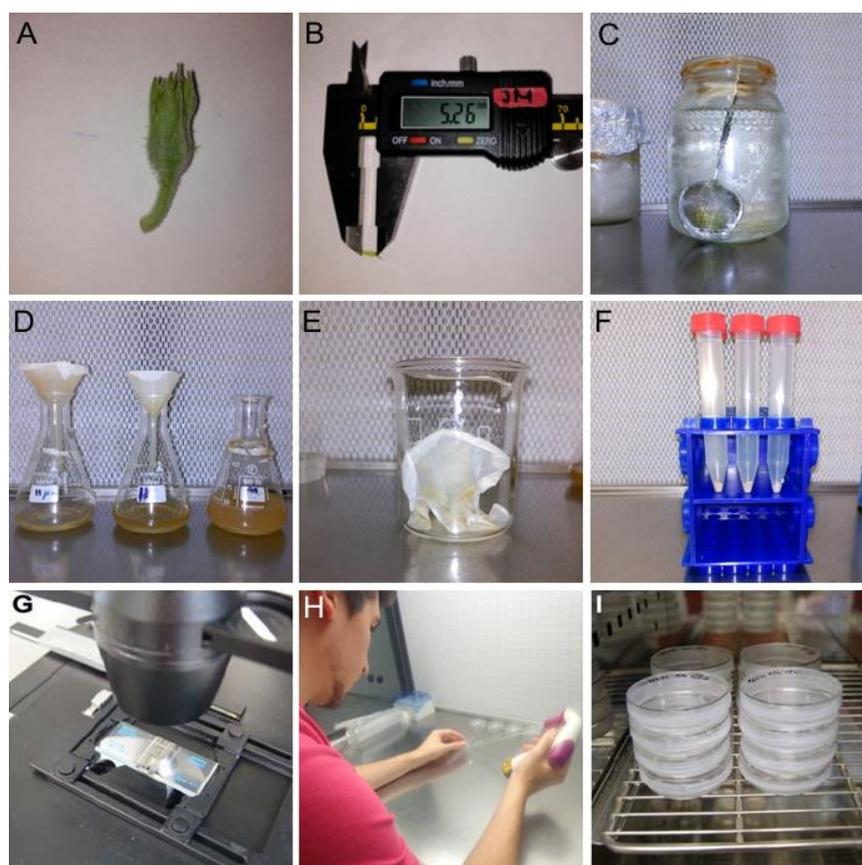


Figura 2. Proceso de extracción de microsporas aisladas.

Tras el cultivo se contó el porcentaje de microsporas en el estadio adecuado para la inducción (microspora vacuolada y polen bicelular joven), en un mínimo de 300 microsporas y 10 campos. La viabilidad de las células se comprobó justo después del aislamiento y tras el periodo de inducción. Para medir la viabilidad se añadieron 5 μ l de diacetato de fluoresceína, por cada ml de cultivo, se dejó incubar 10 minutos en oscuridad y se contó el porcentaje de células vivas en un mínimo de 200 microsporas. Aquellas microsporas que al observarlas al microscopio de fluorescencia presentan un color verde son viables.

Tras el periodo de inducción, la suspensión celular de cada placa se recogió en tubos de plástico estériles de 15 ml, se centrifugó durante 3 minutos a 800 r.p.m. en centrífuga Centrifriger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio y las células depositadas se resuspendieron en el mismo volumen de medio de cultivo compuesto por medio NLN (Duchefa Biochemie B.V.) suplementado con sacarosa al 2%, 0,5 mg/l de ácido naftalenacético y 0,5 mg/l de benziladenina, con pH 5,9 y esterilizado por filtrado con filtros Whatman Klari-Flex (GE Healthcare) de 0,22 μ m de tamaño de poro, según Miyoshi (1996). La suspensión así obtenida se devolvió a las

placas Petri. Las placas se sellaron de nuevo con Parafilm y se incubaron en oscuridad a 25°C durante 30 días.

3.3.1 Ensayos con hierro.

Para los ensayos con hierro se aplicó el mismo protocolo explicado en el apartado 3.3 para el cultivo y recultivo de microsporas aisladas, pero en esta ocasión se suplementó el medio de cultivo con FeNa EDTA hasta conseguir concentraciones de 100, 200, 400, 800, 1600 y 3200 mM.

Se prepararon 300 ml de medio NLN (el cual ya contenía en su composición una concentración de 100 mM de FeNa EDTA) siguiendo las indicaciones del apartado 3.3. Este medio es el que a partir de ahora denominamos como *Medio 1*, y que se utilizó como control sobre el cual referenciar los resultados de las demás concentraciones utilizadas. Una vez se preparó, se distribuyó en la cabina de flujo laminar 50 ml en tubos falcon distintos y se dispensaron los microlitros correspondientes de FeNa EDTA en cada uno de los medios, partiendo de un stock 0.15 M (Tabla 1).

Tabla 1. Microlitros de stock dispensados al medio NLN para obtener las 6 concentraciones de hierro a estudiar.

	<i>Medio1</i>	<i>Medio2</i>	<i>Medio3</i>	<i>Medio4</i>	<i>Medio5</i>	<i>Medio6</i>
FeNa EDTA	0(μL)	33(μL)	100(μL)	230(μL)	500(μL)	1033(μL)

Tras el recultivo se realizó un seguimiento de las estructuras que fueron apareciendo en las placas. A los 7 días se contaron los proembriones, estructuras con más de 5 núcleos que se desarrollarán más tarde en embriones globulares. Con la ayuda del microscopio invertido se contaron 15 campos a 20 aumentos de 3 placas diferentes. A los 14 días se repitió el proceso, esta vez contando los embriones globulares y diferenciando aquellos que presentaban una arquitectura normal, de los que la presentaban aberrante, en esta ocasión se contaron 20 campos a 10 aumentos en 3 placas distintas. Finalmente a los 30 días se contaron los callos obtenidos en cada una de las tres placas. Estos datos fueron procesados y analizados con el programa *StatGraphics Centurión*, realizando un ANOVA, análisis estadístico en el cual la varianza queda particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas. Este análisis estadístico tuvo dos variables, el tratamiento, correspondiente a cada uno de los medios de cultivo empleados y la sesión. Se tomó como aleatorio el efecto de la sesión y un p-value inferior a 0,05. De este modo se determinó si las diferentes concentraciones en el medio de cultivo presentaban un efecto estadísticamente significativo respecto al control en cuanto al desarrollo de los embriones y si las diferencias observadas eran debidas al medio utilizado en cada caso.

3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE DESARROLLO EMBRIOGÉNICO

Tras el recultivo se realizó un seguimiento de los cultivos con el fin de registrar los cambios observados en las microsporas tras el tratamiento de inducción. Los cultivos se observaron diariamente bajo el microscopio invertido para determinar el momento de aparición de las diferentes estructuras objeto de estudio. Las muestras se tomaron a los 14, 21, y 30 días de cultivo. A los 14 días se estudiaron los embriones globulares, a los 21 días las estructuras en transición y a los 30 días los callos.

Una vez determinados los días, se tomaron fotos de dichas estructuras y se realizaron tres procesos en paralelo con el cultivo. Una parte del mismo se fijó con paraformaldehído (PFALD) con el fin de poder procesar dichas muestras mas adelante, también se tomó una pequeña muestra del mismo para hacer una tinción con DAPI con la finalidad de observar los núcleos al microscopio de fluorescencia y descubrir divisiones mas allá de las que se observaron en el microscopio invertido. El resto del cultivo se dejó crecer más días para poder seguir la evolución de las estructuras embriogénicas.

3.4.1 Fijación de la muestra

A los 14, 21 y 30 días de cultivo se tomó una parte de las placas y se depositó su contenido, con ayuda de una pipeta pasteur de 3 ml, en el interior de un tubo de plástico de 15 ml. Posteriormente se centrifugó durante 3 minutos a 700 r.p.m. en centrífuga Centrifriger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de PFALD. La suspensión celular se pasó a un tubo eppendorf y se guardó en nevera hasta el día siguiente. Se realizaron lavados 3 con PBS 1x de 30 minutos a 4 °C. Tras el último lavado se añadió 1 ml de PBS 1x + PFALD 0,1%, ya que es aconsejable mantener de este modo aquellas muestras que no vayan a ser procesadas en un corto periodo de tiempo, evitando que la fijación revierta y se desencadenen fenómenos de degradación y necrosis celular, lo cual se evita poniendo un 0,1% de PFALD. Estas muestras fueron procesadas cuando se dispuso de muestra de todos los estadios de interés para el estudio, realizando al mismo tiempo el procesamiento de Technovit para todas ellas.

3.4.2 Inclusión de muestras en Technovit 7100

Cuando se dispuso de muestra que representase todos los estadios objetivo de estudio se procedió a la realización del procesamiento en technovit. Este es un procesamiento que duró 3 días:

- Día 1: Se realizó la deshidratación de las muestras, para ello se emplearon 3 soluciones de etanol al 30, 50 y 70%, a las muestras que hasta el momento se preservaban en PBS 1x + 0,1% PFALD se les sustituyó por etanol 30 %, para ello se le dio una centrifugación rápida al tubo eppendorf que contenía la muestra de modo que esta quedase en el fondo y se pudiese realizar con comodidad el cambio sin perder estructuras, y se dejó actuar durante 1 hora a temperatura ambiente, lo mismo se realizó con las otras soluciones. Finalmente la solución de etanol al 70 % se dejó actuar o/n a 4 °C.

- Día 2: El segundo día se prosiguió con la deshidratación de la muestra, esta vez con soluciones del 90 y 98%. Se dejó durante 1 hora actuar a la solución del 90% y se realizaron 3 incubaciones sucesivas más de 1 hora con la solución del 98%, realizando siempre los cambios de la forma anteriormente mencionada. Finalmente se dejó la muestra o/n en una solución de preparación a 4 °C, la solución de preparación consiste en 0,1 g de Hardener I por cada 10 ml de Technovit 7100 resín.

- Día 3: El tercer día se realizó la inclusión y el encapsulado, en cabina extractora para evitar la inhalación de tóxicos desprendidos por las resinas en su estado líquido. En primer lugar se depositó la muestra en capsulas (figura 3A), para facilitar el procesamiento se trabajo en grupos de 6 capsulas (figura 3B) ya que la solución de inclusión la cual consta de 0,2 ml de Hardener II por cada 3 ml de solución de preparación, polimeriza rápidamente. Tras depositar la muestra en cada capsula se añadió 0.5 ml de solución de inclusión y se puso el código identificador (figura 3C). Seguidamente se cerro la capsula con su tapa y se colocó en el interior de un

ependorf de 1 ml (figura 3D) con el fin de centrifugar durante 1 minuto a 750 rpm. Este paso es fundamental ya que al ser una suspensión celular la orientación de la muestra es muy difícil. Con esta técnica se pudo generar un precipitado en el fondo de la cápsula que facilitó el proceso de corte con ultramicrotomo. Finalmente se dejó polimerizar durante 24 horas en una gradilla evitando mover las capsulas para que no se resuspendiese el precipitado generado en su interior.

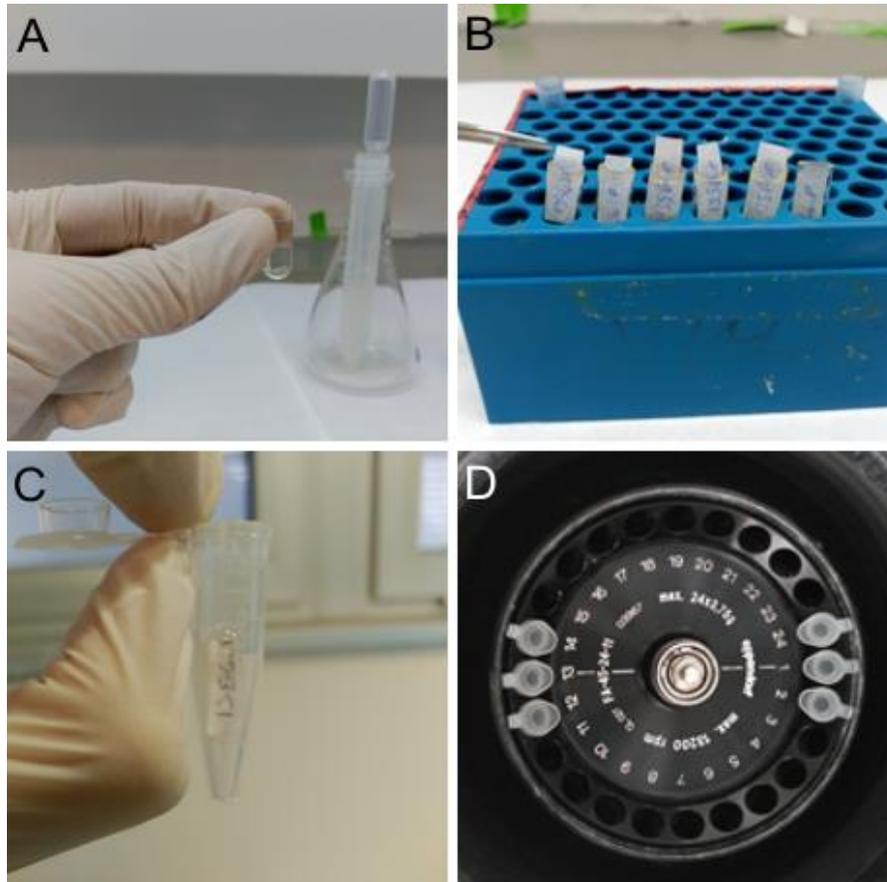


Figura 3. Encapsulación de muestras en Technovit 7100 resin.

3.4.3 Tinción con DAPI

Se tomó una muestra de 20 μ l del cultivo, se centrifugó y se desechó el sobrenadante, posteriormente se le añadió 5 μ l de DAPI 7'5 μ g/ml se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente se procedió a la toma de imágenes con el microscopio de fluorescencia.

3.5 REALIZACIÓN DE CORTES

Una vez se dispuso de muestra encapsulada, se procedió a la realización de cortes para la observación de las estructuras y sus posteriores tinciones.

Empleando una cuchilla de metal se eliminó cuidadosamente la envoltura de gelatina de la capsula. Seguidamente se procedió al desbaste del bloque ajustando el ángulo de corte a 4°. A continuación se realizó el frente. El trapecio es la forma de frente más estable, que asegura que los cortes salgan sin imperfecciones ni diferencias en su grosor. Una vez elaborado el frente se procedió a la orientación del trapecio respecto a la cuchilla. Es fundamental realizar este paso de forma correcta, de lo contrario los cortes no serán uniformes debido a que los ángulos que forma la cuchilla con el trapecio, no serán de 90°. Para la realización de una buena orientación hay que tener en cuenta las tres dimensiones del espacio, en primer lugar se debió de comprobar que la base del trapecio estaba dispuesta absolutamente paralela al filo de la cuchilla. Para la orientación de las dos dimensiones restantes, se empleó como guía la sombra proyectada por la cuchilla sobre el trapecio, comprobando, por una parte que esta tenía la misma amplitud longitudinalmente, y por otra que el tamaño de la misma se mantuvo constante al realizar un suave balanceo del brazo móvil hacia arriba y abajo.

Una vez realizada la orientación, se acercó la cuchilla tanto como se pudo al trapecio sin llegar a tocarlo, se estableció la ventana de corte indicando así donde empezaría y acabaría la muestra a cortar, para que el brazo móvil realizara su movimiento a la velocidad indicada en este tramo, mediante la activación del sistema automático de corte. En este punto se empezaron a obtener cortes que se tomaron cuidadosamente con un pelo de ceja (para evitar dañar el filo de la cuchilla con el roce) y se depositaron sobre una gota de agua en un portaobjetos, el cual se limpió antes de su uso. Una vez depositados un máximo de 6 cortes por portaobjetos, con la ayuda del pelo de ceja y los binoculares del ultramicrotomo, se extendieron correctamente, ya que en muchas ocasiones estos pueden plegarse al ser depositados en la gota.

Finalmente se depositó el portaobjetos sobre una placa calefactora a 40 °C donde con la ayuda del calor los cortes se acabaron de extender y el agua se evaporó, quedando los cortes pegados al portaobjetos, preparados para su posterior montaje con Merckoglas y observación al microscopio, o para las posteriores tinciones a los que se sometieron algunos de ellos.

3.6 TINCIONES

Una vez se obtuvieron los cortes de las diferentes estructuras, se realizaron una serie de tinciones histoquímicas. Con ello se pretendía observar que tipo de estructuras celulares presentaban en su interior. Las tinciones propuestas y su objetivo fueron las siguientes:

- **Yodo-Yoduro potásico (IJK):** Esta tinción consiste en una reacción química entre el yoduro potásico y el almidón.

La forma helicoidal de la molécula de almidón permite la acumulación de yodo en su interior, pudiéndose detectar al microscopio óptico como una coloración de azul a negra, si las moléculas son grandes, o de roja a púrpura en caso de que el polímero sea pequeño lo cual quiere decir que esta recién formado.

Para realizar la tinción en primer lugar se disolvieron 2 g de yoduro potasio en 100 ml de agua, posteriormente se disolvieron 0.2 g de yodo en la solución de yoduro potásico. A continuación se depositó una gota sobre el corte a teñir el cual se encontraba adherido por calor a un portaobjetos. Se dejó actuar durante 10-15 minutos y se lavó muy poco, simplemente se dejó escurrir la disolución de IJK y se aclaró

ligeramente con unas gotas de agua destilada, un lavado en exceso implica la pérdida completa de la tinción en el interior de las estructuras celulares. Finalmente se dejó secar al aire, nunca en la estufa debido a que en muchas ocasiones se observó la formación de cristales por la acción del calor lo cual invalida la tinción y puede dañar las estructuras. Una vez seco se montó con Merckoglas se colocó el cubreobjetos y se observó al microscopio.

- **Azul de toluidina (AT):** Se trata de un colorante capaz de teñir estructuras basófilas como la cromatina. Puede actuar como colorante ortocromático, tiñendo de color azul o metacromático, haciéndolo de color violeta-rojo, dependiendo del pH y la naturaleza química de la sustancia teñida. En este estudio, se observó que esta tinción era de gran utilidad para aumentar el contraste de las muestras, ya que se trata de una tinción bastante inespecífica con lo que tiñe de forma general la estructura mejorando en gran medida su observación al microscopio óptico. Sobre todo es útil cuando se realizó la tinción con IIK (figura 13a) ya que al aplicar dicho colorante el contraste de la muestra disminuye, por lo que una tinción con IIK se complementa realizando posteriormente una tinción con AT para poder comparar las imágenes obtenidas de las mismas estructuras. Con el IIK se detectan los gránulos de almidón, y con el AT es posible saber en que lugar de las estructuras están situados.

Se depositó una gota de AT sobre un corte adherido por calor a un portaobjetos. Se dejó actuar el colorante durante 5 minutos, y se lavó con abundante agua destilada. Se montó con una gota de Merckoglas y se observó al microscopio óptico.

- **Negro de Sudan (NB):** Se trata de un colorante relativamente termoestable con gran afinidad por las grasas, es liposoluble y se emplea para la detección de triglicéridos y lípidos en secciones o cortes. Tiñe de un color negro o azul oscuro aquellos orgánulos o estructuras que contienen lípidos en su interior.

La tinción de negro de sudan se preparó el mismo día que se empleó, ya que se trata de una disolución saturada de negro de sudan en etanol 70%, por tanto, un excesivo reposo de la misma puede dar lugar a precipitados que tendrían efectos negativos en la tinción de los cortes.

En primer lugar se preparó una disolución saturada de negro de sudan en 15 ml de etanol al 70%. Dicha disolución se filtró empleando papel wattman plegado en forma de abanico (para aumentar la superficie de filtrado). La solución obtenida se filtró de nuevo empleando una jeringuilla y un filtro de 0.22 μm . A continuación se aplicó una gota sobre los cortes que se incubaron durante 40 minutos en una cámara húmeda. Se revisaron las gotas de colorante cada 5 minutos, ya que el etanol es muy volátil y tiende a secarse rápidamente a pesar de estar en la cámara húmeda, siempre que fue necesario se añadió de nuevo colorante sobre el corte.

Finalmente se lavó el exceso de colorante empleando etanol al 96%, muy cuidadosamente ya que existe el riesgo de que los cortes se despeguen del portaobjetos. Se montó con Merckoglas y se observó al microscopio óptico.

- **Azul comassie (AC):** Es un colorante para proteínas. Es de tipo aniónico, y se une a proteínas de modo inespecífico. Su estructura es predominantemente no polar.

Para la tinción de los cortes se procedió de la siguiente forma. Se depositó el portaobjetos con los cortes adheridos por calor, en un recipiente y estos fueron cubiertos por la disolución de azul comassie. Se dejaron en agitación durante 24 horas. Pasado este periodo de tiempo se destañaron en agitación durante una hora con agua destilada. A continuación se montó con Merckoglas y se observó la muestra al microscopio.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección expondrán los resultados de este trabajo. En primer lugar se expondrá la caracterización del desarrollo embriogénico, estableciendo la cronología de la aparición de las distintas estructuras objetivo de estudio. También se estudiarán dichas estructuras a nivel histológico mediante cortes y tinciones histoquímicas. Finalmente se interpretarán los datos obtenidos tras realizar una serie de cultivos con distintas concentraciones de hierro en el medio de cultivo.

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIOGÉNICO

Tras realizar un seguimiento de los cultivos, observándolos diariamente al microscopio, se determinaron los días en los que las microsporas inducidas alcanzaban los estadios de interés para este estudio. A los 7 días se observaron unas estructuras redondeadas las cuales parecían tener más de dos divisiones al ser observadas en campo claro (figura 4A). Tras realizar la tinción con DAPI se pudo ver que en su interior había entre 5 y 10 núcleos (figura 4B). Estas estructuras se definieron como proembriones, los cuales seguirán dividiéndose para dar lugar a los embriones globulares.

Tras 14 días de cultivo, se observaron lo que parecían embriones globulares perfectamente formados (figura 4C), a primera vista parecía que presentaban una simetría radial y una epidermis periférica (lo cual se demostrara en el siguiente apartado con la observación de cortes). Tras la tinción con DAPI (figura 4D) se pudieron ver numerosos núcleos correspondientes a todas las células que conforman el embrión globular. A los 14 días también aparecieron en el cultivo callos pequeños, indicativos de microsporas que desde un principio proliferan de forma desorganizada, lejos de cualquier patrón embriogénico.

A los 21 días de cultivo, todos aquellos embriones globulares presentes en las placas empiezan a proliferar, aumentando su tamaño y desorganizándose sus células (figura 4E). Se determinó que esta transición, donde los embriones globulares en vez de alcanzar el estadio de embrión corazón se transforman en callos, suele tener lugar alrededor de este día, el 21. Tras la tinción con DAPI se pueden observar los núcleos de la estructura, sobre todo los de la periferia, ya que debido al grosor del callo, el láser no tiene la potencia suficiente como para revelar los núcleos de la zona central (figura 4F).

Finalmente a los 30 días de cultivo, se pudieron ver en las placas callos mayores de 1 mm completamente desorganizados.

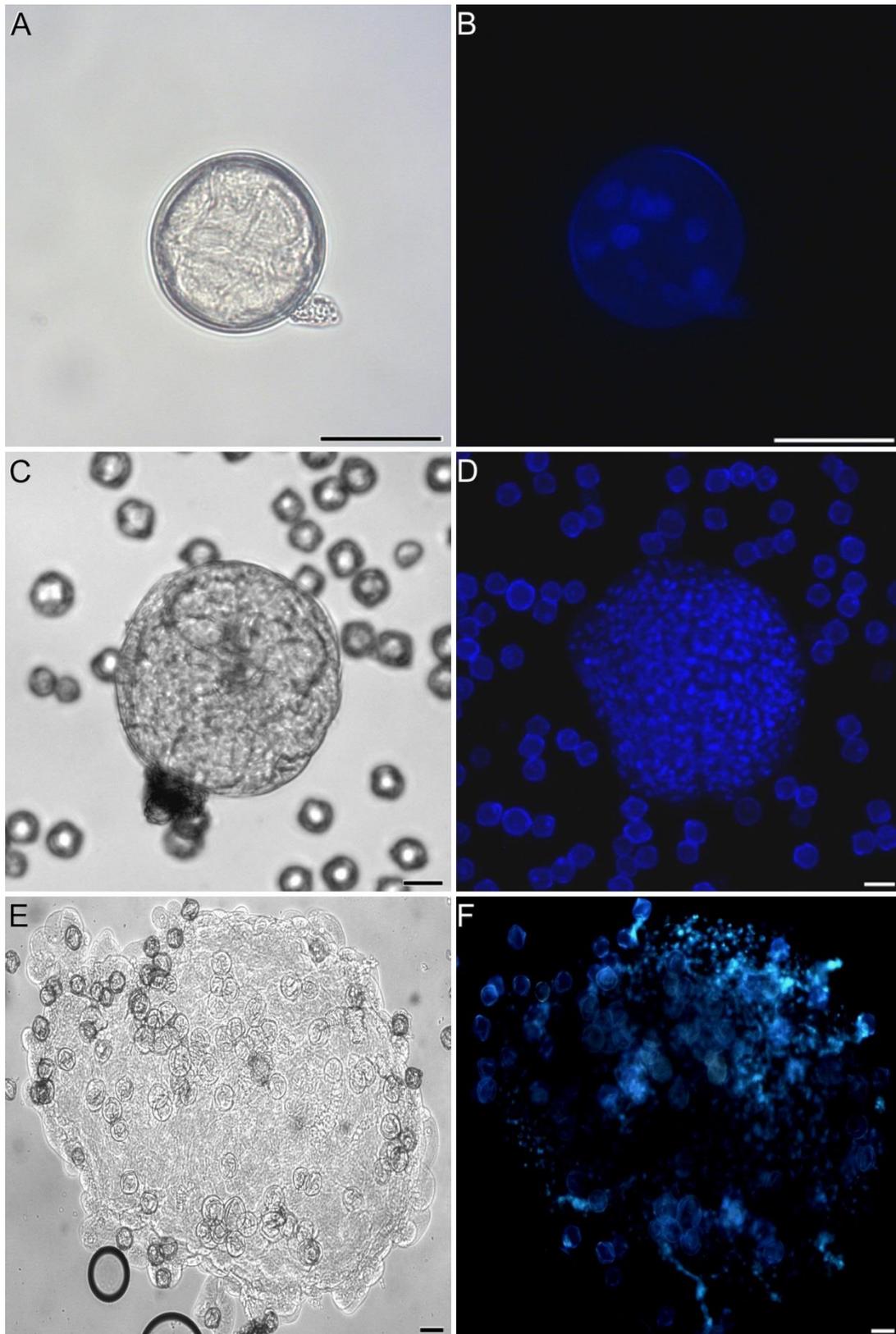


Figura 4. Proembrión de 7 días observado al microscopio en campo claro (A) y teñido con DAPI observado al microscopio de fluorescencia (B); embrión globular de 14 días observado al microscopio en campo claro (C) y teñido con DAPI observado al microscopio de fluorescencia (D); embrión en transición de 21 días observado al microscopio en campo claro (E) y teñido con DAPI observado al microscopio de fluorescencia (F); Barras: 20 μ m.

4.2 ANÁLISIS DE ESTRUCTURAS Y TINCIONES

En este apartado se estudia la estructura interna de los embriones globulares de 14 días, los embriones en transición de 21 días y de los callos de 30 días, así como su composición mediante diversas tinciones histoquímicas, con el fin de comprender mejor que procesos están teniendo lugar en las células y obtener pistas acerca de por qué estas no experimentan la transición hacia embrión globular y si hacia callo.

4.2.1 Estructuras internas

En los embriones cigóticos, desde un primer momento empieza a definirse un eje de polaridad diferenciando un polo apical y un polo basal. La polarización del cigoto es la base de su posterior desarrollo ontogénico (Seguí-Simarro, 2010b). En las primeras divisiones se obtiene como resultado una célula apical y una basal. La célula apical será la responsable del desarrollo del embrión propiamente dicho. En cambio, la célula basal tendrá una función vegetativa. La célula basal crecerá y sufrirá una serie de divisiones transversales que darán lugar al suspensor que conecta al embrión con el saco embrionario y participa en la transferencia de nutrientes (Seguí-Simarro, 2010b). Como se observa en la figura 5AB, los embriones obtenidos mediante androgénesis de microsporas carecen de suspensor. Anteriores estudios en *Arabidopsis* postulan la importancia del suspensor en el establecimiento de los patrones de división en estadios tempranos del embrión (Friml *et al.*, 2003; Weijers *et al.*, 2005, Weijers *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006), aunque otros trabajos afirman no tener pruebas definitivas que demuestren que el suspensor sea el único responsable el establecimiento de dichos patrones (Supena *et al.*, 2008). Existen otros parámetros como el balance de auxinas, necesarias en la embriogénesis, especialmente durante la transición de simetría radial a simetría bilateral en embriones globulares (Ramesar-Fortner y Yeung, 2006). La ausencia de suspensor podría ser un factor a tener en cuenta a la hora de establecer qué eventos están impidiendo una correcta transición hacia embrión corazón. Su papel en la correcta polarización podría ser importante en el proceso. También sería interesante en un futuro realizar estudios del balance hormonal en estas estructuras para ver si se corresponde con los niveles esperados.

A partir de la proliferación de la célula apical se generará el embrión propiamente dicho, sufrirá un patrón de divisiones que hará que el embrión se desarrolle como un conjunto de células esférico de citoplasma denso (Seguí-Simarro, 2010b). En *Arabidopsis*, a partir del estadio en el que el embrión globular alcanza aproximadamente 64 células, comienza el primer evento de diferenciación, la aparición del protodermo o protodermis a partir de células superficiales (Mansfield y Briarty, 1991). Como se observa en la figura 5A, esto también se cumple en los embriones androgénicos. En ellos también se observa una distribución periférica de células dando lugar al protodermo, lo que más adelante formará la epidermis. En general sus células tienen un tamaño similar con la salvedad de que conforme se observan células más periféricas, estas son más gruesas, alargadas y van estratificándose. Por lo que respecta al citoplasma se observa una densidad considerable sin apenas vacuolación, lo que indica la naturaleza eminentemente proliferante de estas células.

Los embriones en transición (figura 5B) parecen mantener aunque en menor medida la simetría radial, pero la estratificación celular va perdiéndose de forma progresiva, ya no se observa un ordenamiento de las células en la epidermis y estas

dejan de ser alargadas, transformándose en células más redondeadas, gruesas y protuberantes (figura 1C). La densidad del citoplasma también parece reducirse, apreciándose en esta ocasión vacuolas más grandes. Otra observación es la que respecta a la geometría de las células del interior de la estructura, tanto en embriones globulares como en transición son poligonales, mientras que en callos son más redondeadas. En los embriones en transición las células de la región del protodermo presentan el mismo aspecto que las células de los callos, son redondas y protuberantes, por lo que se podría decir que la transformación parece darse de fuera hacia adentro.

Es en estos estadios en los que se encuentran mas diferencias entre los embriones cigóticos y androgénicos. En los embriones cigóticos bajo el protodermo se pueden distinguir dos dominios celulares, uno superior que dará lugar al meristemo apical y los cotiledones, y otro inferior que genera el hipocotilo y el meristemo radicular (Seguí-Simarro, 2010b). La diferenciación de las células provenientes de la hipófisis (célula en contacto con el embrión y que lo une al suspensor) también contribuyen a la formación del ápice radicular. La posición relativa de los meristemos apical y radicular definirá el eje embrionario. A ambos lados del meristemo apical tendrán lugar divisiones laterales localizadas que formaran dos protuberancias las cuales formaran los primordios de los futuros cotiledones. Estos fenómenos morfogénicos hacen que el embrión cambie radicalmente su patrón de simetría y experimente la transición hacia embrión corazón, pasando de un patrón de simetría radial, a uno bilateral (Seguí-Simarro, 2010b). Posiblemente la ausencia de polaridad, junto a la falta de suspensor e hipófisis en las estructuras observadas en la figura 5CD están haciendo que el embrión no pueda experimentar el cambio al patrón de división bilateral. Este pierde la referencia que necesita para su desarrollo y las células emprenden un proceso de desorganización experimentando una transición, pero hacia callo.

En estas estructuras (figura 5E) se observa una total perdida de simetría u organización celular, las células se engrosan y proliferan dando lugar a estructuras desorganizadas. El tamaño de las células de la periferia aumenta mucho y se pierde cualquier rastro de epidermis. Por otra parte la densidad citoplasmática disminuye drásticamente observando que la totalidad del citoplasma queda ocupado por una enorme vacuola. Las células adquieren una forma completamente irregular. En esta etapa aparecen zonas en el interior de las estructuras formadas por una sucesión de células aparentemente muertas, en las que no se observa nada en su interior. Muy posiblemente, estas zonas corresponden a los primeros pasos en la diferenciación de haces vasculares similares a los descritos en callos in vitro de otras especies (Seguí-Simarro y Nuez, 2007). De hecho, en algunos casos se pueden ver engrosamientos en las paredes celulares típicos de traqueidas (figura 5F).

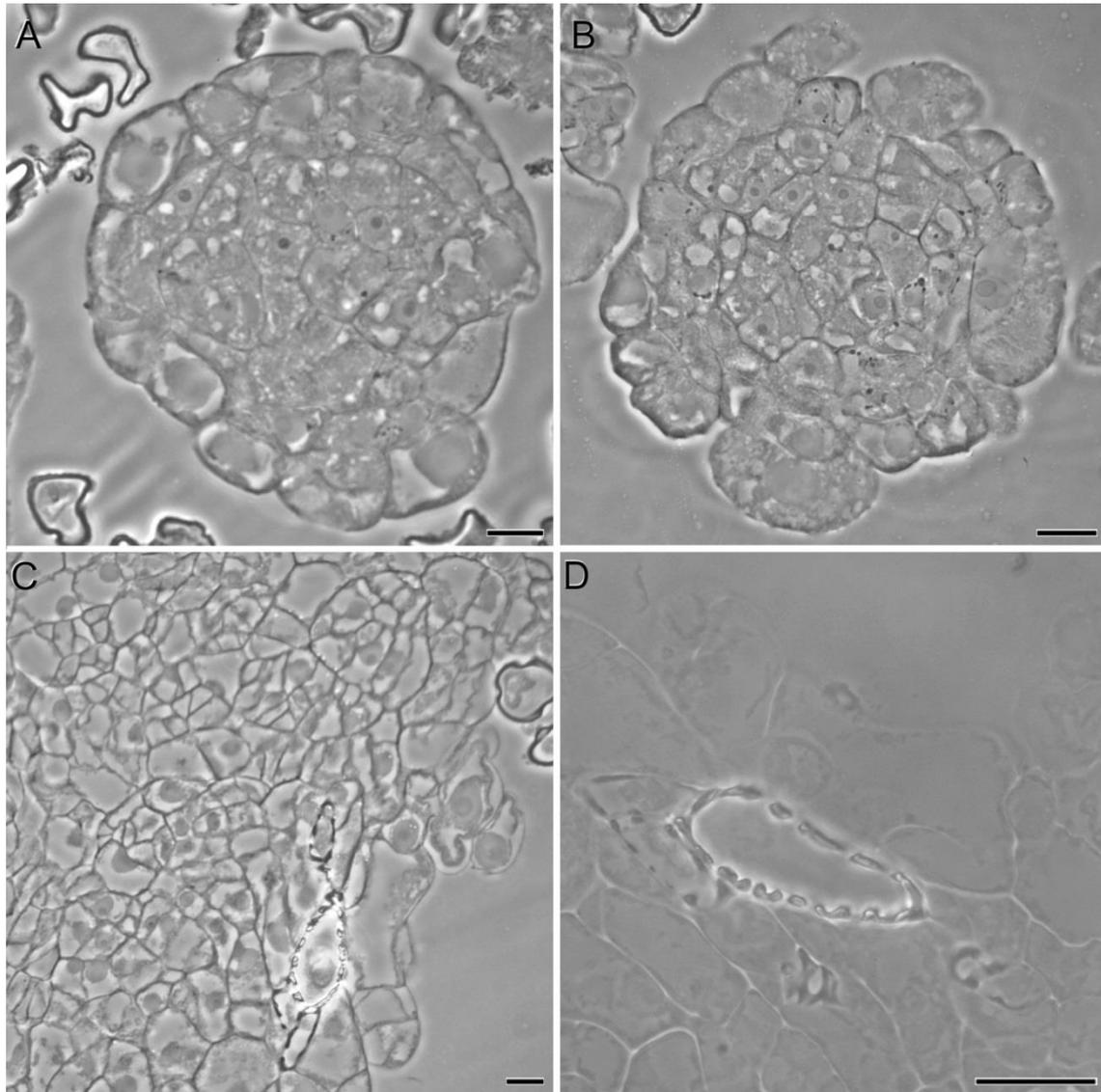


Figura 5. Embrión globular observado en contraste de fases (A); embrión en transición observado en contraste de fases (B); callo observado en contraste de fases (C); detalle de traqueida en contraste de fases (D). Barras A-B: 15 μ m, C-F: 20 μ m.

4.2.2 Presencia de almidón

Distintos estudios asocian la presencia de almidón en las células de la epidermis de los embriones somáticos con su correcta formación. (Jariteh *et al.*, 2015) observó en el nogal que los embriones somáticos que se desarrollaban correctamente eran blancos, opacos y con almidón en las capas externas, mientras que los embriones sin acumulación de almidón tenían un aspecto translúcido y eran incapaces de desarrollarse correctamente. También se realizaron las mismas observaciones en embriones de *Arabidopsis* cultivados *in vitro* (Supena *et al.*, 2008). Según Tarré *et al.*, 2004 durante la embriogénesis somática a partir de explantes de cotiledones de berenjena, se observó la presencia de abundantes gránulos de almidón en los embriones de tipo corazón, en estadios avanzados de su formación, estos gránulos se distribuían sobre todo en las células del protodermo.

Para determinar la presencia o ausencia de almidón en las diferentes estructuras androgénicas estudiadas, se utilizó una tinción con IIK sobre los cortes de las muestras incluidas en Technovit. Con esta tinción, la presencia de almidón se detecta en forma de gránulos teñidos de azul-negro o rojo-púrpura, dependiendo del tamaño de las moléculas teñidas.

Tras la tinción, se observaron gránulos de almidón en algunas estructuras de tipo polen (cabeza de flecha en figuras B, D y F). Esto es de esperar porque, normalmente, en los estadios tardíos de la microgametogénesis, el grano de polen joven empieza a acumular almidón y otras sustancias de reserva en el citoplasma de la célula vegetativa (Seguí-Simarro, 2010a). En cambio, se observó que las células de los embriones globulares (figura 6AB) y en transición (figura 6CD) no acumulan almidón ni en el interior ni en la periferia. En las estructuras de tipo callo (figura 6EF), la presencia de almidón es también muy escasa, restringiéndose a unas pocas células de las capas más externas que presentan gránulos.

La escasísima presencia de gránulos de almidón en algunas células de la periferia de los callos androgénicos de berenjena sugiere que quizás, la acumulación de almidón en la epidermis de los embriones pudo empezar a tener lugar, pero se abortó de manera temprana. Según las observaciones de los estudios anteriormente mencionados, en el desarrollo embrionario somático de nogal, *Arabidopsis* y berenjena, se produce un acumulo de almidón en las células del protodermo. En el caso de berenjena esto debería de ocurrir en estadios cercanos a la transición debido a que la acumulación máxima de almidón se observa en embriones de tipo corazón, pero según lo que se observa en la figura 6 esto no sucede en los embriones androgénicos. De acuerdo con los resultados de los trabajos previos, la ausencia de almidón en nuestras estructuras puede ser un factor que este impidiendo la evolución correcta del embrión.

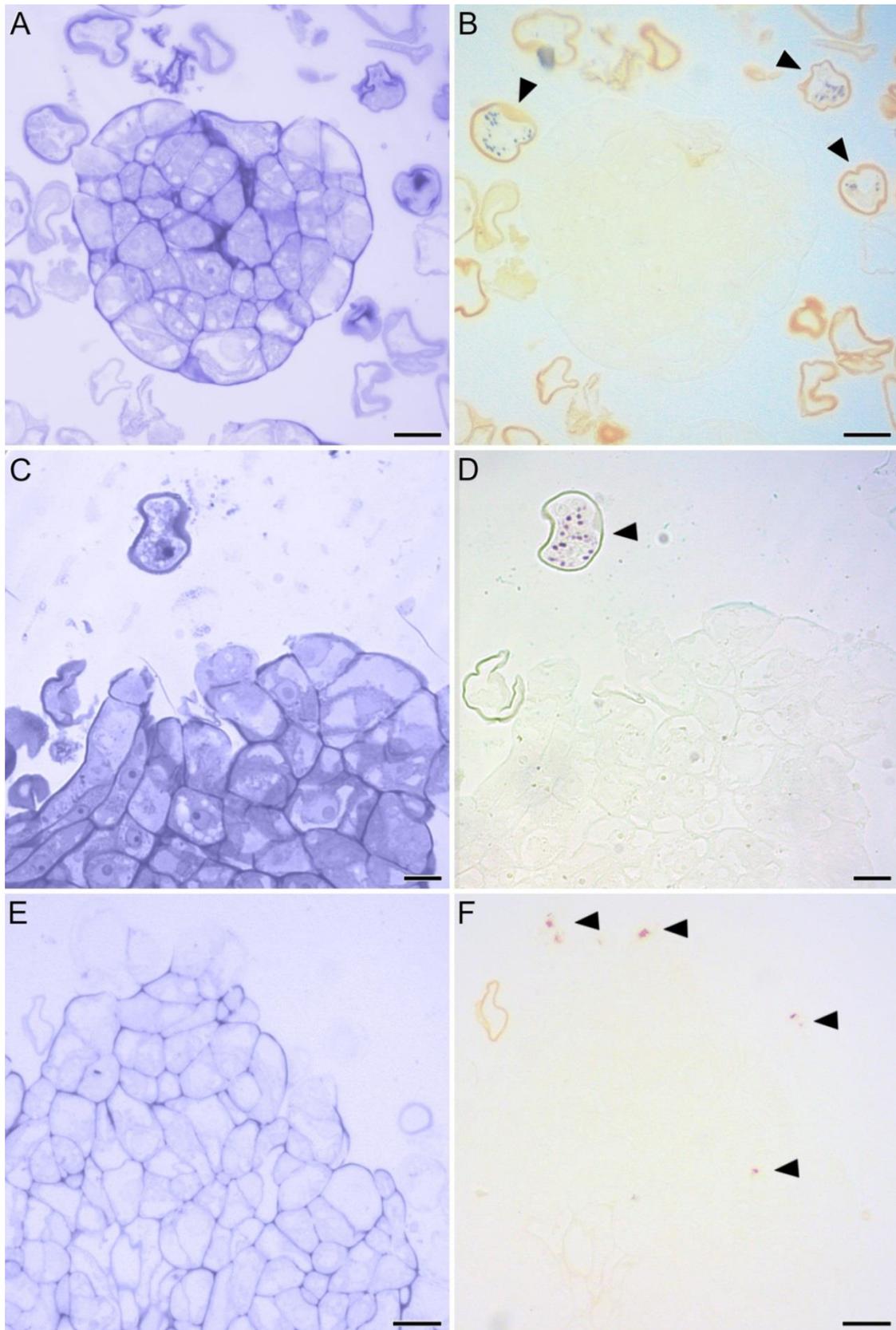


Figura 6. Embrión globular teñido con azul de toluidina (**A**) y con IIK (**B**); embrión en transición teñido con azul de toluidina (**C**) y con IIK (**D**); callo teñido con azul de toluidina (**E**) y con IIK (**F**). Las cabezas de flecha señalan los gránulos de almidón. Barras en A-D: 15 μ m, E-F: 20 μ m.

4.2.3 Presencia de lípidos

Al margen de la cantidad total de lípidos presentes en los embriones, Nehlin *et al.*, 1996 comprobaron en *Brassica napus L.* que el origen de los embriones condiciona su composición en ácidos grasos, y que ésta presenta gran variación entre embriones androgénicos, somáticos y cigóticos. También se ha demostrado en zanahoria que ciertos ácidos grasos, como el ácido petroselinico, se acumulan específicamente en embriones somáticos, y que esta acumulación específica depende mucho de los niveles de reguladores de crecimiento empleados en el medio de cultivo (Dutta y Appelqvist, 1991; Liu *et al.*, 1994). Todo esto parece indicar que existe una influencia ambiental muy importante sobre el metabolismo de los ácidos grasos durante el desarrollo embriogénico *in vitro*.

Para determinar la presencia o ausencia de lípidos en las diferentes estructuras androgénicas estudiadas, se utilizó una tinción con Negro Sudán sobre los cortes de las muestras incluidas en Technovit. Con esta tinción, la presencia de lípidos se detecta con una coloración negra de las estructuras. Se realizó un control positivo empleando cortes de semillas de colza incluidas en Technovit. El control confirmó que la tinción con Negro Sudán es capaz de marcar reservas de lípidos (figura 7).

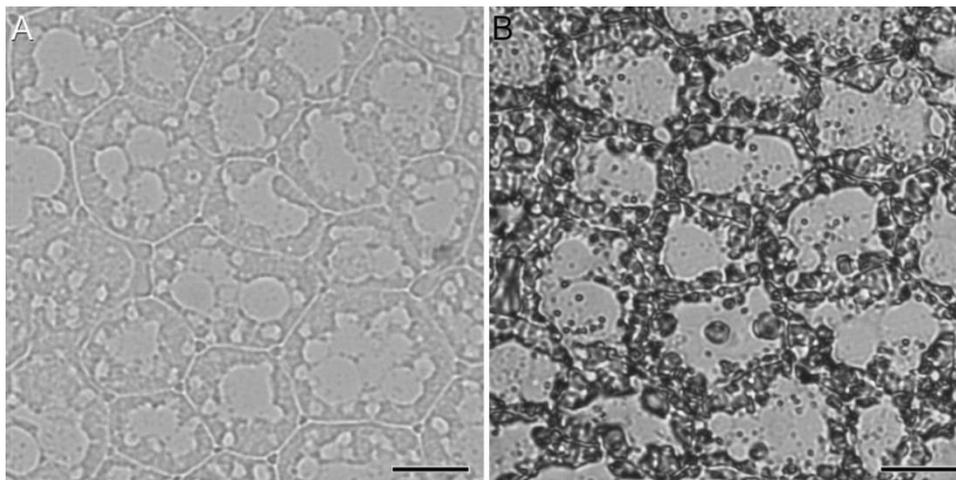


Figura 7. Semilla de colza observadas en campo claro (A) y teñidas con Negro Sudán (B). Barra de aumentos: 15 µm.

En ninguna de las estructuras androgénicas estudiadas se observan zonas claramente teñidas con Negro Sudán, por lo que se puede concluir que no almacenan lípidos en cantidades suficientes como para ser detectados con esta tinción. No obstante, sí que se puede observar como los restos de exina de las microsporas, que se desprenden al crecer las células del embrión se tiñen quedando en un tono más oscuro (flecha en figura 8B), así como la exina de las propias microsporas. Esto confirma que dichos embriones sí que provienen de las microsporas y no de posibles restos de tejido de la antera que pudiesen haber atravesado el filtro empleado durante la extracción de las microsporas durante el cultivo. Por tanto, se puede afirmar que son embriones de origen haploide obtenidos a partir de la inducción de la androgénesis en microsporas. Por otra parte la berenjena no es una especie oleaginosa por lo que es razonable no encontrar acúmulos de lípidos en su interior.

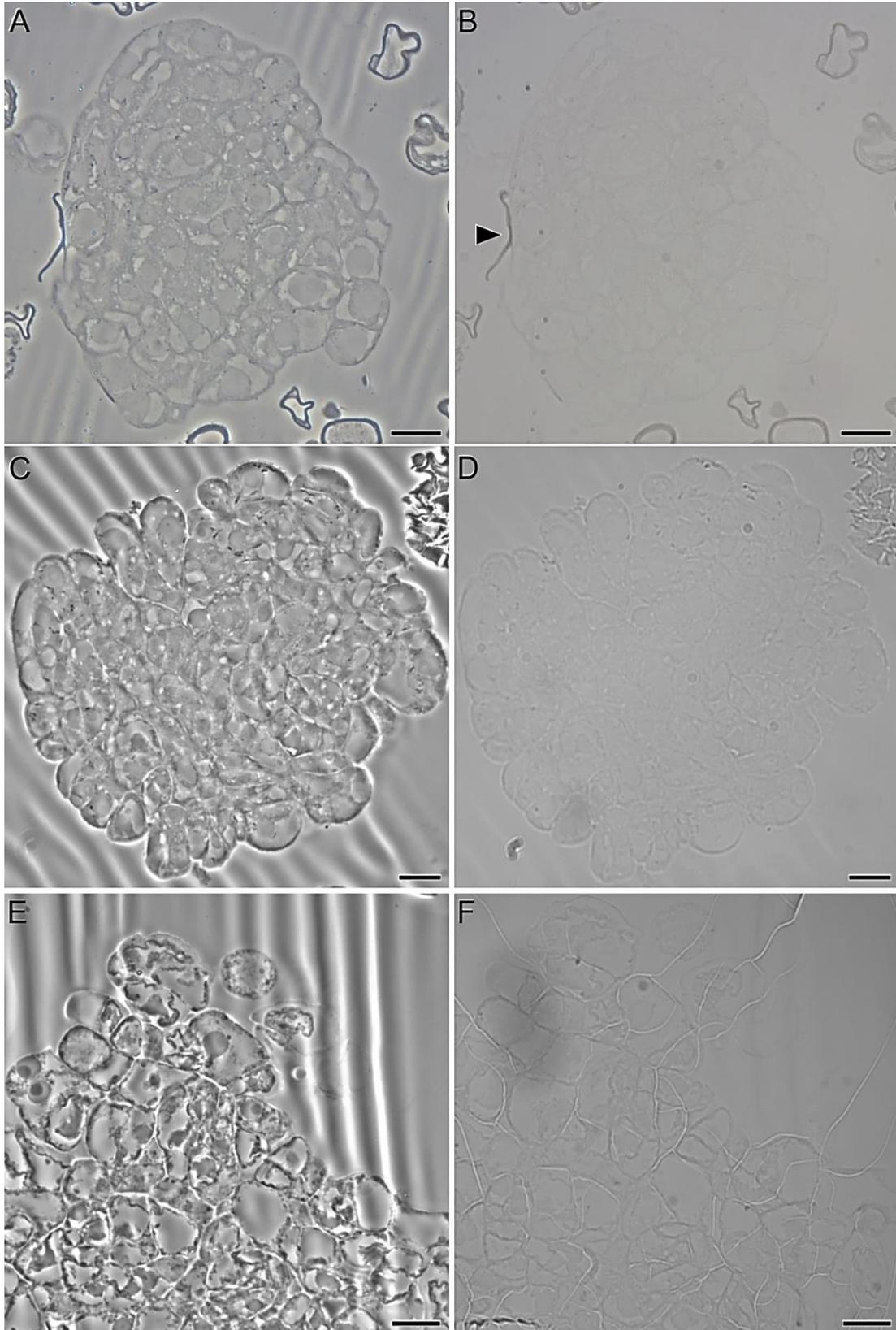


Figura 8. Embrión globular sin teñir observado contraste de fases (**A**) y teñido con Negro Sudán (**B**); embrión en transición sin teñir observado en contraste de fases (**C**) y teñido con Negro Sudán (**D**); callo sin teñir observado en contraste de fases (**E**) y teñido con Negro Sudán (**F**); Barras A-D: 15 μm , E-F: 20 μm .

4.2.4 Acumulación de proteínas

Enzimas antioxidantes como la polifenol oxidasa, peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (Jariteh *et al.*, 201); Vuosku *et al.*, 2015)) aumentan su actividad durante el desarrollo de embriones cigóticos. Otras proteínas entre las cuales se encuentran los AGPs (Pulido *et al.*, 2006), quitinasas y factores de respuesta a patógenos (Borderies *et al.*, 2004), proteínas relacionadas con el estrés como las proteínas de choque térmico (HSP) o proteínas relacionadas con el estrés oxidativo como glutatión s-transferasa (Maraschin *et al.*, 2005b), aumentan durante la inducción en procesos androgénicos. Otras proteínas que incrementan su expresión durante la inducción son proteínas con función proteolítica, como por ejemplo los componentes del proteasoma 26S o ciertas metaloproteasas involucradas en procesos de autodigestión (Maraschin *et al.*, 2005b). Más allá de cambios (aumentos o descensos) en los niveles de proteínas concretas, es un hecho bien establecido que durante la inducción de embriogénesis en microsporas de diversas especies, se produce un descenso en los niveles globales de proteínas totales citoplásmicas (Kyo y Harada, 1990; Garrido *et al.*, 1993; Rihová *et al.*, 1996). Estos descensos parecen estar causados por una serie de procesos por los que la microspora degrada y elimina proteínas y macromoléculas inicialmente destinadas a la diferenciación de la microspora hacia grano de polen, pero que en el contexto de un nuevo programa de desarrollo embriogénico, ya no son necesarias (Corral-Martínez *et al.*, 2013). Así, estos cambios en los niveles totales de proteínas citoplásmicas constituyen un buen marcador celular que, junto con otros, pueda confirmar que efectivamente se ha dado la inducción androgénica, en nuestro caso en berenjena.

Para determinar la presencia o ausencia de proteínas en las diferentes estructuras androgénicas estudiadas, se utilizó una tinción con Azul Comassie sobre los cortes de las muestras incluidas en Technovit. La presencia de proteínas se detecta en forma una fuerte coloración azul en el interior de las estructuras. En los embriones globulares se observa una fuerte tinción del citoplasma (figura 9B), sobre todo en células de la parte mas interna. Se aprecia una pérdida progresiva en la intensidad de la tinción a medida que se observan células más próximas a la periferia. Por otra parte, en embriones en transición se mantiene la coloración del citoplasma (figura 9C) aunque algo mas tenue, sobre todo en las células de la periferia donde se observa una perdida de tinción mas acentuada.

Finalmente, en los callos (figura 9F) se puede apreciar una notable disminución de la tinción del citoplasma, quedando las células coloreadas muy tenuemente de azul. También se observa, que aquellas estructuras que anteriormente se proponían como traqueidas no se han teñido, con lo se podría confirmar que son conductos vasculares tipo xilema, células que han muerto y dejan su estructura externa como conducto hueco para transportar fluidos (figura 9H).

En el caso de las estructuras androgénicas obtenidas en cultivos de microsporas de berenjena, se observa una disminución progresiva en el contenido de proteínas. La densidad del citoplasma disminuye y el tamaño de la vacuola aumenta hasta que en las células de los callos una gran vacuola ocupa la totalidad del citoplasma y la tinción con azul Comassie es muy tenue. Esto sugiere que los efectos del estrés térmico y del ayuno aplicado durante la inducción persisten en el tiempo y el descenso en el nivel de

proteínas totales observadas en las microsporas como consecuencia de la inducción continua en el desarrollo embrionario de estos embriones confirmando que estas estructuras son producto de un proceso androgénico.

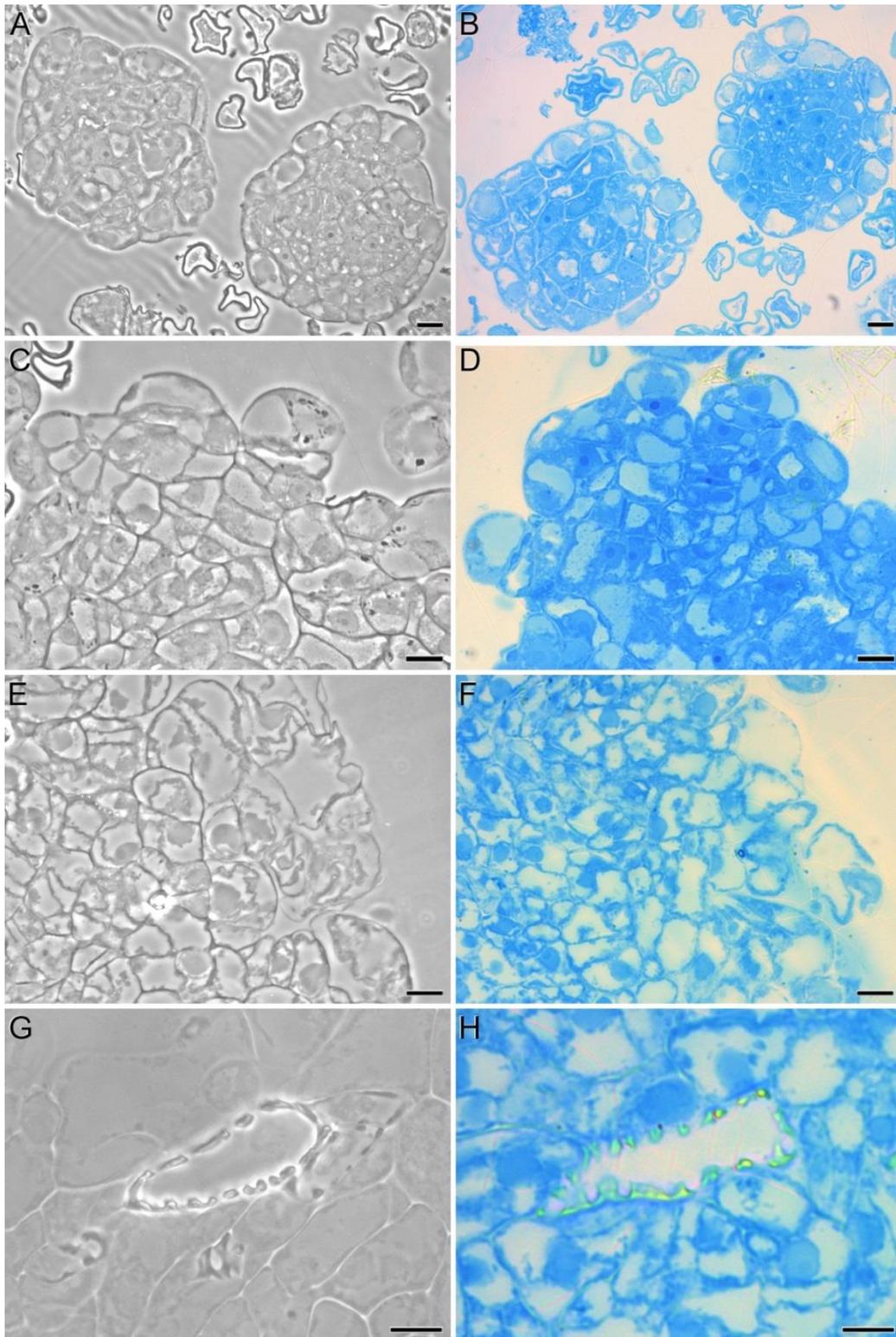


Figura 9. Embriones globulares sin teñir observado contraste de fases (A) y teñidos con Azul Comassie (B); embrión en transición sin teñir observado en contraste de fases (C) y teñidos con Azul Comassie (D); callo sin teñir observado contraste de fases (E) y teñido con Azul Comassie (F); traqueida sin teñir observada en contraste de fases (G) y teñida con Azul Comassie (H); Barras A-F: 15 μm , G-H: 5 μm .

Tras analizar la composición en almidón, lípidos y proteínas de los embriones androgénicos de berenjena y comparar los resultados con los observados en estudios anteriores se podría concluir que:

En primer lugar, el almidón tanto en los embriones somáticos de *Arabidopsis* y nogal (en su estadio de embrión torpedo), como los de berenjena (en su estadio de embrión corazón), presentan gránulos en las células del protodermo. Los embriones androgénicos de berenjena no presentan gránulos de almidón en ninguno de sus estadios, por lo que podría ser un motivo de su desarrollo anómalo y quizás podría estar relacionado con el hecho de que sean las células del protodermo en los embriones en transición las primeras que empiezan a desorganizarse.

Por otra parte, la composición en lípidos presenta una gran variación dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales, por lo que es razonable no encontrar acúmulos de lípidos en los embriones de una especie no oleaginosa como es la berenjena. Sería muy interesante en un futuro hacer un estudio más detallado en el que se comparase la composición de lípidos entre embriones androgénicos y cigóticos de berenjena, ya que con estos datos no se pueden dar más conclusiones.

Finalmente, los niveles de proteínas en nuestras estructuras experimentan una disminución. Durante los procesos de inducción las microsporas sufren un proceso de autofagia donde eliminan todos aquellos componentes que no son necesarios para el programa de desarrollo embrionario, y se registra una disminución en los niveles totales de proteínas. En este sentido, estos resultados permiten confirmar que en berenjena, el proceso morfogénico que estamos observando es efectivamente una inducción de androgénesis.

4.3 EFECTOS DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE HIERRO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE BERENJENA.

El hierro es un micronutriente esencial que juega un papel único en los procesos metabólicos. En las plantas, el hierro es empleado principalmente en los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas operando en reacciones de oxidación-reducción, entre otras (George, 1993). En estudios previos se demostró que una disminución en la concentración de hierro en el medio MS suprime temporalmente la embriogénesis (Loh y Lim, 1992).

Existen muchas evidencias que indican que el hierro tiene un papel fundamental en la embriogénesis de muchas especies. En *Pinus taeda* L. se observaron cambios estadísticamente significativos en los rendimientos de obtención de embriones cotiledonares cuando se aplicaban medios de cultivo en los que las concentraciones de boro, calcio y potasio se habían disminuido, mientras que la de hierro se había aumentado (Pullman *et al.*, 2003). También se ha estudiado el efecto del hierro en la embriogénesis somática de la cereza, demostrándose que concentraciones elevadas de hierro producen, a las 3 semanas de cultivo, un incremento del 50% en el número de embriones en el estadio cotiledonar (Gutierrez y Rugini, 2004). Otros estudios demostraron recientemente que existen distintas concentraciones de iones metálicos como el K, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu, Br y Sr en los tejidos embriogénicos durante sus diferentes estadios del desarrollo (Saha *et al.*, 2010), sugiriendo que existe una

concentración óptima de iones para cada estadio de desarrollo durante el proceso embriogénico en el medio de cultivo y que la regulación de la concentración de estos elementos es fundamental para una embriogénesis exitosa en *Plantago ovata*.

Otra evidencia de la importancia del hierro en los procesos embriogénicos es la existencia de una proteína, la proteína transportadora del hierro (ITP), que aparece en elevadas concentraciones en estadios tardíos de la embriogénesis en un gran número de especies. Dicha proteína presenta una elevada similitud con una proteína transportadora de hierro en *Arabidopsis* (Kruger *et al.*, 2002).

En el contexto de la inducción a embriogénesis de microsporas, estudios en especies relacionadas con la berenjena, como *Datura innoxia* o tabaco, demostraron que una concentración de hierro más elevada en el medio de cultivo facilitaba la transición desde embrión globular a embrión corazón (Nitsch, 1972). Tras conocer estas evidencias, se propuso realizar un experimento para evaluar los efectos de distintas concentraciones de hierro en el medio de cultivo para las microsporas de berenjena.

A los 7 días de cultivo (3 desde el recultivo), se observó que existe un aumento de las estructuras definidas como proembriones a medida que aumenta la concentración de hierro en el medio, alcanzando un máximo a 800 mM (figura 10). A partir de esta concentración empieza a caer el número de estructuras observadas.

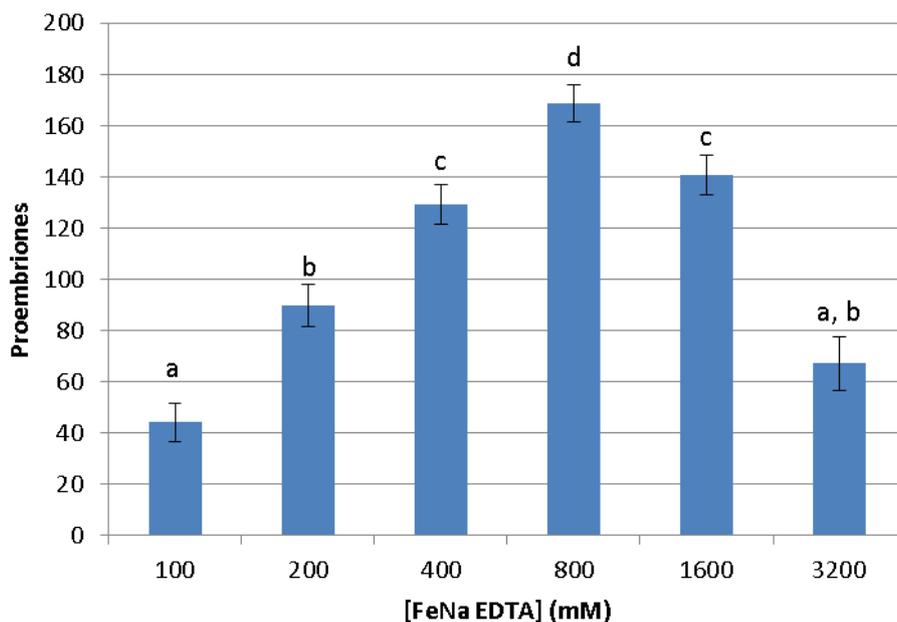


Figura 10. Número de proembriones a los 7 días de cultivo, en función de la concentración de hierro en el medio.

A los 14 días no se mantiene la tendencia por lo que respecta al número de embriones globulares anatómicamente normales (figura 11). Se observa que a 3200 mM se obtienen más que a cualquier otra concentración, pero estos resultados no son significativamente distintos de los obtenidos con las concentraciones de 800 y 1600 mM ya que están en el mismo grupo que la de 3200mM. En cualquier caso, es evidente que el uso de concentraciones altas de hierro promueve la aparición de más

embriones morfológicamente normales que en el control. A los 14 días también se analizó el número de estructuras que, en lugar de continuar como embriones, se han transformado ya en esta etapa del cultivo en callos desestructurados (figura 11). Nuevamente, no se observa la misma tendencia que a los 7 días. 3200 mM sigue siendo la concentración en la que más estructuras de este tipo aparecen, mientras que 800 mM es la que menos callos genera y menos incluso que el control. Las demás concentraciones se mantienen en un rango muy similar.

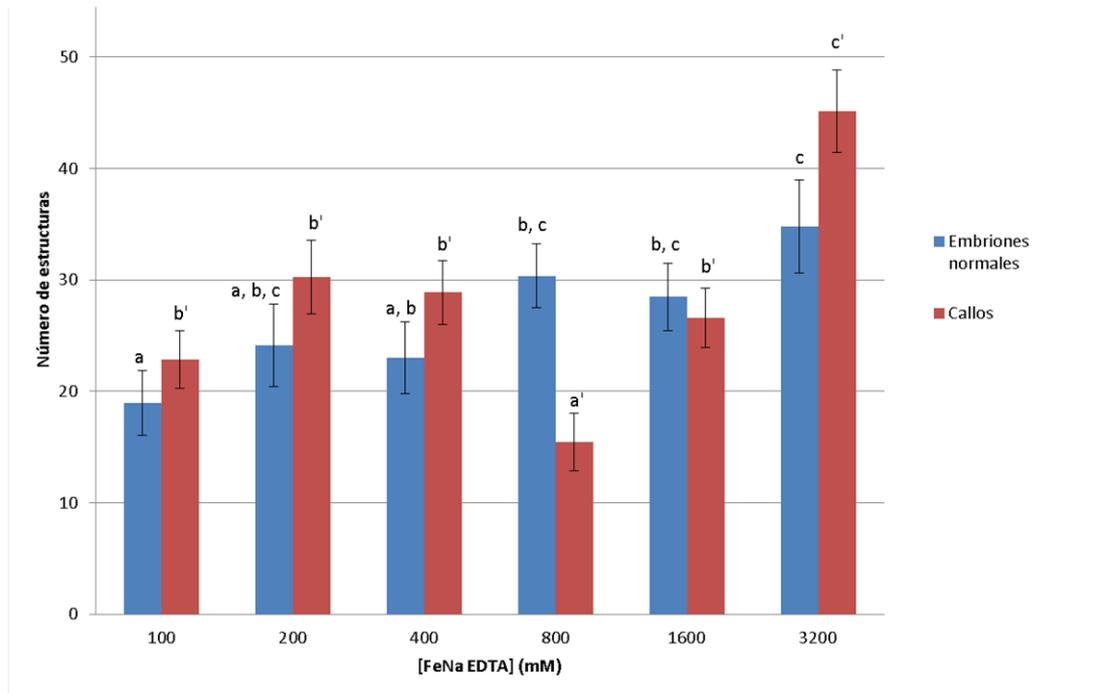


Figura 11. Resumen de las estructuras observadas a los 14 días de cultivo

Finalmente, a los 30 días de cultivo, las únicas estructuras que se observaron en cultivo a cualquier concentración fueron callos (figuras 12 y 13), indicando que en esta etapa, en todos los embriones ha tenido lugar la transformación con independencia de la concentración de hierro. Las concentraciones de 800 y 3200 mM fueron las que más estructuras generaron. Como excepción, obviamente no significativa en términos cuantitativos, se encontró un embrión cotiledonar (figura 14) en una de las placas de 3200 mM.

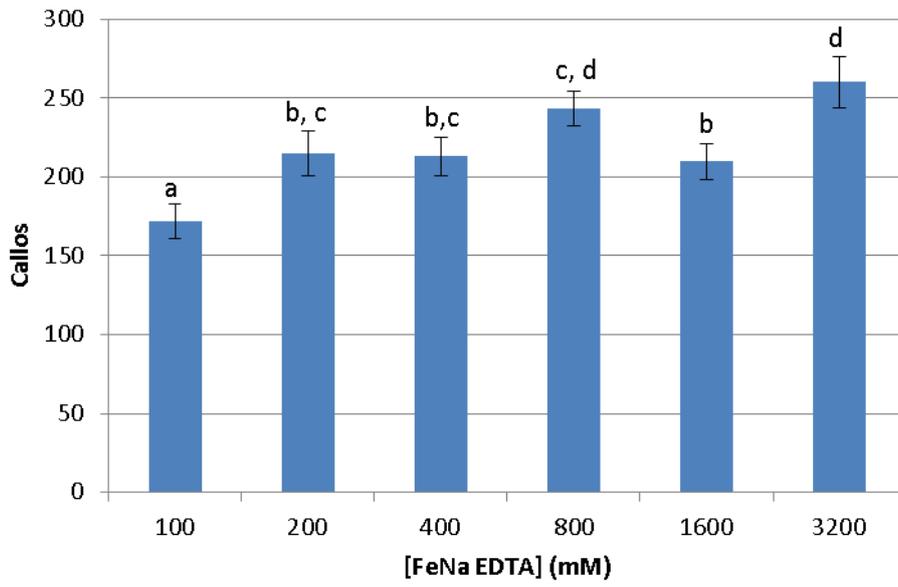


Figura 12. Número de callos a los 30 días de cultivo en función de la concentración de hierro en el medio.

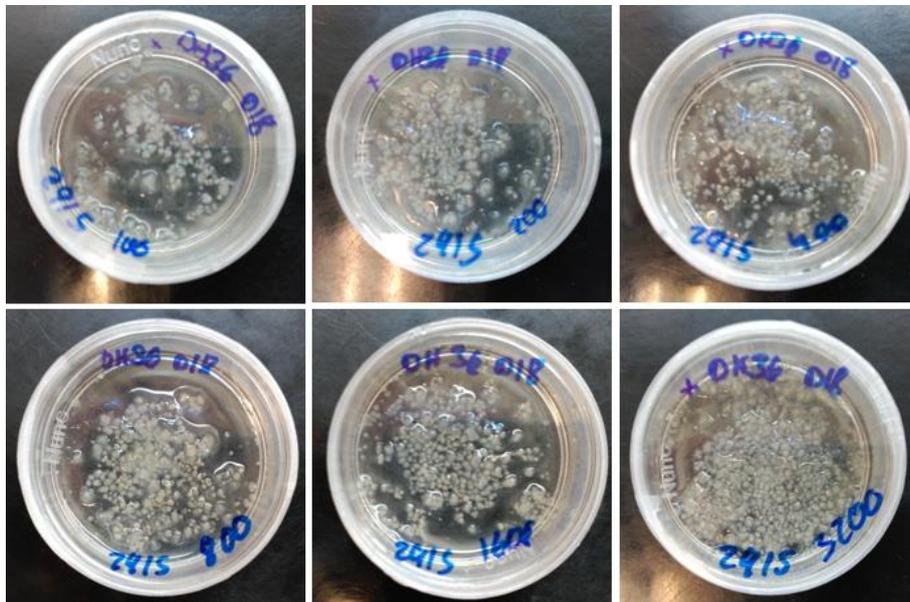


Figura 14. Callos a los 30 días de cultivo en distintas concentraciones de hierro.



Figura 15. Embrión cotiledonar a los 30 días de cultivo en la concentración de 3200 mM. Barra de aumentos: 0,2 mm.

De estos resultados podemos deducir que tras la primera semana de cultivo, el incremento en la concentración de hierro en el medio de cultivo favoreció la formación de estructuras multicelulares que acabarían dando lugar a embriones globulares, especialmente con una concentración de 800mM. Confirmándose así que el hierro tiene un papel fundamental al menos en los primeros estadios del desarrollo del embrión androgénico. Concentraciones más altas no parecen tener un efecto negativo, no han de considerarse tóxicas ya que en todos los casos se obtuvo un mayor rendimiento en embriones que en el control (100 mM), pero tampoco positivo ya que a las dos semanas no parece que el hierro mejore la evolución de los embriones globulares hacia etapas posteriores del desarrollo embrionario. Aunque sí que es cierto que de algún modo, 800 mM de hierro parece prevenir su transformación en callos. Sin embargo, al mes de cultivo todos los embriones se han transformado en callos independientemente de la concentración de hierro.

En conjunto, estos resultados indican que una concentración de 800 mM es la idónea no solo para favorecer la aparición de un mayor número de embriones, si no también para minimizar su transformación en callos. Pero a los 30 días de cultivo, el hierro no está teniendo una influencia en la aparición de estructuras derivadas de microsporas tan marcada como en otras etapas previas. Con la excepción del único embrión observado (no representativo), altas concentraciones de hierro no previenen la transformación de los embriones en callos desestructurados. Si bien altas concentraciones de hierro tienen un claro papel positivo en la promoción del embrión androgénico joven, luego el papel parece negativo, pues los resultados se igualan con los del control. Según lo planteado en el apartado 4.2.4, algunas enzimas al parecer implicadas en la inducción de la androgénesis, como las proteínas antioxidantes

(Murali *et al.*, 1996) o las metaloproteasas (Naumann *et al.*, 2007) precisan del hierro como cofactor. Un aumento del hierro en el medio de cultivo mejora la respuesta a la inducción, por lo que se podría pensar que la insuficiencia de hierro esta afectando de manera negativa a estas proteínas en estadios tempranos de la embriogénesis, de ahí que se incremente el numero de estructuras observadas a medida que lo hace la concentración de hierro.

Por último, para el futuro sería muy interesante realizar otro ensayo en el que, partiendo de un cultivo el cual se ha recultivado en medio NLN + 800 mM FeNa EDTA, se realizara un cambio de medio a los 8 días, reduciendo la concentración de hierro, con el propósito de averiguar si una disminución del hierro en el medio de cultivo en estos estadios tiene los efectos deseados para facilitar la transición de embrión globular a corazón.

5. CONCLUSIONES

1. La transición desde embrión globular hasta embrión corazón en el cultivo de microsporas aisladas de berenjena tiene lugar a los 21 días, los embriones globulares evolucionan hacia callo y no hacia embrión corazón.
2. Tras analizar los cortes de las muestras a 14 días, se puede confirmar que las estructuras que aparecen en el cultivo y que se asemejan morfológicamente a embriones globulares, son embriones globulares perfectamente formados, pero estos no presentan suspensor.
3. Los embriones androgénicos de berenjena no acumulan almidón en sus células.
4. Los embriones androgénicos de berenjena no acumulan suficientes lípidos en sus células como para ser detectados con la tinción de Negro Sudán.
5. Los embriones androgénicos de berenjena experimentan un descenso en los niveles de proteína total de interior de sus células. Este hecho confirma que el proceso morfogénico observado es una inducción de androgénesis.
6. Un incremento en la concentración de hierro en el medio de cultivo favorece la inducción, siendo 800 mM de FeNa EDTA la concentración más favorable. No obstante a las dos semanas de cultivo no parece tener efectos beneficiosos ni mejorar la transición hacia embrión corazón evolucionando todas las estructuras hacia callos a los 30 días de cultivo.

4. BIBLIOGRAFÍA

BAL, U.; ELLIALTIÖGLU, S. y ABAK, K. (2009). Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured in vitro. *Scientia Agricola*, 66: 535-539.

BEHERA, T.K.; SHARMA, P.; SINGH, B.K.; KUMAR, G.; KUMAR, R.; MOHAPATRA, T. y SINGH, N.K. (2006). Assessment of genetic diversity and species relationships in eggplant (*Solanum melongena* L.) using STMS markers. *Scientia Horticulturae*, 107: 352-357.

BOHANEK, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis, en: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Touraev, A.F., BP Jain, SM (ed.) (eds.). Touraev, A.F., BP Jain, SMial Springer. 35-46.

BORDERIES, G.; LE BECHEC, M.; ROSSIGNOL, M.; LAFITTE, C.; LE DEUNFF, E.; BECKERT, M.; DUMAS, C. y MATTHYS-ROCHON, E. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology*, 83: 205-212.

CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B.; PALACIOS-CALVO, N. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010). Androgénesis en solanáceas recalcitrantes: tomate, pimiento y berenjena., en: *Actas de Horticultura, Vol. 55*. Benavente Barzana, E. y Carrillo Becerril, J.M. (ed.) (eds.). Benavente Barzana, E. y Carrillo Becerril, J.M.ial Centro de Publicaciones del Ministerio de Medio ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, Spain, 179-180.

CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2013). Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning. *Journal of Experimental Botany*, 64: 3061-3075.

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.

CUBERO, J.I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Spain. 567 pp.

CHUPEAU, Y.; CABOCHE, M. y HENRY, Y. (1998). *Androgenesis and haploid plants*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 122 pp.

DATTA, S.K. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89: 1870-1878.

DUFOUR, P.; JOHNSON, C.; ANTOINE-MICHARD, S.; CHENG, R.; MURIGNEUX, A. y BECKERT, M. (2001). Segregation distortion at marker loci: variation during microspore embryogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 1002: 993-1001.

DUMAS DE VAULX, R. y CHAMBONNET, D. (1982). Culture *in vitro* d'anthers d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 2: 983-988.

DUNWELL, J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.

DUTTA, P. y APPELQVIST, L. (1991). Lipid and fatty acid pattern in developing seed, leaf, root, and in tissue culture initiated from embryos of *Daucus carota* L. . *Plant Science*, 75: 177-183.

FORSTER, B.P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.J. y TOURAEV, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12: 368-375.

FRIML, J.; VIETEN, A.; SAUER, M.; WEIJERS, D.; SCHWARZ, H.; HAMMAN, T.; OFFRINGA, R. y JUERGENS, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147-153.

FURINI, A. y WUNDER, J. (2004). Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*, 108: 197-208.

GARRIDO, D.; ELLER, N.; HEBERLE-BORS, E. y VICENTE, O. (1993). De novo transcription of specific mRNAs during the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sexual Plant Reproduction*, 6: 40-45.

GÉMES-JUHASZ, A.; VENCZEL, G.; SAGI, Z.S.; GAJDOS, L.; KRISTOF, Z.; VAGI, P. y ZATYKO, L. (2006). Production of doubled haploid breeding lines in case of paprika, spice paprika, eggplant, cucumber, zucchini and onion. *Acta Horticulturae*, 725: 845-854.

GEORGE, E. (1993). en: *Plant propagation by tissue culture*. Springer Netherlands. 502 pp.

GERMANÀ, M.A. (2006). Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 131-146.

GOEDEKE, S.; HENSEL, G.; KAPUSI, E.; GAHRTZ, M. y KUMLEHN, J. (2007). Transgenic barley in fundamental research and biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 1: 104-117.

GONZÁLEZ-MELENDI, P. (1996). *Caracterización in situ mediante sondas moleculares del proceso de inducción de embriogénesis del polen en Capsicum annum L.* Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. pp.

- GUHA, S. y MAHESHWARI, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- GUTIERREZ, P. y RUGINI, E. (2004). Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock 'Colt' (*Prunus avium* · *P. pseudocerasus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 79: 223-232.
- ISOUARD, G.; RAQUIN, C. y DEMARLY, Y. (1979). Obtention de plantes haploides et diploides par culture in vitro d'anthers d'aubergine (*Solanum melongena* L.). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences de Paris*, 288: 987-989.
- ISSHIKI, S.; UCHIYAMA, T.; TASHIRO, Y. y MIYAZAKI, S. (1998). RFLP analysis of a PCR amplified region of chloroplast DNA in eggplant and related *Solanum* species. *Euphytica*, 102: 295-299.
- JARITEH, M.; EBRAHIMZADEH, H.; NIKNAM, V.; MIRMASOUMI, M. y VAHDATI, K. (2015). Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122: 101-115.
- KARIHALOO, J.L. y GOTTLIEB, L.D. (1995). Allozyme variation in the eggplant, *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 767-770.
- KIM, M.; JANG, I.-C.; KIM, J.-A.; PARK, E.-J.; YOON, M. y LEE, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27: 425-434.
- KRUGER, C.; BERKOWITZ, O.; STEPHAN, U. y HELL, R. (2002). A Metal-binding Member of the Late Embryogenesis Abundant Protein Family Transports Iron in the Phloem of *Ricinus communis* L. *The journal of biological chemistry*, 277: 25062-25069.
- KYO, M. y HARADA, H. (1990). Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta*, 182: 58-63.
- LESTER, R.N. y HASAN, S.M.Z. (1991). Origin and domestication of the brinjal-eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum* in Africa and Asia, en: *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Hawkes, J.H., Lester, R.N., Nee, M. y Estrada, N. (ed.)^(eds.). Hawkes, J.H., Lester, R.N., Nee, M. y Estrada, N.ial The Royal Botanic Gardens Kew. Richmond, UK, 369-387.
- LIU, L.; HAMMOND, E. y WURTELE, E. (1994). Accumulation of petroselenic acid in developing somatic carrot embryos. *Phytochemistry*, 37: 749-753.
- LOH, C. y LIM, G. (1992). The influence of medium components on secondary embryogenesis of winter oil seed Rape, *Brassica napus Oleifera*. . *New Phytol*, 121: 425-430.
- MALUSZYNSKI, M.; KASHA, K.J.; FORSTER, B.P. y SZAREJKO, I. (2003). *Doubled haploid production in crop plants. A manual*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 428 pp.
- MANSFIELD, S. y BRIARTY, L. (1991). Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany*, 63: 461-476.
- MARASCHIN, S.D.; VENNICK, M.; LAMERS, G.E.M.; SPAINK, H.P. y WANG, M. (2005a). Time-lapse tracking of barley androgenesis reveals position-determined cell death within pro-embryos. *Planta*, 220: 531-540.
- MARASCHIN, S.F.; DE PRIESTER, W.; SPAINK, H.P. y WANG, M. (2005b). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56: 1711-1726.
- MARÍN, J. (2008). *Portagrano. Vademécum de variedades hortícolas 2007-2008*. Escobar Impresores S.L. El Ejido (Almería). 455 pp.
- MARTÍN, A. (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal, en: *Genómica y Mejora Vegetal*. Nuez, F., Carrillo Becerril, J.M. y Lozano, R. (ed.)^(eds.). Nuez, F., Carrillo Becerril, J.M. y Lozano, R.ial Mundi-Prensa. Sevilla, 37-63.
- MIYOSHI, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.
- MURALI, C.; SAMUNI, A.; TAIRA, J.; GOLDSTEIN, S.; MITCHELL, J. y RUSSO, A. (1996). Stimulation by Nitroxides of Catalase-like Activity of Heme proteins. *J Biol Chem*, 271: 26018-26025.
- NAUMANN, B.; BUSCH, A.; ALLMER, A.; OSTENDORF, O.; ZELLER, M.; H., K. y HIPPLER, M. (2007). Comparative quantitative proteomics to investigate the remodeling of bioenergetic pathways under iron deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics*, 7:
- NEHLIN, L.; MOLLERS, C.; STYMNE, S. y GLIMELIUS, K. (1996). Fatty acid composition in microspore-derived secondary embryos of *Brassica napus* L. *Plant Science Letters*, 120: 205-213.
- NITSCH, J.P. (1972). Haploid plants from pollen. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 67: 3-18.
- NUEZ, F.; PROHENS, J.; VALCÁRCCEL, J.V. y FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, P. (2002). *Colección de semillas de berenjena del Centro de conservación y mejora de la agrobiodiversidad valenciana*. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Madrid pp.
- PALMER, C.E. y KELLER, W.A. (2005). Overview of haploidy, en: *Haploids in crop improvement II*. Palmer, C.E., Keller, W.A. y Kasha, K.J. (ed.)^(eds.). Palmer, C.E., Keller, W.A. y Kasha, K.J.ial Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 3-9.
- PROHENS, J.; VALCÁRCCEL, J.V.; FERNÁNDEZ DE CÓRDOVA, P. y NUEZ, F. (2003). Characterization and typification of spanish eggplant landraces. *Capsicum and Eggplant Newsletters*, 22: 135-138.

- PULIDO, A.; BAKOS, F.; CASTILLO, A.; VALLES, M.P.; BARNABAS, B. y OLMEDILLA, A. (2006). Influence of Fe concentration in the medium on multicellular pollen grains and haploid plants induced by mannitol pretreatment in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Protoplasma*, 228: 101-106.
- PULLMAN, G.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N. y FENG, X. (2003). Lobloolly pine (*Pinus taeda* L.) somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. *Plant Science*, 164: 955-969.
- RAMESAR-FORTNER, N.S. y YEUNG, E.C. (2006). Physiological influences in the development and function of the shoot apical meristem of microspore-derived embryos of *Brassica napus* 'Topas'. *Canadian Journal of Botany*, 84: 371-383.
- RESEARCH-GROUP-OF-HAPLOID-BREEDING. Induction of haploid plants of *Solanum melongena*. Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture, 1978 Peking. Science Press, 227-232.
- RIHOVÁ, L.; CAPKOVÁ, V. y TUPÝ, J. (1996). Changes in glycoprotein patterns associated with male gametophyte development and eith induction of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum*. *Journal of Plant Physiology*, 147: 573-581.
- RIHOVA, L. y TUPY, J. (1999). Manipulation of division symmetry and developmental fate in cultures of potato microspores. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 135-145.
- RIVAS-SENDRA, A.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2015). Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 10.1007/s11240-015-0791-61-7.
- RIZZA, F.; MENNELLA, G.; COLLONNIER, C.; SHIACHAKR, D.; KASHYAP, V.; RAJAM, M.V.; PRESTERA, M. y ROTINO, G.L. (2002). Androgenic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group *Gilo* as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*. *Plant Cell Reports*, 20: 1022-1032.
- ROTINO, G.L. (1996). Haploidy in eggplant, en: *In vitro haploid production in higher plants*. Jain, S.M., Sopory, S.K. y Veilleux, R.E. (ed.)^(eds.). Jain, S.M., Sopory, S.K. y Veilleux, R.E.ial Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 115-141.
- ROTINO, G.L.; SIHACHAKR, D.; RIZZA, F.; VALE, G.; TACCONI, M.G.; ALBERTI, P.; MENNELLA, G.; SABATINI, E.; TOPPINO, L.; D'ALESSANDRO, A. y ACCIARRI, N. (2005). Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27: 723-733.
- SAHA, P.; RAYCHAUDHURI, S.; SUDARSHAN, M. y CHAKRABORTY, A. (2010). Analysis of Trace Elements During Different Developmental Stages of Somatic Embryogenesis in *Plantago ovata* Forssk Using Energy Dispersive X-ray Fluorescence. *Biol Trace Elem Res*, 135: 283-294.
- SANGUINETI, M.C.; TUBEROSA, R. y CONTI, S. (1990). Field evaluation of androgenetic lines of eggplant. *Acta Horticulturae*, 280: 177-182.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010a). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76: 377-404.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010b). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. Editorial Universitat Politècnica de València. Valencia, Spain. 464 pp.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58: 1119-1132.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F. (2008a). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F. (2008b). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 120: 358-369.
- SHARIATPANAH, M.E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E. y TOURAEV, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 519-534.
- 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*. Mujeeb-Kazi, A. y Sitch, L.A. (ed.)^(eds.). Mujeeb-Kazi, A. y Sitch, L.A.ial Mexico y Filipinas: CIMMYT y IRRI, 19-30.
- SRIVASTAVA, P. y CHATURVEDI, R. (2008). *In vitro* androgenesis in tree species: An update and prospect for further research. *Biotechnology Advances*, 26: 482-491.
- SUPENA, E.D.J.; WINARTO, B.; RIKSEN, T.; DUBAS, E.; VAN LAMMEREN, A.; OFFRINGA, R.; BOUTILIER, K. y CUSTERS, J. (2008). Regeneration of zygotic-like microspore-derived embryos suggests an important role for the suspensor in early embryo patterning. *Journal of Experimental Botany*, 59: 803-814.
- TANAKA, H.; DHONUKSHE, P.; BREWER, P. y FRIML, J. (2006). Spatiotmporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular & Molecular life science*, 63: 2738-2754.
- TARRÉ, E.; MAGIOLI, C.; M., M.-P.; SACHETTO-MARTINS, G.; MANSUR, E. y SANTIAGO-FERNANDES, L. (2004). *In vitro* somatic embryogenesis and adventitious roots initiation have a common origin in eggplant (*Solanum melongena* L.). *REvista Brasileira de botânica*, 27: 79-84.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M. y HEBERLE-BORS, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109.

- VUOSKU, J.; SUTELA, S.; KESTILÄ, J.; JOKELA, A.; SARJALA, T. y HÄGGMAN, H. (2015). Expression of catalase and retinoblastoma-related protein genes associates with cell death processes in Scots pine zygotic embryogenesis. *Plant Biology*, 15: 88-101.
- WANG, M.; VAN BERGEN, S. y VAN DUIJN, B. (2000). Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124: 523-530.
- WEDZONY, M.; FORSTER, B.P.; ZUR, I.; GOLEMIEC, E.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; DUBAS, E. y GOTEBIOWSKA, G. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants, en: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Touraev, A., Forster, B.P. y Jain, S.M. (ed.)^(eds.). Touraev, A., Forster, B.P. y Jain, S.M.ial Springer. Dordrecht, Netherlands, 1-33.
- WEI-PING, D.; YUAN-YUAN, J.; HUI, S.; XIAO-QUING, Z. y JIN-FENG, C. (2009). Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 119: 246-251.
- WEIJERS, D.; SAUER, M.; MEURETTE, O.; FRIML, J.; LJUNG, K.; SANDBERG, G.; HOOYKAAS, P. y OFFRINGA, R. (2005). Maintenance of embryonic auxin distribution for apical-basal patterning by PINFORMED-dependent auxin transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17: 2517-2526.
- WEIJERS, D.; SCHLERETH, A.; EHRISMANN, J.S.; SCHWANK, G.; KIENZ, M. y JURGENS, G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Developmental Cell*, 10: 265-70.
- YAMAGISHI, M.; YANO, M.; FUKUTA, Y.; FUKUI, K.; OTANI, M. y SHIMADA, T. (1996). Distorted segregation of RFLP markers in regenerated plants derived from anther culture of an F1 hybrid of rice. *Genes & Genetic Systems*, 71: 37-41.