

# Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural (ETSIAMN)

Grado en Biotecnología



## Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de colza (*Brassica napus* L.)

Andrés Medina Collado

Tutor: Alejandro Atarés Huerta

Primer cotutor: Vicente Moreno Ferrero

Curso académico 2015/2016

València, julio 2016



**Título:** Regeneración de plantas en cultivo *in vitro* de colza (*Brassica napus* L.)

**Resumen:** La morfogénesis *in vitro* es la base de todas las aplicaciones que se derivan del cultivo de tejidos y células vegetales. En efecto, para emplear alternativas biotecnológicas encaminadas a la producción de plantas, como la micropropagación y el saneamiento del material vegetal, o para emprender programas de mejora genética basados en la obtención de haploides y doble-haploides, el aprovechamiento de la variación somaclonal, la hibridación sexual o somática entre especies sexualmente incompatibles, así como la generación de híbridos gametosomáticos, asimétricos y cíbridos, se necesitan métodos que permitan la regeneración de plantas a partir de explantes o de protoplastos. Del mismo modo, salvo en alguna especie modelo como *Arabidopsis thaliana*, donde es factible la transformación *in planta*, la obtención de plantas transgénicas precisa de métodos adecuados para la regeneración en cultivo *in vitro*. En realidad, en este caso, se requieren métodos de regeneración mucho más eficaces porque ciertos tratamientos (e.g. infección con *Agrobacterium tumefaciens*) conducen a un descenso de la respuesta morfogenética del material vegetal. La regeneración *in vitro* se puede conseguir a través de dos vías, la organogénesis y la embriogénesis somática. En este proyecto pretendemos poner a punto un método de regeneración mediante cualquiera de estas alternativas. Conviene resaltar que, si bien se han publicado algunos artículos en los que se describen métodos de regeneración en esta especie, las eficacias no son muy elevadas y, en cualquier caso, son dependientes del material de partida. Esto hace necesario que, para cada nueva variedad, cultivar o línea con la que se quiera trabajar, sea necesario ajustar las condiciones idóneas para la regeneración. Teniendo en cuenta la problemática existente, el objetivo de este trabajo es desarrollar una metodología eficaz para regenerar plantas a partir de explantes primarios de colza para abrir una vía que permita explotar las posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro* en la mejora de esta especie.

**Palabras clave:** Organogénesis adventicia - Cultivo *in vitro* - Colza - Plantas Transgénicas

**Autor:** D. Andrés Medina Collado

**Localidad y fecha:** València, julio de 2016

**Tutor Académico:** Dr. Alejandro Atarés Huerta

**Cotutor:** Dr. Vicente Moreno Ferrero

**Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG/M:**  
Creative Commons: Reconocimiento – NoComercial (by-nc).

**Title:** Plant regeneration in rapeseed (*Brassica napus L.*) *in vitro* culture.

**Abstract:** In vitro morphogenesis is the basis of all applications derived from vegetal cell and tissue culture. Indeed, to use biotechnology alternatives aimed at plant production, as micropropagation and vegetal material sanitation, or to undertake breeding programs based on obtaining haploid and double-haploid plants, taking profit of somaclonal variation, sexual or somatic (between species sexually incompatible) hybridization, as well as for generation of gameto-somatic and asymmetric hybrids or cybrids, methods that allow regeneration of plants from explants or protoplasts are required. Similarly, except in some model species such as *Arabidopsis thaliana*, where in planta transformation is feasible, the production of transgenic plants requires regeneration methods suitable for in vitro culture. Actually, in this case, much more effective regeneration methods are required because certain treatments (e.g. *Agrobacterium tumefaciens* infection) lead to a decrease in plant material morphogenetic response. The in vitro regeneration can be achieved through two ways, organogenesis and somatic embryogenesis. In this project, we intend to develop a regeneration method using any of these alternatives. It should be noted that although some articles have been published in which regeneration methods in this species are described, the efficiencies are not very high and, in any case, are dependent on the starting material. This requires that, for each new variety, cultivar or line is needed to adjust the conditions for regeneration. Given the existing problems, the objective of this work is to develop an effective methodology to regenerate plants from primary explants of rape in order to open a path that allows exploiting the possibilities offered by the in vitro culture on improving this species.

**Keywords:** Adventitious organogenesis - *In vitro* culture - Rapeseed - Transgenic plants

## **Agradecimientos**

Este trabajo no hubiese sido posible sin la ayuda de mucha gente, citada a continuación. En primer lugar a mi madre, a la cual nunca se le agradecerá lo suficiente, a mi hermano que siempre aporta aunque no marque y al resto de mi familia. En segundo lugar, gracias Alex a los compañeros del laboratorio Marybel, Jorge, Verónica y todos los que habitan el 007.

Gracias a Carlos por ayudarme a tener claras las prioridades y a los demás *kool kidz* que durante los cuatro años de carrera han conseguido que sea un periodo digno de recordar.

Gracias a todos los que hicieron que Polonia fuese un país cálido y acogedor. A Elena por sus ánimos y hacerme apreciar las pequeñas victorias del TFG, a Irene por su incansable trabajo, a H por ser el más capo y a Fer por su sosiego.

Gracias a Luis y los chicos del Cabanyal, que ha seguido y siguen ahí.

Gracias a la gente de Ibiza y Cural de vacas, entre los que se incluyen Mom's Spaghetti, Simona, La Osa Mayor, Mrs. Brexit, la familia Fernandes al completo, Quico, Minnie y Cobra.

A toda la gente maravillosa que he tenido la suerte de conocer, que no han tenido influencia directa en este trabajo, pero sí en mí, por tanto, algo habrá quedado.

En resumen, **agradezco**.

1. Introducción.....	1
1.1. La colza y su importancia económica.....	1
1.2. Mejora genética de la colza.....	6
1.3. Fundamentos del cultivo <i>in vitro</i> .....	7
1.4. Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> a la mejora genética de la colza .....	9
2. Objetivos.....	12
3. Materiales y métodos.....	13
3.1. Material vegetal.....	13
3.2. Técnicas básicas del cultivo <i>in vitro</i> .....	13
3.2.1. Esterilización de semillas.....	13
3.2.2. Preparación y esterilización de los medios de cultivo.....	13
3.2.3. Trabajo en cabina de flujo laminar.....	14
3.2.4. Siembra y germinación.....	14
3.2.5. Condiciones de crecimiento.....	15
3.3. Estudios de patrón polisomático y del nivel de ploidía.....	15
3.3.1. Variación de patrón polisomático con el tiempo.....	16
3.3.2. Variación de patrón polisomático con la situación espacial del explante.....	16
3.3.3. Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	16
3.4. Regeneración de plantas.....	16
3.4.1. Medios organogénicos.....	16
3.4.2. Tipos de explantes.....	17
3.4.3. Evaluación de la regeneración.....	18
3.5. Enraizamiento, clonación y aclimatación.....	18
3.5.1. Enraizamiento y clonación.....	19
3.5.2. Aclimatación.....	20
3.6. Evaluación de la resistencia a la kanamicina.....	21
4. Resultados y Discusión.....	22
4.1. Esterilización y germinación de semillas de colza.....	22
4.2. Estudios sobre el patrón polisomático del material de partida .....	23
4.3. Estudio sobre la regeneración de plantas de colza.....	26
4.3.1. Eficacia de la regeneración.....	26
4.3.2. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas.....	29
4.3.3. Enraizamiento y aclimatación.....	30
4.4. Efecto de la kanamicina en explantes de colza.....	31
5. Conclusiones.....	32
6. Bibliografía.....	33

# 1. Introducción

## 1. Introducción

### 1.1 La colza y su importancia económica

El género *Brassica* es el que tiene una mayor importancia económica de toda la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*). Es un buen ejemplo de domesticación de un género vegetal, ya que dentro de este género se puede encontrar gran cantidad de especies de interés agronómico: brócoli, coliflor, repollo y coles de Bruselas (*Brassica oleracea* L.), nabos (*Brassica rapa* L.), mostaza (*Brassica nigra* L.), etc. (Rani *et al.*, 2013). Sin embargo, las especies con una mayor importancia estratégica son aquellas usadas para producir aceite vegetal, la colza (*Brassica napus* L. var. *oleífera*) y algunas líneas de *Brassica juncea* L. y *B. rapa*. Estas especies conforman el tercer cultivo en importancia para producción de aceite vegetal, solo detrás de la soja y la palma que, a pesar de tener una menor producción, se dedica casi exclusivamente a la obtención de aceite (Cardoza & Stewart 2003).

Cuando hablamos de colza nos referimos generalmente a *B. napus*, pero solo a la variedad con la que se produce aceite (*oleífera*), ya que es una especie polimórfica y tiene otra variedad (*napobrassica*) que es el colinabo. Como ya hemos explicado antes, el aceite de colza puede provenir también de *B. rapa* var. *oleífera* (mostaza de campo) y *B. juncea* var. *juncea* (mostaza marrón), que son dos especies estrechamente relacionadas con la colza, como se puede observar en la Figura 1.

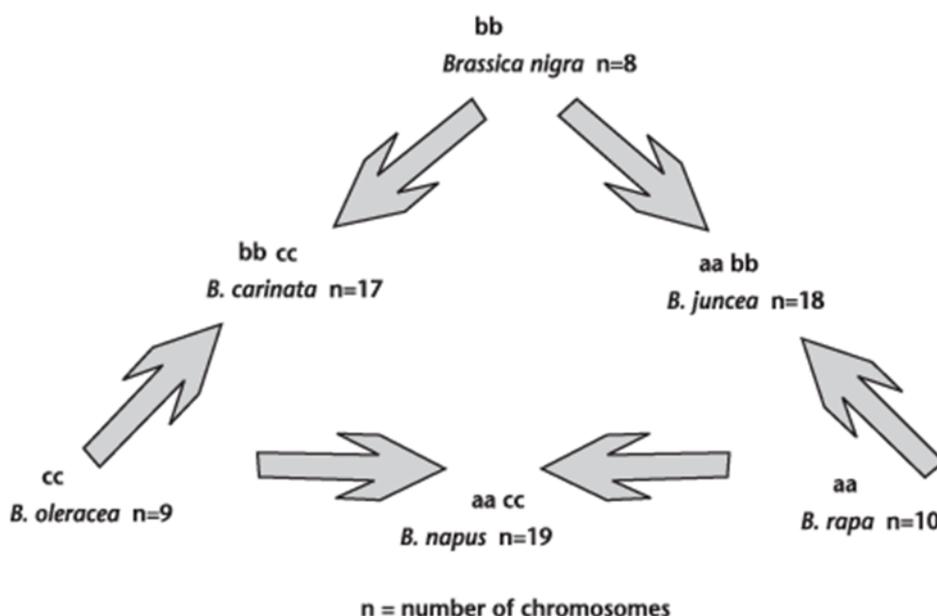


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre especies cultivadas del género *Brassica*. Se indica el número básico de cada especie y su conformación cromosómica. (Canola council of Canada I, 2016)

La planta de colza es anual o bienal, es una planta glabra, o sea, lisa y sin estructuras similares a pelos o espinas. Su raíz es axonomorfa, es decir, crece verticalmente hacia abajo y de ella parten otras raíces secundarias laterales. Su tallo crece hasta 150 cm, ramificándose sobre todo en la parte superior. Las hojas pueden medir hasta 40 cm, de color verde claro y ligeramente azulado (glauco), glabras o muy a menudo ciliadas en los nervios o márgenes. Forma racimos de 20 a 60 flores. Los pedicelos miden de 12 a 18 mm en el periodo de floración y son un poco mayores durante el periodo de fructificación. Los sépalos miden de 5 a 10 mm y son glabros. Los pétalos miden de 8 a 18 mm y son amarillos. Los frutos miden de 60 a 100 mm de longitud y de 2,5 a 4 mm de grosor y contienen de 12 a 18 semillas por lóculo. Las semillas miden de 1,2 a 1,8 mm de diámetro, son esféricas y de color pardo oscuro (Hinata & Gomez, 1980). Todo esto se ve reflejado en la Figura 2.



Figura 2. Representación gráfica de los diferentes órganos de la planta de colza (Koehler, 1897)

Las plantas oleaginosas son aquellas de cuya semilla o fruto se puede obtener aceite. La especie vegetal con mayor importancia económica en este grupo es, con mucha diferencia, la soja, de la que se produjeron en el último año cerca de 320 millones de Tm (CME group, 2016). La segunda en importancia es la planta que nos ocupa en este trabajo, la colza, de la que se producen anualmente alrededor de 67 millones de Tm, y aunque es la segunda en toneladas producidas, es la tercera especie en producción destinada a aceite, por detrás de la palma, tercera en producción total (Figura 3).

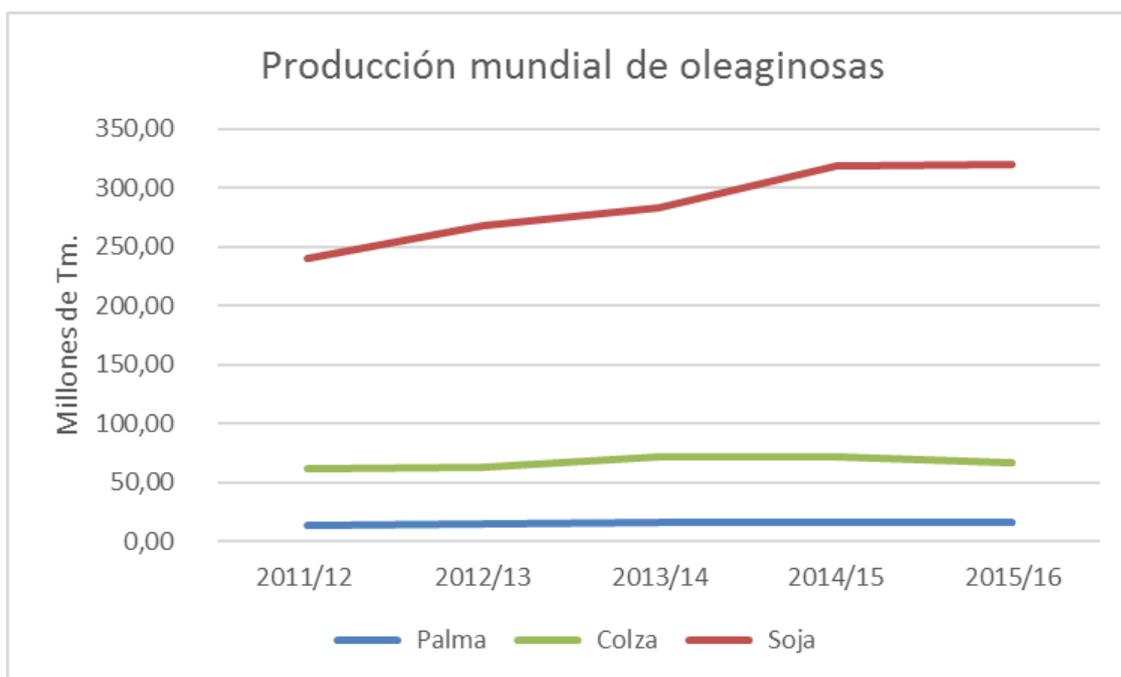


Figura 3. Evolución de la producción mundial de las principales oleaginosas en los últimos años. (USDA, 2016).

La producción de colza y sus industrias asociadas mueven casi de 50.000 millones de euros anualmente (Canola council of Canada II, 2016), especialmente en Canadá, China y la India. En Canadá, el mayor productor a nivel mundial (Figura 4) (Statista I, 2016), la colza da trabajo a 249.000 personas, sobre todo en la parte oeste del país, que es donde más se cultiva.

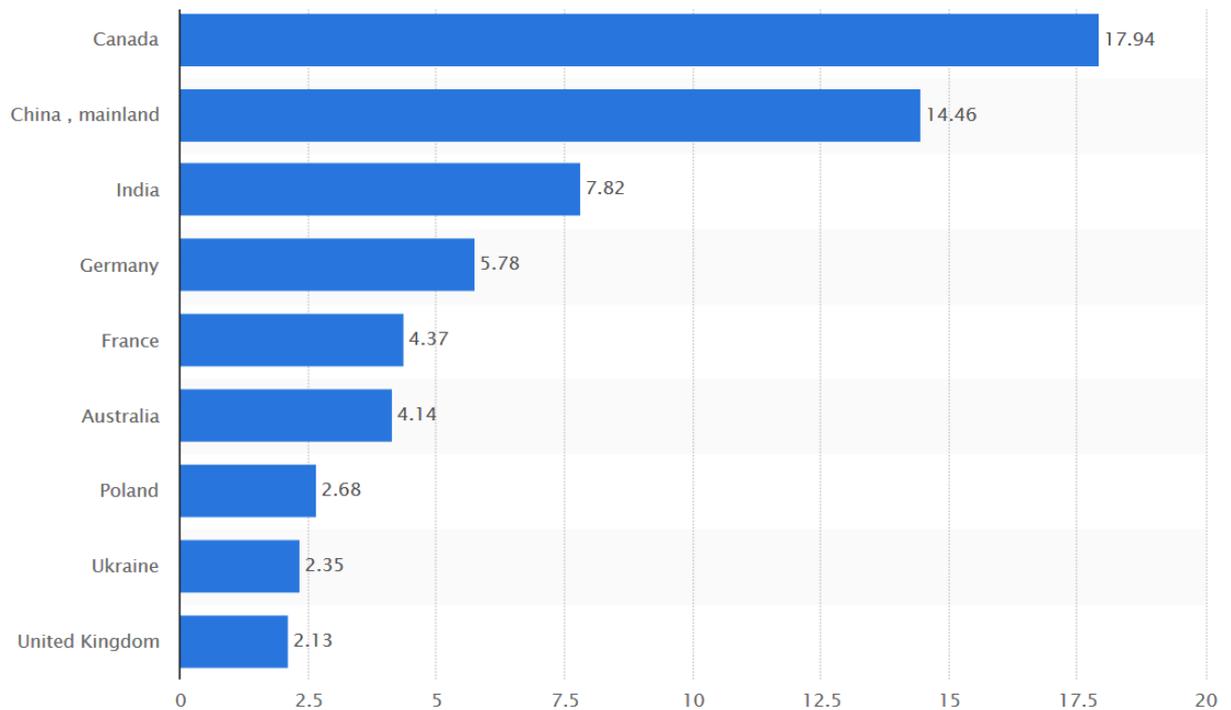


Figura 4. Producción mundial de colza por países en millones de Tm (2013).

La extensión de terreno dedicada a plantaciones de colza en España es de 66.563 hectáreas, casi la mitad, 27.165 hectáreas en la comunidad autónoma de Castilla y León. Estos territorios son idóneos para este cultivo ya que el frío favorece el desarrollo de las raíces. Se siembra en otoño, porque las plantas no soportan menos de  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta que tienen tres meses, después soporta hasta  $-15^{\circ}\text{C}$ . La colza es el segundo cultivo en extensión de semilla oleaginosa en el territorio español, solo detrás del girasol. No obstante, en la última campaña la superficie de girasol se ha reducido cerca de un 5%, en cambio, la superficie de la colza superará en casi un 60% a la campaña anterior, y comparado con el año 2010 la colza ha cuadruplicado su superficie (Figura 5). Una de las causas del ascenso de la colza con respecto al girasol es que el cultivo de este último puede reducir su rendimiento hasta el 30% por golpes de calor y falta de precipitación en primavera, condiciones cada vez más frecuentes.

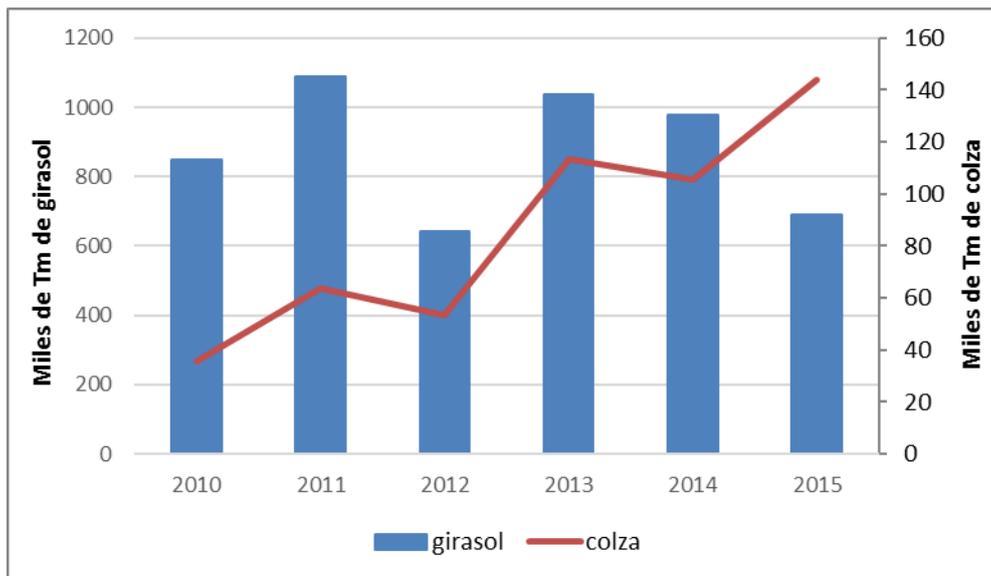


Figura 5. Tendencia de la producción de girasol y colza en España (MAGRAMA, 2015).

Históricamente el aceite de colza se había producido principalmente como lubricante de maquinaria debido a los altos niveles de glucosinolato, un agente astringente que hacía el aceite desagradable al gusto. Además, el aceite contenía niveles de ácido erúrico que podían causar lesiones cardíacas (Charlton *et al.*, 1975).

La primera variedad de lo que fue llamado Canola (por CANada Oil Low Acid), o sea, aceite canadiense con baja concentración de ácido erúrico fue desarrollada en 1974 por la Asociación Canadiense de la Colza (Rapeseed Association of Canada) y era de la especie *B. napus*. Se continuó en los años posteriores el desarrollo de otras variedades de Canola, tanto a partir de *B. napus* como de *B. rapa*, lo que llevó a la colza a ser el cultivo más provechoso en Canadá (Canola council of Canada, 2015). En la actualidad, para que un aceite pueda ser etiquetado como Canola oil debe cumplir que haya sido extraído de semillas del género *Brassica* (*B. napus*, *B. rapa* o *B. juncea*), su contenido de ácido erúrico sea menos del 2% del conteo de ácidos grasos totales y contenga menos de 30 micromoles de glucosinatos por gramo de residuo sólido (Canola council of Canada, 2015). La canola también se llama colza doble 0, cero glucosinatos y cero ácido erúrico. A pesar del desarrollo de líneas de calidad Canola de otras especies, *B. napus* es la especie con mayor importancia para la producción de aceite de colza.

En España el aceite de colza se usa para cocinar, así como para la producción de margarina. De todos los aceites comercializados en la actualidad, es el que tiene un menor contenido en ácidos grasos saturados, solo el 7% (Canola council of Canada, 2015). De la colza se obtiene también alimento proteico muy adecuado para la fabricación de piensos para ganado, estos piensos resultan más respetuosos con el medio ambiente ya que el ganado alimentado de colza muestra una reducción en la producción de

metano con respecto al alimentado a partir de soja (Gidlund *et al.*, 2015). Otra utilidad que se le da al aceite de colza es de componente en la fabricación de tintas, compuestos farmacéuticos y cosméticos (Cardoza & Stewart, 2006). En los últimos años se han estado llevando a cabo estudios para utilizar el aceite de colza en la producción de biocombustibles, que están siendo muy demandados por la disminución de las reservas de combustible fósil (Murphy, 1999). Por todas estas características nutricionales y aplicaciones el consumo de aceite de Canola a nivel mundial se ha incrementado gradualmente con el paso de los años (Figura 6) (Statista II, 2016).

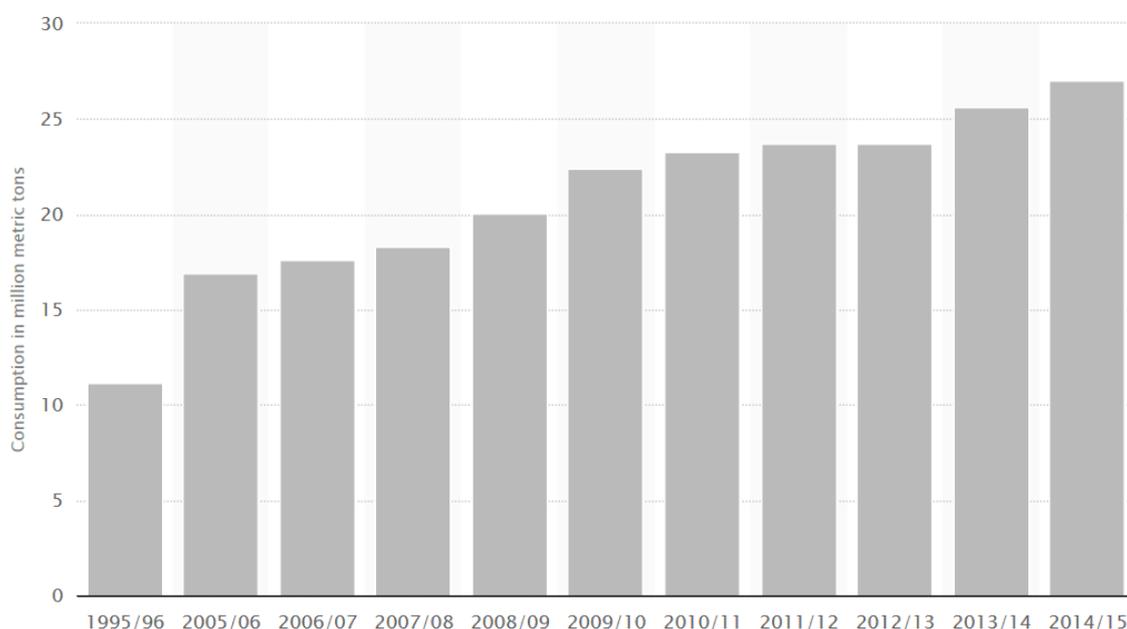


Figura 6. Consumo anual de aceite de colza (canola oil) en Tm.

## 1.2. Mejora genética de la colza

La colza, como otros muchos cultivos, tiene una serie de problemas o limitaciones que se pretende superar. Ante estas barreras se han empleado soluciones tanto por métodos agronómicos como desde el punto de vista de la mejora genética.

Con la mejora de la producción, se busca que ésta sea cada vez mayor o que se necesite menos recursos para mantenerla. Un ejemplo de mejora de la producción es el desarrollo de los cultivares élite mediante procesos de selección de las plantas más productivas. Fue mediante estos métodos mediante los que se desarrollaron variedades como la Westar, una de las más productivas y más extensamente cultivadas (Klassen *et al.*, 1987)

Otro aspecto clave que se pudo modificar mediante la mejora de la colza fueron los altos niveles de glucosinolatos y ácido erúxico (Canola council of Canada, 2015). Para ello se pusieron en marcha programas de mejora por selección recurrente. En este método se llevan a cabo ciclos alternantes de selección y cruzamiento. Con la selección se consigue elevar la frecuencia de genes favorables en la población de plantas a mejorar y con el cruzamiento de las mejores plantas entre sí, se mantiene cierta variabilidad genética que permite obtener las mejores combinaciones génicas. En el caso de selección recurrente intrapoblacional se busca mejorar el comportamiento dentro de una población dada. Para realizar la selección de las semillas cuyo aceite poseía las cualidades deseadas se implantó la llamada mejora de media semilla (half-seed breeding) que aprovechaba que las semillas de colza tienen dos cotiledones para analizar el que no tiene el embrión por cromatografía de gases mientras se reserva el otro con el embrión para plantar solo los que tienen una composición adecuada.

Otro problema que se busca superar es el efecto de estreses bióticos, es decir, causados por seres vivos, que van desde la vulnerabilidad a plagas como gorgojos o pulgillas, hasta enfermedades causadas por hongos como el pie negro de la colza o la podredumbre gris (*Botrytis cinérea* Pers.). Se abordó mediante mejora tradicional la enfermedad del pie negro de la colza (*Phoma lingam* P.Karst.) una enfermedad que se presenta cuando hay rocío o lluvia y las temperaturas están cercanas a los 15-18 °C. Este hongo tiene una permanencia en el suelo de 3 años por lo que se intenta evitar la repetición del cultivo en este tiempo. Se ha logrado transferir la resistencia a esta enfermedad de variedades de invierno europeas a variedades de primavera. Dado que la resistencia está ligada a la vernalización se hicieron cruces recíprocos para estudiar la herencia de este carácter (Light *et al.*, 2004).

Por último, este cultivo se ve sometido a diferentes estreses abióticos, los cuales son causados por condiciones climatológicas y del terreno, y comprenden la sequía, las inundaciones, la salinidad o el frío.

### 1.3. Fundamentos del cultivo *in vitro*

Los orígenes del cultivo *in vitro* se remontan a 1904, cuando Hännig desarrolló un nuevo método de cultivo vegetal llamado cultivo de embriones, en el que aislaba embriones inmaduros *in vitro* y de ellos se obtenía plántulas viables de varios miembros de la familia de las crucíferas. A partir de 1920 se desarrollaron cultivos muy diversos, desde la siembra *in vitro* de semillas, cultivo de callos y cultivo de órganos de plantas entre otros. Después de 1945 todos estos tipos de cultivo se clasificaron conjuntamente como cultivo de tejidos vegetales (Pierik, 1997).

El cultivo *in vitro* de plantas tal y como lo conocemos hoy en día se define como el cultivo en un medio con nutrientes, en condiciones de

esterilidad, de plantas enteras, semillas, embriones, órganos, explantes, tejidos, células o protoplastos de plantas superiores. Por tanto, en estos cultivos se mantienen libres de hongos, bacterias y cualquier otra plaga que pueda atacar al cultivo. El cultivo *in vitro* se puede desarrollar a escala macroscópica con explantes o a escala microscópica con protoplastos. En cualquier caso, las alternativas metodológicas que ofrece este conjunto de técnicas permiten abordar objetivos imposibles de alcanzar por otras vías o alcanzarlos en un menor tiempo que el que sería necesario de otra forma.

Algunas de las aplicaciones que ha hecho posible el cultivo *in vitro* son la multiplicación vegetativa, el saneamiento de plantas enfermas y la mejora genética mediante diversas alternativas. Para propagar una planta en poco espacio y en condiciones axénicas se utiliza el cultivo *in vitro*, o más concretamente la técnica de micropropagación. De esta forma se pueden obtener copias genéticas de la misma planta mediante propagación clonal, es decir, cultivando explantes con meristemos preexistentes. Una de las aplicaciones de esta técnica es la conservación de germoplasma de las especies con dificultad para la obtención de semilla.

Las plantas que se obtienen mediante el cultivo *in vitro* gozan por lo general de un mejor estado sanitario que las plantas que se obtienen por métodos de propagación vegetativa tradicionales (esqueje, injerto, etc.). Además se han desarrollado técnicas como la de cultivo de meristemos o el microinjerto que han permitido la obtención de plantas libres de virus a partir de plantas infectadas.

Por otra parte se han desarrollado técnicas basadas en el cultivo *in vitro* que han permitido la mejora genética de muchas especies vegetales. Esta mejora se ha llevado a cabo desde diferentes frentes, desde el aprovechamiento del aumento de la variabilidad genética debida a la variación somaclonal (que es causada por el cultivo de tejidos), hasta el rescate de embriones de cruces interespecíficos para superar las barreras de incompatibilidad sexual y conseguir de ese modo nuevas fuentes de variabilidad. Otro avance en la mejora al que se ha llegado mediante el cultivo *in vitro*, es la obtención de plantas haploides a partir del cultivo de anteras, microesporas, óvulos u ovarios. Tras la obtención de plantas haploides se puede conseguir la duplicación cromosómica, por ejemplo con colchicina, y de esta forma obtener doble haploides. Estas plantas tienen mucho interés en mejora ya que son líneas puras que se pueden obtener más rápidamente que mediante un programa de autofecundaciones sucesivas. Por último, la transformación genética también parte de las técnicas de cultivo *in vitro* y resulta de gran utilidad debido a que permite la transferencia controlada de uno o pocos genes que pueden añadir alguna característica deseable a las plantas transgénicas sin modificar todo el genotipo previamente mejorado.

Pero ninguna de las aplicaciones previamente nombradas serían posibles sin la morfogénesis *in vitro* la cual es la base de todas ellas, desde

las alternativas biotecnológicas encaminadas a la producción de plantas, hasta las de saneamiento y gran parte de las metodologías dirigidas a la mejora genética. Para todas estas técnicas es vital contar con métodos para la regeneración de plantas a partir de explantes o protoplastos. La regeneración *in vitro* se puede dar por dos vías diferentes, por un lado la organogénesis (axilar o adventicia) y por otro lado la embriogénesis somática, ambas vías mediadas por el efecto de fitohormonas, produciendo la división y desdiferenciación celular de modo que adquieran competencia morfogénica e inicien órganos para su posterior desarrollo. La organogénesis adventicia en concreto permite la formación de yemas y brotes a partir de explantes sin meristemos preexistentes, por otra parte la embriogénesis somática es la formación de embriones completos en tejidos somáticos.

#### 1.4. Aplicaciones del cultivo *in vitro* a la mejora genética de la colza

Dada la importancia económica que tiene la colza y el incremento en el consumo de su aceite, se está llevando a cabo cada vez más investigación para mejorar las características de esta planta. Una de las ventajas de utilizar la transformación genética como método para introgresar un carácter es que se logra el objetivo de forma más rápida que por métodos tradicionales (para introgresar un gen usando técnicas de hibridación y retrocruces sucesivos son necesarias un mínimo de 8 a 10 generaciones (Cardoza & Stewart 2006).

Algunos avances aportados por las técnicas de cultivo *in vitro* a la producción de colza son, por ejemplo, los obtenidos mediante rescate de embriones combinado con el método de retrocruces por Beversdorf y Kott (1987) que consiguieron de este modo introgresar caracteres de alto valor añadido, entre otros, la resistencia a triazina, la base de muchos herbicidas comerciales. Otro ejemplo de mejora de colza mediante métodos de cultivo *in vitro* es la transmisión del sistema *Ogu* CMS, uno de los más utilizados sistemas de androesterilidad, por fusión de protoplastos de *Brassica napus* con *Raphanus sativus* L. (rábano japonés) donde fue descrito originalmente (Yamagishi & Bhat, 2014). La androesterilidad es de mucha utilidad cuando se quiere usar una planta como parental femenino en un cruce. También se han desarrollado avances importantes en mejora mediante el cultivo *in vitro* microsporas, para la producción de doble haploides. Esta técnica se ha visto mejorada gracias al uso de citometría de flujo, que permite observar en qué tanto por ciento de células se ha producido correctamente la duplicación del material genético (Takahira *et al.*, 2011).

Mención aparte merecen los avances obtenidos mediante transformación de plantas de colza. En 1995 la empresa Monsanto registró la primera variedad transgénica de *B. napus* cv Quest resistente al glifosato, desde entonces se ha avanzado mucho en este campo. Actualmente, en

Canadá, el primer país en producción de colza hay 32 variedades genéticamente modificadas en el mercado, la mayoría de las cuales han introducido resistencia a herbicida (glifosato principalmente). Otras con control de la polinización mediante androesterilidad, y unas pocas con ambos caracteres. Además la transformación genética se está utilizando para aportar a las planta otros caracteres, como son, resistencia a insectos y enfermedades, así como para incrementar la producción de aceite o su calidad. Concretamente los trabajos de Zhong y colaboradores (1997) produjeron líneas de colza resistentes al herbicida bromoxinilo, que actúa inhibiendo la fotosíntesis, mediante la introgresión del gen BNX. Otros trabajos en este campo a herbicidas han conseguido líneas resistentes a glufosinato y sulfunilurea (Quing *et al.* 2000, Blackshaw *et al.*, 1994). Se calcula que en Canadá las líneas de colza resistentes a herbicidas produjeron un beneficio (directo e indirecto) de cerca de 1.2 billones de dólares anuales de 2005 a 2007 (Gusta *et al.* 2011). Otro campo en el que la transgénesis ha tenido importancia ha sido en el desarrollo de resistencias a estreses bióticos, como las plagas. Una de las vías que se ha estudiado para controlar las plagas ha sido sobreexpresar el gen de la proteína Bt, la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* mediante la incorporación del gen Cry1A(c) (Wang *et al.* 2005). Estas plantas transgénicas mostraron alto nivel de resistencia contra la plaga testada (*Plutella maculipennis*). Otro de los caminos desarrollados para solucionar este tipo de problemas fue el de introducir en la colza un vector binario que contenía esporamina y quitinasa, que confería a la colza una resistencia dual a insectos y enfermedades (Liu *et al.* 2011).

Se han desarrollado también mediante transgénesis modos de alterar las concentraciones de los diferentes ácidos grasos en las semillas. Esto es posible gracias al silenciamiento de la oleato desaturasa endógena, que incrementa los niveles de ácido oleico en colza (*B. napus* y *B. juncea*). Esta estrategia se probó en cultivares élite en Australia y dio como resultado un incremento en los niveles de ácido oleico de hasta un 89% en *B. napus*. (Stoutjesdijk *et al.* 2000). Gracias a este cambio el aceite resultante resistía mejor altas temperaturas y tardaba más en ranciar.

La transformación de colza también puede convertir un campo de cultivo en una biofactoría de producción de compuestos farmacéuticos o con utilidad industrial. Uno de los productos que se ha conseguido producir en colza han sido los polihidroxicanoatos, que son una clase de polímeros biodegradables que ofrecen una alternativa sostenible a los plásticos con base de petróleo. Para la producción de un compuesto de esta familia, el poli(beta-hidroxibutirato) (PHB), son necesarias tres enzimas (una beta-cetotilasa, una acetoacetyl-CoA reductasa y una PHB sintasa) los genes que codifican para estas enzimas fueron ligados tras un promotor específico de semilla. Las plantas de colza transgénicas llegaron a producir PHB a un nivel que alcanzaba el 7,7% de peso fresco de semilla (Houmiel *et al.* 1999). También se ha usado la colza para producir carotenoides, mediante sobreexpresión

específica en semilla de una fitoeno sintasa de bacteria (crtB). Los embriones resultantes de esta transformación tenían color naranja y las semillas maduras de éstos presentaban un contenido cincuenta veces superior al presente en los controles no transgénicos de estos compuestos, sobre todo se aumentó el contenido en alfa y beta-caroteno (Shewmaker et al. 1999).

También se consiguió producir androesterilidad por métodos de transformación, en este caso no en colza, sino en *B. juncea* mediante un gen citotóxico (barnasa) que se incluyó en una construcción con un promotor específico de tapete. De este modo se consiguió que no se desarrollaran las anteras, dando lugar a tapetes disfuncionales que no permitían que maduren los granos de polen (Jagannath et al. 2001). Trabajos posteriores permitieron también restablecer, mediante un sistema de cruzamientos con plantas que contienen el gen barstar, la fertilidad de las plantas (Jagannath et al. 2002) Este sistema restaurador de androesterilidad tiene un gran potencial en mejora.

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es poner a punto un método de regeneración mediante organogénesis adventicia en colza que nos permita abordar en un futuro un protocolo de transformación genética. Este objetivo principal se puede desglosar en diferentes aspectos:

- a) Establecer las mejores condiciones para la esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas a partir de semillas de colza.
- b) Desarrollar un método de regeneración ajustando el medio de cultivo, el tipo y la edad del explante utilizado.
- c) Analizar el patrón polisomático de los explantes de partida y su influencia en el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para establecer las condiciones que permitan la regeneración de plantas diploides.
- d) Establecer las condiciones más adecuadas para seleccionar plantas de colza resistentes a la kanamicina, el agente selectivo más empleado para obtener plantas transgénicas.

### 3. Material y Métodos

#### 3.1. Material vegetal

En este trabajo se ha empleado la variedad comercial Westar de *Brassica napus*. Ésta es una variedad de colza de calidad Canola, es decir, que tiene un bajo contenido en ácido erúxico y glucosinato. Fue desarrollada en la Agriculture Canada Research Station en Saskatoon, Saskatchewan, mediante selección de cruces del cultivar alemán Liho con el cultivar polaco Bronowski y fue aprobada en 1982 (Klassen *et al.*, 1987). Sus tres características principales son una alta producción de semillas, madurez temprana y alto contenido en aceite.

#### 3.2. Técnicas básicas de cultivo *in vitro*

La primera parte del trabajo consiste en obtener material axénico que permita llevar a cabo los siguientes experimentos.

##### 3.2.1. Esterilización de semillas

Se empleó una disolución al 50% de lejía comercial con tres gotas de tween-20 (7X-0matic Flow Laboratories), que actúa como agente tensoactivo. Además, se esterilizaron en el autoclave cuatro botes de vidrio, tres de ellos con agua desionizada y uno vacío. En este último se colocan 200mL de la disolución esterilizante y se sumergen las semillas durante 30 minutos. A continuación se pasan por los otros tres recipientes con agua estéril durante 5, 10 y 15 minutos. Después de este proceso las semillas estaban listas para ser sembradas en condiciones axénicas. Todo este proceso se desarrolla en una cabina de flujo laminar.

##### 3.2.2. Preparación y esterilización de los medios de cultivo

Los medios en los que se cultiva el material vegetal en condiciones axénicas se preparan diluyendo en un vaso de precipitados los componentes, debidamente pesados, en agua desionizada. A todos los medios de cultivo que se han empleado en este trabajo se les añaden sales minerales, sacarosa, vitaminas y, dependiendo del tipo de medio de cultivo, reguladores de crecimiento. Tras diluir todos los componentes se ajusta a continuación el pH a 5,7 añadiendo HCl y KOH según convenga y se le añaden 7 gL<sup>-1</sup> de agar bacteriológico (Pronadisa) para gelificar el medio y proporcionar un sostén para los explantes. Tras fundir el agar en el microondas el medio se reparte en recipientes de vidrio. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 20 minutos. En este trabajo se usan dos tipos de recipientes: tubos de ensayo de 25 mm de diámetro y 150 mm de altura y botes de vidrio de 75 mm de diámetro por 80 mm de altura con tapa de plástico translúcida.

### 3.2.3. Trabajo en cabina de flujo laminar

La cabina de flujo laminar es un equipo en el que se fuerza el paso de aire a través de un filtro HEPA para eliminar toda partícula de hasta 0,1 micras. A continuación se dirige ese aire estéril hacia el panel frontal de la cabina, generando, de este modo, una corriente de aire limpio que va desde el interior al exterior y dificultando la entrada de contaminación ambiental. Además, la superficie de la cabina de flujo se limpia antes de cada uso con etanol.

Los elementos necesarios para el trabajo en cabina de flujo laminar son los instrumentos con los que se manejará el material vegetal, es decir, pinzas de metal de varios tamaños (para diferentes usos) y bisturí (Figura 7).

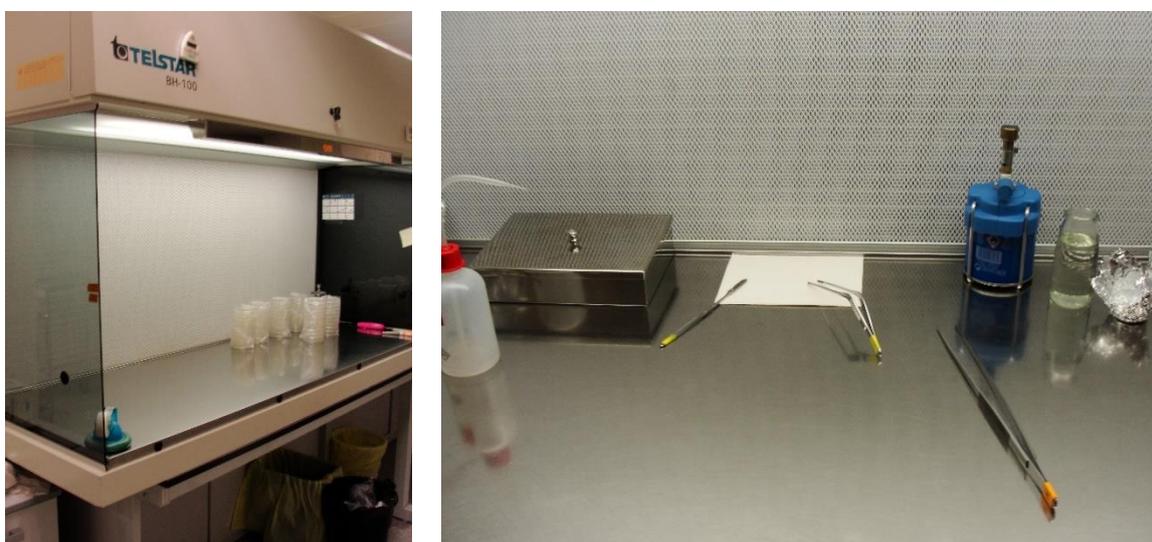


Figura 7. Cabina de flujo laminar y superficie de trabajo con instrumental.

Los instrumentos que estén en contacto directo con el material vegetal deben mantenerse estériles. Para ello, se utiliza el flameado. Se introduce en un bote de vidrio con etanol 96% el extremo de las pinzas y bisturí y se prende con un mechero. La superficie sobre la que se trabaja con el material vegetal son trozos de papel de filtro que han sido esterilizados en el autoclave y que deben tocarse solamente con las pinzas previamente flameadas. Además, no se debe bloquear el flujo de aire estéril colocando objetos entre el fondo de la cabina y la zona de trabajo.

### 3.2.4. Siembra y germinación

Tras la esterilización superficial de las semillas se siembran en un medio de germinación (MG), compuesto por sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) y 10 gL<sup>-1</sup> de sacarosa. Los recipientes utilizados para el desarrollo del experimento fueron tubos de ensayo en los que se colocaban 10 mL de MG y una semilla esterilizada.

### 3.2.5. Condiciones de crecimiento

Las semillas se mantienen 24 horas en oscuridad tras la esterilización y siembra, a una temperatura constante de 28°C. Tras este tiempo, se pasan a la cámara de cultivo con iluminación. Esta cámara proporciona un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, una intensidad lumínica de 45  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  y una temperatura de 25+/-1°C. En estas condiciones se llevaron a cabo todos los experimentos del presente trabajo.

### 3.3. Estudios de patrón polisomático y del nivel de ploidía

Se analizó mediante citometría de flujo el patrón polisomático de diferentes órganos (hipocotilo, limbo y peciolo de cotiledón) procedentes de plántulas de colza en distintos estados del desarrollo (desde 3 hasta 7 días después de la germinación) y los niveles de ploidía de las plantas regeneradas.

Para determinar el patrón polisomático de las muestras se utilizó la citometría de flujo siguiendo el método de Smulders y colaboradores (1994), cuantificando el contenido de ADN nuclear de las células. El primer paso es romper el tejido vegetal troceándolo en fragmentos pequeños con una cuchilla en una placa Petri de 50mm de diámetro, a lo que se le añaden 200  $\mu\text{L}$  de un tampón para la extracción de núcleos (Nuclei extraction solution, Partec, Münster, Germany). A continuación, cuando el tejido ya se ha troceado, se añaden a la placa 800  $\mu\text{L}$  de disolución que contiene 1  $\text{mgL}^{-1}$  de DAPI (4,6-diaminofenilindol) (DAPI staining solution, Partec). El paso siguiente consiste en filtrar el contenido de la placa haciéndolo pasar a través de una malla de nylon de 50  $\mu\text{m}$ , de modo que se eliminan los restos de tejido y se dejan pasar solamente los núcleos celulares. La suspensión de núcleos resultante se hace pasar por el circuito de microtubos de un analizador de ploidía (Partec PA-II Pliody Analyser), el cual utiliza una lámpara de mercurio para emitir luz UV a 366 nm de longitud de onda para iluminar los núcleos cuando pasan por una cámara de cuarzo. La fluorescencia que emite cada núcleo es proporcional a la cantidad de ADN que contiene, la cual es captada por el fotorreceptor del equipo. Dado el gran número de núcleos evaluados (de cada tejido se han analizado tres muestras diferentes y, al menos, 2000 núcleos celulares de cada muestra) es necesario que el sistema informático del citómetro convierta los resultados que está recibiendo (es habitual que el equipo evalúe más de cien núcleos por segundo) en una gráfica para poder ver el resultado en tiempo real.

En nuestro caso, utilizamos un histograma para visualizar y poder analizar posteriormente el resultado obtenido en cada muestra. El valor de cada núcleo analizado en el eje de abscisas de ese histograma es mayor cuanto mayor intensidad tiene la fluorescencia emitida. Por otro lado, el eje de ordenadas contabiliza el número de núcleos con una intensidad comprendida entre dos valores. Es importante realizar un calibrado previo del sistema situando el pico correspondiente al contenido de ADN 2C (diploide en

fase G1) sobre un valor determinado del eje de abscisas regulando el parámetro "ganancia" en el sistema informático. De este modo se pueden reconocer posteriormente los picos correspondientes a las poblaciones celulares 2C, 4C, 8C, 16C, etc. Para representar estos resultados se puede mostrar directamente el histograma, representar los porcentajes de cada tipo celular (2C, 4C, 8C...) a partir del área del pico correspondiente, o calcular un parámetro que resuma el patrón polisomático de un tejido. El parámetro más utilizado en estos casos es CV, que se calcula según el área relativa (en porcentaje) de los picos correspondientes a las distintas poblaciones celulares mediante la fórmula: " $CV=2Cx0+4Cx1+8Cx2+16Cx3...$ ", donde 2C, 4C, 8C y 16C son sustituidos por el área relativa (en %). Así pues, un tejido diploide sin células en fase G2 tendrá un valor  $CV=0$ , mientras que un tejido con la mitad de células diploides y la mitad tetraploides tendría un valor  $CV=0,5$ .

### 3.3.1. Variación de patrón polisomático con el tiempo

Se analizaron los patrones polisomáticos de cuatro tejidos diferentes procedentes de plántulas de colza (limbo de cotiledón grande, limbo de cotiledón pequeño, peciolo de cotiledón e hipocotilo bajo el ápice). Además, este estudio se llevó a cabo con plántulas de 3, 4, 5, 6 y 7 días de edad desde su siembra.

### 3.3.2. Variación de patrón polisomático con la situación espacial del explante

También se analizó cómo variaba el patrón polisomático del hipocotilo según el explante estuviera más o menos cerca del ápice. Para ello, se tomaron muestras de hipocotilo de plántulas de colza de 4 días y se dividieron en 10 partes desde la más cercana al ápice (1/10) hasta la más cercana a la raíz (10/10).

### 3.3.3. Estudio del nivel de ploidía de las plantas regeneradas

Se analizó el nivel de ploidía de las plantas regeneradas para compararlo con el material de partida. Para ello se analizó mediante citometría de flujo el nivel de ploidía de una hoja joven de cada planta regenerada.

## 3.4. Regeneración de plantas

En los experimentos de regeneración de este trabajo se ha estudiado el desarrollo de yemas y brotes adventicios a partir de explantes sin meristemas preexistentes.

### 3.4.1. Medios organogénicos

En base a trabajos previos de otros grupos se han diseñado dos medios de regeneración diferentes para usar en este trabajo, ambos tienen componentes comunes: sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962), 20  $gL^{-1}$  de sacarosa, 100  $mgL^{-1}$  de inositol y vitaminas RT (Staba, 1969).

Al medio MB2-B25 se le añaden  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina. Al medio MB2-BZ 20-10 se le añaden  $2 \text{ mgL}^{-1}$  de 6-Bencilaminopurina y  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de Zeatina (esta hormona se añade tras el autoclavado para evitar la pérdida de función por el calor). Ambos medios se distribuyen en placas Petri de plástico de 90 mm de diámetro y 25 mm de altura, en una cabina de flujo laminar para evitar que el medio pueda contaminarse.

### 3.4.2. Tipos de explantes

Los explantes se obtienen a partir de plántulas axénicas crecidas a partir de semillas esterilizadas. Se utilizaron cuatro tipos de explantes diferentes para el ensayo de regeneración (Figura 8).

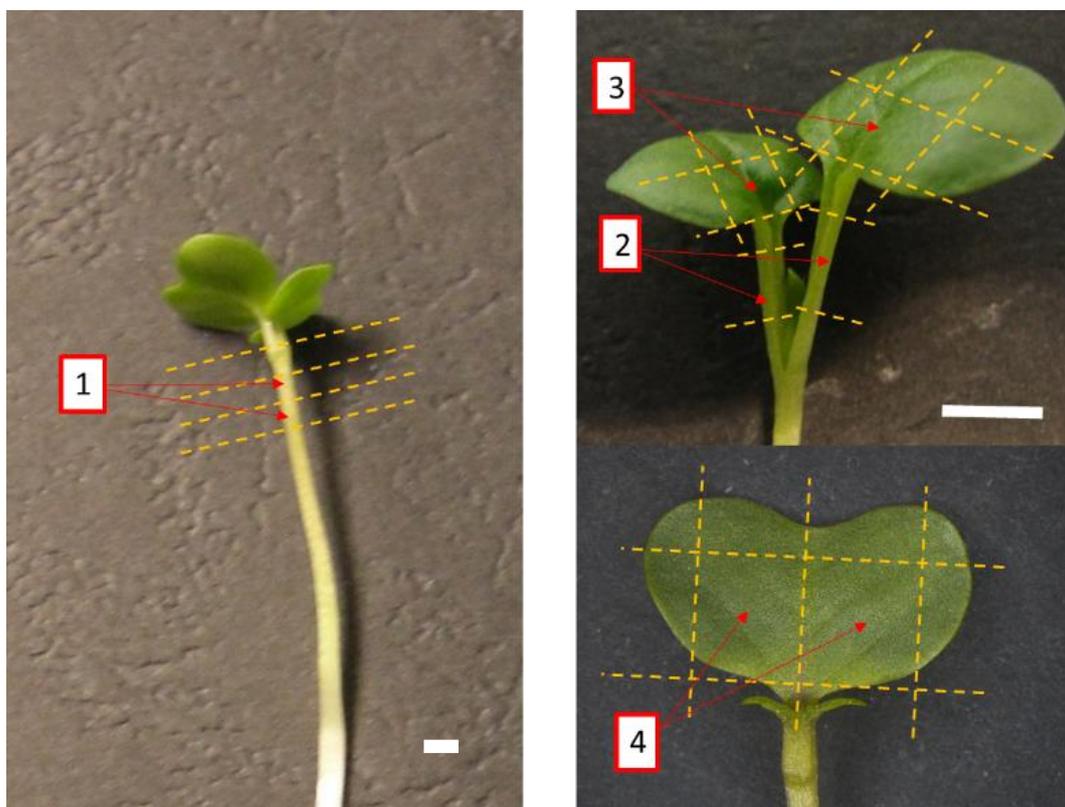


Figura 8. Tipos de explantes de *B. napus* utilizados en los experimentos de regeneración. Hipocotilo (1), peciolo de cotiledón (2), limbo de cotiledón entero (3), medio limbo de cotiledón (4). La barra blanca mide 1 cm.

- Explantes de hipocotilo: se selecciona la parte del hipocotilo más cercana al ápice y de ella se extraen dos explantes por planta de un centímetro de longitud.
- Explantes de peciolo de cotiledón: se cortan los peciolo de cotiledón teniendo la precaución de no coger el ápice, los explantes varían de longitud en función de la edad de la plántula.
- Explantes de limbo de cotiledón: se toma el limbo de los dos cotiledones de cada planta y se selecciona solo la parte central incluyendo la zona de unión al peciolo y dejando un explante cuadrado

de aproximadamente un centímetro de lado, en este caso no se diferencia el cotiledón grande del pequeño.

- Explantes de medio cotiledón: a partir de un cotiledón, se desecha el tercio superior y se divide por el centro la pieza restante para dar los explantes finales de 1 cm de lado aproximadamente.

Una vez extraídos los explantes correspondientes se cultivan 12 explantes por placa Petri en el medio organogénico correspondiente (Figura 9).

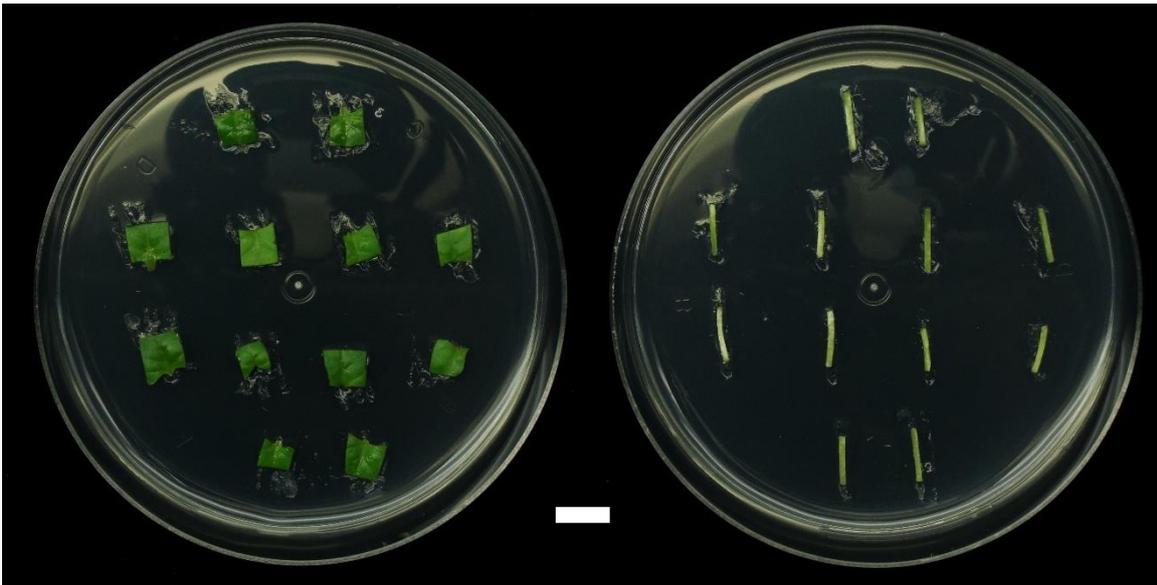


Figura 9. Cultivo de explantes de limbo de cotiledón (izq.) e hipocotilo (der.) de *B. napus* en placa Petri con medio de regeneración a día 0 de cultivo. La barra mide 1 cm.

#### 3.4.3. Evaluación de la regeneración

Se llevó un registro exhaustivo del desarrollo de los explantes en las placas, en los días 7, 14, 21 y 28 desde que se cultivaron. Se evaluaba cuántos de ellos desarrollaban callo desorganizado, yemas y brotes viables. El callo desorganizado surge a partir del crecimiento y división activa de células desdiferenciadas que se forman a partir de las zonas de corte de los explantes. A partir de estos callos se pueden desarrollar yemas, en las que algunas células se organizan en estructuras meristemáticas. Si las yemas siguen creciendo pueden dar lugar a brotes, una estructura en la que se pueden observar hojas y un tallo elongado que permite que se aisle del callo organogénico para enraizarlo y obtener así una planta entera.

#### 3.5. Enraizamiento, clonación y aclimatación

Tras la regeneración de un brote es necesario tener a punto un método de enraizamiento para obtener una planta entera y poder mantenerla el tiempo que sea necesario en condiciones de cultivo *in vitro*. Además, debido a las diferencias en las condiciones ambientales en las que crece la planta,

también es necesario desarrollar un método de aclimatación que nos permita cultivar una planta en condiciones *in vivo* a partir de material que se ha desarrollado *in vitro*. A continuación, se detallan estas metodologías.

### 3.5.1. Enraizamiento y clonación

Se necesita disponer de un medio para que los brotes regenerados desarrollen una planta *in vitro* gracias al crecimiento de raíces adventicias. Además, este medio suele ser el más adecuado para mantener una planta en condiciones axénicas e incluso multiplicarla clonalmente mediante el cultivo de ápices meristemáticos o yemas axilares.

El medio utilizado en este trabajo como medio de enraizamiento ha sido el medio alfa ( $\alpha$ ), que se utiliza en el laboratorio para el enraizamiento y clonación de diferentes especies herbáceas. Este medio está compuesto por sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1964),  $20 \text{ gL}^{-1}$  de sacarosa,  $100 \text{ mgL}^{-1}$  de inositol,  $1 \text{ mgL}^{-1}$  de tiamina clorhídrica y  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  de ácido indolacético. Este medio se distribuye en botes de vidrio de 50 mm de diámetro y 150 mm de altura, que se tapan con papel de aluminio. Cada uno de estos botes se utiliza para cultivar un único explante.

Para obtener una planta entera se cortan los brotes regenerados a partir de los explantes organogénicos y se cultivan en botes con medio de enraizamiento. El cultivo se realiza en condiciones de fotoperiodo, temperatura e intensidad lumínica idénticas a las concretadas anteriormente (ver apartado 3.2.5.). Para mantener estas plantas regeneradas en condiciones axénicas durante el tiempo necesario y, teniendo en cuenta que la planta acaba ocupando todo el espacio disponible y consumiendo el medio de cultivo, es imprescindible realizar subcultivos sucesivos cada dos o tres meses en los que se va clonando el material vegetal. La clonación de las plantas se realiza cortando las yemas axilares o los ápices meristemáticos y cultivándolos en el mismo medio de enraizamiento. De este modo se puede mantener una planta sin alterar su genotipo y, además, este proceso nos puede servir para obtener varias plantas idénticas al material de partida.

### 3.5.2. Aclimatación

La aclimatación es necesaria porque las plantas cultivadas *in vitro* crecen en unas condiciones ambientales diferentes a las que se dan en cultivo *ex vitro* donde van a tener más luz, menos humedad, menor disponibilidad de nutrientes y presencia de patógenos y plagas. Si las plantas se pasaran directamente de cultivo *in vitro* a una maceta probablemente no aguantarían el estrés que supondría todos estos cambios. Por ello, es necesario un paso intermedio, que permita a la planta adaptarse poco a poco a las condiciones del cultivo *in vivo* (Figura 10). A este proceso transitorio se le denomina aclimatación.

Para aclimatar las plantas de colza se extraen del bote con cuidado y se enjuagan las raíces para eliminar el agar. Una vez hecho esto se pasa cada planta a una maceta con sustrato compuesto por turba y vermiculita previamente humedecido y se tapa con un vaso de plástico transparente para evitar que se deshidrate.



Figura 10. Planta de colza obtenida por regeneración adventicia en proceso de aclimatación. La barra mide 10 mm.

Tras unos días el vaso se puede retirar comprobando que la planta no sufra síntomas de estrés hídrico.

### 3.6. Evaluación de la resistencia a la kanamicina

Como parte final de este TFG se ha realizado la evaluación de la resistencia a la kanamicina de diversos explantes. Estos resultados, junto con los anteriores servirán como punto de partida para llevar a cabo experimentos de transformación que utilice como marcador el gen *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina. Para ello se cultivaron explantes de hipocotilo proximal y de limbo de cotiledón en el medio organogénico MB2-B25 con diferentes concentraciones de kanamicina 0 mgL<sup>-1</sup>, 10 mgL<sup>-1</sup>, 20 mgL<sup>-1</sup>, 30 mgL<sup>-1</sup>, 50 mgL<sup>-1</sup> y 100 mgL<sup>-1</sup>. Tras 30 días de cultivo se evaluó su capacidad de regeneración en función de la cantidad de agente selectivo añadido al medio de cultivo.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Esterilización y germinación de semillas de colza en condiciones axénicas

El material de partida de todos los experimentos de este trabajo eran semillas de colza. A lo largo del desarrollo de este trabajo se han realizado 14 esterilizaciones de semilla. De todas ellas se ha calculado el porcentaje de contaminación y el porcentaje de germinación de las semillas no contaminadas. La mayoría de los experimentos dieron una tasa de contaminación menor del 5%, y en ningún caso pasó del 10%. Con esta tasa de contaminación se puede trabajar siempre que se utilicen recipientes como los tubos de ensayo en los que se cultive una única semilla para que la contaminación de un individuo no afecte a otros. Por otro lado, la tasa de germinación en la mayoría de los experimentos fue superior al 75%, y nunca cayó por debajo del 50%. Un estudio sobre la variación de la tasa de contaminación-germinación en semillas oleaginosas (Barampuram *et al.*, 2014) utiliza concentraciones de lejía y tiempos de inmersión similares a los usados en este trabajo, con un efecto parecido.

Una vez se tienen establecidas las condiciones para obtener una buena cantidad de plántulas axénicas, para poner a punto un protocolo de regeneración de plantas a partir de explantes es crucial conocer el material de partida. Como en el laboratorio no se había trabajado con este material anteriormente, se hizo un primer estudio sobre el desarrollo de la plántula en los primeros días. El día en el que se siembran las semillas y se cultivan en oscuridad se considera día 0 mientras que el día en el que las semillas se pasan a condiciones de fotoperiodo se considera como día 1. Se muestra el desarrollo de las plántulas de colza en las etapas en que se van a realizar los siguientes experimentos (Figura 11).



Figura 11: Desarrollo de plántulas de colza tras la germinación de las semillas en medio MG. La barra representa 1 cm.

#### 4.2. Estudios sobre el patrón polisomático del material de partida

Un aspecto clave para conocer el material vegetal de partida es analizar el patrón polisomático de los tejidos que se van a utilizar como explantes de partida para la regeneración. Según nuestra experiencia con otras especies herbáceas de la familia de las solanáceas (tomate) y las cucurbitáceas (melón, pepino y sandía) es habitual observar células que hayan sufrido procesos de endoreduplicación en las primeras etapas de las plántulas. La endoreduplicación es un proceso por el que una célula, tras duplicar su información genética (fase G2), no se divide. La consecuencia es que su dotación cromosómica se ve duplicada (de 2C pasa a 4C, de 4C pasa a 8C, etc.). Este proceso es habitual en determinados órganos como hipocotilo, cotiledón y algunos órganos reproductivos. En nuestro caso, nos interesa conocer el patrón polisomático de los explantes que se van a utilizar en los experimentos de regeneración para poder evitar aquellos que hayan sufrido

en mayor medida eventos de endorreducción y así tener mayor probabilidad de regenerar plantas diploides. Este aspecto es muy importante si queremos utilizar este método de regeneración para obtener plantas transgénicas ya que, en ese caso, el único cambio genético que se pretende introducir es la integración del T-DNA.

El análisis llevado a cabo en estos tejidos de partida (limbo de cotiledón grande, limbo de cotiledón pequeño, peciolo de cotiledón e hipocotilo bajo el ápice), dio como resultado un patrón polisomático de los tejidos estudiados similar con algunas variaciones. En general, estos tejidos presentan picos 2C, 4C, 8C y, en algunas ocasiones, 16C. Esto quiere decir que se han producido en todos ellos fenómenos de uno o dos ciclos de endorreducción dando como consecuencia la formación de células tetraploides y, en menor medida, octoploides. En la Figura 12, se observa como en todos los tejidos analizados las células mayoritarias son aquellas que tienen 2 y 4 complementos cromosómicos (2C y 4C) llegando a componer el 95% del total de células en alguno de los tejidos, y nunca bajando del 75%. De este análisis también se puede concluir que la variación del patrón polisomático de los tejidos a lo largo de los días en los que se desarrolló el experimento no es significativo, como se puede observar en la Figura 12, donde se advierte en la representación del CV que éste no varía de manera significativa del día 3 al día 7 de ninguno de los tejidos. Entre los diferentes tipos de explantes se puede ver en la Figura 12 que los explantes de limbo (grande y pequeño) y peciolo de cotiledón tienen unas proporciones muy parecidas, con un 90% aproximado de células 2C y 4C y con una presencia ínfima de células 16C (nunca más de un 2%), por otro lado, los explantes de hipocotilo bajo el ápice presentan un patrón polisomático en el que las células 2C y 4C componen el 80% de las células a partir del día 4, las 8C conforman cerca del 20% de las células y las 16C aparecen en una proporción del 3% el día 4 y se mantienen durante los días posteriores. Este tipo de estudio no se ha encontrado en ninguno de los trabajos de colza consultados previamente. Sin embargo, los resultados son similares a los observados en melón, otra especie herbácea que fue analizada de forma similar por nuestro grupo (Atarés, 2002). En este caso los explantes de cotiledón daban unos resultados similares, con un 90% aproximado de células 2C y 4C, y el resto de 8C sin presencia de células 16C, con la diferencia que en los resultados de melón se va aumentando la proporción de células 4C en detrimento de las 2C según avanzan los días.

La Figura 12 representa también los valores C (CV) de los diferentes tejidos a lo largo del tiempo, este valor se calcula a partir de la fórmula explicada en el apartado 3.3. y es una manera sencilla de comparar patrones polisomáticos de modo que se vea con mayor claridad la evolución de los mismos. Como ya se ha comentado, un valor de C cercano a 0 corresponde con un tejido diploide mientras que un valor cercano a 1 corresponde a un tejido cuya mayor parte de células sean tetraploides. Por un lado, se observa que en ninguno de los tejidos existe una variación significativa con el tiempo. De

hecho los valores observados para cada explante varían menos de 0,2 en todos los casos. Este comportamiento difiere del observado por nuestro grupo en melón y otras especies en las que con el paso del tiempo se observa un incremento significativo de los valores de C en los explantes analizados.

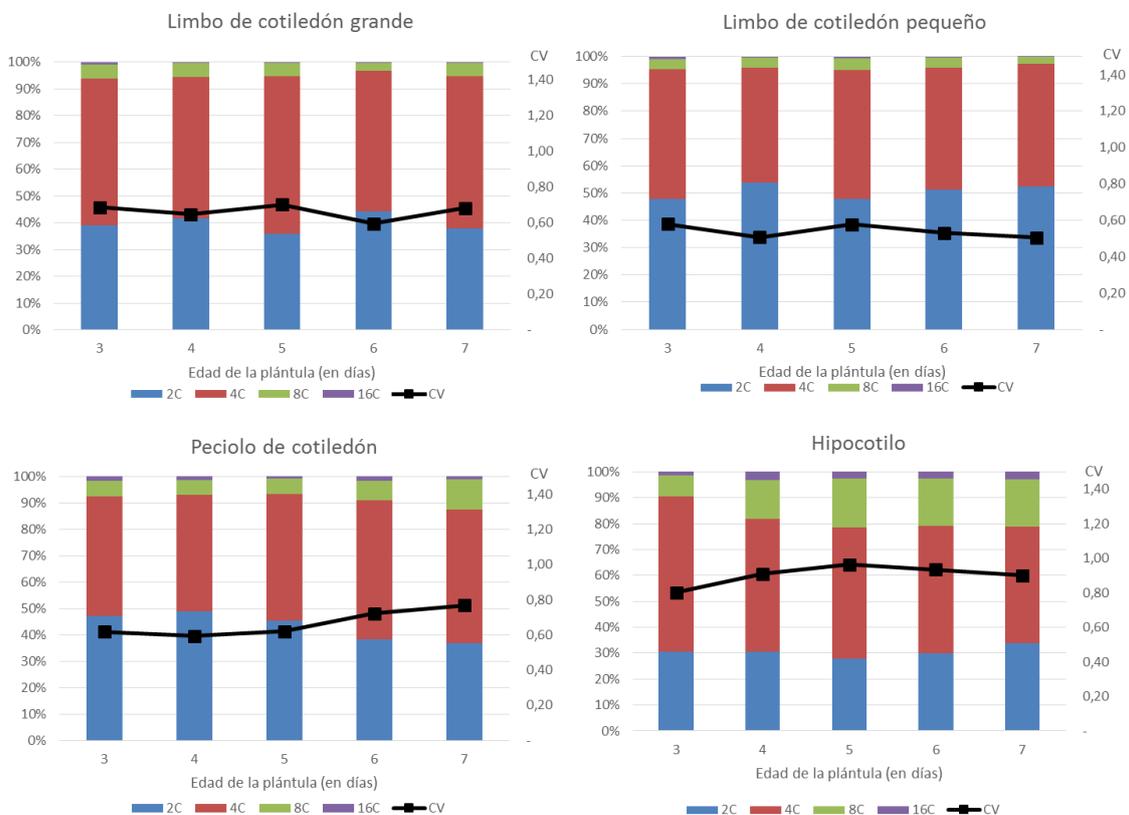


Figura 12. Evolución del patrón polisomático y CV de diferentes explantes de plántulas de colza utilizados en los experimentos de regeneración.

Por otro lado, como podemos ver en la Figura 13 el patrón polisomático varía de manera mucho más significativa por la localización del tejido analizado, es decir, según el tejido del hipocotilo se encuentra más lejano al ápice su contenido en células con dos complementos cromosómicos, que en la primera fracción es del 25%, se va reduciendo hasta desaparecer a la mitad del hipocotilo. Al tiempo que se reduce la proporción de células 2C, también lo hace la proporción de células 4C, pasando del 60% de los tejidos cercanos al ápice hasta el 25-35% cerca de la raíz. También varía la concentración de células 8C y 16C, que pasan de formar menos del 20% del total cerca del ápice a casi el 70% del total en los tejidos más cercanos a la raíz. Son fácilmente visibles también las diferencias entre los CV de los tejidos a lo largo del hipocotilo, llegando a pasar de un CV de 1, que implica muchas células diploides, en el tejido cercano al ápice, a uno de aproximadamente 2 en la parte del hipocotilo más cercana a la raíz, lo cual implica una gran cantidad de células tetraploides en división e incluso octoploides.

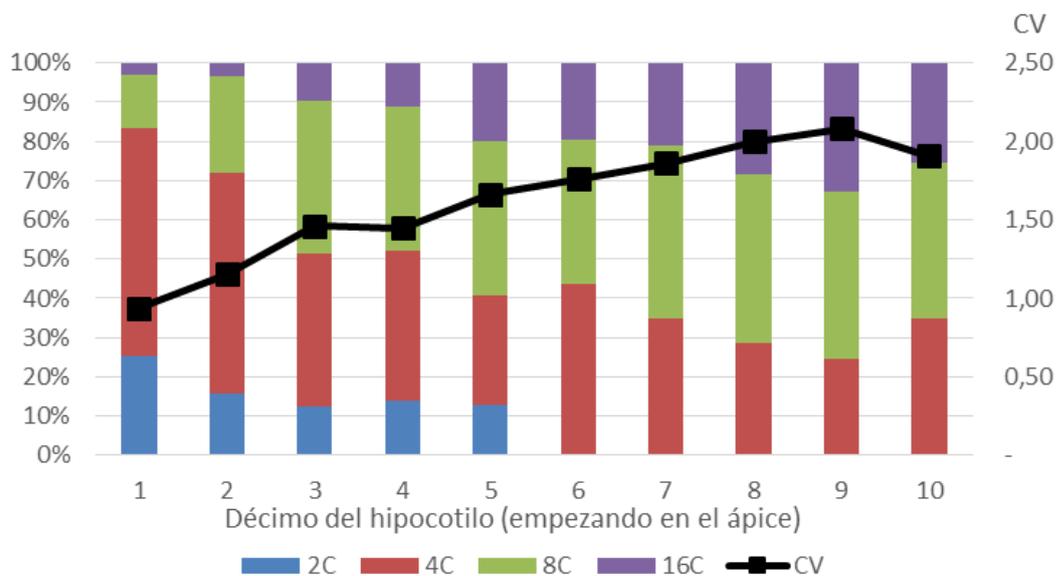


Figura 13. Evolución de patrón polisomático y CV a lo largo del hipocotilo de plántulas de colza de 4 días.

Este estudio se realiza debido a que el hipocotilo es el explante más utilizado en experimentos de regeneración (Burbulis *et al.*, 2010) y se buscaba conocer cuántos explantes se pueden obtener de cada planta que tengan un patrón polisomático adecuado para regenerar plantas diploides, además de para profundizar en el conocimiento de cómo evoluciona el patrón polisomático en función de la posición del explante en la planta. Con los resultados obtenidos se puede concluir que solo los explantes de la parte más cercana al ápice son adecuados para este tipo de experimento de regeneración.

#### 4.3. Estudios sobre la regeneración de plantas de colza

En este trabajo se busca evaluar el efecto que tiene el tipo de explante y el medio organogénico sobre la regeneración que se desarrolla para futuros trabajos, de modo que se pueda seleccionar la condición más favorable. El experimento llevado a cabo para este fin compara la evolución de cuatro tipos de explante (ver apartado 3.4.3.), con dos medios de cultivo diferentes (ver apartado 3.4.1.).

##### 4.3.1. Eficacia de regeneración

En ambos medios organogénicos la evolución de los explantes fue similar, durante la primera semana se podía observar como los explantes se engrosaban y expandían, más por crecimiento de las células que los formaban que por división de las mismas, aunque en las zonas de corte de algunos explantes se podía empezar a observar crecimiento desorganizado, formado

por células indiferenciadas. A las dos semanas se empiezan a observar callos organogénicos perfectamente distinguibles por su color verde. A los 21 días empiezan a mostrar las primeras yemas adventicias, que darán lugar a los brotes que se desarrollarán durante una semana hasta estar totalmente formados a los 28 días (Figura 14).

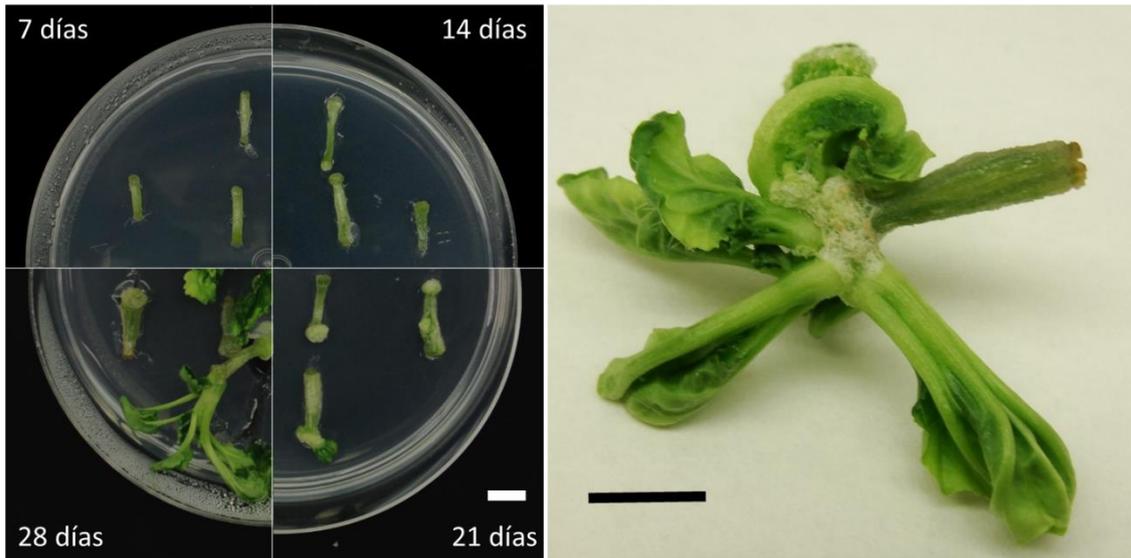


Figura 14. Desarrollo de explantes de hipocotilo de colza a lo largo del tiempo en placa con medio organogénico y detalle de hipocotilo con regeneración adventicia. Las barras miden 1 cm.

Al comparar los resultados de este experimento (Figura 15) se observa claramente que el tipo de explante que mayor tasa de regeneración presenta es el de hipocotilo proximal que ronda el 24% de regeneración independientemente del medio de cultivo. Los siguientes con mejor tasa de regeneración son los explantes de limbo de cotiledón en medio MB2+B25 y los de medio limbo de cotiledón en MB2+BZ20-10. Por último, los explantes de peciolo de cotiledón presentan la menor tasa de regeneración.

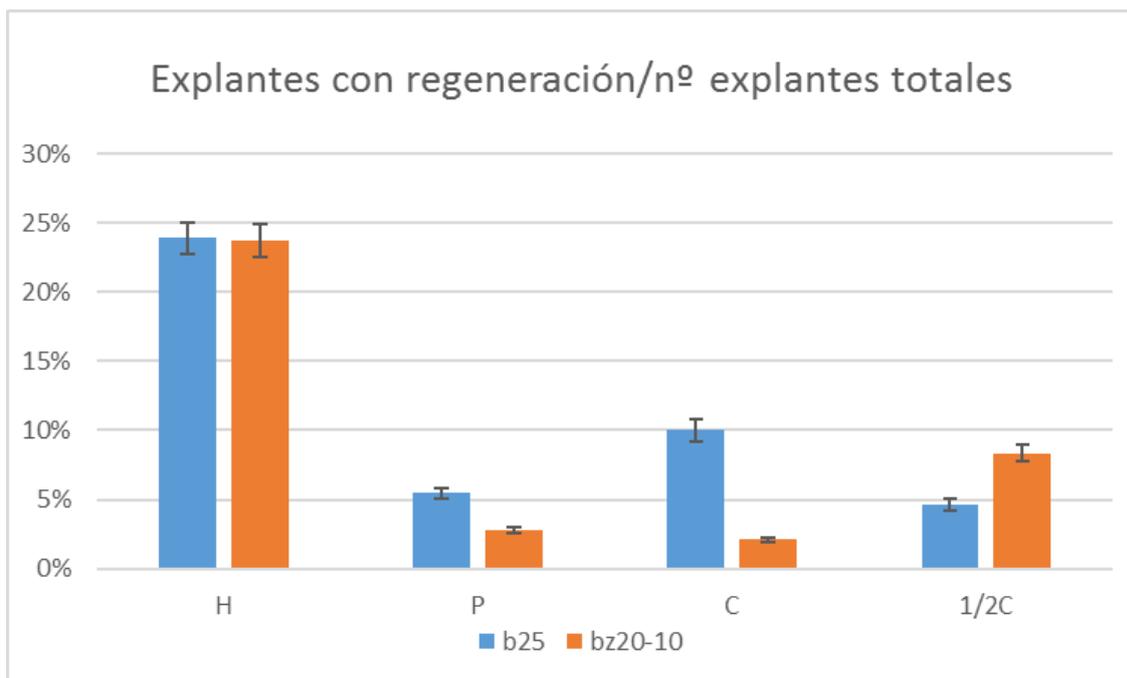


Figura 15. Porcentaje de explantes de colza que regeneran por condición en experimentos de regeneración de explantes de hipocotilo (H), peciolo de cotiledón (P), limbo de cotiledón (C) y medio limbo de cotiledón (1/2C) en dos medios organogénicos diferentes. Las barras representan el error estándar de los porcentajes obtenidos.

La baja tasa de regeneración que presentan los explantes de cotiledón y de peciolo puede estar influida por los problemas de hiperhidratación (excesiva acumulación de agua por parte de los tejidos) que se han tenido a lo largo de este trabajo en estos explantes. Sin embargo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores que utilizaron hipocotilos. Burbulis y colaboradores (2010) obtuvieron tasas de regeneración de entre el 5 y el 24% con explantes de hipocotilo de diferentes líneas de *B. napus*. Por otra parte, en otros trabajos como en Turgut y colaboradores (1998) la regeneración a partir de explantes de cotiledón tiene una eficacia entre el 40% y el 100% según los medios organogénicos utilizados. En futuros trabajos se plantea utilizar modificaciones de los medios empleados y resolver los problemas de hiperhidratación para mejorar la tasa de regeneración obtenida hasta el momento.

Por otra parte, el número de plantas regeneradas de cada explante organogénico varía entre 1 y 2,42 en las condiciones estudiadas (tabla 1).

Medio	Tipo de explante			
	H	P	C	1/2C
b25	2,25	1,86	2,42	2,00
bz20-10	2,37	1,20	1,00	1,43

Tabla 1. Número de plantas regeneradas por explante organogénico en experimentos de regeneración de explantes de hipocotilo (H), peciolo de cotiledón (P), limbo de cotiledón (C) y medio limbo de cotiledón (1/2C) en dos medios organogénicos diferentes.

Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos por Burbulis y colaboradores (2010) en los que los hipocotilos de diferentes variedades de colza producían entre 1 y 2,5 brotes por explante regenerado. Al combinar la eficacia de regeneración con este último dato se puede saber el número de brotes regenerados por explante. En nuestro caso cuando empleamos explantes de hipocotilo se regeneran más de 60 brotes por cada 100 explantes.

#### 4.3.2. Nivel de ploidía de las plantas regeneradas

En ninguno de los trabajos publicados previamente hemos encontrado cuál es el nivel de ploidía de las plantas de colza regeneradas. Si un método de regeneración se va a emplear para obtener plantas transgénicas es importante saber el nivel de ploidía de los brotes regenerados, para poder descartar aquellos que no sean diploides.

Se realizó el análisis de ploidía a las 135 plantas regeneradas de los cuatro tipos de explantes en los dos diferentes medios organogénicos. Todas las plantas regeneradas eran diploides, es decir, habían sido regeneradas de una célula diploide del explante original. Este resultado nos indica que el método de regeneración favorece que no se varíe la ploidía de las plantas regeneradas. Por otro lado, nos da información sobre la capacidad de regeneración de las células con diferentes niveles de ploidía. El hecho de que solo regeneren plantas diploides a partir de explantes con células diploides, tetraploides y hasta octoploides podría deberse a la incapacidad de las células con más complementos cromosómicos para dar lugar a brotes organogénicos. Como ya se ha comentado, no hemos encontrado estudios previos de este tipo en *B. napus*, sin embargo, este resultado es diferente al observado por nuestro grupo en tomate (datos no mostrados). En este caso existe una correspondencia casi directa entre el porcentaje de células diploides de un explante y el porcentaje de brotes diploides regenerados a partir de éstas.

#### 4.3.3. Enraizamiento y aclimatación

Tras la regeneración de los brotes, se ha comprobado que con la metodología empleada para otras especies en el laboratorio se consigue el desarrollo de raíces adventicias en todos los explantes utilizados y, con ello, la obtención de plantas axénicas (Figura 16).

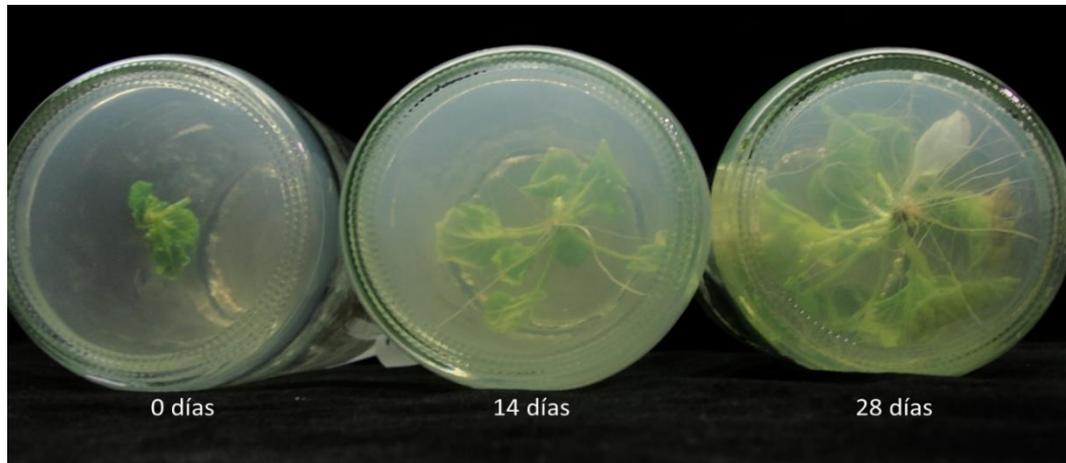


Figura 16. Desarrollo de raíces adventicias a partir del cultivo de brotes de colza.

En cuanto a la aclimatación de las plantas regeneradas, se pudo llevar a cabo sin ningún problema con los métodos empleados para otras especies herbáceas en el laboratorio y así obtener plantas que crezcan en condiciones de cultivo *in vivo* (Figura 17).



Figura 17. Planta de colza aclimatada tras catorce días de cultivo *ex vitro*.

#### 4.4. Efecto de la kanamicina en explantes de colza

Si se quiere implementar un protocolo de transformación mediante *Agrobacterium* en el que el gen selector sea *nptII*, es decir, un gen que confiere resistencia a la kanamicina, es necesario analizar cómo afecta este antibiótico a la planta sin transformar para poder elegir la menor concentración de kanamicina que permita distinguir entre un brote transgénico y uno que no lo sea, es decir, un escape.

Las primeras pruebas se realizaron en medios con concentraciones de kanamicina habituales en protocolos de transformación puestos a punto con otras especies en nuestro grupo, es decir, 0, 50 y 100 mgL<sup>-1</sup>. Como en estas condiciones no se observó ningún crecimiento se decidió hacer un segundo experimento con concentraciones de kanamicina inferiores, 0, 10, 20 y 30 mgL<sup>-1</sup> (Figura 18).



Figura 18. Detalle de explantes de cotiledón (arriba) e hipocotilo (bajo) de colza cultivados en medios organogénicos con 0, 10, 20 o 30 mgL<sup>-1</sup>.

En las placas testigo sin kanamicina la regeneración se desarrolló como en los anteriores experimentos. En las placas con concentraciones más altas (20 y 30 mgL<sup>-1</sup>) los explantes se volvieron blancos y no se observó ningún crecimiento. Por último, en las placas con 10 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina se desarrollaron algunos brotes completamente carentes de clorofila por lo que son fácilmente distinguibles de un brote normal.

Por lo tanto, la concentración de kanamicina en los medios de presión selectiva en los futuros experimentos de transformación de este material será 10 mgL<sup>-1</sup>. Estos resultados son similares a los presentados en estudios de otros autores sobre transformación genética de *B. napus* mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Por ejemplo, en el trabajo de Wu y colaboradores (2009) se utiliza una concentración de 10 mgL<sup>-1</sup> de kanamicina en el medio con presión de selección, pero otros trabajos se desarrollaron con concentraciones de kanamicina de hasta 30 mgL<sup>-1</sup> (Wang *et al.*, 2005).

## Conclusiones

Después de la investigación llevada a cabo en este trabajo se puede concluir lo siguiente

- Se ha puesto a punto una metodología de esterilización, germinación y crecimiento de plántulas axénicas que nos permite disponer del material vegetal necesario para alcanzar los siguientes objetivos.
- Se ha puesto a punto una metodología para la regeneración mediante organogénesis adventicia de colza que sirva de punto de partida para la obtención de plantas transgénicas de esta especie. De los métodos utilizados para regenerar colza, el cultivo de explantes de hipocotilo en medio MB2 B25 y MB2 BZ20-10 es el que ha dado mejores resultados, la regeneración de más de 60 plantas por cada 100 explantes cultivados.
- Aunque el patrón polisomático de los explantes utilizados para la regeneración mostraba la presencia de células diploides, tetraploides y octoploides, las 135 plantas regeneradas eran diploides, lo cual es una ventaja al utilizarlo como método de transformación genética.
- Se ha comprobado que con una presión de selección de  $10 \text{ mgL}^{-1}$  de kanamicina se consigue diferenciar perfectamente el desarrollo de un brote no transgénico, por lo que puede servir como método de selección en los futuros experimentos de transformación genética.

## 6. Bibliografía

- Atarés, A. (2002). Tesis doctoral. 84-85
- Beversdorf, W. D. and Kott, L. S. (1987). Development of triazine resistance in crops by classical plant breeding. *Weed Sci.* 9–11.
- Blackshaw, R. E., Kanashiro, D., Moloney, M. M. and Crosby, W. L. (1994). Growth, yield and quality of canola expressing resistance to acetolactate synthase inhibiting herbicides. *Canadian Journal of Plant Science* 74: 745–51.
- Burbulis, N., Blinstrubienė, A. and Kuprienė, R. (2010). Genotypic and growth regulator effects on shoot regeneration from hypocotyl and stem segment explants of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.8 (2): 634-637.
- Cardoza, V., & Stewart, C. N. (2003). Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. *Plant Cell Reports*, 21, 599–604.
- Cardoza, V., & Stewart, C. N. (2006). Canola (*Brassica napus* L.). In *Agrobacterium protocols* (pp. 257-266). Humana Press.
- Canola council of Canada I, "Canola varieties" (2016) <http://www.canolacouncil.org/crop-production/canola-grower's-manual-contents/chapter-2-canola-varieties/canola-varieties/> 15.05.2016.
- Canola council of Canada II, "Economic impact of the canola industry" (2016) <http://www.canolacouncil.org/markets-stats/industry-overview/economic-impact-of-the-canola-industry/> 20.05.2016.
- Canola council of Canada, "What is canola?" (2015) <http://www.canolacouncil.org/oil-and-meal/what-is-canola/> 20.12.2015.
- Charlton, K. M., Corner, a H., Davey, K., Kramer, J. K., Mahadevan, S., & Sauer, F. D. (1975). Cardiac lesions in rats fed rapeseed oils. *Canadian Journal of Comparative Medicine (Gardenvale, Quebec)*, 39(3), 261–269.
- CME Group, "Soybean reports" (2016) <http://www.cmegroup.com/trading/agricultural/soybean-reports.html/> 15.05.2016.
- Gidlund, H., Hetta, M., Krizsan, S. J., Lemosquet, S., & Huhtanen, P. (2015). Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 8093-8106.
- Hinata, K., Gómez, C. (1980) *Brassica crops and wild allies: Biology and breeding*. Japan Scientific.
- Houmiel, K. L., Slater, S., Broyles, D., Casagrande, L., Colburn, S., Gonzalez, K., Mitsky, T. A., Reiser, S. E., Shah, D. and Taylor N B. (1999). Poly (beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus*. *Planta* 209: 547–50.
- Jagannath, A., Arumugam, N., Gupta, V., Pradhan, A., Burma, P. K. and Pental, D. (2002). Development of transgenic barstar lines and identification of a male sterile (barnase)/restorer (barstar) combination for heterosis breeding in Indian oilseed mustard (*Brassica juncea*). *Current Science* 82: 46–52.

- Jagannath, A., Bandyopadhyay, P., Arumugam, N., Gupta, V., Burma, P. K. and Pental, D. (2001). The use of a spacer DNA fragment insulates the tissue specific expression of a cytotoxic gene (barnase) and allows high frequency generation of transgenic male sterile lines in *Brassica juncea* L. *Molecular Breeding* 8: 11–23.
- Klassen, A. J., Downey, R. K. and Capcara, J. J. (1987). Westar summer rape. *Can. J. Plant Sci.* 67: 491-493.
- Liu, H., Guo, X., Naeem, M. S., Liu, D., Xu, L., Zhang, W., Tang, G. and Zhou, W. (2011). Transgenic *Brassica napus* L. lines carrying a two gene construct demonstrate enhanced resistance against *Plutella xylostella* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Tissue*.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente), "Oleaginosas" (2016) <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/cultivos-herbaceos/leguminosas-y-oleaginosas/#para9> 20.05.2016.
- Murphy, D. J. (1999). Transgenic canola for biofuel production. *BIOFUTUR*, 1999(195), 22-23.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Springer Science & Business Media
- Rani, T., Yadav, R. A. M. C., Yadav, N. R., Rani, A., & Singh, D. (2013). Genetic transformation in oilseed brassicas - A review, 83(April), 367–373.
- Shewmaker, C. K., Sheehy, J. A., Daley, M., Colburn, S. and Ke, D. Y. (1999). Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal* 20: 401–12.
- Statista I, "Worldwide production of rapeseed by country" (2016) <http://www.statista.com/statistics/263930/worldwide-production-of-rapeseed-by-country/> 20/05/2016.
- Statista II, "Consumption of vegetable oils worldwide from 1995/1996 to 2015/2016, by oil type (in million metric tons)" (2016) <http://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> 20.05.2016.
- Stoutjesdijk, P. A., Hurlestone, C., Singh, S. P. and Green, A. G. (2000). High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by cosuppression of endogenous delta 12-desaturases. *Biochemical Society Transactions* 28: 938–40.
- Takahira, J., Cousin, A., Nelson, M.N. and Cowling, W. A. (2011) Improvement in efficiency of microspore culture to produce doubled haploid canola (*Brassica napus* L.) by flow cytometry. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 104: 51.
- Turgut, K., Barghchi, M. and Scott, R. (1998). Efficient shoot regeneration and somatic embryogenesis from immature cotyledons of *Brassica napus* L. *Plant Breeding* 117. 503-504.
- USDA (United States Department of Agriculture), "Soybean & oil crops: related data statistics" (2016) <http://www.ers.usda.gov/topics/crops/soybeans-oil-crops/related-data-statistics.aspx> 15.05.2016.
- Wang, J., Chen, Z., Du, J., Sun, Y. and Liang, A. (2005). Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. *Plant Cell Reports* 24: 549– 55.

Yamagishi, H. and Bhat, S. R. (2014) Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. *Breed. Sci.* 64: 38–47.

Zhong, R., Zhu, F., Liu, Y. L., Li, S. G., Kang, L. Y. and Luo, P. (1997). Oilseed rape transformation and the establishment of a bromoxynil-resistant transgenic oilseed rape. *Acta Botanica Sinica* 39: 22–7.