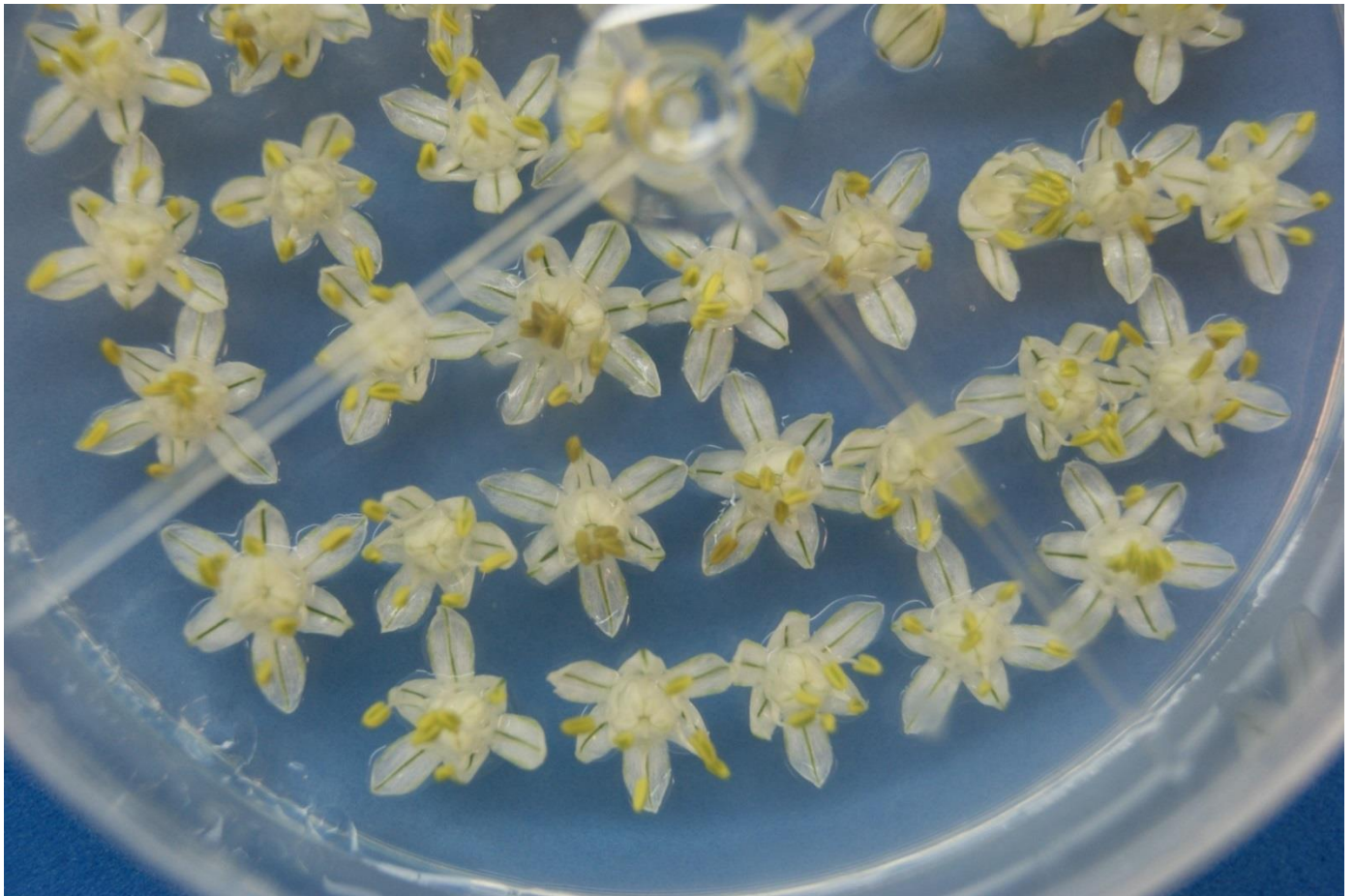


UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA
AGRODIVERSIDAD VALENCIANA



**Evaluación de la competencia ginogénica
de tres genotipos de cebolla (*Allium cepa*)**

MÁSTER EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL CURSO ACADÉMICO 2016-2017

AUTOR: D. EDGAR GARCÍA FORTEA

VALENCIA, 14 DE JULIO DE 2017

TUTOR: Prof. Dr. JOSE M^a SEGUÍ SIMARRO



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

TÍTULO: Evaluación de la competencia ginogénica de tres genotipos de cebolla (*Allium cepa*).

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.

Ginogenesis is an alternative method to androgenesis and interspecific hybridization in those species in which these methods do not work to obtain doubled haploids. It presents obvious advantages over the traditional methods, enabling you to get these lines in less time and with fewer economic resources.

This work evaluates the gynogenic competence of three commercial onion genotypes (*Allium cepa*) by adapting the induction protocol of Michalik et al. (2000) for the agroclimatic conditions of the Vera orchard. The aim is verify if is possible to obtain gynogenic embryos and, if it is successful, try to obtain double haploid lines of these genotypes.

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 ginogénesis es un método alternativo a la androgénesis y la hibridación interespecífica en aquellas especies en las que estos métodos no funcionan para la obtención de dobles haploides. Presenta ventajas evidentes para obtener líneas puras respecto a los métodos tradicionales, ya que permite obtener estas líneas en menor tiempo y con menos recursos económicos.

En este trabajo se evaluará la competencia ginogénica de tres genotipos comerciales de cebolla (*Allium cepa*) adaptando el protocolo de inducción de Michalik *et al.* (2000) para las condiciones agroclimáticas de la huerta de Vera. Con ello se pretende comprobar si es posible o no la obtención de embriones ginogénicos y en caso de que se consiga, intentar obtener líneas dobles haploides de estos genotipos.

KEY WORDS: Embryogenesis, Gynogenesis, Double haploid, Greenhouse, Field, Amiprophos-metyl, *Allium cepa*.

PALABRAS CLAVE: Embriogénesis, Ginogénesis, Doble haploide, invernadero, campo, Amiprophos-metil, *Allium cepa*.

ALUMNO: D. Edgar García Fortea

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, 14 de julio de 2017

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

AGRADECIMIENTOS

Se que muchas de las personas a las que les enseñe este libro, no leerán mas allá de esta página. No es mi intención que lo hagáis, se que no es de vuestro interés, pero si he querido compartir esto con vosotros es por que de alguna manera indirecta me habéis ayudado ha hacerlo posible, así que a todos vosotros, gracias (Mama, Papa, Dani, tíos, abuelos y amigos varios).

El que si que se lo ha leído a fondo es mi tutor Jose M^a. A el quiero agradecerle que me planteara este reto. No todos los dias te dan la oportunidad de trabajar en ginogénesis, algo comprensible, ya que es la gran desconocida de las técnicas de obtención de dobles haploides, y como me dijo una vez: “Solo unos pocos frikis se dedican a ella”. Siento que con este trabajo he superado una difícil prueba que me ha ayudado a curtirme en el plano profesional. Así que por todo esto, y por el apoyo durante todos estos años, mi más sincero agradecimiento.

Otras personas que si que se lo han leído (pero sin muchas ganas) son: Mi queridísima compañera Ana, quien ha reducido considerablemente las faltas de ortografía de este documento y mejorado notablemente algunas de las frases. También algunos de mis compañeros de laboratorio como Santi, que ha tenido la amabilidad de echarle un ojo técnico a algunos apartados; o David, que ha compartido largas tardes de despacho y útiles consejos sobre redacción conmigo. Gracias por echarme un cable también a vosotros.

Más colegas como Alberto y Carol no se lo han leído todavía, pero lo harán seguramente. No obstante si que me han ayudado en el día a día del laboratorio, siendo buenos compañeros y compartiendo conmigo sus mejores consejos. Por ello también gracias.

Y finalmente, pero no menos importante, he de agradecer la inestimable ayuda de Oreto Fayos y Cristina Mallor. Siempre han estado disponibles para contestar mis dudas y ayudarme en cuestiones técnicas por teléfono, correo y Whatsapp si hacía falta. Ha sido un gran alivio tener a mi disposición la experiencia de personas que ya han pasado por donde he tenido que pasar yo y estoy seguro de que sin vuestra ayuda esto no hubiese salido un poco regula. Así que muchísimas gracias.

Por último agradecer a un ente etéreo que no se suele tener en cuenta nunca, pero que sin duda tiene un gran peso y más cuando hablamos de ginogénesis...

¡Gracias suerte!

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	La cebolla	1
1.1.1.	Taxonomía.....	1
1.1.2.	Origen, domesticación y dispersión	1
1.1.3.	Caracterización botánica	4
1.1.4.	Ciclo vegetativo y ecología de la planta	6
1.1.5.	Importancia económica.....	8
1.2.	Los híbridos en la mejora vegetal	10
1.3.	Haploides y dobles haploides.....	11
1.3.1.	Importancia y utilidad en mejora	11
1.3.2.	Otras utilidades de los haploides y dobles haploides	12
1.3.3.	Métodos de obtención	13
1.4.	Ginogénesis.....	14
1.4.1.	Fundamentos de la ginogénesis y metodologías de inducción	14
1.4.2.	Inducción de ginogénesis <i>in vitro</i>	15
1.4.2.1.	Factores que afectan a la inducción	19
1.4.3.	Ventajas e inconvenientes de la ginogénesis	22
2.	Objetivos.....	25
3.	Materiales y métodos.....	27
3.1.	Material vegetal	27
3.2.	Condiciones de cultivo de las plantas donantes	27
3.3.	Cultivo de yemas florales de cebolla <i>in vitro</i>	28
3.4.	Rescate de los embriones y duplicación de la ploidía.....	30
3.5.	Aclimatación de las plántulas.....	32
3.6.	Composición de los medios de cultivo.....	33
3.7.	Análisis de la ploidía de los regenerantes	35
3.8.	Análisis de los resultados	36
4.	Resultados y discusión	37
4.1.	Evaluación de las condiciones agroclimáticas.....	37
4.2.	Determinación del tamaño de yema óptimo para la inducción	40
4.3.	Competencia ginogénica de los genotipos	42
4.4.	Caracterización de los embriones ginogénicos	43
4.5.	Origen y ploidía de los regenerantes	46
5.	Conclusiones.....	51
6.	Bibliografía.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Centros de origen y diversificación de la cebolla2

Figura 2: Bulbos de *Allium* encontrados en la tumba de Tutankhamón3

Figura 3: Anatomía del bulbo y formación de hijuelos5

Figura 4: Formación de la umbela5

Figura 5: Principales países productores del mundo9

Figura 6: Principales países productores del continente europeo 9

Figura 7: Megasporogénesis y megagametogénesis17

Figura 8: Esquema del saco embrionario y de la inducción de la ginogénesis a partir de la célula huevo19

Figura 9: Plantas de parcela e invernadero27

Figura 10: Proceso de cultivo *in vitro* de yemas florales de cebolla29

Figura 11: Proceso de rescate de embriones de cebolla31

Figura 12: Esquema general del protocolo de obtención de DHs en cebolla32

Figura 13: Histograma ajustado de la muestra de referencia35

Figura 14: Diferencia entres escapos de invernadero y parcela37

Figura 15: Diferencias entre flores de invernadero y parcela38

Figura 16: Síntomas del mildiu en la cebolla39

Figura 17: Distintos estadios en el desarrollo de la yema floral41

Figura 18: Comparación de la evolución de las yemas florales41

Figura 19: Distintos tipos de embrión ginogénico44

Figura 20: Estructuras embriogénicas aberrantes46

Figura 21: Disección de un ovario inducido47

Figura 22: Embrión siamés del individuo T1648

Figura 23: Histogramas de los individuos haploides y mixoploides49

Figura 24: Plantas derivadas de los embriones T1650

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción mundial de los principales cultivos hortícolas.....	8
Tabla 2: Plan de abonado.....	28
Tabla 3: Composición del medio A1.....	33
Tabla 4: Composición del medio R1.....	34
Tabla 5: Composición del medio E1.....	34
Tabla 6: Composición del tampón de extracción de núcleos.....	35
Tabla 7: Comparación de pérdidas por contaminación.....	40
Tabla 8: Resumen de los embriones producidos.....	42
Tabla 9: Rendimiento en producción de embriones para cada uno de los genotipos.....	43
Tabla 10: Análisis de la ploidía de los embriones ginogénicos.....	48

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA CEBOLLA

1.1.1. Taxonomía

La cebolla (*Allium Cepa L.*) es una hortaliza de gran importancia a nivel mundial, que pertenece a la familia *Alliaceae*. Es una especie bianual que puede llegar a comportarse como vivaz pero normalmente se cultiva como anual para recolectar sus bulbos (Marín, 2008). Su clasificación taxonómica es la siguiente (Carravedo y Mallor, 2007):

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Liliidae*

Superorden: *Lilianae*

Orden: *Amaryllidales*

Familia: *Alliaceae*

Subfamilia: *Allioideae*

Tribu: *Alleiae*

Subtribu: *Alliinae*

Género: *Allium*

Especie: *Allium cepa L*

Se trata de una especie diploide que tiene ocho pares de cromosomas ($2n = 16$) de gran tamaño. Su genoma tiene 15.300 Mpb, su tamaño es 107 veces el de *Arabidopsis thaliana*, 16 veces el de tomate y 6 veces el de maíz (King y Havey, 1995).

1.1.2. Origen, domesticación y dispersión

No se ha encontrado ningún ancestro silvestre de la cebolla. No obstante, la mayoría de los autores consideran como centro de origen primario de este cultivo el tercer centro de Vavilov, el centro Indo-Afgano de Asia Central (Vavilov, 1926). El mismo Vavilov, definió como centros de domesticación secundaria el cuarto centro, el de Oriente medio, y el quinto centro, el mediterráneo (figura1). Es en este último en el que se originaron las cebollas de bulbo grande cultivadas principalmente en la actualidad.

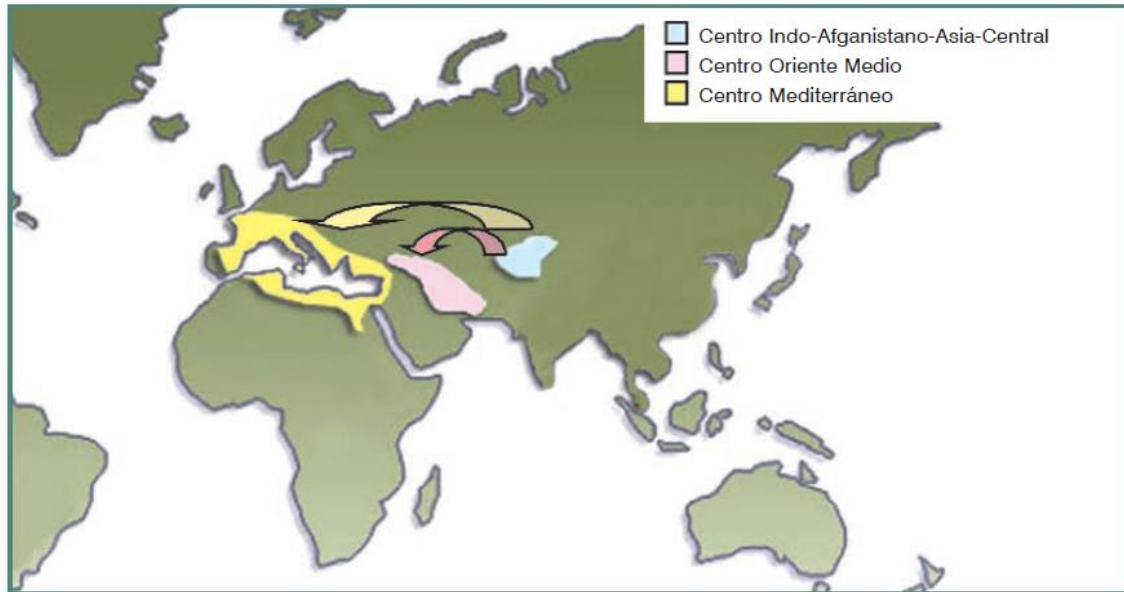


Figura 1: Centros de origen y diversificación de la cebolla (Carravedo y Mallor, 2007)

En Asia Central todavía existen cinco especies silvestres similares y estrechamente relacionadas (Roberts, 2001), por lo que probablemente descienda de alguna de estas: *Allium oschaninii*, *A. praemixtum* o *A. psekmense* las cuales se encontraron principalmente en las montañas Pamir, al oeste de la meseta Tibetana. *A. vavilovii* originaria de las montañas Koppet Day de Turkmenia y *A. galanthum* de las montañas Tien Sham, en la frontera entre Rusia y China.

Todas ellas tienen en común la producción de pequeños bulbos, que desprenden el aroma característico de las cebollas, con tallos altos engrosados por su zona media. Estas plantas perennes suelen desarrollarse en suelos rocosos y desnudos, donde no encuentran competencia con otros organismos vegetales y en ocasiones pueden pasar hasta 10 años para que produzcan sus primeras flores de verano.

La cebolla es uno de los cultivos de los que se poseen referencias más antiguas. Restos de bulbos de cebollas, datados a principios de la Edad de Bronce (5.000 Años a.C) fueron hallados en Jericó (Palestina). En las decoraciones de las tumbas de los faraones de la Primera y Segunda dinastía (3.200-2.780 a.C) se muestran representaciones de cebollas, puerros y ajos. También en Egipto la cebolla se empleó como ofrenda funeraria al principio de la Tercera y Cuarta dinastía (2.780-2100 a.C.) (figura2).



Figura 2: Bulbos de *Allium* encontrados en la tumba de Tutankhamón (Roberts, 2001)

Posteriormente la dispersión de las cebollas hacia otras regiones se vio favorecida por los viajes de Minoicos, importante civilización griega por su poder marítimo en la zona este del Mediterráneo (2000 a 1400 a.C.). Tras su primera domesticación, semillas y bulbos fueron dispersados por el este de la India y el oeste del Mediterráneo. Estos fueron modificados por la selección del hombre y los nuevos ecosistemas, dando lugar a su diversificación.

En el siglo I el médico griego Dioscórides describe diferentes propiedades curativas de esta hortaliza en su obra "*De materia Médica*". Se encontraron cebollas y ajos carbonizados en Pompeya y Herculano, ciudades romanas que fueron enterradas entre cenizas a causa de la erupción del Vesubio en el año 79 d.C. Durante el mismo tiempo, Plinio "El Viejo", en su tratado "*Naturalis Historia*", describe diferentes tipos de cebollas y alaba a esta planta hortícola como factor de salud y longevidad.

En la edad media, las cebollas se convirtieron en un cultivo muy común en Europa. El éxito de esta hortaliza tanto en Europa como en Asia fue debido a su triple uso: hortaliza suculenta, condimento en las comidas y remedio medicinal para una amplia variedad de enfermedades (Block, 1992). Fue probablemente en esta época cuando fueron seleccionadas las variedades de bulbo grande, las cuales dieron origen a las variedades modernas.

La cebolla fue llevada al continente americano durante los viajes de Colón en torno al año 1494 difundiéndose por todo el continente.

1.1.3. Caracterización botánica

La cebolla es una planta cuyo ciclo es bianual. No obstante, se cultiva comúnmente como anual cuando se aprovecha el bulbo y como bianual cuando la finalidad es obtener semilla. La descripción botánica de la cebolla de este apartado esta basada en los trabajos de Schweisguth (1976), Foury y Schweisguth (1992), Brewster (1994) y Carravedo y Mallor (2007).

Presenta un sistema radicular profuso superficial. El 90% se encuentra en los primeros 20 cm del suelo, es fundamentalmente adventicio, de raíces finas cuyo diámetro oscila entre 0,5 y 2 mm y apenas presenta ramificaciones secundarias.

Su tallo es subterráneo, corto y cubierto por las bases de las hojas generadas a partir de la yema apical. Conjuntamente en el propio tallo se generan numerosos primordios radiculares dando origen al sistema radicular adventicio de la planta.

Sus hojas son verdes, provistas de una cutícula cerosa. Se pueden diferenciar dos partes definidas: parte basal o vaina envolvente y parte superior (la cual es realmente un peciolo ensanchado sin limbo verdadero) hueca y redondeada. Todas sus hojas son opuestas y cada una de ellas sale a través de una apertura en el punto de unión de la vaina y limbo de la anterior hoja, de manera que cada vaina envuelve todas las que nacen posteriormente.

Las catáfilos o hipsofilos, en cebolla llamados comúnmente tónicas, son la parte que generalmente se consume. Entre dos tónicas aparece una tela transparente llamada lámina. Tras el engrosamiento del conjunto de partes enfundadas de las hojas se origina el bulbo (figura 3).

Las estructuras de reserva formadas en la primera mitad del ciclo vital de la cebolla se llaman bulbos. Estos bulbos se forman en respuesta a un fotoperiodo específico y son el producto de la acumulación de carbohidratos en la base de las hojas. Los bulbos presentan la siguiente estructura:

- Tallo, en forma de disco basal.
- Tres catáfilos externos las cuales se originan de hojas con lámina, se secan y sirven de protección.
- Un número variable de catáfilos engrosados, normalmente cuatro, procedentes también de hojas con lámina.
- De tres a cuatro catáfilos engrosados sin lámina, los cuales a su vez envuelven a unas cuatro o cinco hojas verdes que inician su desarrollo.

Los conocidos comúnmente como hijuelos o bulbos múltiples son centros secundarios de crecimiento a partir de yemas laterales (figura 3).

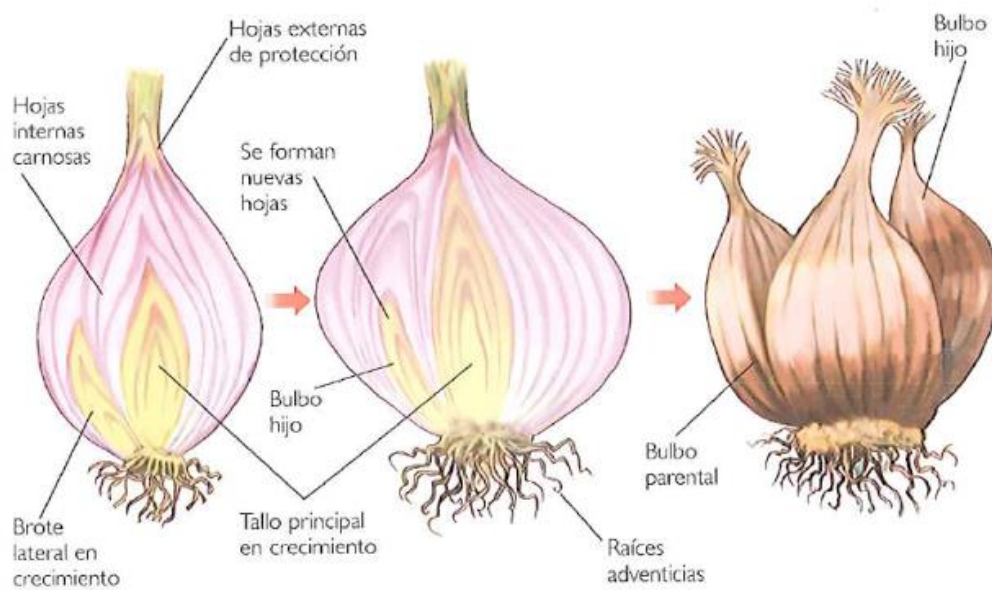


Figura 3: Anatomía del bulbo y formación de hijuelos. (Modificada de www.doblehelix.es.tl)

Durante la segunda mitad del ciclo vegetativo de la cebolla se forma el escapo (figura 4A). Este consiste en una umbela protegida por una bráctea (figura 4B) la cual está sustentada por un tallo hueco de entre 1 y 2 metros de largo. La umbela consta de unas 50 a 2.000 flores pequeñas de color blanco con estrías verdes (figura 4C). Estas flores (figura 4D) presentan seis tépalos, seis estambres y un ovario trilobular con dos óvulos en cada lóculo.

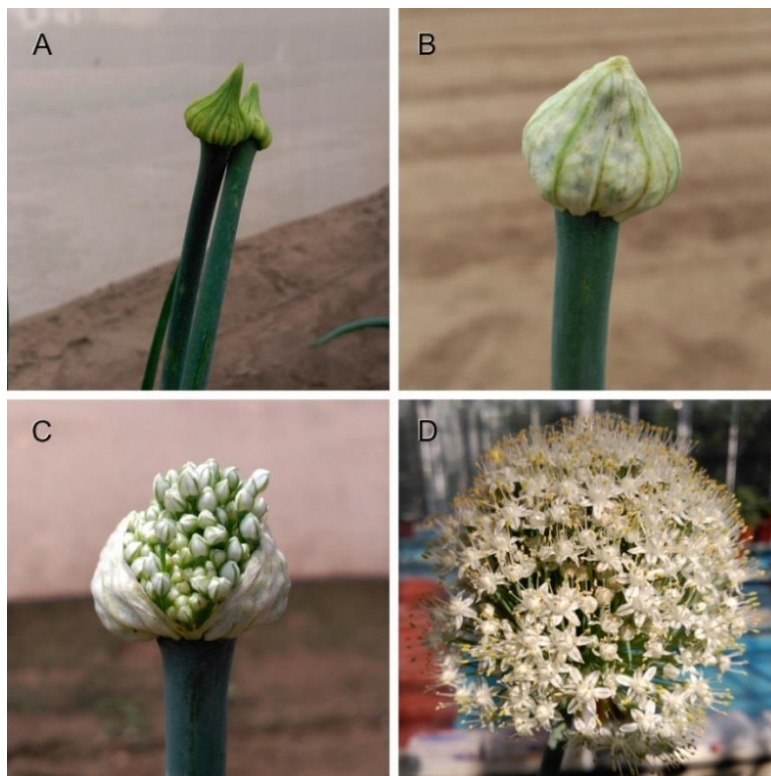


Figura 4: Formación de la umbela.

Durante dos semanas las flores se mantienen en antesis. El polen es liberado 24 horas antes de que el estigma sea receptivo, fenómeno conocido como protandria, favoreciéndose así la polinización cruzada. No obstante la autopolinización es posible debido a que la apertura de las diferentes flores de la umbela se da de forma escalonada y por tanto puede haber polinización entre diferentes flores de la misma umbela o de las diferentes umbelas del mismo bulbo. La polinización es entomófila aunque también puede darse de forma anemófila.

Se producen unas seis semillas por flor cuyo peso oscila entre 3 y 4 mg, Estas son de color negro y tienen forma piramidal. Son muy sensibles a la humedad, deteriorándose rápidamente por lo que es aconsejable almacenarlas en condiciones muy secas.

1.1.4. Ciclo vegetativo y ecología de la planta

Se distinguen cuatro fases en el ciclo vegetativo de la cebolla (Maroto, 2002):

- *Fase de crecimiento herbáceo*: da inicio con la germinación de la semilla, se forma un tallo corto donde se insertan las raíces y en el cual se encuentra el meristemo que dará lugar a las hojas. En esta fase tiene lugar el desarrollo radicular y foliar.
- *Fase de formación de bulbos*: se paraliza el sistema vegetativo aéreo y se inicia la movilización y acumulación de sustancias de reserva en la base de las hojas interiores. Estas se engrosaran dando lugar al bulbo.
- *Fase de reposo vegetativo*: el desarrollo de planta se paraliza y el bulbo entra en latencia.
- *Fase de reproducción sexual*: se produce en el segundo año de cultivo. El meristemo apical del disco desarrolla, gracias a las sustancias de reserva acumuladas, un tallo floral localizándose en su parte terminal una inflorescencia en umbela.

Según los estudios de Thompson y Kelly (1957), Rappaport y Sachs (1976) y Brewster (1977) algunas de las características de la ecología de formación del bulbo pueden resumirse en los siguientes puntos:

- La formación de los bulbos requiere principalmente la incidencia de fotoperiodos largos, aunque hay variedades que suelen conocerse como precoces y extra precoces que requieren de un fotoperiodo menos largo.
- Con fotoperiodos largos la incidencia de temperaturas altas acelera la formación de bulbos, mientras que las temperaturas bajas la retrasan, pudiendo inducir la floración prematura.
- Con fotoperiodos cortos no hay formación de bulbos, sino que la planta sólo forma raíces y hojas.

- En lo que se refiere al binomio “formación de bulbos-floración”, existe una adaptación varietal muy grande de cada uno de los cultivos a unas determinadas condiciones climáticas. El tamaño de planta y la densidad de plantación tienen también influencia en la formación de los bulbos.
- Los bulbos maduros, una vez recolectados, experimentan una cierta latencia. Las temperaturas extremas (altas o bajas) pueden prolongar la latencia, mientras que las temperaturas medias pueden acortarla induciendo la brotación. La aplicación de ácido giberélico puede acortar también la latencia.

Es una planta resistente al frío, aunque para la formación y maduración de los bulbos requiere temperaturas altas y fotoperiodos largos. La temperatura mínima de germinación está cercana a los 2 C° y el óptimo para germinar se aproxima a los 24 C°.

En lo referente a los suelos, vegeta mejor en terrenos de consistencia media ligera. Tan solo puede desarrollarse bien en suelos arcillosos si estos están convenientemente drenados. Las variaciones bruscas en la humedad del suelo puede inducir la formación de grietas en los bulbos, así como bulbos dobles. También es una planta medianamente tolerante a la salinidad y poco tolerante a la acidez del suelo.

En general los riegos constituyen una de las operaciones de cultivo más importantes en este cultivo. Thicoipe (1976) ha estudiado las necesidades de agua de la cebolla y aconseja durante la fase vegetativa regar con caudales de 50-80 % de la evapotranspiración potencial. Mientras que a partir del engrosamiento de los bulbos, debe pasarse al 100 % de la evapotranspiración potencial. Al llegar al estadio de desecación del cuello de la planta, es conveniente paralizar los riegos para frenar el crecimiento vegetativo y agrupar la producción, con lo que además se consigue mejorar la conservación de los bulbos.

1.1.5. Importancia económica

La cebolla es uno de los principales cultivos hortícolas en el mundo (tabla 1) con un total de 88 millones de toneladas en su forma deshidratada y 4 millones en fresco durante el año 2014 según datos de FAOSTAT.

Tabla 1: Producción mundial de los principales cultivos hortícolas (FAOSTAT 2014)

Producción Mundial	Toneladas	Hectáreas
Patatas	381.682.144	19.098.328
Tomates	170.750.767	5.023.810
Sandías	111.009.149	3.477.439
Cebolla deshidratada	88.475.089	5.298.873
Pepinos	74.975.625	2.178.613
Berenjenas	50.193.117	1.870.728
Zanahorias y Nabos	38.835.235	1.368.358
Pimientos, Chiles y Ajíes	32.324.345	1.937.370
Melones	29.626.335	1.178.808
Calabazas	25.196.723	2.004.058
Lechugas	24.976.318	1.158.979
Ajos	24.939.965	1.547.381
Coliflor y Brócoli	24.175.040	1.382.463
Judías	21.720.588	1.527.613
Espárragos	7.830.219	1.451.123
Cebolla en fresco	4.165.600	219.367

La cebolla se comercializa principalmente en su forma deshidratada siendo la producción de esta muy superior a su formato en fresco. Por ello los datos que se comentarán a continuación hacen referencia al formato desecado.

La producción mundial de cebolla se ha duplicado en los últimos 20 años debido al crecimiento de la producción en los tres principales países productores, y alcanzó en el año 2014 los 88 millones de toneladas (FAOSTAT, 2014). El principal país productor es China, que produjo más de 22.5 millones de toneladas, lo que representa más del 25.5% de la producción mundial, seguido de India, Estados Unidos y Egipto (figura 5).

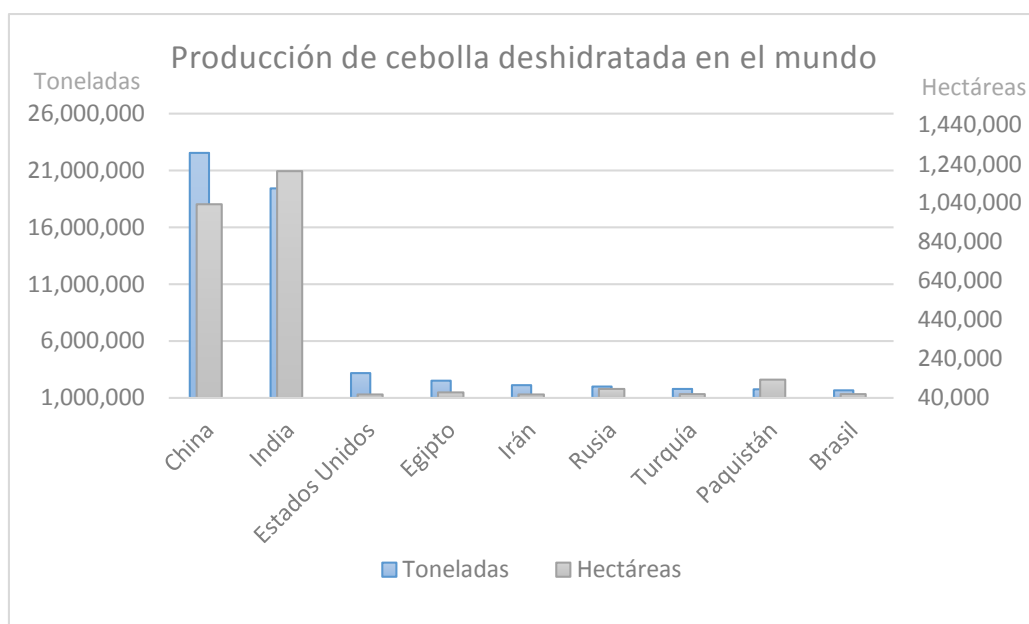


Figura 5: Principales países productores de cebolla deshidratada del mundo (FAOSTAT 2014)

Turquía es el principal país productor del continente europeo con 1.7 millones de toneladas, seguido de Holanda y España con 1.3 millones de toneladas. España ocupa la 2a posición empatada con Holanda en cuanto a producción y área cultivada, con 24.955 Ha totales (figura 6). Esto nos da una idea de la gran importancia económica de este cultivo en España.

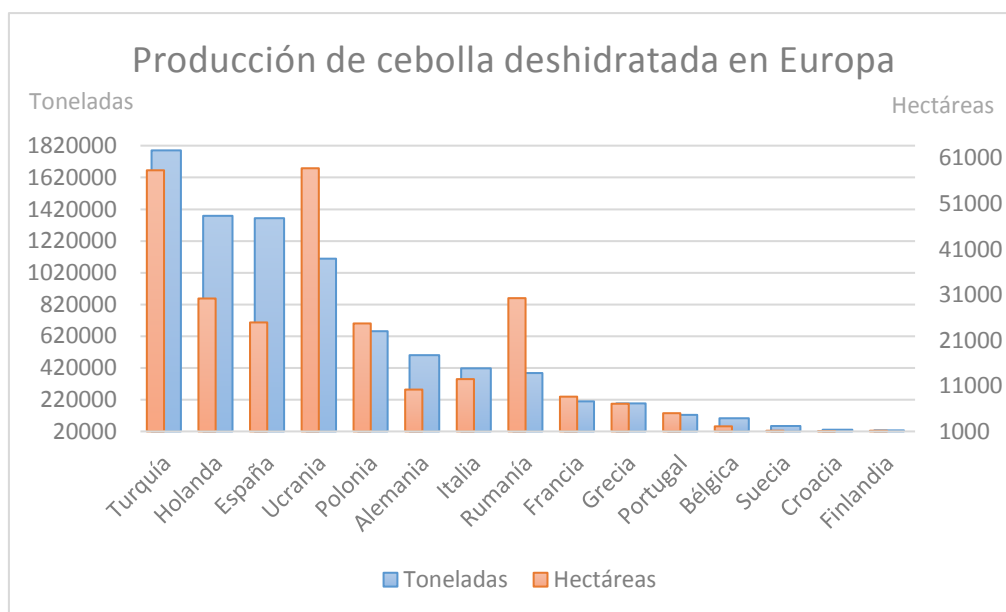


Figura 6: Principales países productores de cebolla deshidratada del continente europeo (FAOSTAT 2014)

Según datos del MAGRAMA de 2008 la principal provincia productora de cebolla en España es Albacete seguida de Toledo, Cuenca, Ciudad Real, Valencia, Murcia, Sevilla y Málaga.

1.2. LOS HÍBRIDOS EN LA MEJORA VEGETAL

La producción de híbridos revolucionó en su día la industria de las semillas y sigue siendo uno de los métodos de la mejora genética vegetal más eficaz, debido al elevado valor comercial que tiene la semilla híbrida (Martin, 2000) y a que los híbridos ofrecen dos claras ventajas para el agricultor: alta homogeneidad y alto rendimiento.

Los híbridos presentan una extraordinaria homogeneidad en todas las fases del cultivo, como consecuencia de que las plantas híbridas son genéticamente idénticas e, idealmente, heterocigóticas para todos los loci. Su otra característica, el alto rendimiento, es debido a la heterosis o vigor híbrido. Se trata de un fenómeno genético que ocurre como resultado de la heterocigosidad y es descrito normalmente como el mayor porte y productividad que presentan los híbridos F1 respecto a los parentales de los que proceden. La heterosis que presentan los híbridos F1 depende en gran medida del valor de mejora y la diversidad genética de los parentales que intervienen en el cruzamiento, así como de las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollará el nuevo híbrido. A causa de la heterocigosis, en el híbrido se genera un aumento en la expresión de caracteres beneficiosos que surge tras el cruzamiento entre especies, variedades o líneas puras. El inconveniente para el agricultor, es que la descendencia (F2) de un híbrido segrega y no mantiene las características deseables. Por supuesto, este hecho es beneficioso para las empresas productoras de semillas, ya que los híbridos constituyen una patente física y aseguran que el agricultor comprará la semilla cada año (Cubero, 2003). Los híbridos comerciales se obtienen en todos los grupos vegetales independientemente de su tipo de reproducción, si bien es cierto que la expresión máxima de la heterosis se da en plantas fuertemente alógamas.

Todo puede estar incluido en el rendimiento del híbrido comercial: semillas, frutos, órganos de reserva (bulbos, raíces, hojas, yemas) e incluso el aspecto ornamental. 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. En plantas de reproducción vegetativa, 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.

Se sabe que los distintos genotipos difieren en su capacidad para combinarse entre sí y con otros genotipos con el fin de obtener buenos híbridos, lo que hace que la identificación de aquellas combinaciones más prometedoras sea esencial a la hora de explotar la heterosis en los cultivos agrícolas (Geleta et al., 2004). Esto se hace mediante pruebas de aptitud combinatoria entre las posibles líneas parentales. La identificación de combinaciones de parentales que produzcan híbridos con un rendimiento superior es el paso más importante en el desarrollo de híbridos. Sin embargo, es uno de los pasos más costosos, tanto en tiempo como en dinero dentro de cualquier programa de mejora. Esto es debido a que es necesario cruzar las líneas de mejora de las que se dispone y evaluar los híbridos obtenidos en ensayos de rendimiento. Sin embargo, las limitaciones de espacio muchas veces hacen que sólo un

escaso número de líneas de mejora puedan ser evaluadas como parentales. Aquellos parentales que posean una mayor aptitud combinatoria específica y una elevada distancia genética producirán un híbrido de interés comercial.

Por tanto, los híbridos se obtienen mediante el cruce de dos, tres o cuatro líneas puras (homocigóticas en todos los loci) elegidas de forma que garanticen la máxima producción y la máxima homogeneidad fenotípica en la explotación comercial. De esto se deduce que, las líneas puras son la base del proceso de obtención 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. Afortunadamente, las técnicas biotecnológicas de cultivo in vitro permiten acelerar mucho este proceso mediante la obtención de doble haploides, individuos totalmente homocigóticos para todos sus loci obtenidos por duplicación cromosómica de un genoma haploide.

Para la obtención de estas líneas son necesarias generaciones sucesivas de autofecundación y selección de los caracteres deseados, en un proceso largo y costoso en el que es necesario emplear una gran cantidad de recursos humanos y económicos. Como alternativa a estos programas clásicos de mejora para la obtención de líneas puras, se ha desarrollado una poderosa herramienta biotecnológica: la obtención de individuos dobles haploides (Seguí-Simarro, 2010b).

1.3. HAPLOIDES Y DOBLES HAPLOIDES

1.3.1. Importancia y utilidad en mejora

Los dobles haploides (DHs) son individuos totalmente homocigóticos para todos sus loci obtenidos por duplicación cromosómica, espontánea o artificial, de un genoma haploide. Los haploides son individuos con un número de cromosomas que es la mitad del número básico de la especie, es decir, con el mismo número de cromosomas que tiene un gameto de la especie. Su imposibilidad para realizar una correcta meiosis (los cromosomas no tienen sus homólogos y no se produce un apareamiento absoluto) les convierte en individuos estériles que impiden la propagación de la planta. Es por esto que es necesario conseguir la duplicación cromosómica y obtener individuos DHs (Cubero, 2003). En muchas de las especies en las que se ha empleado esta técnica, la duplicación cromosómica ocurre de manera espontánea, pero siempre hay algunos individuos en los que la duplicación del material genético no tiene lugar y se forman plantas haploides que resultan estériles (Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Por ello, es necesario comprobar la ploidía de los individuos regenerados para duplicar artificialmente su dotación cromosómica en el caso de que no se produjera espontáneamente (Cubero, 2003).

La producción de dobles haploides (DHs) logra reducir a tan solo una generación las típicas 7-8 generaciones de un programa de mejora necesarias para obtener una línea pura. Esta es su principal ventaja que permite que la obtención de híbridos sea un proceso mucho más rápido y barato (Seguí Simarro, 2010a).

En el caso de variedades comercializadas como líneas puras, la formación de dobles haploides puede generar directamente nuevos cultivares. Los productos recombinantes de un cruce son fijados mediante la producción de individuos haploides y su posterior duplicación, para ser después identificados y seleccionados por sus características agronómicas, ahorrando tiempo y dinero. Además, la selección es más eficiente utilizando dobles haploides, ya que se facilita la fijación de alelos recesivos beneficiosos y la selección de caracteres cuantitativos, principalmente debido a la eliminación de los efectos de la dominancia y la segregación dentro de las familias. 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 haploides y dobles haploides

- **Elaboración de mapas genéticos:** Los mapas genéticos proporcionan una herramienta para el cartografiado de los caracteres, lo cual es de especial interés para los mejoradores (Forster et al., 2007). Los dobles haploides son muy útiles en estudios básicos de ligamiento y estimación de fracciones de recombinación, debido a que en los DHs las combinaciones de marcadores se mantienen en homocigosis y a que se trata de líneas que pueden mantenerse por sí mismas a lo largo del tiempo (Seguí Simarro, 2010a). Han tenido una gran importancia en el establecimiento de mapas genéticos en diversas especies, como son cebada, arroz, colza o trigo.
- **Asociación de marcadores moleculares y caracteres fenotípicos:** Los dobles haploides son también muy útiles para establecer asociaciones entre marcador y carácter, agilizando y simplificando el desarrollo de mapas genéticos y la asociación de marcadores moleculares. Los mejoradores pueden evaluar las líneas DHs con mayor velocidad y precisión (Wedzony et al., 2009; Seguí-Simarro, 2010b).
- **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 el uso 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 (Wedzony et al., 2009; Seguí-Simarro, 2010b). Además, en los individuos haploides se manifiesta el fenotipo de todos los caracteres recesivos que contenga su genoma, y esto es interesante para estudios genéticos y de anotación de genomas.

- **Investigación genómica:** Para la identificación de genes que controlan un determinado carácter, un método que se utiliza de forma común 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, 2010a).

1.3.3. Métodos de obtención

Los DHs 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 DHs 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-zigótica 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, siendo 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, 2010b).
- **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 doble haploides más profundamente estudiada y la que ha demostrado ser más efectiva

(Wedzony et al., 2009). No obstante hay especies en las que esta técnica no funciona y por tanto se debe de recurrir a la ginogénesis.

- **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 DHs, como la cebolla, la remolacha, y en varias cucurbitáceas (Bohanec, 2009; Wei-ping et al., 2009). Debido a que el cultivo con el que se va a trabajar es la cebolla y esta se encuentra entre las especies en las cuales la androgénesis no ha sido exitosa, esta técnica se explicará con mayor detalle en el apartado siguiente.

1.4. GINOGENESIS

1.4.1. Fundamentos de la ginogénesis y metodologías de inducción

Según Ponce (2007) el término ginogénesis es utilizado para describir la posibilidad de obtener plantas haploides a partir del gametofito femenino. La inducción de plantas haploides *in situ* de forma espontánea fue descrita Blakeslee et al. (1922) en *Datura*, aunque este es un evento que ocurre con muy baja frecuencia y su uso práctico es muy limitado. En 1966 Guha y Maheswari describen por primera vez la inducción *in vitro* de haploides vía el cultivo de anteras y con ello se produce el principal progreso en este campo de la ciencia. Debido a que esta técnica resulto la más sencilla y eficiente para la mayoría de las especies, el estudio de la inducción de haploides vía ginogénesis fue postergado por más de una década (Yang y Zhou, 1982). Pasado este tiempo y debido a la imposibilidad de emplear la androgénesis en ciertas especies de interés agrícola se empezó a trabajar en la inducción de haploides ginogénicos en distintos géneros y especies.

Existen dos métodos principales para la inducción de plantas haploides mediante la vía de la ginogénesis. La primera consiste en la inducción *in situ* por polinización irregular, asistida por el rescate *in vitro* de embriones. La segunda vía consiste en la inducción *in vitro* cultivando los órganos femeninos no polinizados.

- Inducción *in situ*: Para esta técnica existen tres posibilidades distintas. La primera consiste en usar polen de la propia especie; el polen debe de tener un genotipo específico el cual causa un incremento en la tasa de embriones haploides formados, esto ha sido descrito en maíz por Lashermes y Beckert (1988). La segunda opción consiste en el uso de polen de especies silvestres relacionadas u otros géneros, de modo que se estimulen los órganos sexuales femeninos sin que llega a haber fecundación. En la mayoría de los casos el rescate de embriones *in vitro* acaba siendo necesario para asegurar la sobrevivencia del haploide. Esta técnica ha sido utilizada en trigo (Laurie y Bennett, 1988) y en patata (Hougas et al., 1964). La tercera posibilidad consiste en el uso de polen irradiado de la propia especie, el cual puede madurar en la planta o ser cultivado *in vitro*. Existen muchos ejemplos de esta aproximación en melón (Sauton y Dumas de Vaulx, 1987), zapallo (Truong-Andre, 1998) y cebolla (Doré y Marie, 1993) entre otras especies.
- Inducción *in vitro*: Consiste en el cultivo de órganos femeninos no polinizados. La primera inducción de haploides exitosa mediante esta vía fue obtenida por San Noeum (1976) en cebada. Como ventaja de esta técnica nos encontramos principalmente con la ausencia de polinización, de modo que en ningún caso obtendremos un embrión zigótico. Por el contrario, es posible que los embriones se desarrollen a partir de tejido no esporofítico, por tanto se debe de comprobar el origen de los mismos. Para la inducción los elementos más importantes son la composición del medio y el genotipo de la planta. *Allium cepa* y *Beta vulgaris* son las especies en las que más se ha estudiado este proceso.

1.4.2. Inducción de ginogénesis *in vitro*

La inducción de organismos haploides mediante ginogénesis puede abordarse mediante estrategias *in vivo* e *in vitro*. En este proyecto se van a emplear las aproximaciones *in vitro* debido a que son las que nos permiten tener un mayor control de las condiciones de inducción y son más sencillas de aplicar. Por ello será este punto el que se desarrollará a continuación.

La ginogénesis *in vitro* se puede conseguir cultivando óvulos, ovarios o yemas florales completas, todos ellos sin polinizar. Los procesos de inducción consisten en uno o dos pasos con subcultivos (Michalik et al., 2000) o sin ellos (Jakse y Bohanec, 2003), dependiendo del tejido y el protocolo que se vaya a utilizar.

El cultivo de óvulos es el más laborioso de todos. Los óvulos se pueden extraer inmediatamente después de la esterilización de las flores (Keller, 1990) o después de un precultivo de las yemas florales (Campion y Alloni, 1990; Bohanec et al., 1995).

El cultivo de ovarios se puede realizar de dos formas distintas. Los ovarios son aislados de la flor inmadura y cultivados hasta la formación de los embriones (Muren, 1989; Campion et al., 1992). O bien, las yemas inmaduras se cultivan primero durante 10-14 días y

seguidamente se procede al aislamiento de los ovarios y a su subcultivo hasta la formación de los embriones en un medio de regeneración diferente (Bohanec et al., 1995; Jakse et al., 1996). Este segundo método presenta como ventaja el hecho de que los ovarios se hinchan y su extracción es mucho más sencilla.

El cultivo de yemas florales es la vía más simple para la inducción ginogénica de haploides. Además en comparación con otras especies el rendimiento en regenerantes haploides de cultivo de óvulos de cebolla es muy bajo, con el cultivo de ovarios completos o yemas florales se obtienen rendimientos más altos. Teniendo en cuenta que el cultivo de óvulos es muy laborioso y sus rendimientos son bajos no es de extrañar que no sea utilizado para la cebolla.

Por lo que respecta al cultivo de ovarios, se estima que la extracción de estos en flores precultivadas requiere tres veces más trabajo que el cultivo de yemas florales completas. Teniendo en cuenta que la respuesta ginogénica en general para la cebolla es similar, es coherente que el método favorito en este cultivo sea el cultivo de yemas florales completas.

La autopolinización en el cultivo *in vitro* de yemas florales no tiene lugar. Según (Cohat, 1994), las anteras de cebolla son indehiscentes bajo las condiciones de cultivo *in vitro* debido a las condiciones de elevada humedad en el interior de la placa. El único inconveniente de cultivar las yemas completas frente al cultivo de ovarios, es el crecimiento de callos basales, los cuales se forman en ocasiones de las regiones septales de los nectarios. Estas flores con callo basal pueden dar lugar a la formación de embriones somáticos, no obstante este evento es muy dependiente del genotipo de la cebolla y no siempre tiene lugar.

Una vez presentadas las opciones que existen para la inducción de embriones ginogénicos *in vitro*, se presentaran las estructuras que potencialmente pueden dar lugar a su formación dentro del saco embrionario. Para la formación del saco embrionario o gametófito femenino, previamente se ha de formar una megaspóra (Figura 7). Esta megaspóra se origina a partir de los productos meióticos de una célula madre de la megaspóra, cuatro células se forman y tres de ellas degeneran. A este proceso se le denomina megasporogénesis. La célula restante, la megaspóra, dará lugar al saco embrionario mediante tres mitosis sucesivas. A todo este proceso se le conoce como megagametogénesis.

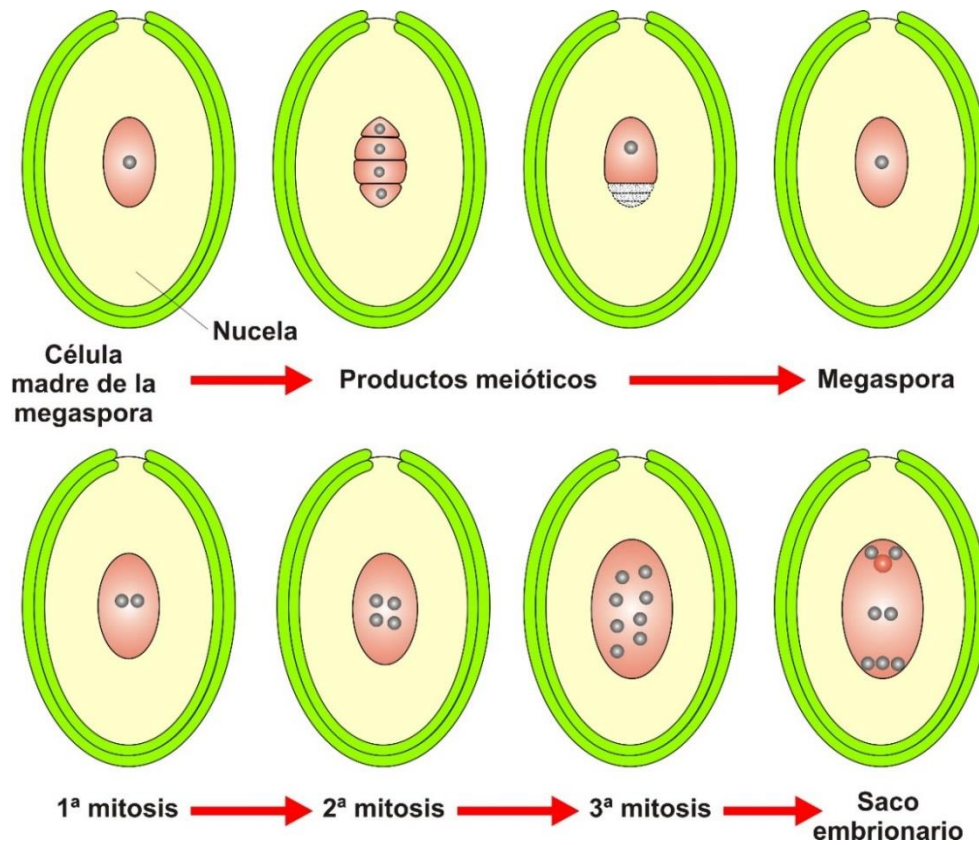


Figura 7: Megasporogénesis y megagametogénesis (Seguí Simarro, 2010a)

El saco embrionario (figura 8) está compuesto de ocho núcleos que se distribuyen en siete células. Dos grupos de tres células se ubican cada uno en un polo, rodeados de pared celular, y dos núcleos restantes se ubican en el ecuador de la célula central. El grupo que se sitúa en el polo próximo al micrópilo constituye el aparato ovular, y está formado por la célula huevo (gameto femenino) y dos sinérgidas laterales. Las sinérgidas son células de transferencia y presentan en el ápice el aparato filar cuya función parece ser atraer al tubo polínico.

El grupo que se ubica hacia el polo de la chalaza son las antípodas cuya función parece estar relacionada con la nutrición del saco embrionario. Los dos núcleos restantes, los núcleos polares, se ubican en la zona media de la célula central. Suelen fusionarse dando lugar al núcleo secundario antes de que se produzca la penetración del tubo polínico y están involucrados en la formación del endospermo (Seguí Simarro, 2010a).

San Noeum (1979) trató de analizar el origen de los proembriones ginogénicos en ovarios de cebada clasificándolos en ocho grupos, provenientes de:

- Célula huevo u ovocélula.
- Ovocélula y antípodas.
- Antípodas.
- Ovocélula y una sinérgida.
- Ovocélula y dos sinérgidas.
- Una o dos sinérgidas.
- Sinérgidas y antípodas.
- Sinérgidas, ovocélula y antípodas.

Según esta autora, los mejores resultados se obtuvieron de los proembriones provenientes de la ovocélula o de las células antípodas; los de las sinérgidas dieron lugar a la proliferación de estructuras tipo callo. Estas conclusiones son una especie de borrador o idea a partir de la cual seguir trabajando, ya que se obtuvieron a partir de ovarios diseccionados y observados con una lupa binocular siendo las observaciones confusas.

Más adelante Zhou y Yang (1981) llevaron a cabo observaciones más precisas en secciones de parafina en ovarios de arroz. Ellos observaron que la ginogénesis no se inicia hasta que los gametofitos maduran completamente durante el cultivo, es decir, no tiene lugar en estadios tempranos del desarrollo del saco embrionario. Los proembriones se situaban principalmente en zonas cercanas al micrópilo y estos derivaban de la célula huevo (figura 8). Estas observaciones fueron confirmadas por Kuo (1982) en arroz y por (Huang et al., 1982) en cebada.

Es interesante mencionar que a partir de los núcleos polares sin fertilizar se han dado casos en algunas especies en las que estos se dividen dando lugar a estructuras similares al endospermo (Zhou y Yang, 1981). No obstante, estas estructuras no parece que sirvan como tejido de sustento para los embriones ginogénicos que se forman.

Mayoritariamente solo existe una unidad ginogénica dentro de un saco embrionario. No obstante en cebada se encontraron varias (San Noeum, 1979; Huang et al., 1982) así como en arroz (Zhou y Yang, 1981). Se postularon dos posibilidades para este hecho. La primera fue la posibilidad de la formación de embriones a partir de diferentes células. La segunda fue la formación de diferentes embriones a partir de una única célula la cual se fue escindiendo en diferentes partes durante su posterior desarrollo.

Hasta ahora solo se ha presentado la embriogénesis directa como la vía de formación de embriones ginogénicos. No obstante al igual que en la androgénesis de microsporas, las plántulas haploides obtenidas mediante ginogénesis pueden haberse obtenido mediante embriogénesis o bien derivar de un callo (figura 8). Hasta la fecha en cebada (San Noeum, 1979; Huang et al., 1982) y en tabaco (Zhu et al., 1981) solo se ha observado formación de embriones, aunque en arroz (Asselin de Beauville, 1980; Zhou y Yang, 1981) y en trigo (Zhu et al., 1981) se observó tanto embriogénesis como callogénesis.

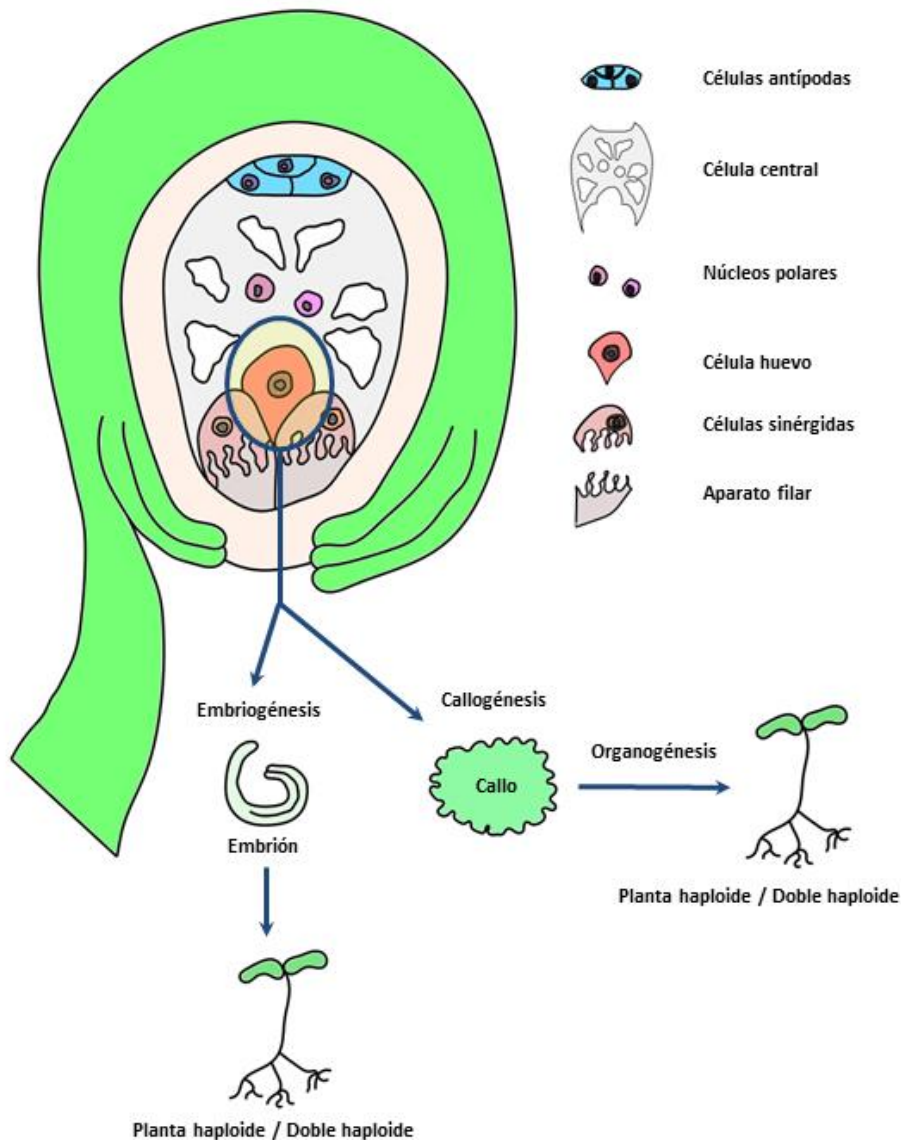


Figura 8: Esquema del saco embrionario y de la inducción de la ginogénesis a partir de la célula huevo.

1.4.2.1. Factores que afectan a la inducción

Los factores más importantes que afectan a la ginogénesis *in vitro* de la cebolla son: el genotipo, las condiciones de cultivo de la planta donante, el explante utilizado, el medio de cultivo y los reguladores de crecimiento (Ponce, 2007).

Es bien sabido que el genotipo es el factor más determinante en la inducción de la ginogénesis, ya que todos los autores que trabajan en este tema evidencian este fenómeno. En cebolla, Muren (1989) clasificó las plantas donantes en plantas de alta, media y baja respuesta, cuando el porcentaje de regenerantes es mayor que 2, entre 1 y 2 y menor que 1 individuo. La frecuencia de regenerantes reportada por Campion et al. (1995) a partir de flores y ovarios de seis cultivares diferentes se encontraba en torno al 0,1 y más del 5%. En otro estudio (Geoffriau et al., 1997) en el que se utilizaron 22 variedades de distinto origen geográfico se encontraron desde variedades recalcitrantes con un 0% de regenerantes hasta variedades de alta respuesta con 17%. Estos autores encontraron también variación en la respuesta según el

origen geográfico y aún dentro del mismo genotipo señalaron un efecto de la planta donante. Por todo esto hay que tener presente que el genotipo es un factor muy importante en la inducción. Por lo general los rendimientos son muy bajos considerando las variedades con rendimientos de individuos regenerantes respecto al total de flores cultivadas superiores al 10% de alta respuesta, siendo lo más habitual encontrar rendimientos entre el 0,1 y el 5%.

La relación existente entre la edad de la flor y la producción de regenerantes también ha sido ampliamente estudiada (Muren, 1989). Se encontró que los ovarios que más embriones ginogénicos produjeron fueron obtenidos entre tres y cinco días antes de la antesis. En este estado, el saco embrionario se encuentra en fase de célula madre de la megaspora y probablemente toda la fase de megasporogénesis y megagametogénesis tiene lugar *in vitro* durante los primeros días de cultivo (Guha y Johri, 1966). Posteriormente se correlacionó el tamaño de la flor con el rendimiento de embriones encontrándose así diferencias según el genotipo, no obstante en todos los casos las yemas florales con mayor respuesta oscilaban entre los 3,5 y 4,5 mm de tamaño (Michalik et al., 2000). En el momento de la inducción de las flores de la línea híbrida B0223B, Musial et al. (2001) encontraron sacos embrionarios maduros e inmaduros, pero al analizar las flores a los 7 días después de ser cultivadas *in vitro* encontraron mayoritariamente sacos embrionarios maduros. Esto indica que el saco embrionario inmaduro sigue su normal desarrollo *in vitro*. Los mismos autores encontraron que los embriones haploides se generan a partir del saco embrionario y plantearon la hipótesis de que los sacos embrionarios inmaduros tienen mayor capacidad partenogénica que el maduro.

Como ya se ha presentado anteriormente para la obtención de haploides vía ginogénesis se pueden emplear óvulos, ovarios o flores. Debido a su sencillez y a que presenta rendimientos comparables al resto de explantes, para la cebolla se emplean principalmente yemas florales.

Existen distintos estudios en los que se evalúan las condiciones de cultivo de la planta donante. Keller (1990) encontró que un mismo cultivar rindió significativamente más cuando la planta crecieron en un fitotrón que cuando lo hicieron en invernadero. Campion y Schiavi (1994) compararon el cultivo en invernadero de un mismo cultivar en dos épocas distintas y también encontraron diferencia en la obtención de embriones.

Puddephant et al. (1999) lograron aumentar 10 veces la tasa de regenerantes cuando las plantas cultivadas en maceta en invernadero fueron colocadas en cámaras de crecimiento al inicio de la floración a una temperatura de 15 °C. Michalik et al. (2000) también compararon el rendimiento en haploides obtenidos a partir de plantas cultivadas en campo y cultivadas en cámaras a 14 °C; este tratamiento mejoró el porcentaje de inducción en los cuatro genotipos ensayados. No se conoce el efecto del pretratamiento sobre la capacidad ginogénica de los óvulos, aunque a la vista de estos resultados podría pensarse que las bajas temperaturas disminuyen la velocidad de los eventos celulares en el saco embrionario dando más tiempo para recibir el estímulo de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo (Ponce, 2007).

La elección del medio de cultivo en cebolla tiene una base empírica ya que probablemente cada tipo de tejido tenga un requerimiento nutricional específico aunque en general se desconoce. El medio basal más extensamente utilizado es el BDS (Dunstan y Short, 1977) y en menor medida el B5 (Gamborg et al., 1968). Sobre la base de que varios aminoácidos, vitaminas e inositol, estimulan la partenogénesis (Mukhambetzhonov, 1997), se ha ensayado la adición de L-prolina, inositol y sulfato de adenina (Campion y Alloni, 1990; Bohanec et al., 1995; Jakse et al., 1996).

La concentración más adecuada para la inducción es del 10% en sacarosa siendo ésta la única fuente de carbono utilizada en procesos ginogénicos (Muren, 1989). Otro componente importante es el agente, siendo goma Gellan el que mayor porcentaje de regenerantes proporciona, aunque compromete la supervivencia final de los mismos (Jakse et al., 1996). Por ello en la mayoría de los trabajos se utiliza agar-agar al 7%.

La ausencia de reguladores de crecimiento permite la formación de haploides pero con una frecuencia muy baja (Ponce, 2007). Por esto es necesaria la adición de los mismos. En la mayoría de los trabajos los medios de inducción incluyen una combinación de auxinas y citoquininas, principalmente 2,4-D y BAP. En la etapa de regeneración el subcultivo a un medio sin reguladores de crecimiento presentó los mejores resultados en los trabajos de Campion et al. (1992,1994). Otros reguladores de crecimiento utilizados son las poliaminas. Estas mejoraron la tasa de regenerantes cuando utilizaron 4 mM de putrescina durante 15 días y luego las flores se subcultivaron en un medio con 0,1 mM de espermidina (Martínez, 2003). El rol de estos reguladores de crecimiento en la inducción de la partenogénesis puede explicarse a partir de los conceptos generales de auxinas y citoquininas. Durante la polinización el polen aporta ácido indol acético el cual estimula la división celular de la célula huevo fecundada, posteriormente será el endospermo el que aportará las auxinas hasta que finalmente el embrión sea capaz de sintetizarlas (Taiz y Zeiger, 1998). Por otra parte, en algunas especies se ha encontrado presencia de citoquininas en óvulo, embrión y endospermo (Besnier Romero, 1989). En estos casos no se conoce si estas citoquininas son sintetizadas *in situ* o provienen de las raíces o de los ápices vegetativos. Tanto las auxinas como las citoquininas promueven la división celular. Teniendo en cuenta el ciclo celular, las auxinas intervienen induciendo la síntesis de las ciclinas kinasas que actúan en el paso de fase G1 a fase S y de fase G2 a mitosis, además actúan en la citocinesis (Taiz y Zeiger, 1998). En un desarrollo partenocárpico no existe el aporte de auxinas del polen y como ya se ha mencionado, las citoquininas necesarias para el desarrollo del óvulo han de ser aportadas por otros tejidos. Tanto la ausencia del polen como la ausencia del resto de la planta (al separar las yemas para su cultivo *in vitro*) justifican el agregado exógeno de auxinas y citoquininas con el fin de promover la división de la oófera y de a partir de esta formar un embrión haploide (Ponce, 2007).

1.4.3. Ventajas e inconvenientes de la ginogénesis

La ginogénesis es una técnica de obtención de doble haploides menos ventajosa en comparación con la androgénesis o la hibridación interespecífica porque:

- No esta puesta a punto en la mayoría de las especies.
- Su eficiencia a la hora de obtener dobles haploides es muy baja. En comparación con la androgénesis el número de células susceptibles de inducción dentro del saco embrionario es mucho menor (no llega a una decena) que en el interior de las anteras (miles de microsporas).
- Mediante la ginogénesis pueden obtenerse algunos individuos que duplican de forma espontánea su material cromosómico. No obstante, esto sucede con baja frecuencia, siendo necesaria la aplicación de colchicina o amiprofosmetil, comprometiendo la supervivencia de los ya escasos regenerantes haploides.
- Malformaciones: La aparición de embriones con malformaciones es muy común en los procesos de ginogénesis. Las malformaciones más comunes son las relacionadas con una formación deficiente del meristemo caulinar: cotiledones múltiples, soldados, así como embriones albinos y con formas aberrantes.
- En el caso de la cebolla, al tratarse de una especie alógama, existen alelos letales que son portados en heterocigosis. Al obtener individuos haploides dichos alelos pueden manifestarse dando lugar a la muerte del embrión o la plántula regenerada. Aunque esto también ocurre en la androgénesis.
- Debido a que se cultivan tejidos que presentan células somáticas junto con las células gaméticas, siempre será necesario comprobar la ploidía de los regenerantes mediante citometría de flujo así como su naturaleza doble haploide mediante el uso de marcadores moleculares.

Pese a estas desventajas, la ginogénesis presenta algunas ventajas como por ejemplo:

- No es necesario que la floración de los parentales esté sincronizada como en la hibridación interespecífica.
- En la mayoría de las especies en las que la ginogénesis ha resultado exitosa, la embriogénesis es la ruta predominante, siendo la formación de callos un evento menos frecuente.
- En el caso de la cebolla la ginogénesis es una técnica de gran importancia para la obtención de líneas puras. La cebolla es una especie bienal alógama. Estas dos características hacen que un programa de autofecundación para la obtención de líneas puras además de necesitar muchos años implique problemas de depresión consanguínea. Por ello la ginogénesis es fundamental para la obtención de líneas puras haciendo el proceso asequible en un corto periodo de tiempo y evitando los problemas de depresión consanguínea.

- En ocasiones la ginogénesis puede ser la única vía para obtener individuos haploides en ciertas especies como es la cebolla.

Como se ha mostrado en esta introducción la ginogénesis es una técnica de la cual todavía se desconocen muchas cosas a pesar de ser la única vía de obtención de dobles haploides en algunas especies. Por ello, todos los avances en el conocimiento de esta herramienta biotecnológica pueden ser de gran ayuda para avanzar en la mejora genética. Sobretudo en cebolla que será la especie que se empleará en este trabajo.

2. OBJETIVOS

A pesar de ser la técnica más ineficiente, la ginogénesis es la única vía para la obtención de líneas dobles haploides en cebolla. Y por si fuera poco el genotipo es determinante para la inducción de embriones haploides. Por ello el objetivo principal de este trabajo es el estudio del proceso de inducción de ginogénesis en plantas de cebolla mediante cultivo de yemas florales. Para ello, los objetivos concretos de este trabajo son los siguientes:

Objetivo 1: Evaluar que condiciones agroclimáticas (invernadero o campo) son las mejores para el desarrollo de las plantas y cual es su respuesta al tratamiento de inducción.

Objetivo 2: Evaluar la competencia ginogénica de tres genotipos comerciales de cebolla empleando para ello el protocolo de inducción en dos pasos Michalik et al. (2000) siguiendo los pasos descritos en el trabajo de Fayos et al. (2015).

Objetivo 3: Obtener líneas dobles haploides de estos genotipos. Evaluar la acción del amiprofos-metil (APM) como agente duplicante.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

En este estudio se utilizaron tres genotipos de cebolla definidos como genotipos A, T y P de la empresa Vegenat S.A. Se desconoce si se trata de híbridos F1 o líneas en diferentes puntos del proceso de mejora. Todos los genotipos presentaron entre 1 y 5 escapos de aproximadamente 150 cm de altura. Los bulbos fueron de color blanco y tamaño medio. Las plantas experimentaron una floración irregular, algunas de ellas formaron la inflorescencia al mismo tiempo y otras se demoraron un poco más. El periodo completo de floración del total de las plantas tuvo lugar entre el día 16 de mayo y el 20 de junio de 2016, es decir, en aproximadamente un mes se cosecharon todas las umbelas y se pusieron las yemas florales en cultivo *in vitro*. Al ser una planta con una única floración en forma de inflorescencia fue muy importante dedicar el mayor tiempo del proyecto a la puesta en cultivo *in vitro* de las yemas antes de que se produjese la antesis de las flores.

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS DONANTES

Las plantas adultas fueron enviadas desde la empresa mediante un servicio de mensajería y fueron descargadas en los invernaderos de COMAV y en la parcela protegida con túnel de malla dentro del Campus de Vera de la Universitat Politècnica de València. Se dispuso de un total de 23 plantas del genotipo A, 17 del genotipo T y 16 del genotipo P, lo que hace un total de 56 plantas las cuales se distribuyeron la mitad en parcela y la otra mitad en el invernadero. Estas vinieron en macetas de 30 cm de diámetro las cuales se colocaron en una única fila (figura 9).

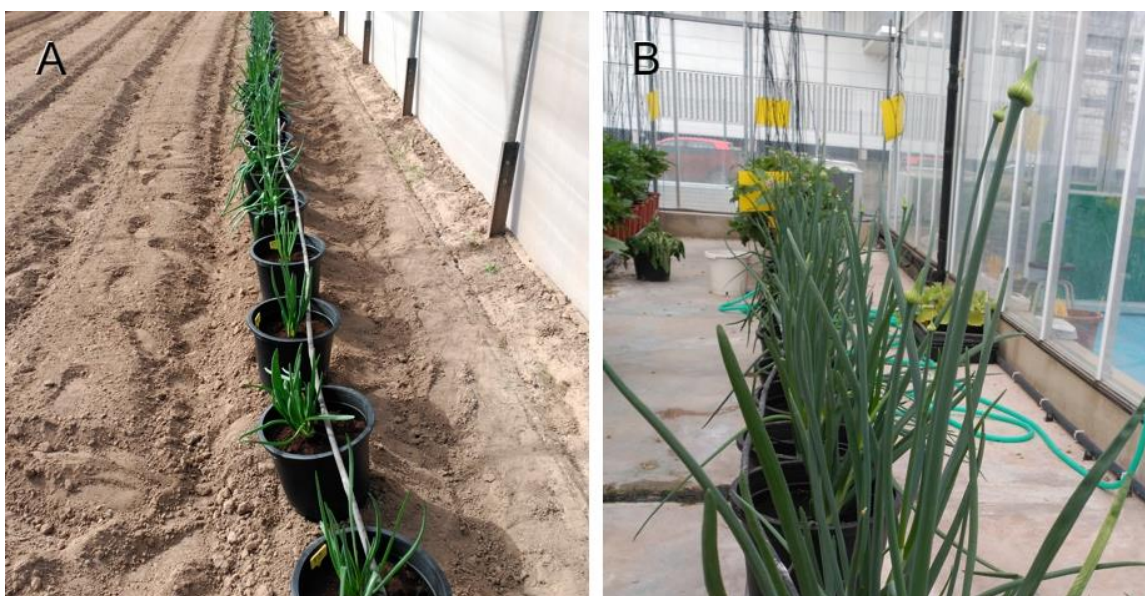


Figura 9: Plantas de cebolla en parcela (A); plantas de cebolla en invernadero (B)

A estas plantas se les aplicó el plan de fertirrigación aconsejado por la empresa (tabla 2) con una aportación aproximada de 35-45 l/m² por semana con una temperatura media de 25°C-28°C (para las de invernadero ya que las plantas de parcela estuvieron expuestas a la temperatura ambiental), sin que haya desecación total del terreno ni tampoco encharcamiento para evitar asfixias. Con respecto a posibles enfermedades y plagas se aplicó el siguiente tratamiento: Iprodiona 50%, Mancozeb 64% + Metalaxil 8%.

Tabla 2: Plan de abonado, los valores para cada compuesto en están en unidades fertilizantes.

	N	P₂O₅	K₂O
Semana 17	15	7,5	15
Semana 18	15	7,5	15
Semana 19	15	7,5	15
Semana 20	5	0	35
Semana 21	5	0	35
Semana 22	5	0	35

Las plantas se mantuvieron en estas condiciones hasta el momento de la cosecha de la umbela.

3.3. CULTIVO DE YEMAS FLORALES DE CEBOLLA *IN VITRO*.

Para aplicar el protocolo en dos pasos de Michalik et al. (2000) se siguió el método descrito por Fayos et al. (2015):

1. Se cosechan las umbelas enteras cuando aproximadamente el 30% de las flores han experimentado la antesis (figura 10A). Se transportan hasta el laboratorio a baja temperatura.
2. Se seleccionan 30 flores de cada umbela por cada placa, de una longitud comprendida entre 3,5-4,5 mm. Estas han de estar cerradas. La longitud se mide con un calibre (figura 10B).
3. En cabina se procede a la esterilización de las flores. Esta esterilización se realiza en tubos falcon de 50 ml (figura 10C).
 - a. En primer lugar se realiza un lavado con etanol 70 % durante 2 minutos.
 - b. En segundo lugar se realiza un lavado con ácido dicloroisocianurico sal disódica (15,5 g/L) durante 12 minutos. Es muy importante agitar bien durante los lavados para que el compuesto desinfectante penetre en la flor y elimine la contaminación endógena.
 - c. Finalmente se realizan 5 lavados de un minuto con agua destilada estéril. De nuevo hay que agitar bien para lavar.
4. A continuación las flores se depositan sobre un papel de filtro estéril para que este absorba el agua que les queda. Se cultivan las flores en placas con medio sólido (A1) ordenadamente en cuadrículas de 5 x 6 (figura 10D).

5. Estas placas se guardan en el fitotrón a 24°C con un fotoperiodo de 16h de luz 8h de oscuridad. Se quedarán así durante 30 días.
6. A los 30 días se realiza un subcultivo y las flores se depositan en medio R1 hasta la aparición de los embriones unos 60 días después.

Es muy importante no descuidar las placas en ningún momento. Es muy probable que aparezcan hongos y contaminación endógena, por lo que llegado el momento, se ha de disponer de placas de repuesto para subcultivar las flores que no estén contaminadas.

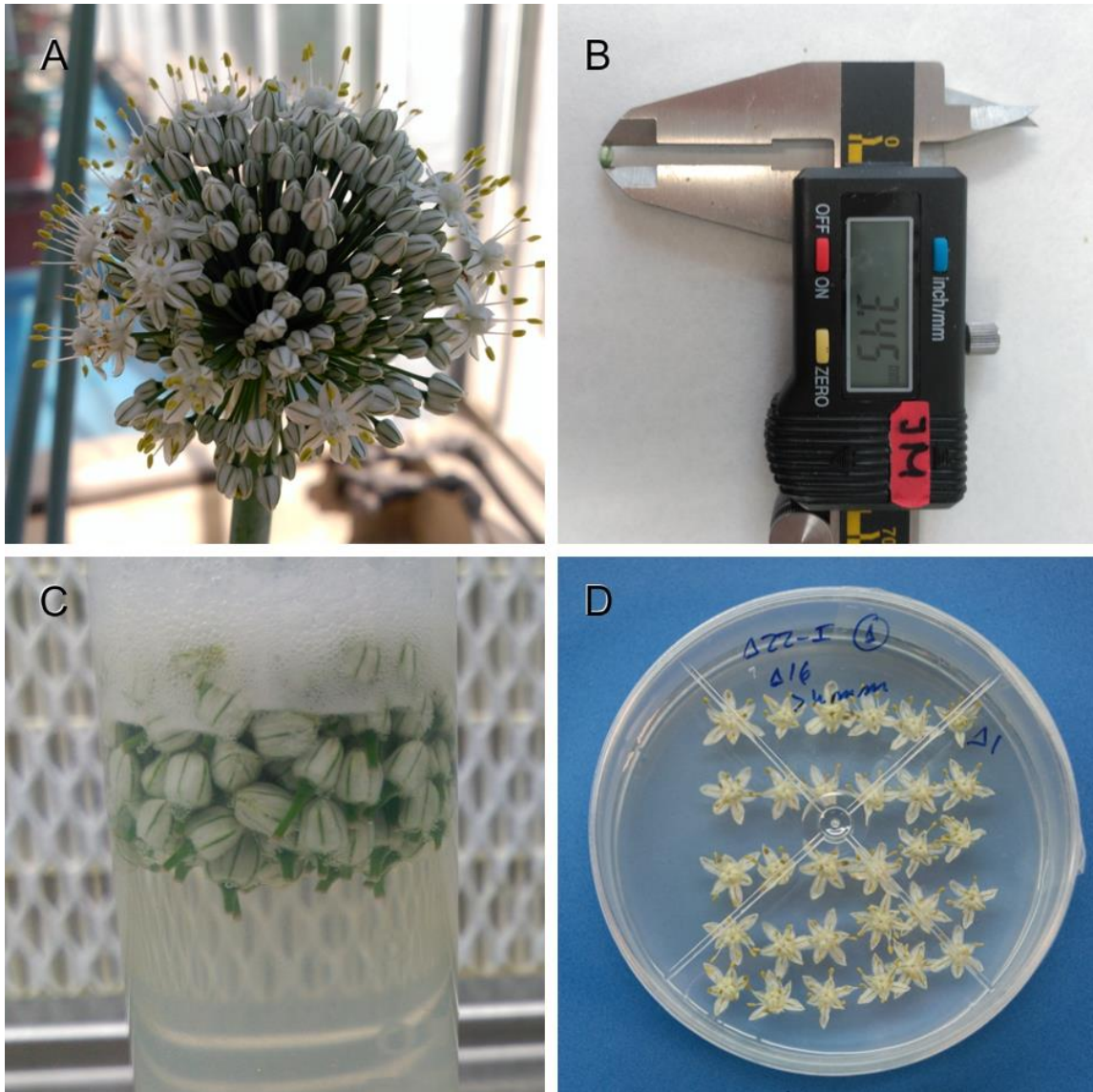


Figura 10: Proceso de cultivo *in vitro* de yemas florales de cebolla.; umbela en el momento adecuado para la cosecha (A); medida de las yemas utilizando un calibre (B); esterilización de la yemas en tubo de 50 ml (C); yemas puestas en cultivo *in vitro* (D)

3.4. RESCATE DE LOS EMBRIONES Y DUPLICACIÓN DE LA PLOIDÍA

A continuación se detalla el método para el rescate de los embriones del interior de ovario de la cebolla y para la duplicación de su genoma.

1. Cuando los embriones aparecen, rompiendo el tejido del ovario, se deja que estos alcancen un tamaño considerable para asegurar su supervivencia a la hora de rescatarlos (figura 11A).
2. Con la ayuda de dos agujas (figura 11D) y una lupa binocular (figura 11B) se extrae el embrión del tejido del ovario. Se les hace fotos antes (figura 11C) y después de rescatarlos (figura 11E).
3. Estos embriones se depositan en medio E1 + 25 μ M de APM durante 24h, para inducir la duplicación cromosómica.
4. Al día siguiente se cultivan dentro de tubos de vidrio (figura 11F) hasta que alcanzan un tamaño adecuado para aclimatarlos en maceta.

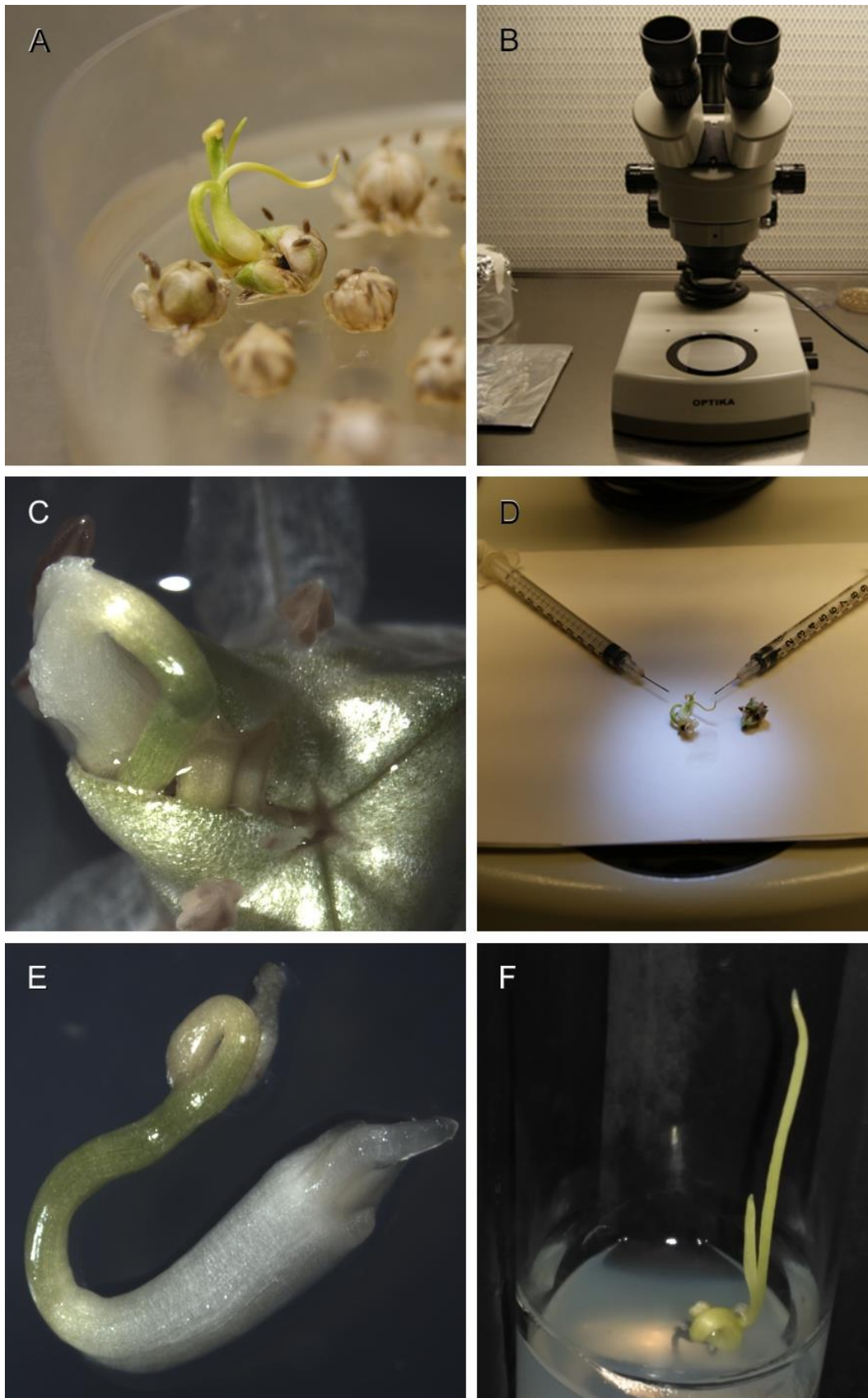


Figura 11: Proceso de rescate de embriones de cebolla; embrión rompiendo el ovario (A); lupa binocular empleada para el rescate de los embriones (B); embrión antes de ser rescatado (C); agujas empleadas para el rescate de los embriones (D); embrión aislado (E); embrión sembrado en tubo de vidrio(F)

3.5. ACLIMATACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

La aclimatación de las plántulas fue uno de los pasos más delicados y que más atención requirió de todo el proceso. Una vez los embriones son sembrados en medio E1 se hizo un seguimiento de su desarrollo. Tan pronto como estos empezaron a desarrollar raíces y experimentaron una elongación de los cotiledones de unos pocos centímetros fueron pasados a sustrato. Esta temprana aclimatación fue debida a que aquellos embriones que permanecieron más tiempo en condiciones de cultivo *in vitro* experimentaron una quemadura apical en los cotiledones que acabó causando la muerte de la plántula. Esto pudo ser debido a un efecto negativo de los reguladores de crecimiento o bien a un exceso de humedad. Otras hipótesis que se barajaron fueron efectos negativos del APM o bien efectos deletéreos de algún gen del propio embrión.

Las plántulas se extrajeron con cuidado del medio de cultivo, se lavaron las raíces con agua para eliminar los restos del medio y evitar así el posible crecimiento de microorganismos contaminantes y se plantaron en macetas de plástico cuadradas de 9 cm de lado y 10 cm de alto con sustrato de la marca Hortimix, compuesto por una mezcla de turbas y otros componentes de origen vegetal. Estas plantas se cultivaron en un fitotrón con un fotoperiodo de 16h de luz y 8h de oscuridad, a 25°C. Para evitar un cambio brusco de las condiciones de humedad relativa, las plantas recién trasplantadas se protegieron con un vaso de plástico totalmente transparente. Durante los siguientes 10 días el vaso se fue agujereando para que la humedad ambiental alrededor de la planta fuera disminuyendo paulatinamente, hasta que se retiró. El riego se realizó manualmente, según las necesidades de la planta.

A continuación se muestra un esquema general de todo el proceso a modo de resumen (figura 12):

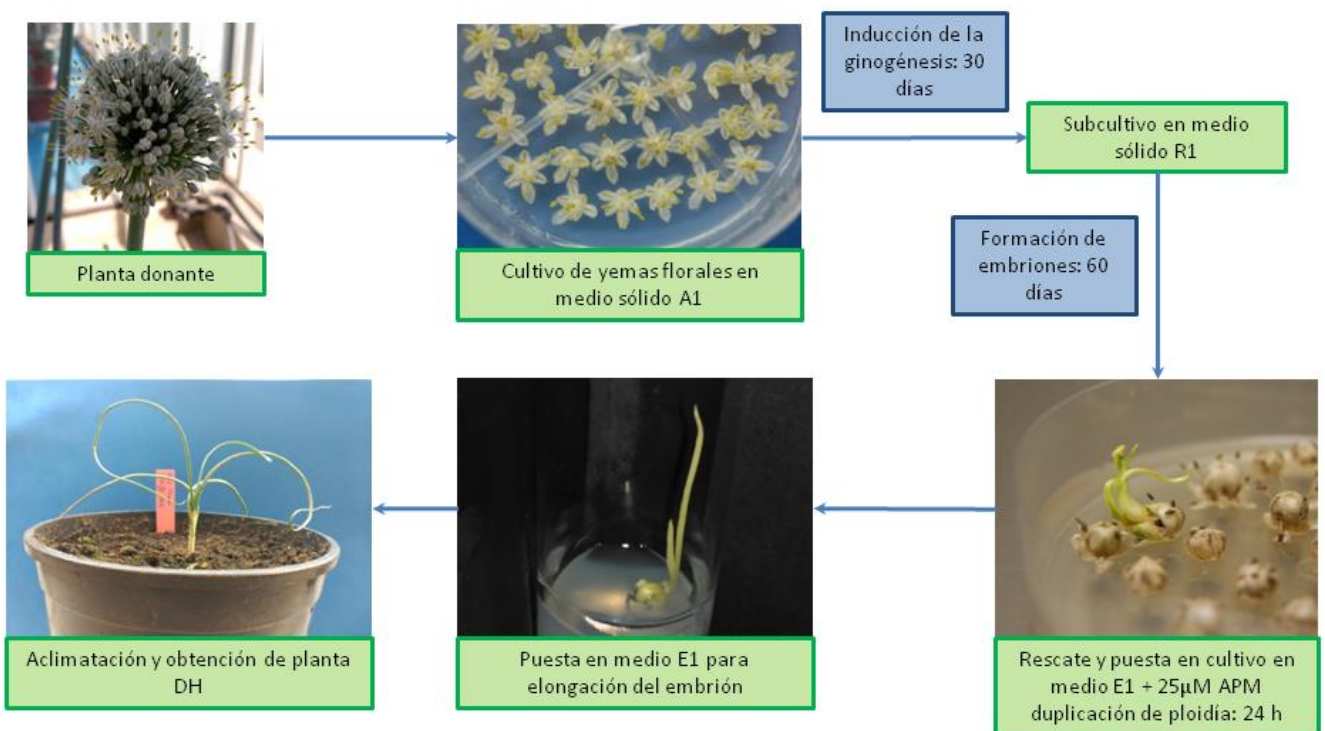


Figura 12: Esquema general del protocolo de obtención de DHs en cebolla.

3.6. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

En el siguiente apartado se presenta la formulación de los diferentes medios de cultivo utilizados en este proyecto. Para la inducción de la ginogénesis en las yemas de cebolla se empleó el medio A1 (tabla 3):

Tabla 3: Composición del medio A1 (Jakse y Bohanec, 2003) pH=5,8.

Macronutrientes	
Macronutrientes Gamborg	
Micronutrientes	mg/L
Micronutrientes Gamborg	
FeNaEDTA	40
Vitaminas y aminoácidos	mg/L
Tiamina 2 mg/L	2
Piridoxina	1
Ácido Nicotínico	1
Pantotenato Cálcico	1
Glicina	2
Ácido Fólico	1
Biotina	0.01
Myo-Inositol	100
Reguladores del crecimiento	mg/L
2,4-D	2
BAP	2
Fuente de carbono	g/L
Sacarosa	100
Agente gelificante	g/L
Plant Agar	7

El medio de regeneración empleado fue el medio R1 cuya composición se presenta en la tabla 4:

Tabla 4: Composición del medio R1 (Jakse y Bohanec, 2003) pH=5,8.

Macronutrientes	mg/L
Macronutrientes Gamborg	
NH ₄ NO ₃	320.16
NH ₄ H ₂ PO ₄	172
Micronutrientes	mg/L
Micronutrientes Gamborg	
FeNaEDTA	40
Vitaminas y aminoácidos	mg/L
Tiamina 2 mg/L	2
Piridoxina	1
Ácido Nicotínico	1
Pantotenato Cálcico	1
Adenina	2
L-Prolina	200
Myo-Inositol	500
Reguladores del crecimiento	mg/L
2iP	2
NAA	1
Fuente de carbono	g/L
Sacarosa	100
Agente gelificante	g/L
Plant Agar	7

Para la elongación de los embriones se empleó el medio E1 cuya composición se muestra en la tabla 5:

Tabla 5: Composición del medio E1 (Jakse y Bohanec, 2003) pH=6,0.

Macronutrientes	mg/L
½ Macronutrientes Gamborg	
NH ₄ NO ₃	320.16
NH ₄ H ₂ PO ₄	172
Micronutrientes	mg/L
½ Micronutrientes Gamborg	
FeNaEDTA	40
Vitaminas y aminoácidos	mg/L
Piridoxina	1
Ácido Nicotínico	1
Tiamina	10
L-Prolina	100
Myo-Inositol	250
Fuente de carbono	g/L
Glucosa	15
Agente gelificante	g/L
Plant Agar	7

3.7. ANÁLISIS DE LA PLOIDÍA DE LOS REGENERANTES

La ploidía de los embriones y de las plantas regeneradas se determinó mediante citometría de flujo (Partec CyFlow® Ploidy Analyzer). El material vegetal se obtuvo de embriones que no llegaron a aclimatarse (para evaluar el efecto del APM) y de las plantas ya aclimatadas, y consistió en fragmentos pequeños, de aproximadamente 1 cm², de hojas jóvenes y sanas. Las muestras se mantuvieron a 4°C antes y después de ser procesadas y hasta ser analizadas con el citómetro de flujo. Se añadió a cada muestra 0,5 ml del tampón de extracción de núcleos (tabla 6) y se picó con una cuchilla hasta que los fragmentos prácticamente no pudieron diferenciarse a simple vista. La suspensión resultante se filtró a un vial de 3,5 ml (Sarstedt) a través de un filtro CellTrics de 30 µm (Sysmex) para eliminar los restos de tejido vegetal, y se añadió 1,5 ml del tampón de tinción compuesto por 4,6-diamidino- 2-fenilindol (CyStain® UV Ploidy, Sysmex). El vial se colocó en el aparato para analizar la ploidía de cada muestra.

Tabla 6: Composición del tampón de extracción de núcleos.

	Concentración	Para 200 ml
Tris base	15 mM	0.36 g
Na₂EDTA	2 mM	0.148 g
Espermina	0.5 mM	0.02 g
KCl	80 mM	1.192 g
NaCl	20 mM	0.232 g
2-mercaptoetanol	15 mM	240 µl
Tritón X-100	0.1% (v/v)	200 µl

La posición de los picos de los histogramas generados por el citómetro no es absoluta, sino relativa, por lo que debe ser ajustada previamente basándose en una muestra control de referencia de ploidía conocida que en este caso fue la línea doble haploide de cebolla OH-1. Para facilitar la interpretación de los resultados, el pico G1 de la muestra de referencia se ajustó al valor 50 del eje de abscisas, y el pico G2 al valor 100 (figura 13).

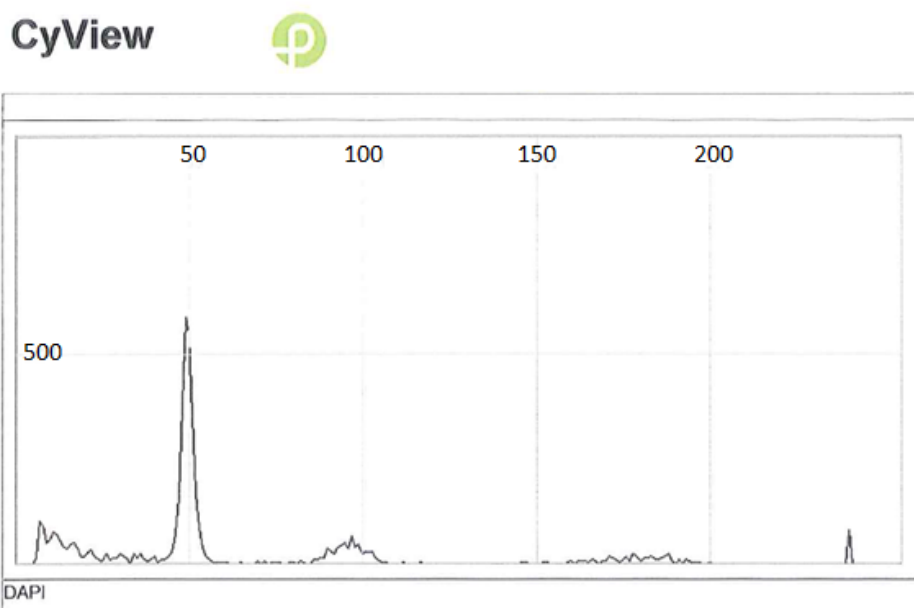


Figura 13: Histograma ajustado de la muestra de referencia.

3.8. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Todos los datos del proyecto fueron analizados con el programa StatGraphics Plus 5.1. Con ello se determinó la significación estadística de la tasa de contaminación de las flores cuyo origen era la parcela o el invernadero, así como que condiciones agroclimáticas fueron las más favorables. También se evaluaron los rendimientos en producción de embriones de cada genotipo. Como en todos los casos se trabajó con porcentajes, los datos se transformaron mediante el método del arcoseno de la raíz cuadrada y se realizó un análisis de la varianza, estableciendo un valor de $p=0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se presentarán los resultados de la evaluación de condiciones agroclimáticas y cuales fueron sus efectos para el buen o mal funcionamiento de los explantes en el cultivo *in vitro*. Seguidamente, la determinación del tamaño de yema más adecuado para la inducción de la ginogénesis en cebolla. Se presentarán los resultados de la inducción en los tres genotipos analizándose el rendimiento de cada uno de ellos en cuanto a la producción de embriones. Para finalizar se mostrarán los embriones obtenidos en este proceso, se analizará su morfología, su ploidía y su viabilidad.

4.1. EVALUACION DE LAS CONDICIONES AGROCLIMÁTICAS

En un principio el desarrollo de las plantas en ambas condiciones fue semejante, no obstante las plantas de parcela parecían más vigorosas, con escapos más gruesos e inflorescencias más grandes, mientras que los escapos en invernadero parecían ahilados y las inflorescencias más pequeñas (figura 14).



Figura 14: Detalle del escapo en la parcela (A); detalle del escapo en el invernadero (B)

Se observaron también algunas diferencias morfológicas entre las flores de la parcela y las del invernadero. Las flores de invernadero tenían pedúnculos más largos y yemas más ovaladas, mientras que las de la parcela tenían pedúnculos más cortos y gruesos y yemas más achatadas (figura 15)



Figura 15: Diferencia entre flor de invernadero (**derecha**) y flor de parcela (**izquierda**)

Como se vio en la introducción existe una adaptación varietal muy grande de cada uno de los cultivos a unas determinadas condiciones climáticas en lo que se refiere al binomio “formación de bulbos-floración”. Según los trabajos realizados por Brewster (1983) la iniciación de las inflorescencias se acelera con fotoperiodos largos (16-20 h) y temperaturas cercanas a los 9°C disminuyendo el aporte de nitrógeno. A medida que el fotoperiodo y la temperatura aumentan, su efecto promotor sobre el crecimiento de la inflorescencia será compensado en algún momento por los efectos perjudiciales causados por la competencia que se establece con el bulbo (Vankampen, 1970). Es probable que las diferencias de temperatura entre el día y la noche existentes en la parcela donde se llevaron a cabo los ensayos, en el mes de mayo de 2016, generaran este efecto beneficioso sobre el desarrollo de las inflorescencias. Las plantas de la parcela experimentaron un descenso de temperatura mayor durante la noche, mientras que las del invernadero se mantuvieron a una temperatura más elevada. Teniendo en cuenta que no hubo diferencias entre el fotoperiodo y el aporte de nutrientes se podría pensar que la temperatura fue el causante de las diferencias observadas.

Este aspecto más vigoroso de las inflorescencias de la parcela parecía prometedor ya que en estudios anteriores (Fayos et al., 2015) obtuvieron los mejores rendimientos en producción de regenerantes ginogénicos bajo condiciones de campo frente a condiciones de cámara de cultivo o invernadero. En los trabajos de Michalik et al. (2000) los mejores rendimientos también se obtuvieron en plantas cultivadas en campo a las cuales se les había aplicado un pretratamiento en cámara a 14°C. Y como él, otros autores comprobaron que el pretratamiento de las flores durante el inicio de la floración favorece la tasa de regenerantes, como se expuso en el correspondiente apartado de la introducción.

Lamentablemente hubo otros factores que dificultaron la evaluación de esta postulada superioridad de las plantas de campo frente a las cultivadas en invernadero, y que además dificultó mucho el uso *in vitro* del material proveniente de la parcela. Tanto las plantas de invernadero como las de parcela sufrieron diferentes plagas. Las plantas de invernadero tuvieron que ser tratadas en dos ocasiones contra la araña roja. Este hecho no afectó en gran medida a su viabilidad en el cultivo *in vitro*. Por otra parte las plantas de la parcela sufrieron también las plagas de araña, pero a pesar de haber sido tratadas, su viabilidad en cultivo *in vitro* fue mucho peor. Las flores presentaban una tasa de contaminación endógena muy elevada, y muy difícil de eliminar mediante los procesos de desinfección empleados. También, estas flores contenían en su interior en numerosas ocasiones trips que sobrevivían a los procesos de esterilización, lo cual propiciaba la contaminación en las placas de cultivo. Finalmente, cuando el sistema radicular de las plantas de la parcela creció lo suficiente como para salirse de la maceta y entrar en contacto con el suelo, estas plantas se infectaron probablemente por el hongo *Peronospora destructor*, más conocido como el mildiu vellososo de la cebolla. Este hongo genera grandes pérdidas anuales en la producción de cebolla a nivel mundial (Prohens y Nuez, 2008), el tejido parasitado pierde el color verde y va pasando a verde claro-amarillento, hasta llegar a un aspecto blanquecino, se debilita, las hojas en esa zona se doblan y la parte superior empieza a marchitarse terminando completamente seca. Estos síntomas coinciden con los que se observaron en las cebollas cultivadas en la parcela. Esto supuso que a los problemas de contaminación endógena de las flores se les sumase problemas graves en el desarrollo de las umbelas (figura 16) y de la planta en general. Esto afectaría al rendimiento en la respuesta de las plantas de la parcela ya que además de las contaminaciones, se dispuso de menos material vegetal para el cultivo *in vitro*.

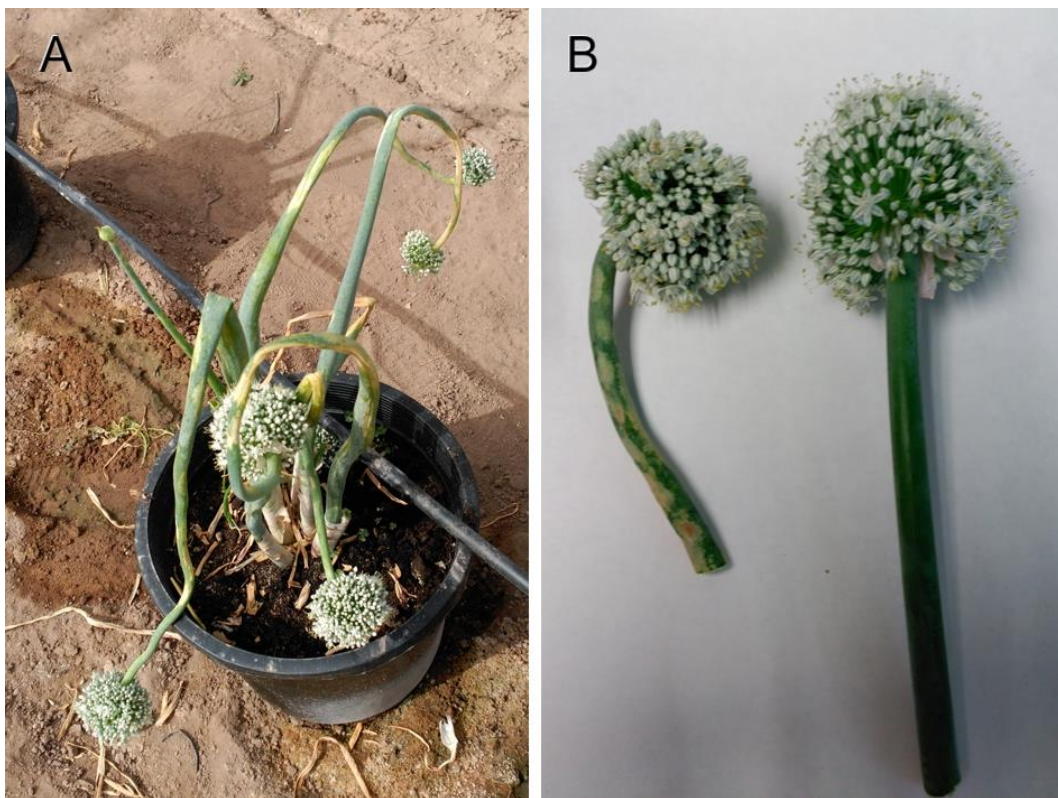


Figura 16: Síntomas del mildiu en la cebolla; planta infectada por mildiu (A); a la izquierda umbela de una planta de parcela infectada por mildiu, a la derecha umbela de planta de invernadero sana (B)

Por todo esto finalmente el material vegetal que mejor respuesta *in vitro* mostro fue el proveniente de invernadero. Presentaba menos contaminaciones tras la esterilización y mostró rendimientos más elevados en formación de embriones. En futuros trabajos se debería de controlar el material de campo de una manera más eficiente para evitar este tipo de problemas ya que a priori estas plantas presentaban un desarrollo más vigoroso. Probablemente se podría incrementar el rendimiento en producción de regenerantes trabajando con los materiales de campo al igual que ocurre en los trabajos citados anteriormente. Eso si, en el caso de que se consiguiese reducir en ellos la carga fúngica y bacteriana al tiempo que se controlan las enfermedades a las que estas plantas están expuestas en la parcela.

En la tabla 7 se muestra el número de flores puestas en cultivo y las pérdidas ocasionadas por contaminación:

Tabla 7: Comparación de pérdidas por contaminación de flores de parcela e invernadero puestas en cultivo *in vitro*.

Flores	Iniciales	% del total	30 días	%del total	% pérdidas
Parcela	3056	45,9	1418	32,8	53,6
Invernadero	3593	54,1	2900	67,2	19,3

Más de la mitad de las flores puestas en cultivo provenientes de la parcela se perdieron por contaminación. A partir de estas observaciones y resultados se podría afirmar que al menos en la zona de la huerta de Vera las condiciones agroclimáticas para el cultivo de cebolla, cuya finalidad es la producción de dobles haploides mediante ginogénesis, son muy desfavorables. Es preferible conservar las plantas en invernaderos para evitar los problemas de contaminación *in vitro* respondiendo así al primer objetivo de este proyecto.

4.2. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE YEMA ÓPTIMO PARA LA INDUCCIÓN

Debido a que el material de que se disponía era muy limitado y no se podían emplear demasiadas flores en este análisis, el tamaño óptimo de la flor se determinó a partir de datos previos de otros autores (Klein y Korzonek, 1999). Este tamaño está comprendido entre 3,5-4,5 mm de longitud de la yema floral, desde la base de los pétalos hasta la parte superior, sin tener en cuenta el pedúnculo (figura 18). Para algunas especies el ultimo estadio del desarrollo del gametofito femenino es el optimo para la inducción de la ginogénesis (Mukhambetzhonov, 1997; Michalik et al., 2000; Fayos et al., 2015), mientras que para otras el saco embrionario maduro es el que proporciona los mejores resultados (Ferrant y Bouharmont, 1994). La evaluación del estado de desarrollo de los óvulos en el momento de realizar el cultivo es difícil y costosa. Por ello existe un método indirecto de evaluación basado en la observación del estado de desarrollo de las microsporas y puede ser de ayuda en la elección apropiada de las flores para el cultivo *in vitro* (Mukhambetzhonov, 1997). En cebolla el saco embrionario está completamente maduro cuando la mayoría de las microsporas se encuentra en estado de polen uninuclear o binuclear, es en este momento cuando las flores están a punto de experimentar la antesis (Campion y Alloni, 1990). De acuerdo con Klein y Korzonek (1999), este momento se corresponde cuando las yemas presentan una longitud de 3,5-4,5 mm. En los trabajos de Michalik et al. (2000) las yemas con esta longitud se encontraban entre 2 y 3 días

antes de la antesis y sus anteras también contenían polen binuclear mayoritariamente. Por estos motivos se decidió emplear este intervalo de tamaño de yema en este trabajo.

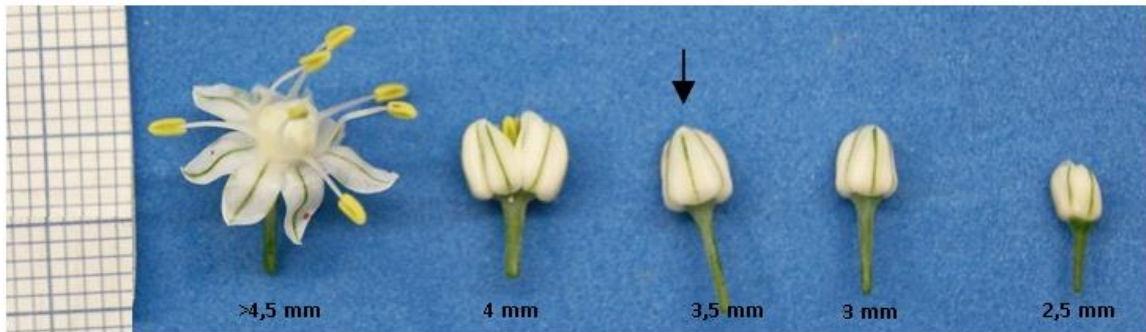


Figura 17: Distintos estadios en el desarrollo de la yema floral, la flecha señala el tamaño óptimo de yema para la puesta en cultivo *in vitro*.

Se probaron otros intervalos de longitud que fueron: 2,5-3 mm y de 3-3,5 mm. Este primer intervalo resultó en un mal desarrollo de la flor en la placa, ya que eran incapaces de experimentar la antesis *in vitro* y acababan necrosándose y muriendo (figura 18A). El siguiente intervalo no funcionó mal, pero tampoco tuvo la buena respuesta del intervalo de 3,5-4,5 mm ya que algunas de las flores de este intervalo tuvieron problemas para experimentar la antesis. En cambio las flores con una longitud comprendida entre 3,5-4,5 mm se desarrollaron satisfactoriamente, experimentando la antesis *in vitro* entre 3 y 7 días después de ponerlas en cultivo (figura 18B).

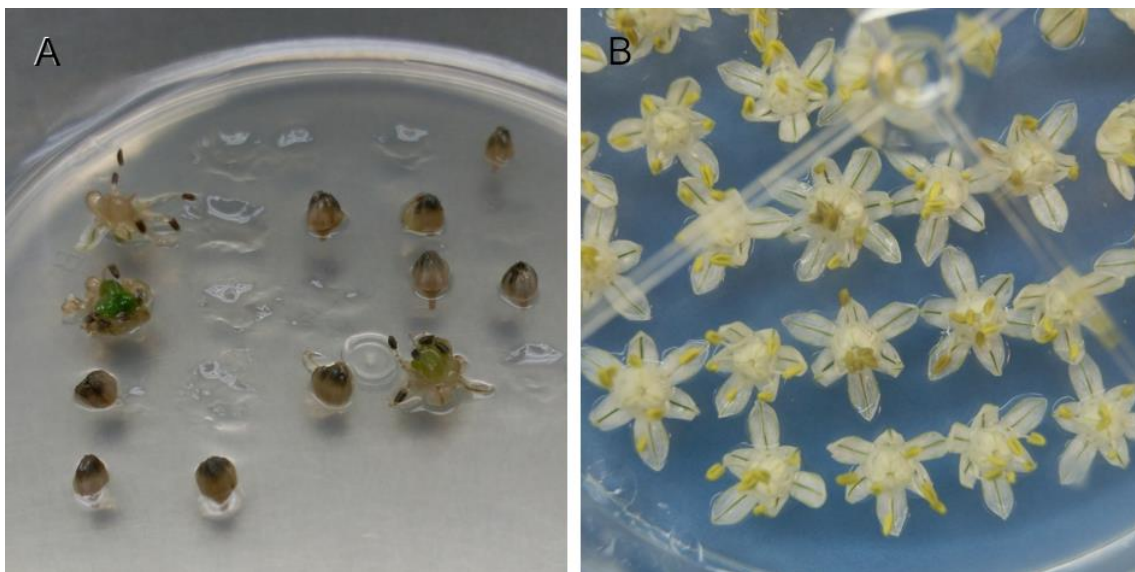


Figura 18: Comparación de la evolución de las yemas florales de diferentes intervalos de tamaño puestas en cultivo *in vitro*; intervalo 2,5-3mm (A); intervalo 3,5-4,5mm (B)

4.3. COMPETENCIA GINOGÉNICA DE LOS GENOTIPOS

En este apartado se presentan los resultados de la inducción del proceso ginogénico en las 6613 yemas florales que inicialmente se cultivaron *in vitro* entre los meses de mayo y junio del año 2016.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, se produjeron grandes pérdidas por contaminaciones, con lo que el número de yemas florales que potencialmente podrían producir embriones fue considerablemente menor. Aquellas yemas en disposición de dar lugar a embriones ginogénicos tras eliminar las contaminaciones fueron 4318. De estas, solo 24 dieron lugar a los 24 embriones ginogénicos que se obtuvieron finalmente. En la tabla 8 se muestran los individuos que produjeron los regenerantes, el número total de flores de cada individuo y el número final de embriones que produjeron. En todos los casos corresponde a un embrión por yema floral.

Tabla 8: Resumen de los embriones producidos. El código del individuo hace referencia en su primer carácter al genotipo A, T o P; el número hace referencia al individuo concreto, la letra I hace referencia a que este se desarrolló en invernadero y la C a lo hizo en la parcela.

Individuo	Flores Iniciales	Flores tras 1 mes	Embriones
A13I	81	48	1
A16I	60	48	1
A17I	131	112	1
A21I	210	204	1
A22I	180	137	7
A23I	160	144	2
T11I	126	109	4
T16I	143	143	1
P7C	257	232	1
P9I	161	155	2
P10I	104	95	1
P11I	90	89	1
P13I	138	120	1

El genotipo A dio lugar a la formación de un mayor número de embriones con un total de 13. Hay que destacar que el individuo A22 destaca por haber producido 7 de los embriones. El genotipo T dio lugar a 5 embriones, 4 de los cuales fueron producidos por el individuo T11. El genotipo P dio lugar a 6 embriones. Este fue el único genotipo en el cual uno de los individuos crecidos en la parcela dio lugar a la formación de un embrión. Este fue el individuo P7. Los embriones tardaron entre 60 y 90 días en formarse desde que las yemas se pusieron en cultivo, rescatándose la mayoría entre finales de julio y el mes de agosto, con la salvedad de la aparición de algún embrión aislado en el mes de noviembre.

Los rendimientos en producción de embriones se calcularon dividiendo el número de embriones producidos por cada uno de los genotipos entre el número de flores no contaminadas, teniendo en cuenta a todos los individuos del mismo genotipo y no solo a aquellos que dieron lugar a producción de regenerantes (tabla 9).

Tabla 9: Rendimiento en producción de embriones para cada uno de los genotipos.

Genotipo	Embriones	Flores finales	Embriones/Flores (%)
A	13	1418	0,91
T	6	1465	0,34
P	5	1435	0,42

Estos resultados, a pesar de que los rendimientos son bajos, fueron satisfactorios teniendo en cuenta que se está hablando de rendimiento en procesos de ginogénesis y que estos suelen ser muy bajos o nulos en general. En este caso los genotipos han dado lugar a rendimientos dentro de la media si tenemos en cuenta que no se tratan de líneas de alta respuesta. En 2015 Fayos et al. registraron rendimientos similares a los de este trabajo en los genotipos: Fuentes de Ebro (0,53%), Recas (2,09%) y BGHZ1354 (1,28%). En 2000, Michalik et al. estudiaron la capacidad ginogénica de 30 cultivares polacos de cebolla obteniendo resultados similares a los vistos en este estudio empleando el mismo protocolo. Estos rendimientos oscilaban entre el 0% y el 10% siendo el valor medio del 1.12%. Otras evidencias de que estos genotipos se encuentran dentro del rango de rendimiento en producción de embriones ginogénicos habitual son los trabajos ya citados en la introducción de Muren (1989) y Campion et al. (1995). Ambos registraron rendimientos que oscilaban entre el 0,1% y el 5%.

Por todas estas evidencias, se puede afirmar que los tres genotipos de cebolla empleados en este estudio responden satisfactoriamente a la inducción y son capaces de producir embriones ginogénicos. Se confirma así su competencia ginogénica tal y como se planteaba en segundo objetivo de este trabajo.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS EMBRIONES GINOGENICOS

Los 25 embriones obtenidos presentaron diferencias entre sí. Por su morfología podrían dividirse en 2 grupos:

1. Embriones albinos:
 - Embriones aberrantes y con deformaciones, que acaban muriendo.
 - Embriones normales que tras rescatarlos y exponerlos a la luz se vuelven de color verde.
2. Embriones bien formados: en ellos se aprecia dos polos definidos diferenciándose cotiledones, hipocotilo y radícula.

Se obtuvieron 8 embriones albinos de los cuales 4 tenían deformidades importantes (figuras 19A y 19B). No se diferencia ninguna polaridad en ellos y no pueden distinguirse los cotiledones ni las radículas, todas sus partes forman una masa que en todos los casos acaba muriendo sin formar plántulas. Los 4 restantes tenían una morfología más o menos normal aunque también eran albinos (figuras 19C y 19D) y adquirieron una tonalidad verde al exponerlos a la luz. Estos suelen presentar cierta polaridad, diferenciándose una radícula definida y los cotiledones enrollados. No obstante tras ponerlos a germinar adquieren la misma morfología que los embriones bien formados y son capaces de germinar *in vitro*. El resto de embriones presentó un aspecto normal (figuras 19E y 19F).

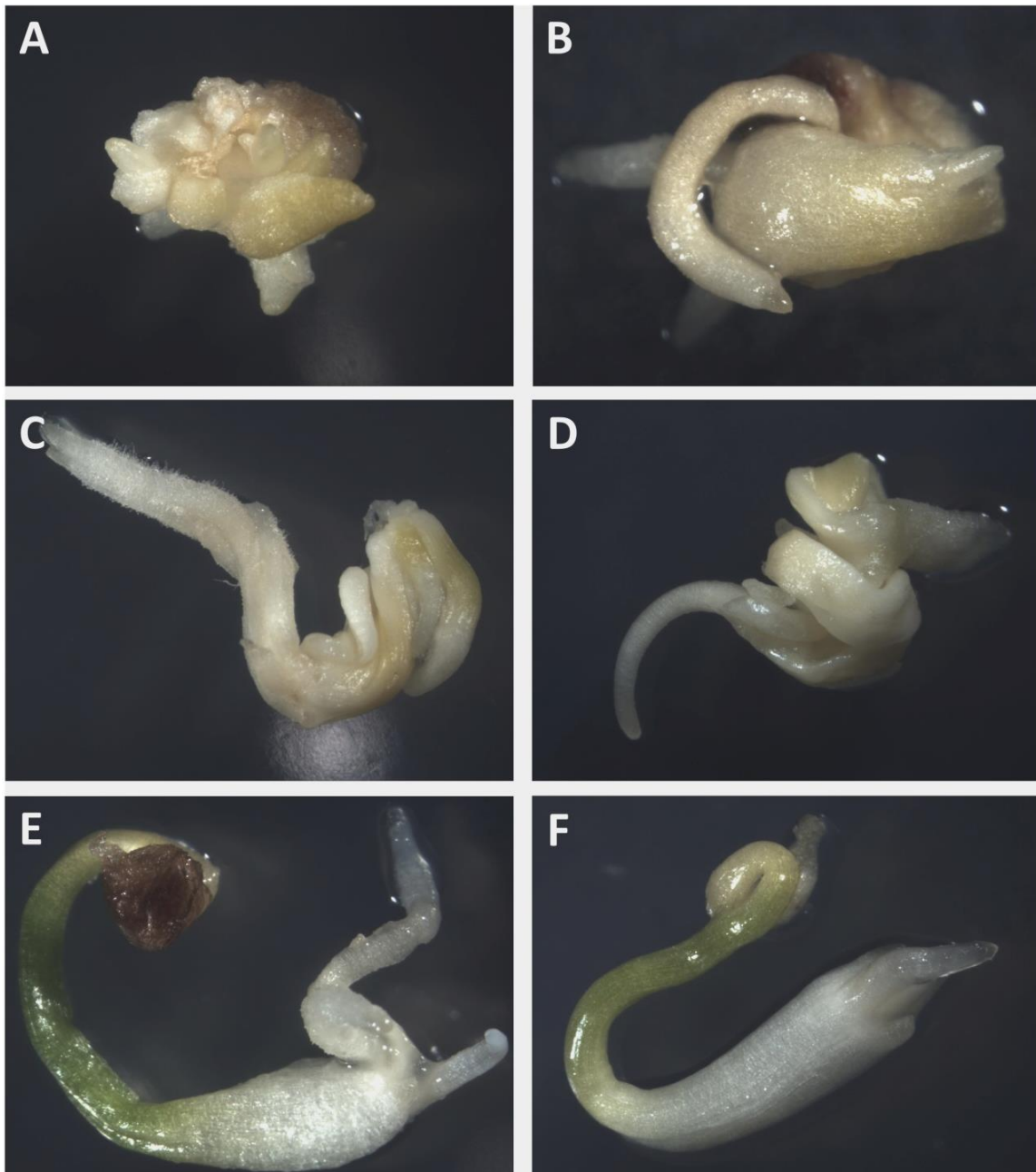


Figura 19: Distintos tipos de embrión ginogénico. Embriones albinos deformes **(A)** y **(B)**; embriones albinos con una morfología que les permite germinar *in vitro* **(C)** y **(D)**; embriones con morfología normal, polaridad y todas las partes bien definidas **(E)** y **(F)**

Los embriones ginogénicos experimentan un desarrollo similar a los embriones cigóticos, aunque pueden darse pequeñas variaciones. Además, los tegumentos y el endospermo, tejidos necesarios para la conservación y germinación del embrión, no se forman en los procesos de embriogénesis somática o ginogénesis (Dodeman et al., 1997). Por ello es posible que algunos de los embriones ginogénicos presenten ciertas anomalías morfológicas. 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. 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. Esta 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. 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 esféricas de citoplasma denso. 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. 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 meristemas apical y radicular definirá el eje embrionario. A ambos lados del meristemo apical tendrán lugar divisiones laterales localizadas que formaran dos protuberancias que originarán 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, 2010a). Y a partir de aquí seguirá desarrollándose pasando por estadio de embrión torpedo y finalmente cotiledonar. Un elevado porcentaje de embriones ginogénicos degeneran en diferentes puntos del su desarrollo. Probablemente pueda ser debido a errores al establecerse la polaridad del embrión, sobre todo en el momento en el que se diferencian las células que darán lugar a los diferentes meristemas, dando como resultado los embriones aberrantes que se han observado.

Otro motivo sería la expresión de alelos letales que hasta el momento de la formación del embrión habían estado silenciados por la acción de otro alelo en heterocigosis (Bhojwani y Dantu, 2003). Esto no es un fenómeno aislado, ya que otros autores han observado este tipo de anomalías morfológicas en embriones ginogénicos. En *Allium porrum* solo el 24% de los embriones producen plántulas, el resto sufren anomalías (Smith et al., 1991). Ocurre algo similar en cebolla, como por ejemplo en el cultivar "Stuttgart Risen", donde el 33% de los regenerantes presentan anomalías como hinchazón irregular del hipocotilo, poco vigor e hiperhidratación (Bohanec et al., 1995; Keller y Korzun, 1996) u otros trabajos en los cuales también describieron embriones albinos en sus experimentos (Campion y Alloni, 1990; Geoffriau et al., 1997). A día de hoy se desconoce el porque de la aparición de regenerantes albinos que a pesar de no ser demasiados aparecen con cierta frecuencia. Al parecer no es un problema que preocupe demasiado ya que en otras especies como cebada, arroz o trigo, la ginogénesis es una alternativa a la androgénesis para evitar precisamente problemas de albinismo (Bhojwani y Dantu, 2003).

Finalmente nombrar que el individuo A21 de una única flor dio lugar a un embrión que al ser extraído del interior del ovario, resultó ser un conjunto de embriones deformes que se encontraban entrelazados. Al separarlos se pudo contar un total de 6 estructuras ginogénicas (figura 20) que provenían del interior de una estructura necrosada similar a las nucelas y no presentaban ningún punto de unión con el tejido del ovario. Existe la remota posibilidad de que cada una de ellas proviniese de distintos núcleos del saco embrionario, según afirmaba (San Noeum, 1976) como se vió en la introducción. También podrían haberse generado por embriogénesis secundaria a partir del embrión principal, aunque no se pudo identificar uniones evidentes entre los embriones, los cuales se separaban fácilmente como unidades

independientes. En cualquier caso esto fue un caso aislado que se presenta como una curiosidad y no como un resultado representativo.

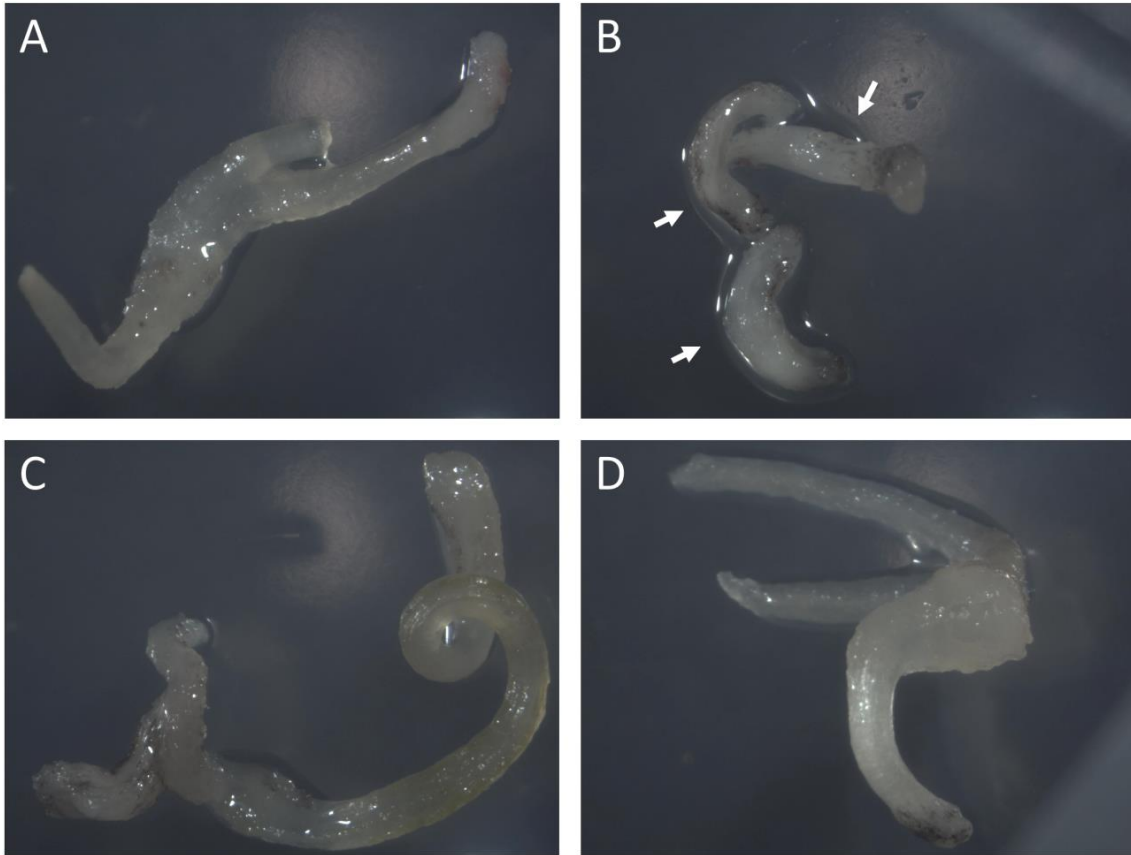


Figura 20: Estructuras embriogénicas aberrantes producidas dentro de un mismo saco embrionario del individuo A21; las flechas indican embriones aberrantes independientes (C)

4.5. ORIGEN Y PLOIDÍA DE LOS REGENERANTES

Tanto si se emplea la técnica de la androgénesis como si se emplea la técnica de la ginogénesis existe la posibilidad de que los embriones que se obtienen no provengan de células gaméticas y regeneren a partir del tejido somático de la antera o del ovario. Es por ello importante asegurarse del origen de los embriones. Para ello en este estudio se empleó una comprobación morfológica y otra empleando la citometría de flujo. Para experimentos futuros también sería interesante añadir un tercer nivel de comprobación que consistiría en un análisis con marcadores moleculares para confirmar si los individuos son 100% homocigotos para todos sus *loci*.

La comprobación morfológica consistió en la disección de ovarios inducidos (figuras 21A y 21B). Con esto se pudo observar que los embriones se formaban en el interior de lo que parecían tegumentos o nucelas necrosadas (figura 21C). Además en ningún caso el embrión estaba unido a los tejidos somáticos del óvulo. Todo indica que estos embriones provenían de las células del saco embrionario y que por tanto, su origen era haploide. Estos embriones se depositaron sobre el medio de germinación y se desarrollaron normalmente rompiendo la capa necrosada que los recubría (figura 21D).

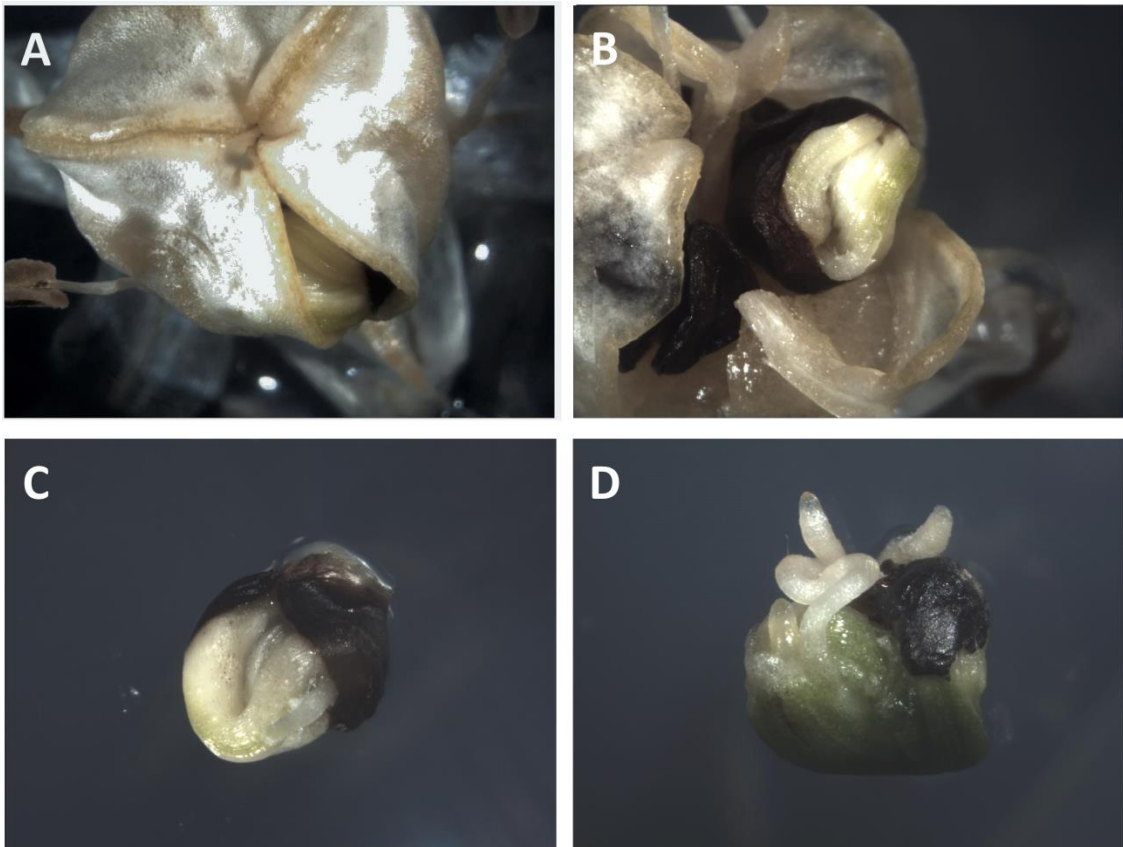


Figura 21: Disección de un ovario inducido; ovario hinchado empezando a romperse (A); interior del ovario en el que se aprecia un embrión ginogénico dentro del tejido necrosado de la nucela (B); embrión ginogénico aislado dentro de la nucela necrosada (C); embrión ginogénico desarrollándose *in vitro* (D)

Tras el tratamiento con APM las muestras fueron analizadas con el citómetro de flujo. Cabe indicar que dos de los embriones que se obtuvieron no se sometieron al tratamiento con APM. Esto fue debido a que la totalidad de los embriones que se sometieron a dicho tratamiento experimentaron una necrosis apical en estadios avanzados del crecimiento de la plántula impidiendo que esta pudiera aclimatarse correctamente y ocasionándole finalmente la muerte. Estos dos embriones control experimentaron una duplicación espontánea de su genoma y pudieron aclimatarse adecuadamente dando lugar a dos plantas dobles haploides. Estos embriones se originaron a partir del individuo T16, una de sus yemas dio lugar a un único embrión siamés que se escindió en estos dos embriones (figura 22).

No se le puede atribuir la causa de la muerte de los embriones al tratamiento con APM, ya que no hay evidencias suficientes para ello. Otros factores como los alelos letales presente en las especies alógamas (Bhojwani y Dantu, 2003) podrían ser la causa de este fenómeno, entre muchos otros factores durante la aclimatación. Para experimentos futuros en los que se disponga de más material vegetal y más embriones, sería necesario hacer más pruebas de duplicación de la ploidía empleando distintas concentraciones de APM. Debido a las limitaciones de material vegetal y a los pocos embriones ginogénicos obtenidos, en este trabajo solo se aplicó la concentración de 25 μM de APM, ya que fue la que mejores resultados dio en los trabajos de Fayos et al. (2015). Otra opción sería probar un tratamiento con otro agente duplicante como es la colchicina, aunque no es recomendable ya que este producto es mucho más agresivo que el APM y además es tóxico para los seres humanos.

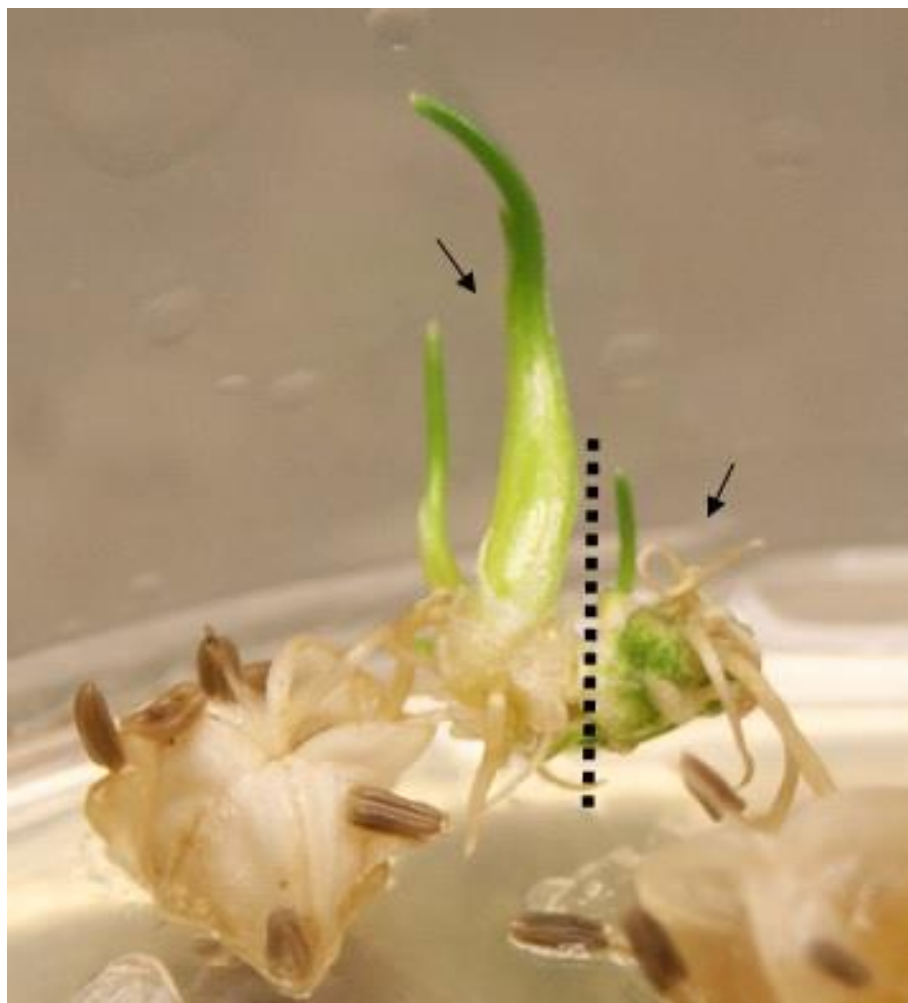


Figura 22: Embrión siamés del individuo T16; las flechas indican los dos embriones siameses, la línea discontinua indica la zona por la cual se separaron.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo para la ploidía de los embriones sometidos al tratamiento con APM (y los dos embriones control) se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Análisis de la ploidía de los embriones ginogénicos.

Tratamiento	Embriones	Nivel de ploidía				Plantas aclimatadas
		n/s	n	n+2n	2n	
25µM APM	23	7	2	7	7	0
Control	2				2	2

n/s No se disponía de suficiente material para la prueba de citometría

n individuos haploides

n+2n individuos mixoploides

2n individuos diploides

Los resultados parecen indicar que el tratamiento con APM si que dio lugar a la duplicación del genoma de la mayoría de los embriones. Los histogramas de los individuos diploides coinciden con la figura 13 del apartado de materiales y métodos. Los histogramas de los individuos haploides y mixoploides presentaron el aspecto de los mostrados en la figura 23. No obstante se deben de hacer más pruebas y ajustar bien esta parte del protocolo ya que todavía no se ha conseguido un tratamiento satisfactorio que además de duplicar la ploidía de los individuos permita su aclimatación.

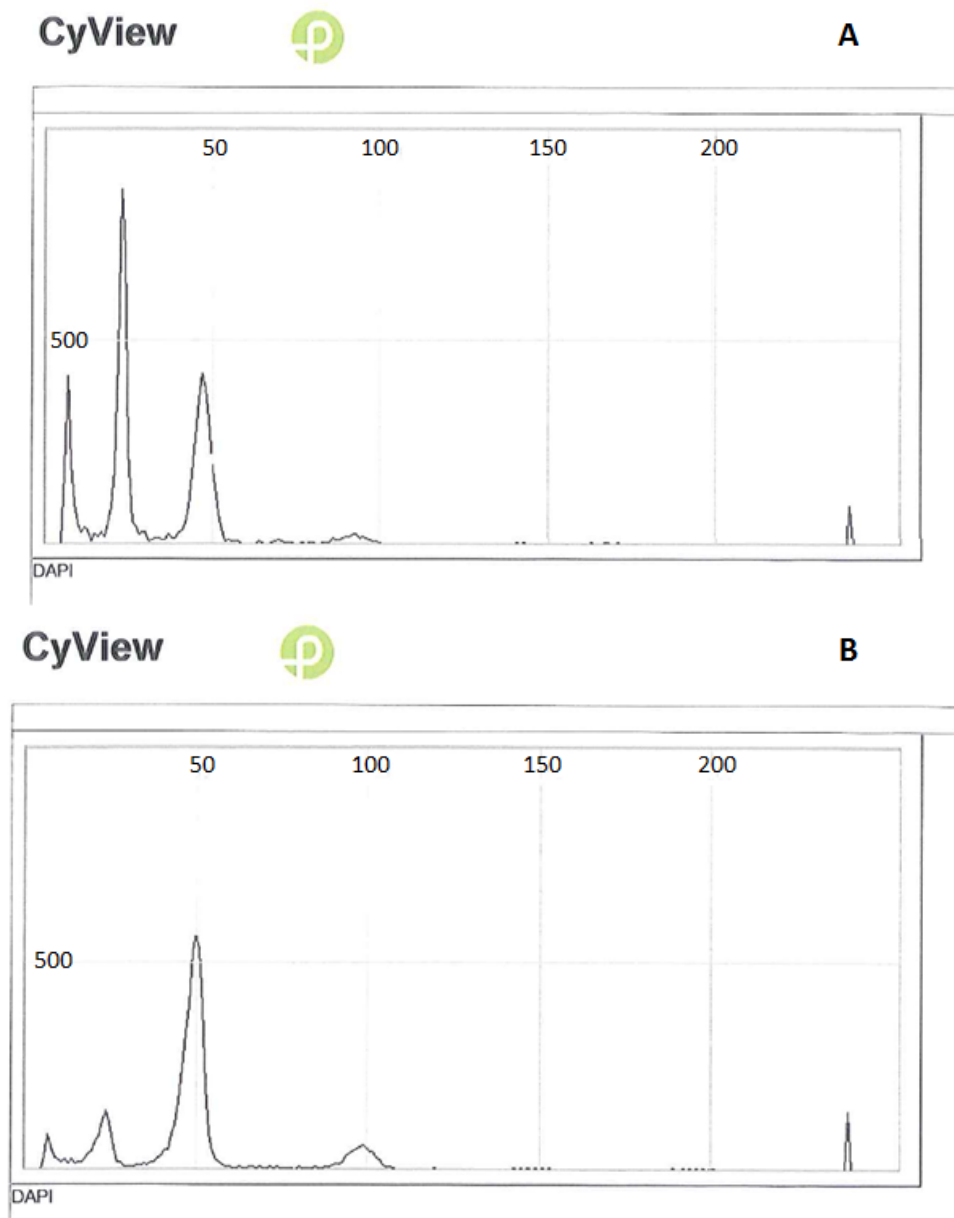


Figura 23: Aspecto de los histogramas de los individuos haploides **(A)** y mixoploides **(B)**

Finalmente los dos individuos control se aclimataron y se les hizo un seguimiento de su ploidía tomando muestra regularmente y analizándola con el citómetro. En los últimos análisis empezaron a mostrar un pequeño pico haploide, probablemente de alguna región que no experimento la duplicación espontánea y que al crecer la planta superó el umbral de detección del equipo. Estas dos plantas fueron entregadas a la empresa el día 20 de abril de 2017 (figura 24).

Con estos resultados se cumplió el objetivo 3 de este trabajo, obteniéndose dos individuos dobles haploides y evaluándose el papel del APM como agente duplicante. Estos datos servirán, en futuros trabajos, como punto de partida para mejorar el rendimiento de esta parte del protocolo.

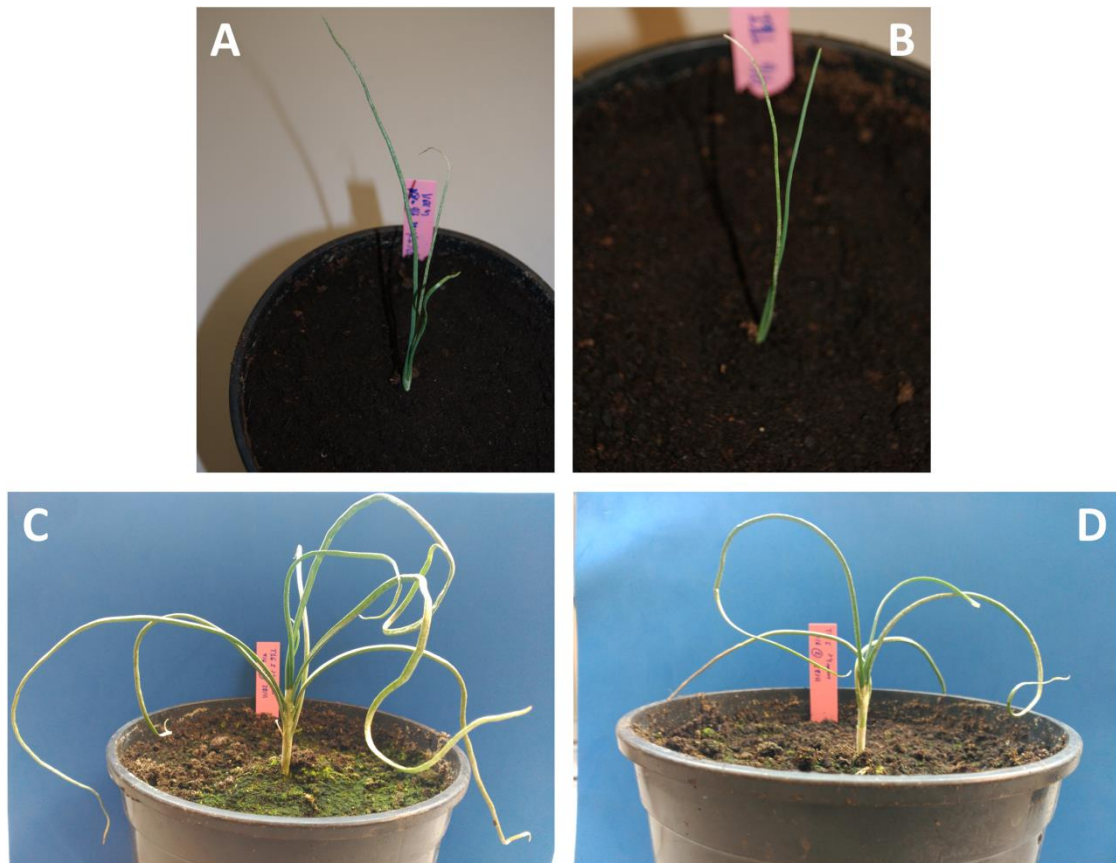


Figura 24: Plantas derivadas de los embriones T16I 1 y 2; Planta T16I 1 tras el proceso de aclimatación **(A)** y el día de entrega a la empresa **(C)**; Planta T16I 2 tras el proceso de aclimatación **(B)** y el día de entrega a la empresa **(D)**

5. CONCLUSIONES

1. Las condiciones más favorables para el cultivo in vitro de flores de cebolla con la finalidad de obtener dobles haploides mediante ginogénesis, son las de invernadero. Al menos en la huerta de Vera.
2. El protocolo de esterilización no consigue eliminar completamente la contaminación de las yemas provenientes de parcela.
3. El tamaño óptimo de la flor para la puesta en cultivo de estos genotipos esta comprendido entre 3,5-4,5 mm.
4. El protocolo en dos pasos de Michalik et al. (2000) ha sido exitoso para obtener dobles haploides de cebolla mediante ginogénesis al menos en estos genotipos obteniéndose un total de 24 embriones a partir de 4318 plantas. Con lo que se puede afirmar que la ginogenesis es posible en estos tres genotipos.
5. El tratamiento de 25 μ M de APM durante 24h ha conseguido duplicar la ploidía en la mayoría de los individuos. No obstante por algún motivo la aclimatación no ha sido satisfactoria por lo que seria recomendable hacer más pruebas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Asselin de Beauville, M.** (1980). Obtention d'haploides in vitro à partir d'ovaires non fécondés de Riz, *Oryza sativa* L. C.R. Acad. Sci. **296**, 489-492.
- Besnier Romero, F.** (1989). Semillas. Biología y tecnología. (Madrid).
- Bhojwani, S.S. y Dantu, P.K.** (2003). Gynogenesis. En Plant Tissue Culture: An Introductory Text (India: Springer), pp. 113-118.
- Blakeslee, A.F., Belling, J., Farnham, M.E. y Bergner, A.D.** (1922). A haploid mutant in the Jimson weed *Datura stramonium*. Science **55**, 646-647.
- Block, E.** (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Allium*- implications for the organic chemistry of sulfur. Angew Chem. Int. Ed. Engl. **31**, 1135-1178.
- Bohanec, B.** (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis. En Advances in Haploid Production in Higher Plants, A.F. Touraev, BP Jain, SM, ed (Springer), pp. 35-46.
- Bohanec, B., Jakse, M., Ihan, A. y Javornik, B.** (1995). Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) inductions procedures and genetic analysis of regenerants. Plant Sci. **105**, 215-224.
- Brewster, J.L.** (1977). The physiology of the onion. Horticultural Abstracts **47**, 17-23.
- Brewster, J.L.** (1983). Effects of Photoperiod, Nitrogen Nutrition and Temperature on Inflorescence Initiation and Development in Onion (*Allium cepa* L.). Ann. Bot. **51**, 429-440.
- Brewster, J.L.** (1994). Onions and other vegetable *Alliums*. (Wallingford, UK).
- Campion, B. y Alloni, C.** (1990). Induction of haploid plants un onion (*Allium cepa* L.) in vitro culture of unpollinated ovules. Plant Cell Otiss. Org. Cult. **20**, 1-6.
- Campion, B., Azzimonti, M.T., Vicini, E., Schiavi, M. y Falavigna, A.** (1992). Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through in vitro gynogenesis. Plant Sci. **86**, 97-104.
- Campion, B., Perri, E., Azzimonti, M.T., Vicini, E. y Schiavi, M.** (1995). Spontaneous and Induced Chromosome Doubling in Gynogenic Lines of Onion (*Allium cepa* L.). Plant Breed. **114**, 243-246.
- Campion, B. y Schiavi, A.** (1994). Production of doubled haploids lines of onion (*Allium cepa* L.): Progres report and problems. . En Proceedings of the International Colloquium on Inpact Plant Biotechnology on Agriculture (Rogla, Slovenia), pp. 25-33.
- Carravedo, M. y Mallor, C.** (2007). Variedades autóctonas de cebollas españolas.
- Cohat, J.** (1994). Production of gynogenetic plants by *in vitro* culture of flower buds in shallot (*Allium cepa* L. var aggregatum). Agronomie **14**, 299-304.
- Cubero, J.I.** (2003). Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición. (Madrid, Spain: Ediciones Mundi-Prensa).
- Dodeman, V.L., Ducreux, G. y Kreis, M.** (1997). Zygotic embryogenesis versussomatic embryogenesis. J. Exp. Bot. **48**, 1493-1509.
- Doré, C. y Marie, F.** (1993). Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L) after crossing eith irradiated pollen. Plant Breed. **111**, 142-147.
- Dunstan, D.I. y Short, K.C.** (1977). Improved Growth of Tissue Cultures of the Onion, *Allium cepa*. Physiol. Plant. **41**, 70-72.
- Dunwell, J.M.** (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. Plant Biotechnol. J. **8**, 377-424.
- Fayos, O., Vallés, M.P., Garcés-Claver, A., Mallor, C. y Castillo, A.M.** (2015). Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. Front Plant Sci **6**.

- Ferrant, V. y Bouharmont, J.** (1994). Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. Sex. Plant Reprod. **7**, 12-16.
- Forster, B.P., Heberle-Bors, E., Kasha, K.J. y Touraev, A.** (2007). The resurgence of haploids in higher plants. Trends Plant Sci. **12**, 368-375.
- Foury, C. y Schweisguth, B.** (1992). Amélioration des espèces végétales cultivées. En L'oignon, INRA, ed (Paris, Francia), pp. 406-419.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K.** (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. **50**, 151-158.
- Geleta, L.F., T., L.M. y Viljoen, C.D.** (2004). Relationship between heterosis and genetic distance based on morphological traits and AFLP markers in pepper. Plant Breed. **123**, 467-473.
- Geoffriau, E., Kahane, R., Bellamy, C. y Rancillac, M.** (1997). Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). Plant Sci. **122**, 201-208.
- 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.
- Guha, S. y Johri, B.M.** (1966). *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa* L. Phytomorphology **16**, 353-364.
- Guha, S. y Maheshwari, S.C.** (1966). Cell division and differentiation of embryos in tyhe pollen grains of *Datura in vitro*. Nature **1**, 97-98.
- Hougas, R.W., Peloquin, S.J. y Gabert, A.C.** (1964). Effect of seed parent and pollinator on frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. Crop Sci **4**, 593-595.
- Huang, Q.F., Yang, H.Y. y Zhou, C.** (1982). Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers in *Hordeum vulgare* L. Acta Bot. Sin. **24**, 295-300.
- Jakse, M. y Bohanec, B.** (2003). Haploid induction in onion via gynogenesis. En Doubled Haploid Production in Crop Plants, M.M.e. al., ed (Netherlands).
- Jakse, M., Bohanec, B. y Ihan, A.** (1996). Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. Plant Cell Rep. **15**, 934-938.
- Keller, E.R.J. y Korzun, L.** (1996). Ovary and ovule culture for haploid production. En In vitro Haploid Production in Higher Plants. (Kluwer Acad Publ), pp. 217-235.
- Keller, J.** (1990). Culture of unpollinated ocules, ovaries and flowers buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica **47**, 231-247.
- King, J.J. y Havey, M.J.** (1995). A low density genetic map of onion provides evidence for duplication and rearrangement during evolution of a large diploid genome. En Plant Genome IV (San Diego: CA), pp. 256.
- Klein, M. y Korzonek, D.** (1999). The relationship between flower size and developmental stage of *Allium cepa* L. umbels. Acta Biologica Cracoviensis, series Bot **41**, -in press.
- Kuo, C.S.T.** (1982). he preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice in vitro. Acta Bot. Sin. **24**, 33-38.
- Lashermes, P. y Beckert, M.** (1988). Genetic control of maternal haploidy in maize. Theor Appl Genet **76**, 405-410.
- Laurie, D.A. y Bennett, M.D.** (1988). The production of haploid wheat plants from what x maize crosses. Theor Appl Genet **76**, 303-397.
- Marín, J.** (2008). Portagrano. Vademécum de variedades hortícolas 2007-2008. (El Ejido (Almería): Escobar Impresores S.L.).
- Maroto, J.V.** (2002). Horticultura herbácea especial. (Madrid: Mundiprensa).
- Martin, B.E.** (2000). p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. BioEssays **22**, 637-645.
- Martínez, L.** (2003). In vitro gynogenesis induction and doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.). En Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual, M.

- Maluszynski, K.J. Kasha, B.P. Forster y I. Szarejko, eds (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 275-279.
- Michalik, B., Adamus, A. y Nowak, E.** (2000). Gynogenesis in Polish onion cultivars. *J. Plant Physiol.* **156**, 211-216.
- Mukhambetzhanov, S.K.** (1997). Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult* **24**, 833-834.
- Muren, R.C.** (1989). Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *Hortscience* **24**, 833-834.
- Musial, K., Bohanec, B. y Przywara, L.** (2001). Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Sex. Plant. Reprod.* **13**, 335-341.
- Ponce, M.T.** (2007). Ginogénesis en cebolla. *Avances en Horticultura* **5**, 1-12.
- Prohens, J. y Nuez, F.** (2008). Frontmatter (Vegetables II). En *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*, J. Prohens y F. Nuez, eds (New York, NY: Springer New York), pp. I-XI.
- Puddephant, I.J., Robinson, H.T., Smith, B.M. y Lynn, J.** (1999). Influence of stock plant pretreatment on gynogenic embryo induction from flower buds of onion. *Plant Cell Tiss Org Cult* **57**, 145-148.
- Rappaport, L. y Sachs, R.** (1976). *Physiology of cultivated plants.* (University of California).
- Roberts, J.** (2001). *Cabbages & king the origin of fruit & vegetables.* . (Ltd. London, UK: Harper Collins Publishers).
- San Noeum, L.H.** (1976). Haploides d'*Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* d'ovaries non fécondés. *Ann. Amélior. Plantes.* **26**, 751-754.
- San Noeum, L.H.** (1979). In vitro induction of gynogenesis in higher plants. . En *Proc. Conf. Broadening Genet., Base Crops*, ed (Wageningen: Pudoc), pp. 327-329.
- Sauton, A. y Dumas de Vaulx, R.** (1987). Obtention de plantes haploides chez melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese indute par du pollen irradiié. *Agronomie* **7**, 141-148.
- Schweisguth, B.** (1976). L'oignon. Chapitre II: Le matériel végétal. INVUFLEC. Paris, Francia: pp. 27-44.
- Schweizer, D.** (1976). Reverse Fluorescent Chromosome-Banding with Chromomycin and Dapi. *Chromosoma* **58**, 307-324.
- Seguí-Simarro, J.M.** (2010b). Androgenesis revisited. *Bot. Rev.* **76**, 377-404.
- Seguí-Simarro, J.M. y Nuez, F.** (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiol. Plant.* **134**, 1-12.
- Seguí Simarro, J.M.** (2010a). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas.* (Valencia, Spain: Editorial Universitat Politècnica de València).
- Smith, B.M., Godwin, R.M., Harvey, E. y Werner, C.P.** (1991). Gynogenesis from whole flower buds in bulb onion (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.). *J Genet Breed* **45**, 353-358.
- Snape, J.W.** (1989). Doubled haploid breeding: theoretical basis and practical applications. En *Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988: 2nd International Symposium on Genetic Manipulation in Crops*, A. Mujeeb-Kazi y L.A. Sitch, eds (Mexico y Filipinas: CIMMYT y IRRI), pp. 19-30.
- Taiz, L. y Zeiger, E.** (1998). *Plant physiology.* (Massachusetts).
- Thicoipe, J.P.** (1976). Les besoins en eau de l'oignon. En *L'oignon*, INVUFLEC, ed (Paris, Francia).
- Thompson, H.C. y Kelly, W.C.** (1957). *Vegetable Crops.* (Nueva york-Toronto-Londres).
- Troung-Andre, I.** (1998). *In vitro* haploid plants derived from pollination by irradiated pollen on cucumber. En *Cucurbitaceae 88: Proceedings of the Ixth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, INRA, ed (France), pp. 143-144.
- Vankampen, J.** (1970). Shortening the breeding cycle in onions.
- Vavilov, N.I.** (1926). Centers of origins of cultivated plants. *Trudy Prikl. Bot. Gen. Sel.*, 139-248.

- Wedzony, M., Forster, B.P., Zur, I., Golemić, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E. y Gotebiowska, G.** (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. En *Advances in haploid production in higher plants*, A. Touraev, B.P. Forster y S.M. Jain, eds (Dordrecht, Netherlands: Springer), pp. 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.
- Yang, H.Y. y Zhou, C.** (1982). In vitro induciment of haploid plants from unpollinated ovaries. *Theor Appl Genet* **63**, 97-104.
- Zhou, C. y Yang, H.Y.** (1981). In vitro induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza sativa* L. *Acta Genet. Sin.* **7**, 287-288.
- Zhu, Z.C., Liu, Z.Y., Wu, H.S. y An, Q.K.** (1981). Development of embryoid from the unpollinated ovary of *Nicotiana tabacum* cultivated in vitro. *Acta Bot. Sin.* **23**.