



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

Efecto del ácido abscísico en la respuesta androgénica de microsporas de *Brassica napus*

Autora: María Remírez de Ganuza Monfort

Directores: José María Seguí Simarro

Ricardo Mir Moreno

Máster en Mejora Genética Vegetal

Universitat Politècnica de València

Curso 2019-2020

Valencia, julio 2020

Brassica Napus. 314.

Título: Efecto del ácido abscísico en la respuesta androgénica de microsporas de *Brassica napus*

Resumen:

La inducción de androgénesis es un proceso por el cual las microsporas o células precursoras del polen son inducidas a formar embriones bajo determinadas condiciones de cultivo *in vitro*, obteniéndose así plantas haploides que, de manera natural o forzada, pueden dar lugar a individuos doble haploides (DHs) homocigotos en un único paso. Esta metodología permite acortar tiempos en la producción de líneas puras para programas de mejora genética vegetal. La obtención de individuos DHs se puede conseguir tanto por cultivo de anteras como por cultivo de microsporas, si bien este último método genera una mayor cantidad de embriones que además proceden exclusivamente de células gaméticas, evitando así la posible obtención de plantas diploides procedentes del tejido somático de la antera. Un mejor conocimiento de los fundamentos básicos de los mecanismos que subyacen a procesos biológicos como la androgénesis podría ayudar a aumentar la respuesta androgénica en especies recalcitrantes de interés comercial.

La respuesta androgénica depende de diversos factores, tanto genéticos como ambientales, e incluso de tipo metodológico (por ejemplo, el protocolo utilizado). En nuestro laboratorio se ha observado que la inducción de la respuesta embriogénica de microsporas de colza está acompañada por la acumulación de calosa en la capa subintinal de microsporas, la cual podría proteger a las microsporas, y contribuir así a superar el estrés al que se le somete para inducir la embriogénesis. Por otro lado, se ha descrito previamente que el ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que realiza importantes funciones dentro de la planta, entre las que se encuentran la respuesta a distintos tipos de estrés y el control de la regulación de procesos osmóticos. El ABA es además un activador de la síntesis de calosa en plantas en procesos de respuesta a patógenos. Por esta razón hemos estudiado el efecto de la aplicación de ABA en cultivos de microsporas de colza, y hemos analizado su respuesta androgénica. Además, hemos analizado mediante tinciones vitales el efecto del ABA sobre la viabilidad de las microsporas. Finalmente hemos analizado por microscopía confocal la acumulación de calosa en microsporas de colza tanto tratadas con ABA como crecidas en condiciones control.

Palabras clave

ácido abscísico; microsporas; *Brassica napus*; embriogénesis; colza; calosa; estrés; androgénesis

Title: Effects of abscisic acid on the embryogenic response of *Brassica napus* microspores

Abstract:

Induction of androgenesis is a process where microspores or pollen precursor cells are induced to produce embryos under certain *in vitro* culture conditions thus obtaining

haploid plants and eventually homozygous doubled haploid (DHs) individuals in a single step. This fact allows us to shorten the time needed to produce pure lines for plant breeding programs. DHs can be obtained by both anther and microspore cultures. Microspore cultures generate larger amounts of embryos, coming exclusively from haploid cells and therefore avoiding the possibility of obtaining non-DH plants developed from anther somatic tissue. A better understanding of the fundamentals of the mechanism behind this process might help increase the androgenic response in recalcitrant species of commercial interest.

The androgenic response depends on a set of diverse factors, including genetic, environmental, and methodological factors (i.e. the protocol to be used). We previously observed that the induction of the embryogenic response in rapeseed microspores is accompanied by the accumulation of callose in a new cell wall layer, which in turn can help to protect the microspore, and contribute to overcome the stress applied to induce embryogenesis. On the other hand, it has been previously described that abscisic acid (ABA) is a plant hormone with important functions, such as response to stress and regulation of osmotic balance. Furthermore, ABA also regulates callose synthesis as part of the response to pathogen attack. For these reasons, we have studied the effect of ABA application to rapeseed microspore cultures, and we have analyzed their androgenic response. Through the use of a vital stain, we have also analyzed whether the effect of ABA results in an increase in its viability. Finally, using confocal microscopy, we have observed the accumulation of callose in microspores treated with ABA versus control conditions.

Keywords:

abscisic acid; microspores; *Brassica napus*; embryogenesis; rape; callosa; stress; androgenesis

Abreviaturas

DH: Doble haploide

ABA: Ácido abscísico

NLN: Nitsch & Nitsch

PE: Plantas exterior

PF: Plantas fitotron

Agradecimientos

Este trabajo es el broche final, no solo de este máster, sino de mi estancia en Valencia. Unos años que siempre recordare con alegría y cariño a pesar del final abrupto que ha tenido. Desde luego, cuando me fui de Valencia en mayo no esperaba que iba a ser mi última vez como estudiante. Esta pandemia ha sido algo que nos ha interrumpido la vida a todos, pero creo que ha sido una experiencia de la que podemos recalcar el valor de la ciencia y su importancia. Ojalá esta situación sirva para darle en la sociedad el lugar que se merece. Gracias a todas las personas que han estado a mi lado estos 6 años, han sido inolvidables. Creo que es justo agradecerse ya que sin ellas no habría llegado a donde estoy.

En primer lugar, muchas gracias a José María por aceptarme en su laboratorio y por ayudarme con paciencia con todas las dudas que he tenido a lo largo de este proyecto. En segundo lugar, gracias a Ricardo que ha estado siempre ahí y que se ha volcado totalmente en este trabajo, como si fuera suyo ayudando en todo. Gracias también a todos mis compañeros del laboratorio, pues siempre han estado ahí en lo que he necesitado.

Gracias a mis compañeros de máster, porque creo que hemos sido una clase bastante inusual y divertida. En especial quiero darles las gracias a Patri, Mari, Gema, Elena y Alicia por toda la ayuda que me han prestado en este máster. A los profesores que nos lo han enseñado todo y me han descubierto el mundo vegetal.

Por supuesto he llegado a donde estoy gracias a mi familia. A mis padres que me han apoyado en todo lo que he decidido y a mis abuelos que siempre estaban interesados en mis experimentos. Finalmente tengo que agradecerle a David el haberme aguantado todos estos años.

Muchas gracias a todos.

Índice

1	Introducción	- 2 -
1.1	Importancia de los DHs en la mejora genética	- 2 -
1.1.1	Híbridos	- 2 -
1.1.2	Líneas dobles haploides (DHs) y su importancia	- 3 -
1.2	<i>Brassica napus</i> como especie modelo	- 4 -
1.2.1	Características botánicas	- 4 -
1.2.2	Importancia económica y usos comerciales	- 5 -
1.2.3	Líneas DHs en colza	- 6 -
1.3	Métodos de obtención de DHS	- 7 -
1.3.1	Inducción de androgénesis	- 8 -
1.3.2	Factores que influyen en la obtención de dobles haploides	- 10 -
1.4	Regulación hormonal en la androgénesis	- 11 -
1.5	Calosa y la capa subintinal durante la embriogénesis de microsporas	- 12 -
2	Objetivos	- 14 -
3	Materiales y métodos	- 15 -
3.1	Material vegetal	- 15 -
3.2	Método de extracción de microsporas de colza	- 15 -
3.3	Medida del PH en el medio con distintas concentraciones de ABA	- 17 -
3.4	Tinción vital de microsporas con FDA	- 18 -
3.5	Fijación y tinciones de microsporas	- 18 -
3.6	Análisis estadísticos	- 18 -
4	Resultados	- 19 -
4.1	Selección de intervalos	- 19 -
4.2	Resultados medidas de pH	- 20 -
4.3	Estudio de la viabilidad de las microsporas	- 21 -
4.4	Efecto del ABA en la respuesta embriogénica de microsporas de colza	- 24 -
4.5	Efecto del ABA en la síntesis y acumulación de calosa en las microsporas	- 26 -
5	Discusión	- 28 -
5.1	Medidas de pH	- 28 -
5.2	Efecto del ABA en la viabilidad de microsporas	- 28 -
5.3	Efecto del ABA en la embriogénesis de microsporas	- 29 -
5.4	Efecto del ABA en la síntesis y acumulación de calosa en las microsporas	- 31 -
6	Conclusiones	- 32 -
7	Bibliografía	- 33 -

1 Introducción

1.1 Importancia de los DHs en la mejora genética

1.1.1 Híbridos

Se prevé que la población mundial alcance los 9000 millones de personas en el año 2050, con el consecuente incremento de la demanda de alimentos que esto supone. Retos como el cambio climático, la urbanización de las tierras de cultivo, la degradación de suelos de cultivo, o estreses bióticos y abióticos de distinta naturaleza, suponen un gran desafío para los mejoradores (Lenaerts et al., 2019). Los programas de mejora genética, y especialmente la producción de híbridos, contribuyen a la obtención de variedades vegetales adaptadas a las nuevas necesidades.

Los híbridos se obtienen del cruce de dos parentales homocigóticos y presentan unas características muy interesantes debido a la heterosis. La heterosis es un fenómeno natural donde la descendencia híbrida que se obtiene tras cruzar dos parentales genéticamente distintos posee características fisiológicas y funcionales superiores a las de sus progenitores. El fenómeno de la heterosis fue descrito por primera vez en 1876 por Charles Darwin, el cual describió que plantas con polinización cruzada poseían interesantes características, como una mayor altura, peso y fertilidad, además de un mayor vigor, que las plantas parentales. Hay diferentes explicaciones para la aparición de heterosis. Por un lado la dominancia, es decir, alelos ligeramente nocivos que en los parentales son homocigóticos, se pierde en la descendencia híbrida donde los alelos nocivos son complementados por alelos superiores (Bruce, 1910). Otra posible explicación para la heterosis es la sobredominancia. En este caso, los alelos diferentes tienen un efecto estimulante, y la heterocigosidad genética da como resultado una mayor actividad genética (East, 1936). La hipótesis más aceptada en la actualidad la basada en el concepto de dominancia (Charlesworth y Willis, 2009). Las principales investigaciones en el campo de los híbridos se hicieron en maíz por George H. Shull y Edward M. East, y contribuyeron a la obtención de una variedad de maíz híbrido por William James Beal. El vigor híbrido se ha considerado una de las innovaciones modernas en la agricultura y su explotación ha tenido una gran importancia económica. Concretamente en colza las variedades híbridas suponen más del 90% de la cuota de mercado (Hochholdinger y Baldauf, 2018).

Para obtener híbridos se necesita que los parentales sean líneas puras, es decir, variedades homocigóticas en todo su genoma. En la actualidad, gran parte de los programas de mejora están basados en la obtención de variedades híbridas por cruzamiento de líneas homocigóticas o líneas puras. La obtención de estas líneas puras requiere de varias generaciones de autofecundación y selección, por lo que este proceso puede alargarse varios años. Una solución viable a este problema, como veremos posteriormente, es la generación de dobles haploides (DHs), que nos permitirá obtener el 100 % de homocigosis en una única generación. El desarrollo de nuevas variedades de híbridos es cada vez más importante para satisfacer la demanda de una población mundial en aumento y los desafíos que presenta un clima cada vez más cambiante (Yan et al., 2017).

1.1.2 Líneas dobles haploides (DHs) y su importancia

Las plantas haploides presentan una reducción a la mitad del número normal de cromosomas de su especie, es decir, tiene un número gamético de cromosomas (n). La aparición de haploides puede ser espontánea en algunas especies, con una frecuencia de aparición muy baja, si bien lo que más nos interesa desde un punto de vista comercial es la posibilidad de inducir haploidía en especies cultivadas (Dwivedi et al., 2015). La obtención de individuos haploides se puede conseguir mediante alteraciones en el desarrollo normal de las células haploides de la línea germinal, utilizando para ello técnicas basadas en cultivo *in vitro* tanto del gametófito masculino como del femenino, mediante hibridaciones interespecíficas, o por hibridaciones con polen tratado o con polen de líneas inductoras de haploidía.

Desde un punto de vista biológico los individuos haploides son claramente inferiores a los diploides, ya que suelen tener un porte menor, órganos de menor tamaño, mayor inestabilidad genética, crecimiento más lento, mayor susceptibilidad a patógenos y esterilidad. Por este motivo, por sí solos no tienen una gran utilidad más allá de la investigación básica. Es necesario convertirlos en DHs para poder utilizar sus características beneficiosas (su total homocigosis) sin los efectos negativos que produce la reducción en su número cromosómico. Esto se logra duplicando su genoma, ya sea de forma espontánea por la inestabilidad genómica, o mediante tratamientos químicos con compuestos como la colchicina o los taxanos, entre otros. Lo que obtenemos tras la duplicación cromosómica de un individuo haploide es, por tanto, plantas con dos copias exactas del genoma, es decir, con todos sus genes fijados en homocigosis (Seguí-Simarro, 2010). Mientras que mediante métodos tradicionales basados en autofecundaciones sucesivas se necesitarían unas 7-8 generaciones (Figura 1 A), el uso de estas herramientas biotecnológicas nos permite la obtención de líneas puras dobles haploides en una única generación, ahorrando por tanto tiempo y dinero (Figura 1 B). En la actualidad hay más de 300 variedades comerciales derivadas de DHs y más de 50 en colza.

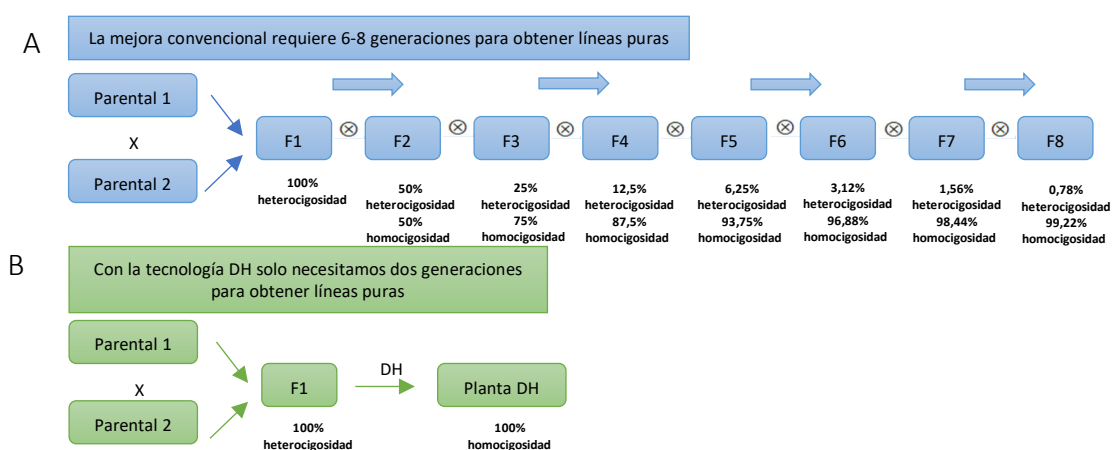


Figura 1. Proceso de obtención de líneas puras mediante (A) generaciones sucesivas de autofecundación, y (B) tecnología DH. (Adaptado de Yan et al., 2017).

La primera evidencia de la inducción de haploidía se reportó tras obtener haploides a partir del cultivo de anteras en *Datura* (Guha y Maheshwari, 1964, 1966). Más adelante se describió en cebada (*Hordeum vulgare* L.) la posibilidad de inducir haploides mediante cruces interespecíficos seguidos de cultivo de embriones (Kasha y Kao, 1970). Años después de estas investigaciones se descubrieron nuevos protocolos para inducir DHs basados en técnicas de cultivo *in vitro* del gameto femenino, o en segregaciones cromosómicas aberrantes. En la actualidad la tecnología DHs se emplea frecuentemente para el desarrollo de líneas puras con la finalidad de producir híbridos (Maluszynski et al., 1996).

Los primeros cultivos comerciales en los que se utilizaron DHs durante su proceso de obtención se probaron en Canadá, y fueron la colza 'Maris Haplona' y la cebada 'Mingo' (Ho y Jones, 1980). A pesar de las ventajas de los DHs respecto a la manera tradicional de obtención de líneas puras, todavía se trata de un proceso mejorable, sobre todo en lo que respecta a la eficiencia de obtención de DHs y a la obtención de protocolos para especies recalcitrantes (Dwivedi et al., 2015). Las líneas DHs también se usan como líneas puras recombinantes o RILs y tienen gran utilidad en la genética cuantitativa ayudando a descubrir mutaciones.

1.2 *Brassica napus* como especie modelo

1.2.1 Características botánicas

La colza (*Brassica napus*) es una especie alotetraploide o anfidiplóide, la cual contiene cuatro dotaciones cromosómicas no homólogas, provenientes de dos complementos cromosómicos distintos y posteriormente duplicados (AACC). Aunque sus orígenes no se conocen aún con certeza, *B. napus* probablemente se originó a partir de múltiples e independientes hibridaciones interespecíficas espontáneas entre *Brassica rapa* (AA, $2n = 2 \times = 20$) y *Brassica oleracea* o col rizada (CC, $2n = 2 \times = 18$).

La colza pertenece a la familia *Brassicaceae* (Tabla 1), como otras especies de interés agronómico (coliflor, rábano, rúcula, nabo...), así como la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Dentro de la especie, se han definido dos variedades botánicas: *B. napus* L. var rapifera (DC) Metzger ($2n = 4 \times = 38$), una variedad de raíz corta relacionada con el nabo, y *B. napus* L. var oleifera Delile ($2n = 4 \times = 38$) o colza propiamente dicha. *B. napus* ha recibido mucha atención como planta modelo para comprender las secuencias consenso de poliploidía en organismos superiores. Además, es una especie de la que se han descrito variedades que presentan una elevada respuesta androgénica, lo cual las hace especialmente idónea como especie modelo para el estudio de la inducción de androgénesis (Iniguez-luy y Federico, 2011).



Figura 2. Inflorescencia de colza (Extraída de *luirig.altervista*; 2020)

Taxonomía de <i>Brassica napus</i>	
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Subdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Capparales
Familia	<i>Brassicaceae</i> / <i>Cruciferae</i>
Género	<i>Brassica</i>
Especie	<i>Brassica napus</i> L.

Tabla 1. Taxonomía de *B. napus* (adaptada de *USDA, Department of Agriculture*; 2020).

En cuanto a su anatomía general, *B. napus* se caracteriza por su raíz axonomorfa, normalmente fusiforme o tuberosa. Sus hojas son glaucas, glabras, y muy a menudo ciliadas en los nervios o márgenes. Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racimo (Figura 2), y producen frutos de tipo silicua sésil y suberecta, que contienen entre 12-18 semillas por lóculo. Las semillas de colza miden entre 1,2 y 1,8 mm de diámetro, son esféricas y de color pardo oscuro (Iniguez-luy y Federico, 2011).

1.2.2 Importancia económica y usos comerciales

Las variedades tradicionales de *B. napus* contienen elevadas cantidades de ácido erúxico y de glucosinolatos. El ácido erúxico es un ácido graso monoinsaturado que produce retraso en el crecimiento humano, y provoca un aumento de colesterol en las glándulas suprarrenales y en el hígado. Los glucosinolatos, por otro lado, son compuestos que tienen efectos tóxicos para el ganado que consume la torta obtenida después de la extracción del aceite (de Leon et al.,1978). La obtención de líneas de colza anuales y semestrales con baja cantidad de ácido erúxico (<2% en el aceite) y bajos niveles de glucosinolatos (<30 mg / g), favoreció el uso agronómico de la colza como una excelente fuente para aceite vegetal comestible. El perfil lipídico del aceite de colza es extremadamente bueno (bajo en grasas saturadas, alto en grasas monoinsaturadas y rico en grasas omega-3) convirtiéndolo en uno de los aceites más recomendados por nutricionistas de todo el mundo. En este contexto, el interés comercial por la colza ha resultado en un aumento considerable de proyectos de investigación genética y genómica, que han permitido obtener variedades de colza con rasgos agronómicos y de calidad, como mayor cantidad de ácidos grasos insaturados y mayor producción (Iniguez-luy y Federico, 2011).

Área	Valor
Mundo	75001457
Europa	25494038
Canadá	20342600
China	13281208
India	8430000
Francia	4945589
Australia	3893071
España	175231

Tabla 2. Producción anual en toneladas de colza (por países (FAOSTAT))

Además de la producción de aceite a partir de sus semillas, cuya productividad es de un 40-45%, con los restos de los procesos de extracción se obtienen tortas para la alimentación animal. Algunas variedades son cultivadas como forrajeras para alimentación de ganado. Por último, la colza también se emplea para la obtención de energía a partir de su biomasa (de Leon et al., 1978). La producción mundial de colza en el 2018 fue de 75.001.457 toneladas (Tabla 2), siendo Canadá, China, India, Francia y Australia, los principales productores.

A pesar de ser un cultivo óptimo para su consumo, en España todavía hay una gran reticencia al consumo de este aceite por su mala percepción social, adquirida tras la crisis nacional del síndrome del aceite tóxico que tuvo lugar en 1981. Esta crisis sanitaria fue provocada por la comercialización fraudulenta e ilegal de aceite de colza desnaturalizado con anilina al 2%, lo cual lo convertía en altamente tóxico. Esto resultó en la intoxicación masiva de más de 20.000 ciudadanos, y en el fallecimiento de 1.800 de éstos. El problema radicó en que el aceite lo vendieron para consumo humano, cuando estaba preparado (desnaturalizado con anilina) para uso industrial, por lo que era altamente tóxico (Rodríguez et al., 2011).

1.2.3 Líneas DHs en colza

La colza es una especie modelo para el estudio de la respuesta embriogénica de microsporas aisladas, así como su respuesta fisiológica a diversos estímulos de estrés (Ferrie y Caswell, 2010). En 1982 se aislaron mecánicamente por primera vez microsporas de *B. napus* antes de cultivarlas *in vitro* (Lichter 1982), lo cual supuso una innovación en el campo de la investigación de la androgénesis. A partir de entonces varios estudios se centraron en aumentar la frecuencia de la embriogénesis de microsporas aisladas de líneas de *Brassica* sensibles a la inducción, así como en desarrollar protocolos para especies recalcitrantes (Dwivedi et al., 2015).

A pesar de que la embriogénesis de las microsporas de *B. napus* es relativamente eficaz, todavía se están aportando nuevas mejoras en protocolos para el aumento de la producción de embriones a partir de gametos, que finalmente puedan ser aplicadas a protocolos para especies recalcitrantes. Algunos ejemplos de mejora de la eficacia androgénica de *B. napus* donde puede verse un aumento de la embriogénesis son la adición de bleomicina (Zeng et al., 2010), cuyo efecto es dependiente de la dosis aplicada, brasinoesteroides (Ferrie et al., 2005), nitrato de plata y carbón activado al medio (Prem y Gupta, 2008), compuestos con actividad anti-auxinas (Agarwal et al., 2006), y la sustitución de polietilenglicol por sacarosa (Ferrie y Keller, 2007).

Es imprescindible que las microsporas se encuentren en un estadio de microspora vacuolada o polen bicelular joven en el momento de la aplicación de estrés para que puedan cambiar su patrón de desarrollo normal en favor de un patrón de desarrollo embriogénico. Las microsporas vacuoladas se caracterizan por una gran vacuola en el centro de la célula, la cual llega a ocupar una tercera parte del citoplasma, contribuyendo así a un rápido incremento del volumen celular. Esta gran vacuola se forma a base de pequeñas vacuolas que se funden entre sí. La vacuola central desplaza al núcleo lateralmente, y son fácilmente distinguibles en observación microscópica tras teñirlas con DAPI (Figura 3). Además, las microsporas vacuoladas presentan una pared compuesta por dos capas, la exina y la intina. La exina es la capa más externa, y está compuesta por compuestos resistentes con propiedades similares a la lignina y cutina (Erdtman, 1969). La intina es la capa interna, y continúa su desarrollo con el desarrollo de la microspora, siendo más evidente en microsporas en estadio de grano bicelular (Turk, 1991).

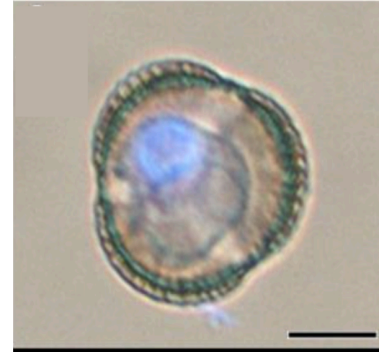


Figura 3. Combinación (fusión) de imágenes de fluorescencia y contraste de fase de una microspora teñida con DAPI donde se puede apreciar el núcleo desplazado. Barra de escala: 10 μm (Adaptado de Parra-Vega, et al., 2015).

1.3 Métodos de obtención de DHS

Actualmente hay diversas formas de producir haploides y DHs después de un proceso de duplicación cromosómica (Seguí Simarro, 2010). Estas metodologías son:

- Ginogénesis, o técnicas basadas en el gametofito femenino: producción de embriones haploides a partir del cultivo *in vitro* de óvulos, ovarios o incluso flores enteras no fecundadas. El desarrollo de estos embriones provenientes de un núcleo haploide (reducido) del parental femenino, generarán individuos haploides o DHs. Un caso particular de ginogénesis es la inducida por polinización con polen tratado (no funcional) sobre los tejidos del gineceo, lo cual dispara una serie de respuestas típicas de la fecundación que inducen el desarrollo del óvulo y la producción de embriones haploides. El polen que se aplica está previamente irradiado, o bien puede aplicarse polen triploide, para que no se produzca una fecundación real y las plantas se mantengan con la dotación cromosómica haploide del parental femenino.
- Androgénesis, o técnicas basadas en el gametofito masculino: producción de embriones haploides a partir de células precursoras de polen o microsporas en un estado de desarrollo específico (microsporas vacuoladas, Figura 2), las cuales son desviadas de su ruta de desarrollo normal mediante la aplicación de un estrés y su posterior cultivo *in vitro*. Las microsporas bajo estas condiciones son inducidas a formar embriones o callos.
- Hibridación interespecífica: producción de embriones haploides mediante cruces interespecíficos o intergenéricos, tras los cuales se produce la germinación del

polen, si bien éste no llega a fecundar la célula huevo u óvulos debido a incompatibilidad genética. Algunos ejemplos son:

- El método bulbosum: es el más conocido y se emplea para obtener dobles haploides de cebada (*Hordeum vulgare*) mediante la hibridación con una especie silvestre relacionada con la cebada, pero incompatible, *Hordeum bulbosum*.
 - El uso de polen de maíz como polinizador lejano: se emplea el polen para inducir el desarrollo de embriones haploides en otros géneros mediante hibridaciones interespecíficas.
- Hibridaciones intraespecíficas con líneas inductoras de haploidía: producción de haploides mediante cruzamiento con líneas inductoras de haploidía. Estas líneas inductoras de haploidía, obtenidas por mutaciones en *loci* específicos, han tenido una especial importancia en cereales como el maíz (Zhong et al., 2019). Esta tecnología, sin embargo, está limitada a ciertas especies, y no se ha conseguido extrapolarla a otras especies de valor industrial como las pertenecientes a la familia de las *Solanaceae*. Como por ejemplo los genes *ig*, en los que una mutación produce un aumento de haploides espontáneos (Pollacsek, 1992). En la actualidad se ha descrito en *Arabidopsis* un sistema basado en la combinación de versiones silvestres y modificadas de CENH3 en los cigotos que conlleva la eliminación completa del genoma del parental modificado, obteniéndose así un cigoto haploide. La histona CENH3 es importante para el correcto anclaje de los cromosomas al huso mitótico durante la división, y presenta una elevada conservación de secuencia en todos los organismos vegetales estudiados. Por esta razón, esta nueva metodología, junto con la posibilidad de edición a la carta que nos ofrecen tecnologías como CRISPR/Cas9, abre nuevas puertas para la obtención de DHs en especies recalcitrantes (Ravi y Chan, 2010; Ravi et al., 2014).

El éxito de las diferentes metodologías depende del genotipo en cuestión, tanto a nivel de especie como de variedad. Algunas especies se emplean como modelos experimentales con el fin de estudiar los aspectos básicos del proceso y poder avanzar en el desarrollo de protocolos más eficientes. Como ejemplo podemos poner el caso de la cebolla para ginogénesis, o el de la colza para androgénesis (Seguí Simarro, 2010). La optimización de protocolos ha avanzado considerablemente y ha facilitado su uso en programas de obtención de semilla híbrida, de manera que ya hay disponibles una gran cantidad de cultivares, principalmente en *Brassica* y cereales, cuyas líneas puras se han obtenido mediante la tecnología DH.

1.3.1 Inducción de androgénesis

Las microsporas son células haploides precursoras de los granos de polen que proceden de la división meiótica que se da en las células madre de polen diploide. En su desarrollo normal, las microsporas se preparan durante la interfase, e irán aumentando progresivamente su volumen hasta alcanzar un estado de desarrollo adecuado para la división asimétrica que dará lugar al grano de polen. El proceso desde su primera división hasta la formación del grano de polen maduro se divide en varios estadios de desarrollo: el estadio de tétrada, el estadio de microspora propiamente dicho (joven recién liberada,

media y vacuolada), y el estadio de grano bicelular (joven, medio y maduro; Gómez, 1993). La inducción de androgénesis puede darse bajo ciertas condiciones de cultivo *in vitro* de las microsporas, y es imprescindible que éstas se encuentren en un estadio de desarrollo concreto, como se detallará más adelante.

La androgénesis es una de las herramientas más útiles para la obtención de plantas DHs en diversas especies de angiospermas. Para la obtención de embriones haploides mediante androgénesis se puede emplear la antera completa o las microsporas aisladas. El cultivo de anteras es la técnica más antigua y también la alternativa más sencilla. Para ello se recolectan yemas florales con las microsporas en la etapa de desarrollo adecuada, se extraen las anteras, y se cultivan en un medio de cultivo específico para cada especie. Con el tiempo los tejidos somáticos degeneran y se necrosan, mientras que las microsporas prosiguen su desarrollo y generan embriones haploides que emergen de la antera. Estos embriones se pueden subcultivar *in vitro* bajo ciertas condiciones, generándose una planta completa. No se necesita una gran infraestructura para este método, lo que hace que sea una opción muy empleada. Además, durante las primeras etapas del desarrollo los tejidos de la antera favorecerán el crecimiento de las microsporas. Esta metodología presenta, sin embargo, algunos inconvenientes que deben considerarse. Por un lado, el hecho de no eliminar el tejido somático diploide de la antera hace posible la aparición de regenerantes que provengan de éste, los cuales son diploides, pero no homocigotos. Por lo tanto, es necesario evaluar cada embrión de manera individual mediante el uso de marcadores moleculares. Además es una técnica con una eficiencia baja, ya que el número de embriones obtenidos por antera es limitado (Seguí Simarro, 2010).

El cultivo de microsporas aisladas es una alternativa al cultivo de anteras que evita los inconvenientes de éste, ya que el material de partida consiste exclusivamente en células haploides, evitando el tejido somático y los posibles regenerantes a partir de este. En este caso extraemos las microsporas de la antera y las cultivamos en un medio líquido. Se trata de un método mucho más eficiente pues genera más embriones y más rápidamente, y su principal ventaja es que todos los embriones son haploides o DHs. Esta técnica, sin embargo, también tiene inconvenientes como una mayor exigencia a nivel de infraestructura, y requiere de un mayor cuidado en su manejo para evitar contaminaciones y daños a las microsporas aisladas. A pesar de esto, es el método más usado para muchas especies por su eficacia y rapidez a la hora del obtener haploides y DHs (Seguí Simarro, 2010).

La figura 4 muestra el desarrollo normal de las microsporas dentro de una antera (Figura 4 A), así como la ruta androgénica que deriva en la embriogénesis a partir de microsporas binucleadas o vacuoladas (Figura 4 B) en anteras tratadas. Las microsporas vacuoladas o el polen bicelular sometidos a estrés pueden cambiar su patrón de desarrollo normal, y activar una ruta embriogénica. Los embriones haploides generados a partir de microsporas acabarían desarrollándose en plantas haploides o DHs (Figura 4 B). En algunas ocasiones, dependiendo de la especie, se activa un patrón de desarrollo indiferenciado de la microspora que da lugar a una estructura de tipo callo, a partir del cual se podrían obtener plantas haploides o DHs por procesos de organogénesis (Figura 4 C). La mayoría de las microsporas aisladas mueren después de exponerse al estrés

térmico (Figura 4 E), y algunas otras continúan su camino de desarrollo original formando granos de polen (Figura 4 D).

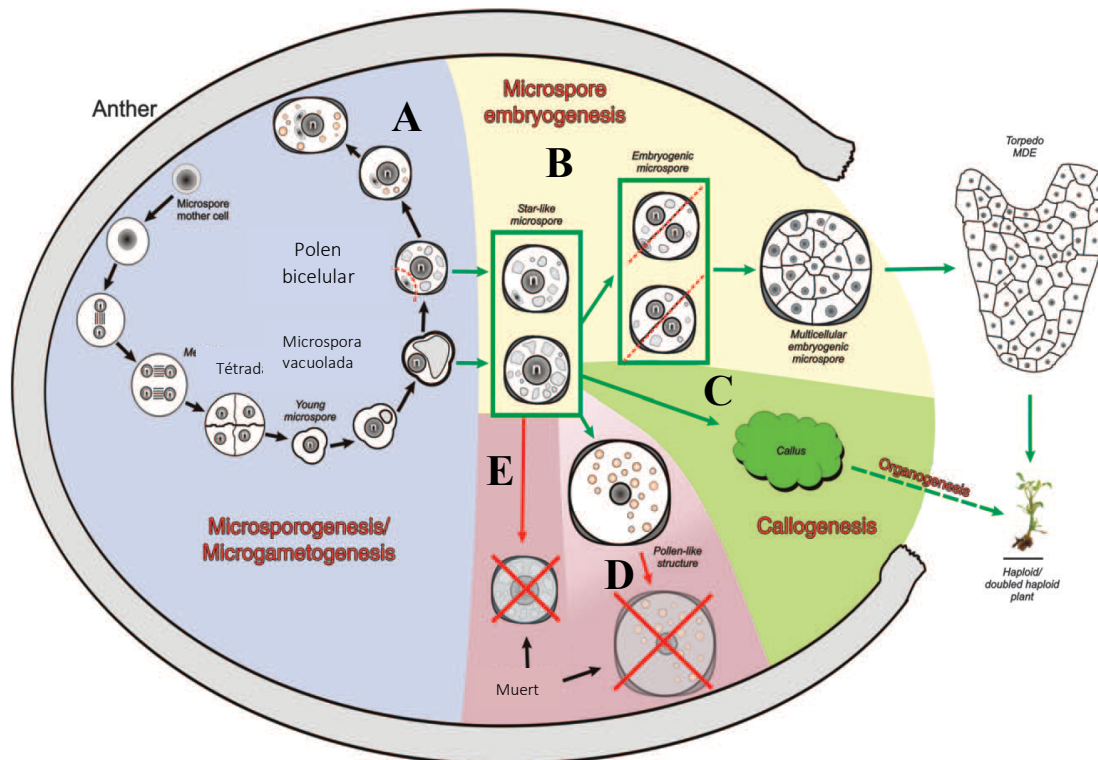


Figura 4. Diferentes rutas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microsporas o polen. (A) Ruta gametofítica natural. (B) Desvío de la ruta normal hacia la embriogénesis. (C) Ruta alternativa donde se da lugar a un callo capaz de regenerarse en plantas haploides/DHs. (D) Desarrollo normal de microsporas. (E) Muerte celular en las fases tempranas del proceso de androgénesis (Adaptado de Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

Si bien la inducción de androgénesis ha sido y es en la actualidad un proceso usado para muchas especies, todavía quedan aspectos por elucidar. Los principales retos a los que se enfrenta la ciencia en el campo de la androgénesis son:

- Una mejor comprensión de los procesos moleculares y celulares que subyacen a la formación de plantas haploides.
- La necesidad de establecer nuevos protocolos para especies recalcitrantes.

Durante varias décadas los avances en los protocolos *in vitro* de producción de dobles haploides han estado principalmente basados en enfoques de prueba y error. Desentrañar los mecanismos subyacentes a la inducción embriogénica nos ayudaría a identificar nuevos objetivos y diseñar nuevas estrategias para mejorar la eficiencia de los sistemas empleados para la androgénesis *in vitro*, incluso en especies recalcitrantes (Testillano, 2019).

1.3.2 Factores que influyen en la obtención de dobles haploides

Uno de los principales factores que afectan a la eficiencia de la inducción de DHs es el genotipo de la planta donante (Dwivedi et al., 2015). Esta recalcitrancia genética se da no sólo a nivel de especie, sino también a nivel varietal, existiendo variedades de alta y de

baja respuesta androgénica. Dentro de la familia *Brassica*, *B. napus* responde mejor a la embriogénesis de microsporas en comparación con *B. juncea*. Además, los genotipos de invierno de *B. napus* responden mejor que los genotipos de primavera (Chanana et al., 2005). Es tal la dependencia genética de la respuesta androgénica que incluso dentro de una misma variedad se han descrito diferentes tipos de respuesta entre diferentes líneas DHs. La línea de colza DH4079 se usa rutinariamente como modelo de embriogénesis de microsporas por su elevada respuesta androgénica (Ferrie y Möllers, 2011), mientras que la línea DH12075 es altamente recalcitrante (Chanana et al., 2005).

Además del factor genético, hay otros factores que influyen en la eficacia del proceso androgénico (Takahata et al., 1991):

- El medio de cultivo de las anteras o microsporas.
- El tamaño de la yema, que determinará el estadio de desarrollo de las microsporas contenidas en las anteras.
- Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes. La respuesta androgénica suele ser alta cuando las plantas se cultivan en condiciones ambientales controladas (por ejemplo, fitotrón). El estrés provocado por el frío incrementa la frecuencia de embriogénesis de microsporas (Dwivedi et al., 2015).
- El estado fisiológico de las plantas donantes. La frecuencia de la androgénesis suele ser mayor en las anteras recogidas al comienzo del período de floración, y disminuye con la edad de la planta (Bhojwani et al., 1997).
- Los análisis de viabilidad celular han demostrado que hay un marcado aumento en los niveles de muerte celular después de la extracción y del tratamiento de estrés térmico. Este estrés es otro factor muy importante ya que nada más aislar las microsporas ya hay porcentajes de muerte importantes, en torno al 46%, y este porcentaje se incrementa exponencialmente después del estrés térmico (Pérez-Pérez et al., 2019).
- Algunas hormonas, como el ácido salicílico, las auxinas, las citoquininas, el ácido abscísico (ABA) y el ácido jasmónico, regulan la transducción de señales inductoras embriogénesis (Ahmadi et al., 2018).

1.4 Regulación hormonal en la androgénesis

El desarrollo de la embriogénesis de microsporas implica una compleja alteración de la señalización hormonal, aunque su interacción y funciones en su desarrollo aún no se conocen con exactitud. Además, procesos como la autofagia y la actividad de proteasas son cruciales en la respuesta al estrés, mientras que la reprogramación celular y la adquisición de totipotencia están reguladas por mecanismos hormonales y epigenéticos (Testillano, 2019).

Las auxinas son posiblemente el grupo de hormonas más estudiado en el desarrollo general de la planta, ya que es un regulador clave de la división celular y la diferenciación (Teale et al., 2006; Weijers et al., 2018). Se ha documentado que los factores de estrés abióticos pueden afectar a la homeostasis de las auxinas produciendo una gran variedad de respuestas en las células vegetales. En diferentes estudios se ha podido observar una acumulación de auxinas endógenas en la reprogramación de las microsporas *in vitro* en

B. napus (Prem et al., 2012; Rodríguez-Sanz et al., 2015). Se han realizado tratamientos farmacológicos con inhibidores de los transportadores de las auxinas y se ha llegado a la conclusión de que perturban la inducción y la progresión de la embriogénesis, lo que resulta en una menor producción de embriones. De igual forma se ha visto que la biosíntesis de auxinas es necesaria para que se produzca la embriogénesis (Rodríguez-Sanz et al., 2015).

Junto con las auxinas, las citoquininas son reguladores hormonales clave en la planta. El equilibrio de estas dos hormonas, que generalmente actúan de manera antagónica, controla la división y la diferenciación celular. El efecto de las citoquininas en el control de la embriogénesis de microsporas, sin embargo, es mucho más limitado. Sabemos mucho menos sobre el papel de las citoquininas en el desarrollo general de la planta que sobre las auxinas (Durán-Medina et al., 2017). Se ha visto de manera preliminar que las auxinas y las citoquininas tienen patrones opuestos de distribución en el desarrollo de las microsporas para dar lugar a embriones, lo que sugiere que tienen una localización espacio-temporal definida durante la embriogénesis (Testillano, 2019).

Por otro lado, el ABA juega un papel fundamental tras el estrés térmico en las microsporas de genotipos de alta y baja respuesta. La aplicación de estrés por calor, como el que se emplea para inducir la androgénesis en microsporas de colza, modula los niveles endógenos de hormonas asociadas al estrés, como el ABA, que es particularmente útil para contrarrestar los efectos adversos generados (Wahid et al., 2007). Durante la embriogénesis, gran parte del ABA parece provenir del suspensor, que puede suministrar ABA o precursores metabólicos de ABA al embrión (Hays et al., 2001). Se ha visto que la adición de ABA al medio de cultivo promueve la inducción y crecimiento de callos a partir de microsporas aisladas de berenjena, debido a un aumento en la tasa de división y en la velocidad de división de las microsporas (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Además, el ABA juega un importante papel en la respuesta frente a patógenos, promoviendo la resistencia mediante la inhibición de la entrada a través del cierre estomático o mediante la inducción de depósitos de calosa en las regiones de infección (Cutler et al., 2010), proceso que es dependiente de ABA (Kaliff et al., 2007). De hecho, la síntesis y deposición de calosa se ha descrito como un evento diferencial entre microsporas inducidas y no inducidas tras el estrés (Rivas-Sendra et al., 2019). El papel del ABA en la deposición de calosa en microsporas inducidas, sin embargo, queda por dilucidar.

1.5 Calosa y la capa subintinal durante la embriogénesis de microsporas

Las microsporas inducidas a embriogénesis presentan tres envolturas celulares definidas y distinguibles (Figura 5). Además de las dos capas típicas, la exina (ex) en su parte más externa y la intina (in) en su parte más interna, las microsporas presentan una capa subintinal interior (sl), sobre la membrana plasmática (pm) y por debajo de la intina. La envoltura celular de las microsporas es una estructura dinámica cuya composición cambia drásticamente al entrar en la androgénesis. Durante el desarrollo de la microspora se acumula calosa como un componente principal de la capa subintinal, crítica para el desarrollo adecuado de las microsporas embriogénicas (Rivas-Sendra et al., 2019). Las propiedades de las moléculas de calosa la hacen adecuada para crear barreras

físicas y químicas que pueden ejercer un efecto protector de las microsporas durante las primeras etapas de su desarrollo embriogénico.

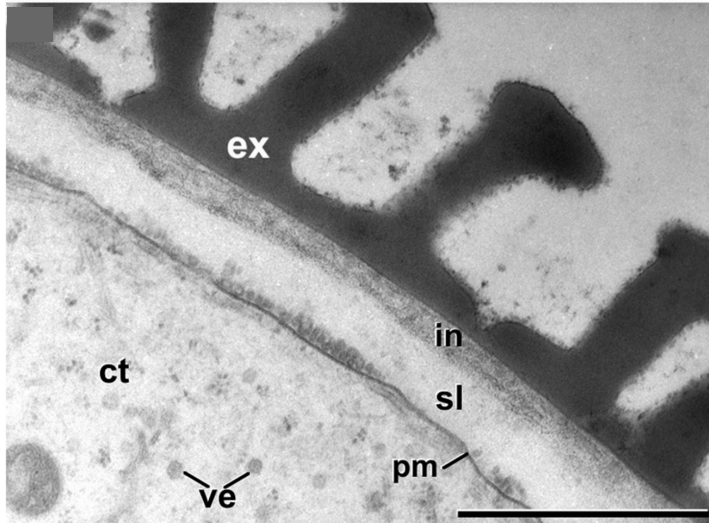


Figura 5. Imagen de microscopía electrónica donde se aprecia la envoltura externa de las microsporas compuesta por una capa externa de exina (ex), seguida de la intina (in), y la capa interior subintinal (sl) en una microspora de *Brassica napus*. Barra de escala 200 nm. (ct: citosol, mp: membrana plasmática; ve: vesículas Adaptado de Parra-Vega, et al., 2015)

Con todo lo expuesto, nos planteamos la hipótesis de que el ABA pueda ejercer un papel inductor de la androgénesis por el aumento de la síntesis y acumulación de calosa en la capa subintinal de microsporas de colza, lo cual supondría una mayor protección de éstas, y una mayor tasa de supervivencia durante su cultivo *in vitro*. No podemos descartar, sin embargo, que el ABA pueda ejercer un papel directo en la regulación transcripcional de genes implicados en la formación de embriones.

2 Objetivos

- Estudiar el efecto de la aplicación de ABA en la viabilidad de microsporas vacuoladas y/o binucleadas aisladas de líneas de *B. napus* de alta (DH4079) y de baja (DH12075) respuesta androgénica.
- Estudiar los efectos de la aplicación de ABA exógeno sobre la respuesta embriogénica de microsporas aisladas de líneas DHs de *B. napus* de alta respuesta (DH4079) androgénica.
- Observar por microscopía confocal la acumulación de calosa de microsporas aisladas en respuesta a la aplicación de ABA.

3 Materiales y métodos

3.1 Material vegetal

Se utilizaron dos líneas DHs de colza (*Brassica napus* Topas) de alta (DH4079) y baja (DH12075) respuesta androgénica. Las plantas se cultivaron en cámaras a 22°C y fotoperiodo 16/8 hasta el momento de su floración, tras lo cual se pasaron a condiciones inductivas (15°C, luz continua). Estas plantas se aclimataron al menos dos semanas antes de ser utilizadas. Alternativamente, en los meses de marzo a mayo se usaron plantas crecidas en parcela bajo condiciones ambientales adecuadas (noches frías, días templados).

3.2 Método de extracción de microsporas de colza

Tras recolectar las yemas florales (Figura 6 A) se mantuvieron en frío hasta la extracción de las microsporas para evitar su degradación e impedir que se aclimataran a una temperatura más alta para aplicar un estrés térmico de una forma más efectiva. Se midió la longitud de las yemas de forma individual, y se agruparon en intervalos de tamaño. Para las plantas de alta respuesta del fitotron ya teníamos comprobados los intervalos que mejor funcionaban de 3 a 3,2 mm, 3,3 a 3,4 mm y 3,5 a 3,6 mm. Para las plantas crecidas en el exterior tanto de alta como de baja respuesta hubo que comprobar qué longitud de yema tenían las microsporas en el estadio óptimo. Se realizó una selección de intervalos. Para la línea de baja respuesta (DH12075) se consideraron los siguientes intervalos: 2-2,4 mm; 2,5-2,7 mm; 2,8-3 mm; 3,1-3,4 mm. Para la línea de alta respuesta (DH4079) se consideraron los siguientes intervalos: 2,8-3,1 mm; 3,2-3,4 mm; 3,5-3,7 mm; 3,8-4 mm. Tras estudiar el estadio de las microsporas en las yemas, seleccionamos los intervalos que contenían las microsporas en los estadios adecuados (vacuoladas y polen bicelular). Para la variedad DH4079 los intervalos adecuados fueron de 3,1-3,4 mm y 3,5-3,7 mm. En el caso de DH12075 los intervalos seleccionados fueron de 2,7-3 mm y de 3,1-3,4 mm. Para evaluar su longitud se empleó una lupa binocular con una escala micrométrica acoplada en uno de los oculares (Figura 6 B, C). Durante todo el proceso de medición las yemas se mantuvieron en frío para ralentizar el desarrollo de las microsporas durante la extracción e inducir mejor el estrés aplicado (Figura 6 D). Se emplearon varios intervalos para asegurarnos que cogemos las microsporas en su estadio óptimo de desarrollo. El aislamiento de microsporas de yemas florales del tamaño adecuado se realizó según el protocolo propuesto en Corral-Martínez *et al*, 2018, con ligeras modificaciones. Realizamos todo el experimento bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Las yemas florales de diferentes intervalos se mantuvieron separadas durante todo el proceso de extracción (Figura 6 E). Primero se desinfectaron las yemas florales de manera superficial con una solución de hipoclorito de sodio a 20 g/L durante 10 minutos. Luego se realizaron tres lavados de 1, 5 y 10 minutos con agua estéril (Figura 6 F).

Tras desinfectar las yemas, se extrajeron las microsporas mecánicamente por aplastamiento con un émbolo de jeringuilla, esterilizado previamente en alcohol, en medio NLN-13 (Tabla 3), previamente esterilizado por filtración con filtros de tamaño de poro de 0,2 µm de diámetro.

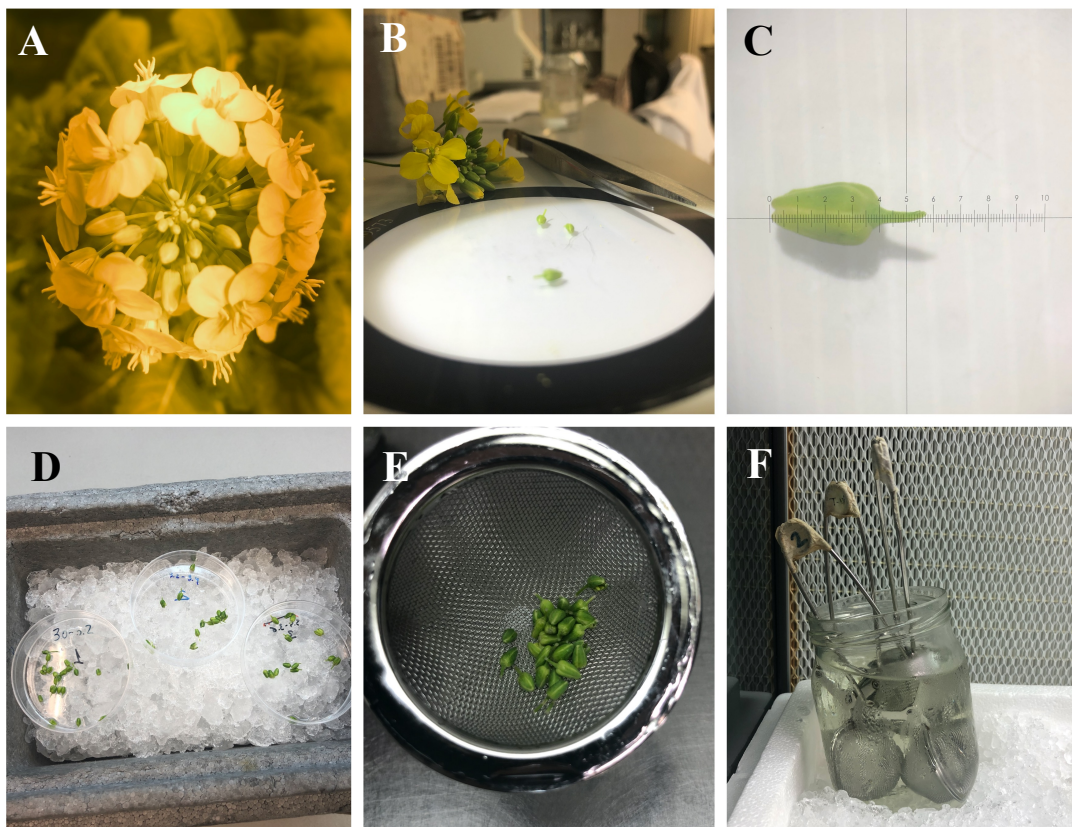


Figura 6. Procedimiento para la disección y desinfección de yemas de colza. (A) Inflorescencia de colza crecida en fitotrón con yemas cerradas de diferentes tamaños. (B) Inflorescencia de donde se extrajeron individualmente las yemas con las pinzas para colocarlas en la lupa para la medición de su tamaño. (C) Yema de colza vista a la lupa estereoscópica con escala micrométrica acoplada en uno de sus objetivos. (D) Conjunto de yemas pertenecientes a diferentes intervalos mantenidas en hielo. (E) Filtro de té utilizado en la esterilización para mantener juntas las yemas de cada intervalo. (F) Proceso de esterilización superficial de las yemas agrupadas por intervalos.

NLN-13 de colza

NLN Salt mixture	0,39 g/L
NLN Vitamin mixture	1,04 g/L
Calcium nitrate 4H ₂ O	0,5 g/L
Sacarosa	130 g/L

Tabla 3. Componentes del medio de cultivo de microsporas de colza, NLN-13

El extracto de microsporas se filtró con filtros de nailon de 41 μm de tamaño de poro y se recogió el filtrado en tubos estériles de 14 ml (Figura 7 A). Este extracto inicial se llevó a 10 ml de volumen. A continuación, se realizaron 3 lavados con sacarosa al 13%. Para cada lavado se centrifugó a 820 rpm durante 4 minutos en una centrifuga a 4°C, y se resuspendió el precipitado obtenido en 10 ml de sacarosa al 13% (Figura 7 B, C). Tras la última centrifugación se resuspendió el precipitado en 1 ml con medio NLN-13. Las microsporas aisladas se cuantificaron con una cámara de Neubauer y un microscopio óptico Nikon Eclipse E1000. Para ello se pipetearon 10 μl en cada una de las 2 cámaras de la cámara de Neubauer (Figura 7 D), y se realizó el conteo por duplicado. Se consideró un valor promedio de ambos conteos, siempre que la diferencia de éstos no fuera superior al 20%. Finalmente se añadió el volumen de medio NLN-13 necesario para llevar

el preparado de microsporas a una concentración de trabajo final de 40.000 microsporas/ml, según la fórmula matemática para calcular el volumen final:

$$\text{Volumen final} = \frac{N * FD}{C * VC}$$

Siendo N el numero de células resultante del promedio de dos conteos, FD el factor de dilución (en nuestro caso 1), C la concentración de microsporas en la disolución final (40000 microsporas/ml) y VC el volumen de la cámara (0,0001 ml). La suspensión de microsporas a la concentración deseada y para cada intervalo se plaqueó en placas multipocillo de 24 pocillos o en placas de 1 mL y 3 mL, según el experimento (Figura 7 E). Se incubaron 72 horas a 33°C en oscuridad para inducir la embriogénesis, y posteriormente se pasaron a temperatura ambiente en oscuridad el tiempo necesario, según el experimento (Figura 7 F).

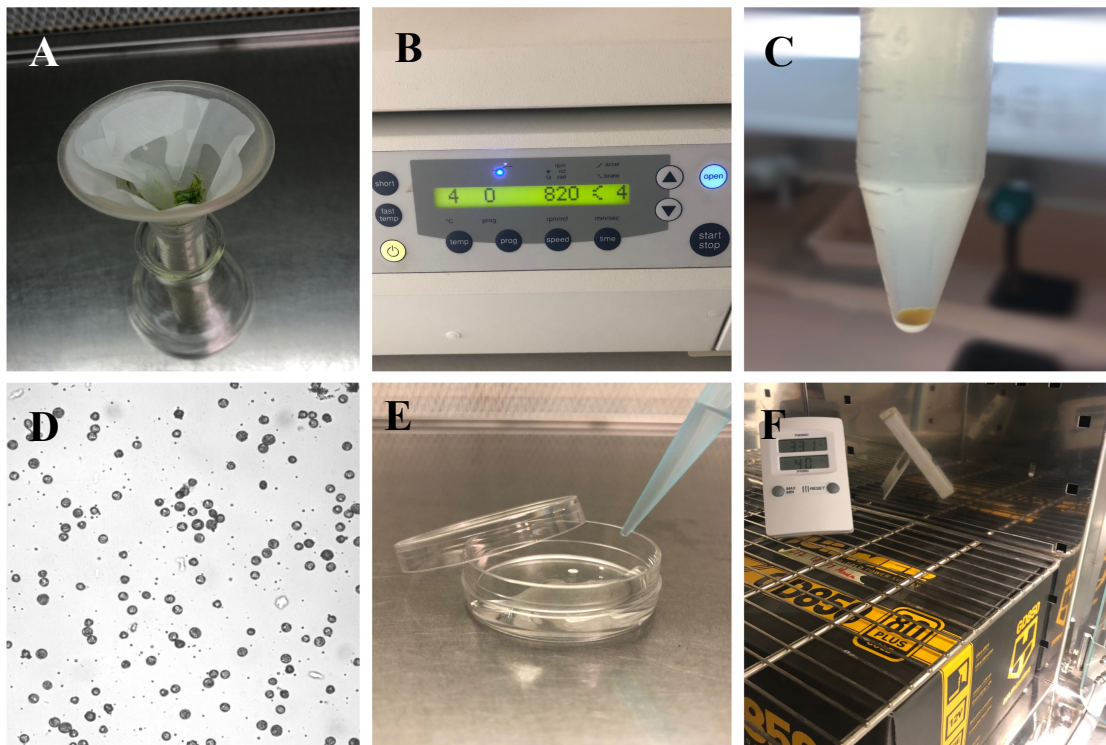


Figura 7. Procedimiento para el aislamiento de microsporas de colza y posterior cultivo *in vitro*. (A) Filtro de nylon de 41 µm sobre un embudo esterilizado previamente en autoclave. El Erlenmeyer sirve como soporte para el tubo cónico. (B) Centrifuga y condiciones empleadas para la sedimentación de las microsporas. (C) Pellet obtenido tras la centrifugación de las microsporas. (D) microsporas en la cámara de Neubauer para realizar el conteo celular. (E) Placas de cultivo *in vitro* empleadas. Cada placa contiene un cultivo celular de 1 ml con una densidad de 40000 microsporas por ml. (F) Condiciones de incubación de los cultivos de microsporas a 33 °C.

3.3 Medida del PH en el medio con distintas concentraciones de ABA

En un vaso de precipitados se puso un volumen de 30 ml de medio NLN-13 filtrado, idéntico al que se usó en las preparaciones de microsporas. Se preparó medio con tres concentraciones diferentes de ABA, 0,5 nM, 500 nM ABA y 5000 nM ABA, además de la preparación control suplementado con la cantidad correspondiente de solvente (Tris-HCl

pH 9). El pH fue medido con un pHmetro (Sartorius) previamente calibrado según instrucciones del fabricante.

3.4 Tinción vital de microsporas con FDA

Se ha utilizado la tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) para medir la viabilidad de las microsporas. El colorante penetra en las células y tanto las hidrolasas de las membranas como las esterasas citoplasmáticas lo hidrolizan. El colorante hidrolizado emite fluorescencia verde a 510 nm cuando es irradiado por luz azul de 493 nm. Se empleó una concentración final de 0,001% de FDA a partir de un stock al 0,2% en acetona mantenido a -20°C. Tras la adición de la cantidad correspondiente de stock a la placa de cultivo, esta se incubó 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. La fluorescencia se observó con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 40 CFL.

3.5 Fijación y tinciones de microsporas

La preparación de microsporas se fijó en paraformaldehído al 4% en 1x TBS. Inicialmente se diluyó por un lado 10x PBS pH 7 comercial a PBS 1x pH 7, y por otro una ampolla de 10 ml de paraformaldehído al 16% en 30 ml de tampón PBS 1x pH 7. Esta preparación se alicuoató en eppendorf de 1,5 ml y se guardó a -20°C.

Para la fijación se tomaron 2 ml del cultivo de microsporas, y se centrifugó a 8.000 rpm durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en paraformaldehído 4%. La suspensión de microsporas en fijador se incubó 24 horas a 4°C en oscuridad. Después se realizaron tres lavados con PBS 1x, y en el último lavado se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió finalmente en PBS + 0,1% paraformaldehído, y se almacenó a 4°C hasta el momento de su tinción.

Las microsporas se tiñeron inicialmente durante 10 min con yoduro de propidio (PI, Fluka) en PBS, cuya interacción con las membranas lipídicas nos permite observar la periferia de las microsporas, su citoplasma y ácidos nucleicos. A continuación, se realizó una contratinción con azul de anilina (AB, Fluka) durante 20 min a temperatura ambiente para la observación de la calosa. Tras cada tinción se realizaron tres lavados con PBS 1x. Finalmente se resuspendieron las microsporas teñidas en 10 µl de TBS 1x, y se montó la preparación en un portaobjetos para su visualización en microscopio confocal (Confocal Zeiss 780). La señal específica del yoduro de propidio se observó recogiendo la luz emitida a 617 nm y la de azul de anilina a 365 nm. Las imágenes se procesaron con el uso del programa informático Fiji/ImageJ.

3.6 Análisis estadísticos

El análisis de normalidad de los datos se realizó mediante el test de Shapiro-Wilks. La significatividad estadística de los datos con distribución normal se realizó mediante la prueba paramétrica de la ANOVA. La significatividad estadística de los datos de distribución no normal se realizó con el test de Friedman. Estos cálculos fueron llevados a cabo con el programa Infostat y con Excel. Para la significatividad estadística de datos se escogió un p-valor de 0,05 en todos los casos.

4 Resultados

4.1 Selección de intervalos

La aplicación de un estrés térmico sobre microsporas de colza puede activar una ruta de desarrollo embriogénico, obteniéndose así embriones haploides. Para este proceso es fundamental que la microspora se encuentre en el estadio de microsporas vacuoladas y/o polen bicelular joven. En este trabajo se ha empleado la longitud de las yemas florales como una estimación indirecta del estadio de las microsporas que contienen. El estadio de desarrollo exacto de las microsporas, sin embargo, puede diferir ligeramente según genotipos y condiciones ambientales en el momento de la toma de muestras. Por esta razón, con el fin de inferir a priori la relación entre longitud de yema y estadio de desarrollo de las microsporas en nuestros genotipos y condiciones de cultivo, se observó el estadio más frecuente de las microsporas contenidas en yemas de diferentes rangos de longitud. Para ello se analizó por tinciones DAPI el estadio de las microsporas contenidas en cuatro intervalos de longitud de yema extraídas de plantas tanto de la línea de baja respuesta DH12075 (2-2,4 mm; 2,5-2,7 mm; 2,8-3 mm; 3,1-3,4 mm), como de alta respuesta DH4079 (2,8-3,1 mm; 3,2-3,4 mm; 3,5-3,7 mm; 3,8-4 mm).

La figura 8 muestra imágenes de contraste de fases (Figura 8 A, C, E, G) y fluorescencia (Figura 8 B, D, F, H) de microsporas teñidas con DAPI que han sido aisladas de yemas de distintos intervalos de plantas de la línea de baja respuesta DH12075 crecidas en condiciones ambientales naturales (plantas de exterior, PE). Las microsporas contenidas en yemas de intervalos 2-2,4 mm (Figura 8 A, B) y 2,5-2,7 mm (Figura 8 C, D) presentan un núcleo central de gran tamaño, lo cual indica que se trata de microsporas jóvenes o medias. Para longitudes de yema superiores, sin embargo, podemos observar algunos núcleos desplazados lateralmente debido a la presencia de una vacuola de gran tamaño en el centro de la célula (Figura 8 E, F, G y H). De este experimento concluimos que los intervalos de longitudes 2,8-3 mm (Figura 8 E, F) y 3,1-3,4 mm (Figura 8 G, H) son los que más nos interesan para el estudio de la androgénesis en microsporas aisladas de yemas de la línea DH12075 en condiciones ambientales de crecimiento.

De manera análoga hemos analizado las microsporas aisladas de yemas de la línea de alta respuesta DH4079 crecidas en el exterior. La figura 9 A y B muestran microsporas aisladas de yemas de 2,8-3,1 mm, las cuales presentan el núcleo centrado característico de un estadio de microsporas medias. En las figuras 9 C y D, correspondientes a tamaños de yema de 3,2-3,4 mm, las microsporas contienen núcleos desplazados lo cual indica que se trata de microsporas vacuoladas. Esta morfología se observó también en microsporas aisladas de yemas de 3,5-3,7 mm (Figura 9 E, F). Por último, las microsporas contenidas en intervalos de tamaño de yema de 3,8-4 mm (Figura 9 G, H) se han desarrollado en granos de polen maduros, los cuales son incapaces de desarrollar embriones, por lo que quedan fuera de nuestro interés. Con esta información hemos observado que para la variedad DH4079 los mejores intervalos de tamaño de yema para el estudio de la androgénesis de microsporas son 3,2-3,4 mm y 3,5-3,7 mm (Figura 9 C, D, E, F).

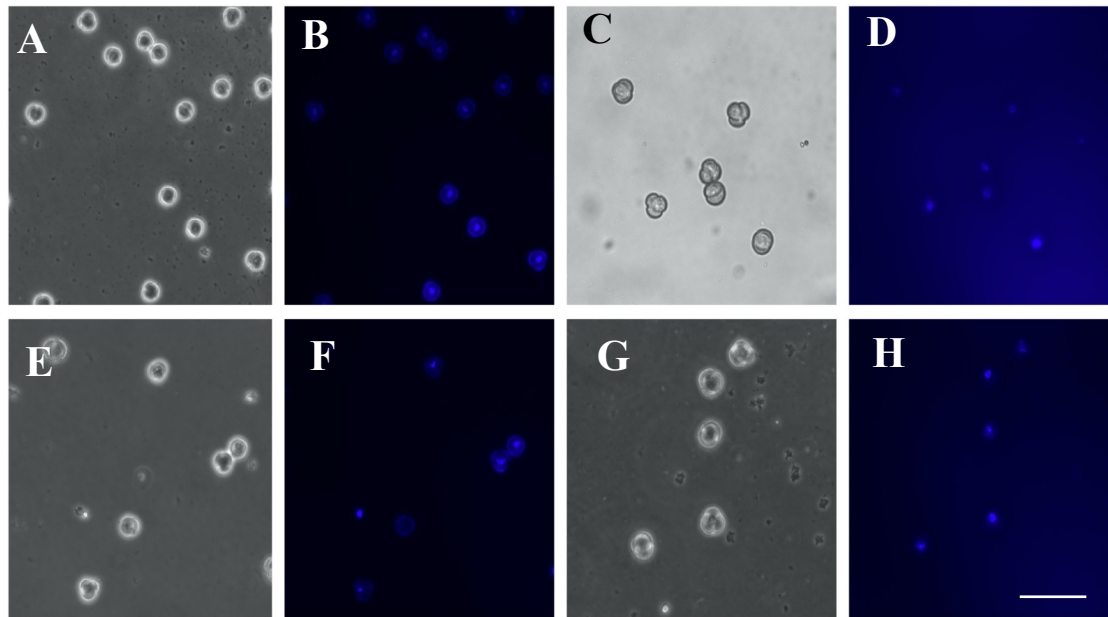


Figura 8. Imágenes de los estadios de las microsporas de colza aisladas de la línea de baja respuesta androgénica DH12075 teñidas con DAPI. Las imágenes se registraron con un microscopio de fluorescencia a 40X (A,E,G) con contraste de fases, (C) en campo claro, y (B,D,F,H) con fluorescencia. Tamaños de yema comprendidos entre (A,B) 2-2,4 mm, (C,D) 2,5-2,7 mm (E,F) 2,8-3 mm y (G,H) 3,1-3,4 mm. Barra de escala: 100 μ m.

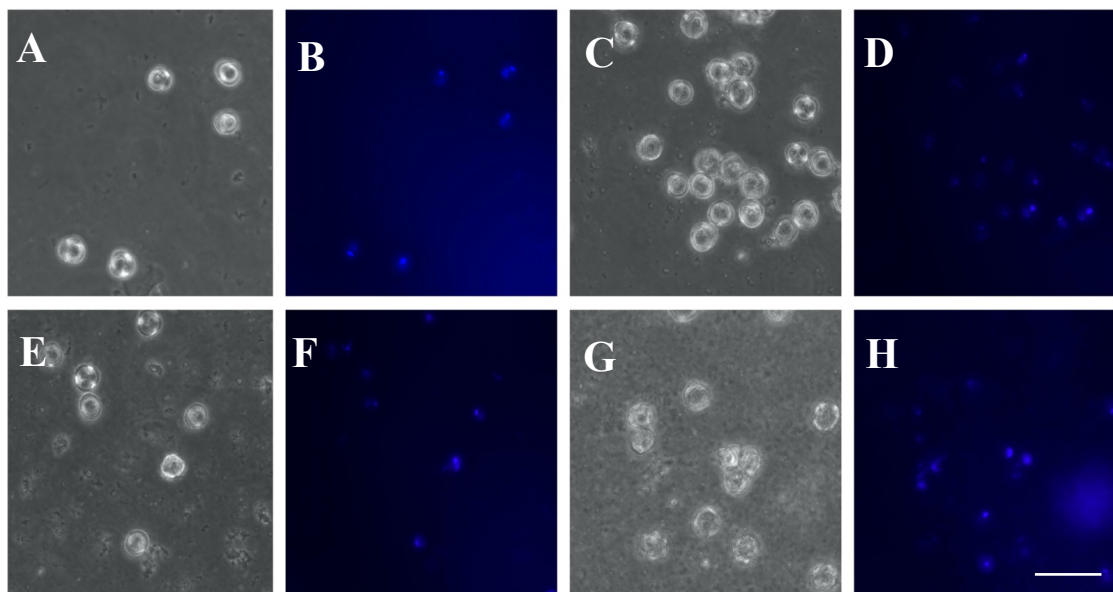


Figura 9. Imágenes de los estadios de las microsporas de colza aisladas de la línea de alta respuesta androgénica DH4079 teñidas con DAPI. Las imágenes se registraron con un microscopio de fluorescencia a 40X (A,E,G) con contraste de fases (C) en campo claro y (B,D,F,H) con fluorescencia. Tamaños de yema comprendidos entre (A,B) 2,8-3,1 mm, (C,D) 3,2-3,4 mm (E,F) 3,5-3,7 mm y (G,H) 3,8-4 mm. Barra de escala: 100 μ m.

4.2 Resultados medidas de pH

La adición de un compuesto ácido como el ABA al medio ya formulado podría provocar cambios en el pH que podrían alterar el desarrollo normal de las microsporas en el medio de cultivo y, en definitiva, su potencial androgénico. El medio NLN-13 está tamponado y hemos añadido un volumen relativamente pequeño de un ácido débil, por lo que las

posibilidades de modificación de su pH en nuestras condiciones experimentales son bajas. Sin embargo, dada la susceptibilidad del proceso de androgénesis a las condiciones de cultivo *in vitro*, hemos realizado un análisis preliminar para corroborar la estabilidad del pH en las distintas condiciones ensayadas en el trabajo. Para ello, hemos medido el pH tras añadir a un volumen determinado de medio de cultivo a temperatura ambiente, los volúmenes de stock de ABA para obtener las diferentes concentraciones finales de experimentación (Tabla 4).

Concentración	pH
5000 nM	5,96
500 nM	5,96
0,5 nM	5,92
Control	5,91

Tabla 4. Mediciones de pH del medio NLN-13 con distintas concentraciones de ABA.

El pH, que estaba previamente ajustado a 5,8, se volvió a medir con 3 concentraciones diferentes de ABA (0,5 nM, 500 nM y 5000 nM), además de una condición control a la que se añadió el mayor volumen del tampón correspondiente (Tris-HCl pH 9). Se escogieron inicialmente las concentraciones tan elevadas para ver si en las condiciones más desfavorables la adición de ABA alteraba el pH del medio. Este análisis muestra que, para ambas concentraciones, 5000 nM y 500 nM, el valor del pH es de 5,96 y 5,96, respectivamente, observándose un cambio despreciable comparado con el valor del pH del medio control, 5,91 (Tabla 4). Para la concentración de 0,5 nM, el pH calculado fue de 5,98 (Tabla 4), prácticamente igual al del medio control. Los pequeños cambios pueden atribuirse a la variabilidad de tomar distintas mediciones. La diferencia del valor del pH obtenido con respecto al pH de 5,8 inicial puede deberse a que se quedaron algunos componentes del medio en el filtro tras la esterilización. En cualquier caso, estos cambios de pH del medio filtrado ocurren en todas las condiciones ensayadas.

4.3 Estudio de la viabilidad de las microsporas

El proceso de extracción y cultivo *in vitro* de las microsporas implica un estrés celular que conlleva generalmente una alta tasa de mortalidad. La viabilidad de las microsporas, por tanto, es un aspecto clave para su respuesta y afecta directamente a la eficacia del proceso. Debido a la relación reportada entre el ABA y la síntesis de calosa (Cutler et al., 2010), pensamos que la adición de ABA podría favorecer la acumulación de este polímero en la capa subintinal de las microsporas, favoreciendo su protección y aumentando su viabilidad durante las primeras etapas de cultivo. Para analizar la viabilidad de las microsporas contenidas en yemas de los diferentes intervalos de tamaño ensayados, hemos usado la tinción vital con FDA a distintos tiempos de incubación y concentraciones de ABA. El ratio de viabilidad se midió como el número de microsporas vivas respecto al total observado (n=80-300 microsporas por placa) a tres tiempos: en el momento de la extracción a tiempo 0 (T0), después del estrés por choque térmico 3 días tras la extracción (T3), y en estadios más desarrollados 10 días después de la extracción (T10), donde ya se puede apreciar algún embrión.

A tiempo 0 (Figura 10 A, B), tras el proceso de extracción, independientemente de la condición de cultivo de las plantas donantes y de la línea, las poblaciones de microsporas presentaban valores similares de viabilidad. Los valores medios de viabilidad se encontraban entre un 50% y un 72,7% (Figura 10 C). Por lo general, a este tiempo se observó una mayor viabilidad en las microsporas extraídas de yemas de mayor longitud, que se corresponde con microsporas más desarrolladas. Se midió la viabilidad de las microsporas provenientes de las plantas de exterior (PE) de las líneas DH12075, DH4079, y plantas del fitotrón (PF) de la línea DH4079. En el caso de las microsporas obtenidas de plantas de exterior de la línea DH12075 se puede ver que el intervalo 2 (3,1-3,4 mm) tiene una viabilidad mayor que el intervalo 1 (2,7-3 mm).

Por otro lado, las microsporas aisladas de plantas de la línea DH4079 crecidas en exterior presentan una mayor viabilidad para el intervalo 2 (3,5-3,7 mm) que para el intervalo 1 (3,2-3,4 mm). Sin embargo, para las microsporas extraídas de plantas crecidas en fitotrón de la línea DH4079 se observa que el intervalo 1 (3-3,2mm) tiene una viabilidad ligeramente mayor al intervalo 2 (3,3-3,4 mm), si bien los datos de viabilidad registrados para las microsporas del intervalo 3 (3,5-3,7 mm) muestran que éstas son las que mayor viabilidad celular presentan.

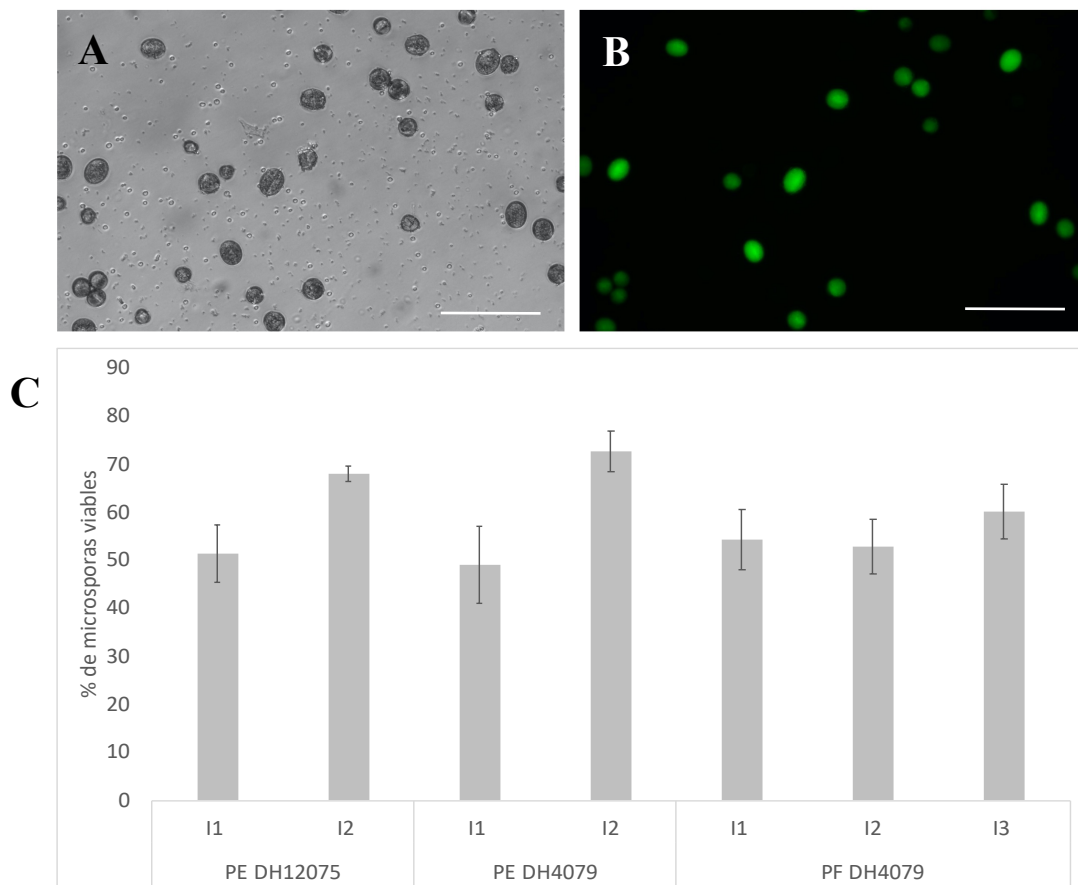


Figura 10. Ensayos de viabilidad de microsporas a tiempo 0. (A Y B) Observación al microscopio de microsporas teñidas con FDA en (A) campo claro, y (B) con fluorescencia a (T0). Barra de escala: 100 μ m. (C) Viabilidad media inicial de las microsporas en plantas de exterior (PE) de las líneas DH12075 y DH4079, y plantas del fitotrón (PF) de la línea DH4079, según se indica en cada caso. Las barras de error muestran el error típico.

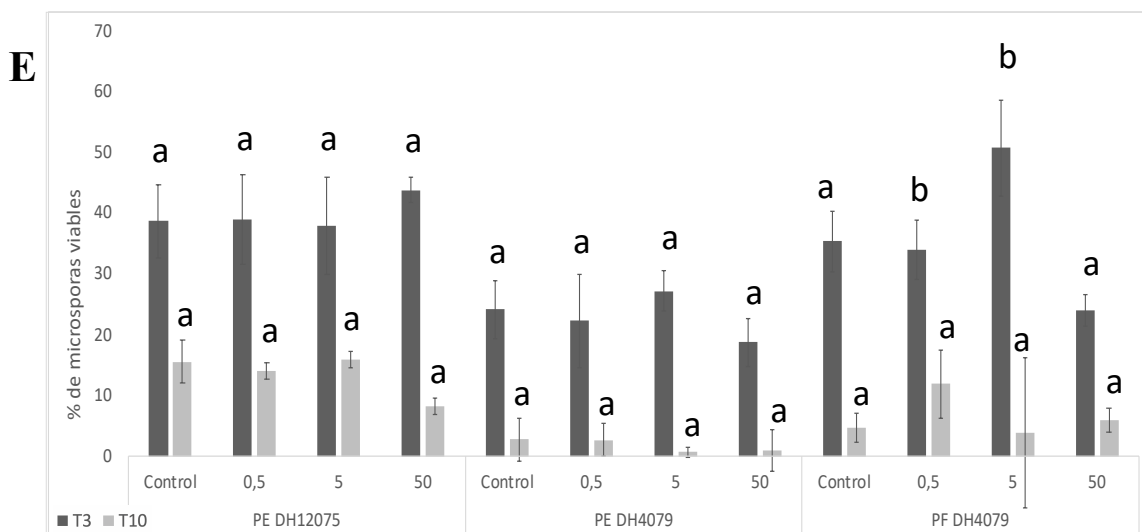
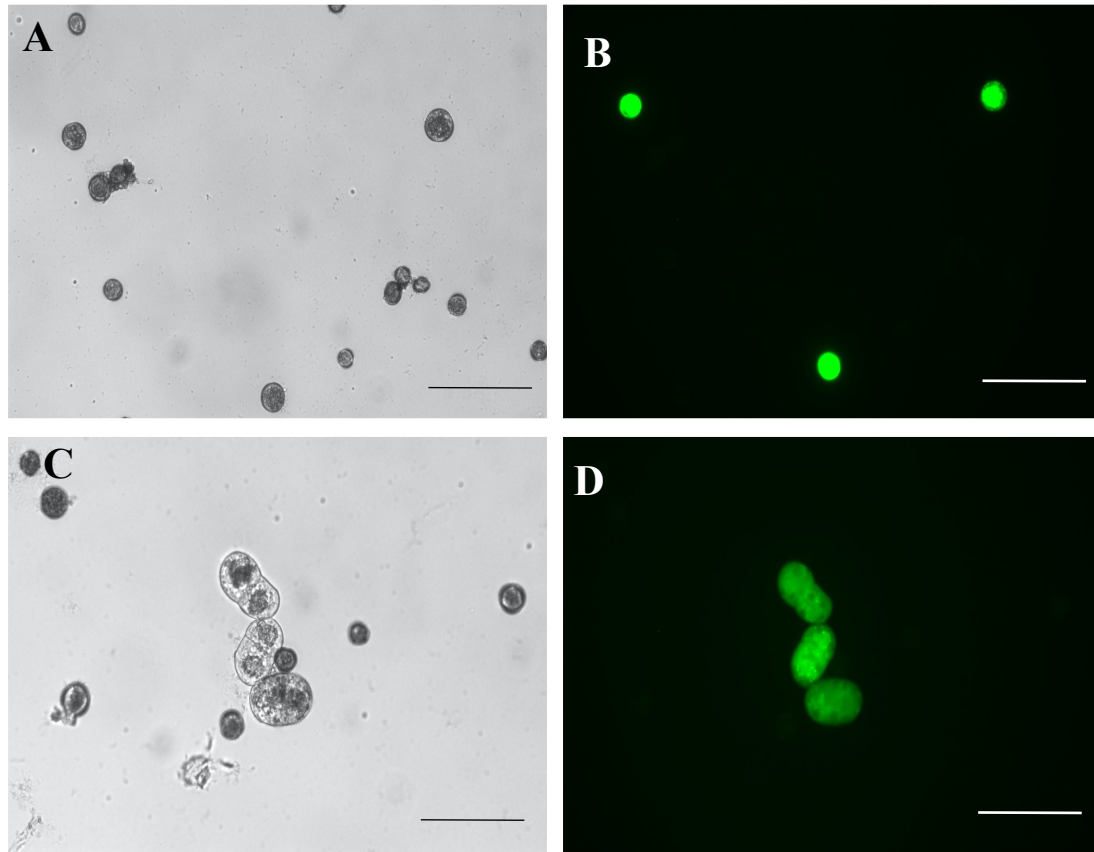


Figura 11. Efecto de la adición de ABA al medio de cultivo sobre la viabilidad de las microsporas. Imágenes de microscopio de (A, C) campo claro, y (B, D) su correspondiente fluorescencia, de microsporas de colza tras (A, B) 3, y (C, D) 10 días de cultivo *in vitro*. Las microsporas fueron extraídas de plantas crecidas en fitotrón (PF). Barra de escala: 100 μ m. (E) Representación gráfica de los datos obtenidos de viabilidad de microsporas aisladas de yemas de plantas de la línea de baja respuesta androgénica crecidas en condiciones de exterior (PE DH12075), y de la línea de alta respuesta androgénica crecidas en condiciones de exterior (PE DH4079) y en fitotrón (PF DH4079) a T3 (gris oscura) y T10 (gris claro). Las barras de error muestran el error estándar. Las letras indican diferencias significativas según lo determinado por el test de Friedman ($\alpha < 0.05$).

De igual forma se realizaron tinciones con FDA para medir la viabilidad tras el estrés (T3, Figura 11 A, B), y tras un tiempo en cultivo *in vitro* (T10, Figura 11 C, D). Como preveíamos, a tiempos más largos (T10) se registró una reducción mayor de la viabilidad de las

microsporas con respecto a T3 en todas las condiciones ensayadas (Figura 11 E). De forma global se puede inferir a partir de los resultados obtenidos que para todas las condiciones ensayadas no se aprecia una diferencia significativa de viabilidad de las microsporas por la adición de diferentes concentraciones de ABA al medio de cultivo (Figura 11 E). Se observó cómo a T10 la mayor parte de las células estaban muertas, y de las que quedaban vivas en las placas, unas se habían desarrollado a embriones inmaduros, y otras a granos de polen que acabaran muriendo en las condiciones de cultivo del ensayo. De esta observación se puede deducir que parte de las microsporas que se adaptan satisfactoriamente al estrés generado durante el proceso generan embriones haploides o DHs.

4.4 Efecto del ABA en la respuesta embriogénica de microsporas de colza

Se ha observado previamente que en la respuesta androgénica de microsporas de berenjena, el ABA promueve la inducción de callos y su crecimiento (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Si bien la respuesta androgénica de microsporas de colza es diferente a la de berenjena en cuanto a la producción de embriones, y no de callos, hemos analizado la eficacia de ésta, medida como número de embriones por ml a tiempos de saturación (1-2 meses, Figura 14 A, B, C, D), bajo condiciones control y de tratamiento con ABA a diferentes concentraciones. Para ello, se han usado yemas aisladas de plantas de la línea de alta respuesta DH4079 crecidas en condiciones controladas de fitotrón. Interesantemente, la adición de 0.5 y 5 nM de ABA provoca un incremento significativo del 150 y 280% de la respuesta androgénica de las microsporas, respectivamente (Figura 12, réplica 1). Una tendencia similar fue observada en otras dos réplicas independientes (Figura 12, réplicas 2 y 3), si bien las diferencias obtenidas no fueron tan notorias. Los datos de respuesta androgénica obtenidos para las microsporas cultivadas en condiciones control, sin embargo, no fueron los esperados, ya que hubo en general una respuesta mucho más baja de la esperada. En cualquier caso, la adición de ABA al medio tuvo consistentemente un efecto inductor de la respuesta androgénica en microsporas de colza, de forma similar a lo observado previamente en microsporas de berenjena (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014).

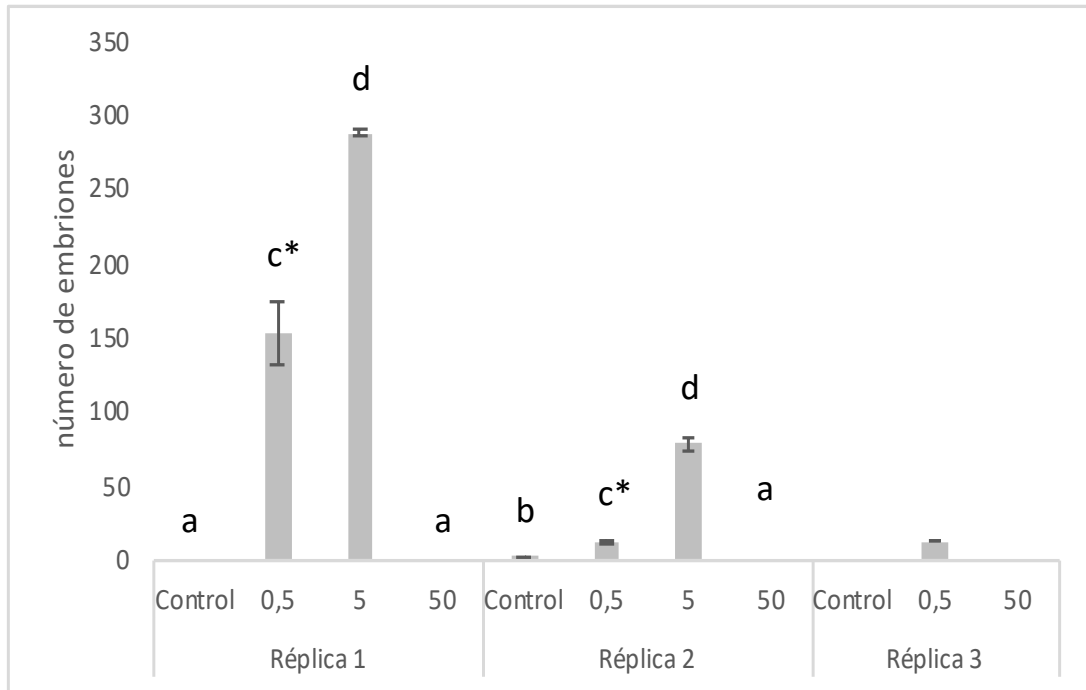


Figura 12. Efecto de diferentes concentraciones de ABA en la respuesta androgénica de microsporas de colza aisladas de yemas de plantas de la línea de alta respuesta DH4079 crecidas en condiciones controladas de fitotrón. Los datos se obtuvieron de tres réplicas independientes (réplica 1, 2, y 3). Los datos para cada réplica y condición provienen del conteo de tres placas independientes. Las barras de error muestran el error estándar. Las letras indican diferencias significativas según lo determinado por el ANOVA ($\alpha \leq 0.05$).

Un mayor tiempo de estrés podría suponer una mayor respuesta androgénica, si bien se sabe que la calidad de los embriones obtenidos, y su potencial para regenerar una planta completa, es menor (Figura 14 C, D). Por esta razón, se repitió el experimento aumentando el tiempo de estrés de 3 a 6 días a 33°C. De igual forma que antes, se ensayó el efecto del ABA con este protocolo alternativo con yemas aisladas de plantas de la línea de alta respuesta DH4079 crecidas en condiciones controladas de fitotrón. Los datos obtenidos muestran que, efectivamente, un mayor tiempo de estrés supone una mayor respuesta androgénica, obteniéndose un número de embriones en condiciones control bastante mayor al que se obtiene a tres días de estrés. Sin embargo, de manera sorprendente podemos ver que cuando se aumenta el periodo de estrés desaparecen las diferencias entre el control y las condiciones de tratamiento con ABA, tanto con 0,5 como con 5 nM (Figura 13). Lo único que se mantuvo fue que con 50 nM hubo una caída significativa en la respuesta embriogénica.

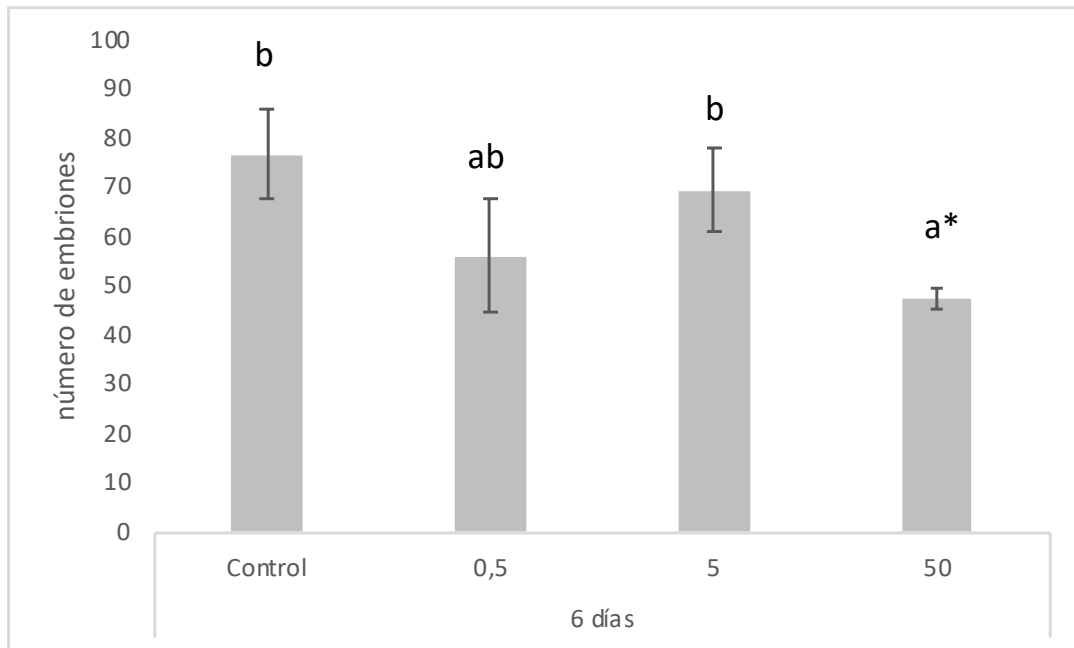


Figura 13. Estudio de la respuesta embriogénica de microsporas sometidas a 6 días de estrés por calor a 33 °C. Las barras de error muestran el error estándar. Las letras indican diferencias significativas según lo determinado por el test de Friedman ($\alpha \leq 0.05$).

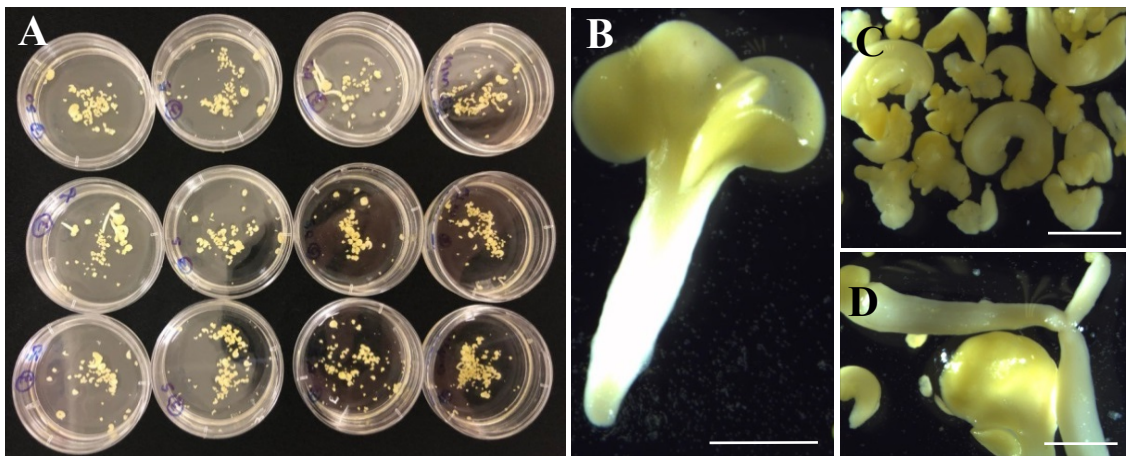


Figura 14. (A) Placas de cultivo de microsporas con embriones obtenidos a partir de microsporas de colza en diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. (B, C, D) Detalle de los embriones obtenidos en estas condiciones. Barra de escala (B, D) 500 μm (C) 300 μm .

4.5 Efecto del ABA en la síntesis y acumulación de calosa en las microsporas

La calosa es un polímero cuyas características físico-químicas pueden aportar protección a las células, y cuya síntesis está regulada por el ABA (Cutler et al., 2010). Además, se ha descrito que las microsporas acumulan calosa en su capa subintinal cuando entran en un programa de desarrollo embriogénico (Rivas-Sendra et al., 2019). Por esta razón se ha estudiado la deposición de calosa en las microsporas de alta respuesta DH4079 cultivadas durante 10 días. Para ello se realizó una tinción con yoduro de propidio para poder observar el citoplasma y los ácidos nucleicos de las microsporas que en las imágenes se ve como un tenue fondo rojizo, y lo que mas destaca es la exina por la autofluorescencia

(Figura 15 A, D, G). A continuación, la preparación de microsporas fue teñida con azul de anilina para observar la acumulación de calosa (Figura 15 B, E, H). En ambas tinciones se observó una fuerte señal emitida por la autofluorescencia de la exina, que es inespecífica de ambas tinciones. En las microsporas cultivadas en medio control se observó una señal heterogénea en algunas zonas del borde de las microsporas (Figura 15 C). Cuando se suplementó el medio de cultivo con las distintas concentraciones de ABA ensayadas, se observó una mayor señal específica para la calosa, tanto con 0,5 nM de ABA (Figura 15 F), como con 5 nM de ABA (Figura 15 I). El hecho de no observar la señal específica de la calosa justo por debajo de la intina puede deberse a que la señal de cada microspora está registrada de zonas de ésta alejadas del ecuador celular, ya sea por su parte superior, como por la inferior. En cualquier caso, se ha observado una mayor acumulación de calosa en las microsporas cultivadas en medios con ABA (Figura 15 F, I) que en las cultivadas en medios control (Figura 15 C).

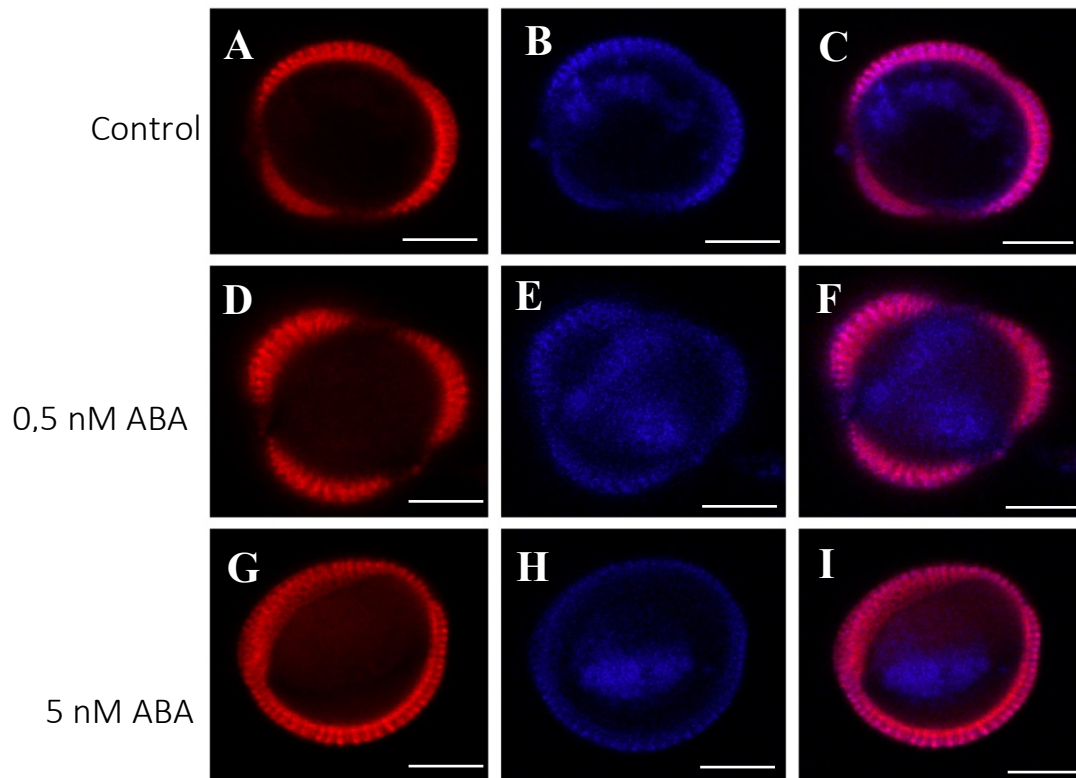


Figura 15. Imágenes de microsporas teñidas obtenidas mediante microscopía confocal. (A, D, G) Señal registrada por la emisión de fluorescencia específica por yoduro de propidio que nos muestra el citoplasma, los ácidos nucleicos y la autofluorescencia de la exina. (B, E, H) Señal registrada por la emisión de fluorescencia específica por azul de anilina que nos muestra la acumulación de calosa en las microsporas. (C, F, I) Imagen compuesta de las dos tinciones.

5 Discusión

5.1 Medidas de pH

En el presente trabajo hemos observado que la adición de distintas concentraciones de ABA al medio de cultivo provocan un cambio de pH despreciable y no significativo si lo comparamos con el del medio control (Tabla 4). Los pequeños cambios observados pueden atribuirse a la variabilidad de tomar distintas mediciones. La diferencia observada de pH para todas las condiciones con respecto al pH inicial de 5,8 puede deberse a que se quedaron algunos componentes del medio en el filtro tras la esterilización. Alternativamente, la adición de ABA diluido en el solvente utilizado (Tris-HCL pH 9), o de un volumen de tampón correspondiente en el caso del medio control, podría suponer el ligero aumento del pH observado en los diferentes medios, comparado con el pH inicial de 5,8. En cualquier caso, los valores de pH en medio control y en medios con diferentes concentraciones de ABA son similares, y por tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos considerarlos independientes del pH del medio.

5.2 Efecto del ABA en la viabilidad de microsporas

Hemos analizado en este proyecto el efecto que tiene la adición de la hormona vegetal ABA en la respuesta embriogénica de microsporas aisladas de colza. Para ello hemos medido varios parámetros, como la viabilidad de las microsporas y número de embriones por ml en medios de cultivo con distintas concentraciones crecientes de ABA, así como la deposición de calosa en la capa subintinal.

La viabilidad de las microsporas en condiciones de cultivo *in vitro* es un aspecto fundamental en la eficacia del proceso androgénico. El propio proceso de extracción mecánica de microsporas de la antera y su posterior cultivo en condiciones de laboratorio supone un estrés para éstas que conlleva una alta tasa de mortalidad. Se ha observado una importante mortalidad inicial, ya que el número inicial de microsporas aisladas y cultivadas se ve reducido entre un 27,3% y un 51% (Figura 10 C y 11 E). En general no se han observado diferencias de viabilidad entre las plantas de la línea de baja respuesta DH12075 cultivadas en condiciones del exterior, y las de alta respuesta DH4079 cultivadas tanto en condiciones ambientales como en condiciones controladas en cámaras de cultivo. Sin embargo, se ha observado una menor viabilidad de las microsporas más inmaduras extraídas de yemas de menor tamaño, si las comparamos con la viabilidad de microsporas con mayor grado de desarrollo, provenientes de yemas de mayor tamaño.

El sometimiento a un estrés térmico de las microsporas de colza aisladas puede desencadenar la activación de un programa de desarrollo embriogénico. Sin embargo, este estrés conlleva una caída de su viabilidad de más de un 50%. La caída de viabilidad aumenta con el tiempo de cultivo de forma progresiva (Figura 11 E). Se ha reportado un porcentaje promedio inicial de viabilidad celular después del aislamiento de microsporas de las anteras (antes del estrés) de $53,16 \pm 1.45$ (Pérez-Pérez et al., 2019), un porcentaje similar al obtenido en este estudio (entre un 72,7% y un 49%, Figura 10 C). El ratio de letalidad de microsporas tras el estrés térmico aplicado aumenta

considerablemente, obteniéndose ratios de viabilidad de hasta un $44,36 \pm 2.49$ (Pérez-Pérez et al., 2019). Estos valores, sin embargo, son muy superiores a lo que hemos observado en nuestras condiciones experimentales. Estas discrepancias pueden deberse al tiempo de aplicación del estrés, que puede ser de un día (Pérez-Pérez et al., 2019), o de 3 a 6 días, como es el caso de nuestras condiciones de experimentación. Un mayor tiempo de estrés conlleva, por tanto, una mayor mortalidad de las microsporas aisladas, si bien también aumenta la eficacia de formación de embriones (comparar Figuras 12 y 13). En cualquier caso, las microsporas vivas tras el sometimiento de estrés continúan su camino de desarrollo original formando granos de polen, y unas pocas entran en el desarrollo no embriogénico seguido de pocas divisiones esporofíticas. Sólo una pequeña fracción de éstas da lugar a embriones con o sin un suspensor (Ahmadi et al., 2018).

El segundo objetivo de este experimento era determinar si el ABA protegía de alguna manera a las microsporas, y si éstas tenían una mayor viabilidad en las condiciones de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que ninguna de las concentraciones de ABA ensayadas proporciona una mayor viabilidad tras 3 y 10 días de cultivo en microsporas aisladas de yemas, tanto en la línea de baja respuesta DH12075, como en la de alta respuesta DH4079, en condiciones de cultivo ambientales y controladas, respecto a las microsporas cultivadas en medio control (Figura 11 E).

Como conclusión de este apartado podemos decir que el ABA no tiene un efecto termoprotector de las microsporas cultivadas *in vitro*, o que si lo tiene es demasiado sutil para ser detectado en nuestras condiciones de experimentación. Alternativamente, el potencial efecto termoprotector del ABA en las microsporas podría verse encubierto por las elevadas tasas de mortalidad celular que hemos obtenido tras el tratamiento de estrés térmico a las que las microsporas han sido sometidas. El análisis de viabilidad en condiciones de estrés más suaves, un día a 33 °C, podría elucidar este último aspecto. En cualquier caso, en el caso de que ABA tenga un mecanismo termoprotector sobre las microsporas aisladas, éste será más complejo de lo que en un primer momento pensamos y estará influido por varios factores.

5.3 Efecto del ABA en la embriogénesis de microsporas

La aplicación de ABA en cultivos de microsporas de berenjena conlleva un aumento de la formación de callos, que en determinadas condiciones pueden producir plantas haploides o DHs (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Además, se han reportado algunos compuestos que específicamente mejoran la embriogénesis en microsporas de colza. Por ejemplo, la adición de 0.1 µg/ml de bleomicina, un gluco péptido antimicótico, mejora la embriogénesis (Zeng et al., 2010), si bien su adición a altas dosis tiene un efecto inhibitor sobre la respuesta. Los compuestos de tipo brasinoesteroides 2,4-epibrassinolide (EBR) y brassinolide, también tienen un efecto inductor de la respuesta androgénica sobre microsporas de *B. napus* (Ferrie et al., 2005). Algunas modificaciones del medio de cultivo, como la adición de nitrato de plata y carbón activado, produce un incremento de la embriogénesis (Prem y Gupta, 2008). La adición de anti-auxina, ácido p-clorofenoxiisobutírico (PCIB) aumenta la embriogénesis (Agarwal et al., 2006). Por último, la sustitución de polietilenglicol por sacarosa también tiene efectos positivos sobre la embriogénesis (Ferrie y Keller, 2007).

En el presente proyecto nos hemos planteado la hipótesis de que al ABA pueda ejercer un papel inductor de la embriogénesis de microsporas de colza, como se ha descrito previamente para berenjena (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). En nuestras condiciones de experimentación se ha observado que bajas dosis de ABA (0.5 y 5 nM) tienen un efecto inductor sobre la capacidad androgénica, y que ésta se ve reducida a los niveles control cuando se aplica una concentración mayor de ABA (50 nM). Este efecto se ha observado en tres réplicas independientes, si bien la magnitud de las diferencias obtenidas entre estas ha sido diferente (Figura 12). En nuestras condiciones de experimentación, sin embargo, y a pesar de la alta respuesta androgénica reportada para la línea DH4079 (Ferrie y Möllers, 2011), la respuesta androgénica obtenida para microsporas crecidas en condiciones control ha sido muy baja, siendo nula en algunos casos. En cualquier caso, de los experimentos realizados podemos concluir que de forma consistente, la adición de ABA al medio de cultivo de microsporas de colza conlleva una mayor respuesta androgénica en condiciones de estrés térmico moderado (3 días a 33°C). El mecanismo por el cual el ABA puede ejercer un papel inductor de la androgénesis queda por dilucidar. En el escenario planteado en este proyecto, parece ser que el ABA no afecta a la viabilidad de las microsporas a días cortos de cultivo. Hay estudios que proponen que el ABA puede estar implicado en la reprogramación del desarrollo de microsporas, si bien los resultados no son del todo esclarecedores (Zur et al., 2012). Otra posible explicación para este aumento de embriones es que el ABA limite el daño oxidativo inducido por el estrés osmótico, hecho que se basa en que ABA es un bloqueador clave de la producción de peróxido de hidrógeno, H₂O₂ (Ozfidan et al., 2012). La posibilidad de que elevadas concentraciones (50 nM) de ABA tenga efectos nocivos para las microsporas o produzca cambios de acidez en el medio queda descartada, ya que no hemos observado una mayor mortalidad de las microsporas en estas condiciones (Figura 11), ni un cambio en el pH del medio (Tabla 4), respectivamente. Una posible explicación para este resultado es que una dosis elevada de ABA provoque cambios en la ruta a nivel metabólico, con la consecuente alteración de los niveles de hormonas endógenas asociadas al estrés (Wahid et al., 2007).

Hemos observado una mayor respuesta androgénica general de las microsporas que fueron sometidas a un estrés de mayor intensidad (6 días a 33°C). En estas condiciones, la viabilidad de las microsporas a los diferentes días no fue analizada, si bien se espera que un mayor estrés tenga un mayor efecto letal sobre las microsporas, a pesar de la mayor capacidad de inducir androgénesis observada. Este experimento, a diferencia de lo observado anteriormente, no muestra diferencias significativas entre las condiciones analizadas (Figura 13). Esta observación nos indica que el ABA podría tener un efecto promotor de la androgénesis en condiciones de crecimiento que generen un estrés moderado, pero no en las condiciones de mayor estrés, donde se activan rutas metabólicas y moleculares que camuflan o reducen el efecto de la adición de ABA. Alternativamente, el ABA añadido al medio y sometido a 33°C durante 6 días podría sufrir algún proceso de modificación o degradación que impediría que éste tenga efecto sobre los cultivos. Una alternativa experimental que se puede plantear sería cambiar el medio con medio fresco tras la aplicación del estrés.

5.4 Efecto del ABA en la síntesis y acumulación de calosa en las microsporas

Se sabe que la calosa se acumula en la capa subintinal durante la reprogramación embriogénica de las microsporas, rodeando el protoplasma. En la figura 15 C vemos cómo la calosa se acumula en la capa subintinal, que es la capa más interior que queda por debajo de la exina (magenta) y de la intina (espacio sin teñir). La señal obtenida en microsporas cultivadas en medio control muestra una distribución heterogénea en la capa subintinal. En la figura 15 F (0,5 nM de ABA) y I (5 nM de ABA) se observa una mayor dispersión de la señal específica de la calosa por la zona media de la microspora, lo cual sería concorde con una mayor deposición de calosa en las microsporas tratadas con ABA.

En las imágenes obtenidas por microscopía confocal se observa una fuerte emisión de autofluorescencia de la exina, fundamentalmente en el canal específico del yoduro de propidio (Figura 15 A, D, G), que es recogida además por el canal del azul de anilina específico de la calosa (Figura 15 B, E, H). Esta señal perturba de alguna manera la observación de la acumulación de calosa en capas interiores de la microspora. Además, la resolución del microscopio no nos permite observar por separado las diferentes capas de la microspora con el mismo detalle que otras técnicas de microscopía, como la microscopía electrónica. Finalmente, la microscopía confocal puede tener la limitación de registrar la señal de un plano Z concreto de la célula, por lo que la señal registrada en las imágenes podría proceder de planos inferiores o superiores de la célula, diferentes al plano medio que se pretende captar. En cualquier caso, se ha observado una mayor expansión de la señal específica que se correspondería con una mayor acumulación de calosa en las microsporas en condiciones de cultivo *in vitro* enriquecidas con distintas concentraciones de ABA.

El mecanismo de acción del ABA exógeno en las microsporas se desconoce. Sin embargo, una hipótesis plausible es que estimula los genes responsables de la activación de rutas embriogénicas, de manera similar al mecanismo molecular desencadenado por el sometimiento de las microsporas a estrés térmico. Esto tendría sentido ya que explicaría el aumento de embriones en condiciones normales, y no tras aumentar la intensidad del estrés. Una forma de corroborar esta hipótesis sería por análisis de la actividad transcripcional de genes relacionados con la embriogénesis por RT-qPCR en microsporas cultivadas en diferentes concentraciones de ABA.

6 Conclusiones

Las conclusiones de los resultados obtenidos en este trabajo son:

- Las concentraciones de ácido abscísico ensayadas en este trabajo no afectan al pH del medio.
- El tamaño de las yemas que contienen las microsporas puede ser usado como medida indirecta del estadio de desarrollo de éstas. Los intervalos de tamaño de yema más adecuados para el estudio de la androgénesis de microsporas de colza en condiciones ambientales de crecimiento son 2,7-3 mm y 3,1-3,4 mm, para la línea de baja respuesta DH12075, y 3,1-3,4 mm y 3,5-3,7 mm, para la línea de alta respuesta DH4079.
- La adición de ABA al medio de cultivo de las microsporas no tiene efectos sobre su viabilidad en ninguna de las condiciones ensayadas.
- El ABA añadido de manera exógena promueve de manera llamativa la embriogénesis a bajas concentraciones. Sin embargo, en concentraciones superiores no parece haber diferencias con el control.
- La aplicación de ABA en cultivos de microsporas parece aumentar la deposición de calosa en la capa subintinal.

7 Bibliografía

- Agarwal, Custers, Liu, & Bhojwani. (2006). PCB an antiauxin enhances microspore embryogenesis in microspore culture of *Brassica juncea*, 201–210. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9108-0>
- Ahmadi, B., Ahmadi, M., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Microspore embryogenesis in *Brassica*: calcium signaling, epigenetic modification, and programmed cell death. *Planta*, *248*(6), 1339–1350. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2996-5>
- Bhojwani, S. S., Razdan, M. K., & Pospisilova, J. (1997). Plant and tissue culture: theory and practice, a revised edition. *Biologia Plantarum*, *39*(4), 542.
- Bruce, A. B. (1910). The mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science*, *32*(827), 627 LP – 628. <https://doi.org/10.1126/science.32.827.627-a>
- Chanana, N. P., Dhawan, V., & Bhojwani, S. S. (2005). Morphogenesis in Isolated Microspore Cultures of *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *83*(2), 169–177. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-4855-x>
- Charlesworth, D., & Willis, J. H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, *10*(11), 783–796. <https://doi.org/10.1038/nrg2664>
- Corral-Martínez, P., & Seguí-Simarro, J. M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: Effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica*, *195*(3), 369–382. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1001-4>
- Cutler, Rodriguez, Finkelstein, & Abrams. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1), 651–679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- de Leon, M., Garcia, & González. (1978). La colza oleaginosa. *Madrid: Hojas Divulgadoras Del Ministerio de Agricultura Del Departamento Nacional de Plantas Oleaginosas Del I.N.I.A.* <https://doi.org/10.1192/bjp.111.479.1009-a>
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., & Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the move. *Frontiers in Plant Science*, *8*(FEBRUARY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146>
- Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., & Ortiz, R. (2015). Haploids : Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.001>
- East, E. M. (1936). Heterosis. *Genetics*, *21*(4), 375 LP – 397. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/21/4/375.abstract>
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of palinology*. (Hafner., Ed.). New York.
- Ferrie, A. M. R., & Möllers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *104*(3), 375–386. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9831-4>
- Ferrie, & Caswell. (2010). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid

- and doubled haploid plant production, 301–309. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9800-y>
- Ferrie, Dirpaul, J., Krishna, P., & Krochko, J. (2005). Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in brassica species, (December), 742–745. <https://doi.org/10.1079/IVP2005690>
- Ferrie, & Keller. (2007). Optimization of methods for using polyethylene glycol as a non-permeating osmoticum for the induction of microspore embryogenesis in the Brassicaceae, 348–355. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9053-6>
- Gómez, M. B. C. (1993). *Estudio ultraestructural y citoquímico del desarrollo y maduración de la microspora de tomate (Lycopersicon esculentum M.)*. Universidad de Granada Facultad de Ciencias. <https://doi.org/ISBN 84-609-14499-2>
- Guha, Maheshwari, S. (1964). In vitro Production of Embryos from Anthers of Datura. *Nature*, 204(4957), 497. <https://doi.org/10.1038/204497a0>
- Guha, Maheshwari, S. (1966). Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of Datura in vitro. *Nature*, 212(5057), 97–98. <https://doi.org/10.1038/212097a0>
- Hays, D., Mandel, R., & Pharis, R. (2001). Hormones in zygotic and microspore embryos of Brassica napus. *Plant Growth Regulation*, 35(1), 47–58. <https://doi.org/10.1023/A:1013831116996>
- Ho, K. M., & Jones, G. E. (1980). MINGO BARLEY. *Canadian Journal of Plant Science*, 60(1), 279–280. <https://doi.org/10.4141/cjps80-041>
- Hochholdinger, F., & Baldauf, J. A. (2018). Heterosis in plants. *Current Biology*, 28(18), R1089–R1092. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.041>
- Iniguez-luy, F. L., & Federico, M. L. (2011). *Genetics and Genomics of the Brassicaceae. Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7118-0>
- Kaliff, Staal, Myrenås, & Dixelius. (2007). ABA is required for Leptosphaeria maculans resistance via ABI1 and ABI4-dependent signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 335–345. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0335>
- Kasha, K. J., & Kao, K. N. (1970). High Frequency Haploid Production in Barley (Hordeum vulgare L.). *Nature*, 225(5235), 874–876. <https://doi.org/10.1038/225874a0>
- Lenaerts, Collard, & Demont. (2019). Plant Science Review : Improving global food security through accelerated plant breeding. *Plant Science*, 287(June), 110207. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110207>
- Lichter, R. (1982). Induction of Haploid Plants From Isolated Pollen of Brassica napus. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie*, 105(5), 427–434. [https://doi.org/10.1016/S0044-328X\(82\)80040-8](https://doi.org/10.1016/S0044-328X(82)80040-8)
- Maluszynski, M., Szarejko, I., & Sigurbjörnsson, B. (1996). Haploidy and mutation techniques, 1, 67–93. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1860-8_5
- Ozfidan, C., Turkan, I., Sekmen, A. H., & Seckin, B. (2012). Abscisic acid-regulated responses of aba2-1 under osmotic stress: the abscisic acid-inducible antioxidant defence system and

- reactive oxygen species production. *Plant Biology*, 14(2), 337–346. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00496.x>
- Parra-Vega, Corral-Martínez, Rivas-Sendra, & Seguí-Simarro. (2015). Induction of embryogenesis in brassica napus microspores produces a callosic subintinal layer and abnormal cell walls with altered levels of callose and cellulose. *Frontiers in Plant Science*, 6(NOVEMBER), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01018>
- Pérez-Pérez, Y., Bárány, I., Berenguer, E., Carneros, E., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2019). Modulation of autophagy and protease activities by small bioactive compounds to reduce cell death and improve stress-induced microspore embryogenesis initiation in rapeseed and barley. *Plant Signaling & Behavior*, 14(2), 1559577. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1559577>
- Pollacsek, M. (1992). Management of the *ig* gene for haploid induction in maize. *Agronomie*, 12(3), 247–251. <https://doi.org/10.1051/agro:19920304>
- Prem, D., & Gupta, A. K. (2008). Activated charcoal induced high frequency microspore embryogenesis and efficient doubled haploid production in Brassica juncea, 269–282. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9373-1>
- Prem, D., Solís, M.-T., Bárány, I., Rodríguez-Sanz, H., Risueno, M.-C., & Testillano, P. (2012). A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in Brassica napus. *BMC Plant Biology*, 12, 127. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-127>
- Ravi, M., & Chan, S. W. L. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature*, 464(7288), 615–618. <https://doi.org/10.1038/nature08842>
- Ravi, M., Marimuthu, M. P. A., Tan, E. H., Maheshwari, S., Henry, I. M., Marin-Rodriguez, B., ... Chan, S. W. L. (2014). A haploid genetics toolbox for Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, 5, 5334. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/ncomms6334>
- Rivas-Sendra, A., Corral-Martínez, P., Porcel, R., Camacho-Fernández, C., Calabuig-Serna, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2019). Embryogenic competence of microspores is associated with their ability to form a callosic, osmoprotective subintinal layer. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1267–1281. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery458>
- Rodríguez-Sanz, H., Solís, M.-T., López, M.-F., Gómez-Cadenas, A., Risueño, M. C., & Testillano, P. S. (2015). Auxin Biosynthesis, Accumulation, Action and Transport are Involved in Stress-Induced Microspore Embryogenesis Initiation and Progression in Brassica napus. *Plant & Cell Physiology*, 56(7), 1401–1417. Retrieved from https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/25907568/Auxin_Biosynthesis_Accumulation_Action_and_Transport_are_Involved_in_Stress_Induced_Microspore_Embryogenesis_Initiation_and_Progression_in_Brassica_napus_
- Rodríguez, P., Calvo, M., Molina, Z., Durán, J., & Martínez, N. (2011). Toxic oil syndrome: 30 years after. *Revista Espanola de Medicina Legal*, 37(4), 155–161. [https://doi.org/10.1016/S0377-4732\(11\)70082-7](https://doi.org/10.1016/S0377-4732(11)70082-7)
- Seguí-Simarro. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*, 449. <https://doi.org/10:0-8400-5444-0>

- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: Changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, *134*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2008.01113.x>
- Takahata, Y., Brown, D. C. W., & Keller, W. A. (1991). Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L. *Euphytica*, *58*(1), 51–55. <https://doi.org/10.1007/BF00035339>
- Teale, W. D., Paponov, I. A., & Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(11), 847–859. <https://doi.org/10.1038/nrm2020>
- Testillano, P. S. (2019). Microspore embryogenesis: targeting the determinant factors of stress-induced cell reprogramming for crop improvement. *Journal of Experimental Botany*, *70*(11), 2965–2978. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery464>
- Turk, J. L. (1991). Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus: Facsimile of the first edition 1873. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *84*(1), 61–62. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1293079/>
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., & Foolad, M. R. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany*, *61*(3), 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- Weijers, D., Nemhauser, J., & Yang, Z. (2018). Auxin: small molecule, big impact. *Journal of Experimental Botany*, *69*(2), 133–136. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx463>
- Yan, G., Liu, H., Wang, H., Lu, Z., Wang, Y., Mullan, D., ... Liu, C. (2017). Accelerated generation of selfed pure line plants for gene identification and crop breeding. *Frontiers in Plant Science*, *8*(October). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01786>
- Zeng, X., Wen, J., & Wan, Z. (2010). Effects of Bleomycin on microspore embryogenesis in *Brassica napus* and detection of somaclonal variation using AFLP molecular markers, 23–29. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9658-z>
- Zhong, Y., Liu, C., Qi, X., Jiao, Y., Wang, D., Wang, Y., ... Chen, S. (2019). Mutation of ZmDMP enhances haploid induction in maize. *Nature Plants*, *5*(6), 575–580. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0443-7>
- Zur, I., Krzewska, M., Dubas, E., Gołebiowska-Pikania, G., Janowiak, F., & Stojalowski, S. (2012). Molecular mapping of loci associated with abscisic acid accumulation in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anthers in response to low temperature stress inducing androgenic development. *Plant Growth Regulation*, *68*(3), 483–492. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9738-7>