

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

**INSTITUTO DE CONSERVACIÓN Y MEJORA DE LA AGRODIVERSIDAD
VALENCIANA**

MÁSTER INTERUNIVERSITARIO OFICIAL EN MEJORA GENÉTICA VEGETAL



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**



Estudio del efecto del alcohol bencílico en la inducción de androgénesis

TRABAJO FIN DE MÁSTER

ALUMNA: Dña. Estefanía Mata Nicolás.

TUTOR: Prof. D. José María Seguí Simarro.

Director experimental: Dña. Alba Rivas Sendra.

VALENCIA, SEPTIEMBRE 2016

Dicen que todo lo que empieza tiene que terminar, y que un final es un nuevo comienzo.

Muchas personas que me han acompañado en este pequeño viaje, que han formado parte de este proyecto porque me han enseñado, ayudado cuando lo he necesitado o guiado. Otras personas que también han sido importantes en esta aventura son aquellas que me han dado su apoyo y ánimo.

“Tendré que soportar dos o tres orugas si quiero conocer a las mariposas” Antoine de Saint-Exupéry.

FORMULARIO DEPÓSITO TESIS MÁSTER

AUTOR	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	MATA	NICOLÁS	ESTEFANÍA	71459652D
DIRECTOR(ES) TESIS	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	
	SEGUÍ	SIMARRO	JOSÉ MARÍA	
UNIVERSIDAD	MÁSTER			
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA	MÁSTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO DE MEJORA GENÉTICA VEGETAL			
TÍTULO DE LA TESIS				
Estudios preliminares sobre el efecto del alcohol bencílico en el cultivo de microsporas aisladas de colza (<i>Brassica napus</i>), berenjena (<i>Solanum melongena</i>) y pimiento (<i>Capsicum annuum</i>).				
RESUMEN	<p>La obtención de plantas dobles haploides es una herramienta muy valiosa en los programas de mejora, ya que estas presentan un 100% de homocigosis. Estas líneas puras actuarían como parentales, permitiendo obtener descendencia híbrida, interesante por su alto rendimiento y la manifestación de la heterosis o vigor híbrido.</p>			
	<p>La androgénesis es un método que proporciona grandes ventajas a la hora de obtener líneas puras frente a lo que sería un programa de mejora convencional, ya que estos requieren mucho tiempo y recursos económicos. Pese a que es una técnica ventajosa en especies como la colza, presenta limitaciones ya que es una metodología que todavía necesita ser puesta a punto en muchas especies recalcitrantes como pueden ser la berenjena o el pimiento. El cultivo de microsporas aisladas presenta limitaciones en ambas especies ya que, una vez inducida la androgénesis, el embrión detiene su patrón de desarrollo embriogénico para dar lugar a un conjunto de células indiferenciadas (callos). Dentro de los múltiples factores que determinan el éxito de la técnica, tanto el genotipo como el estrés son de los más importantes. Existen multitud de estreses que se pueden aplicar para inducir la androgénesis, con efectos distintos en cada especie. En este estudio se pretende comprobar qué efecto tendría un nuevo agente inductor de estrés, el alcohol bencílico, sobre dicho proceso en cada una de las tres especies. (español)</p>			
	<p>Obtaining double haploid plants is a powerful tool for breeding programs, because these plants are 100% homozygous. These pure lines can be used as parental lines, allowing for the production of hybrids. Hybrids are interesting due to their high yield potential and to the presence of hybrid vigor (heterosis). Androgenesis is a rapid and convenient method to produce pure lines for plant breeding because androgenic</p>			

double haploids reach 100% homozygosity after one in vitro generation, instead of the several generations of inbreeding needed in classical pure line production. Despite of the considerable importance in plant breeding programs, the potential of this technique cannot be fully exploited in many species due to the lack of a reproducible and reliable method. Regeneration of androgenic plants in many recalcitrant species, such as eggplant or pepper, occurs indirectly via callus production because embryos arrest in development and transform into calli. Efficient androgenesis is usually induced by the application of a stress treatment. There are many different stressing agents, with variable effects among species. The aim of this study is to determine the effect of a novel stressing agent, benzyl alcohol, on the induction of androgenesis in rapeseed, eggplant and pepper.

(inglés)

DESCRIPTORES EN ESPAÑOL

Androgénesis, embriogénesis, alcohol bencílico, microsporas, estrés, dobles haploides, *Brassica*, *Solanum*, *Capsicum*.

DESCRIPTORES EN INGLÉS

Androgenesis, embryogenesis, benzyl alcohol, stress treatment, microspores, double haploids, *Brassica*, *Solanum*, *Capsicum*.

CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO

URL MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN:

http://ciencia.micinn.fecyt.es/ciencia/jsp/plantilla.jsp?area=plan_idi&id=6&contenido=/files/portada.jsp

CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA
31	07	06
24	09	91
24	17	92

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	MEJORA GENÉTICA VEGETAL.....	1
1.1.1.	Haploides y dobles haploides	1
1.1.1.1.	Utilización de dobles haploides en programas de mejora	2
1.1.1.2.	Utilización de dobles haploides en mutagénesis	2
1.1.1.3.	Utilización de dobles haploides en transformación genética	2
1.1.1.4.	Utilización de dobles haploides en investigación genómica	2
1.2.	MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DOBLES HAPLOIDES.....	3
1.2.1.	Androgénesis.....	4
1.2.1.1.	Androgénesis a partir de microsporas	5
1.2.1.1.1.	Cultivo de anteras.....	6
1.2.1.1.2.	Cultivo de microsporas aisladas.....	7
1.2.1.2.	Factores que afectan a la inducción	7
1.3.	GENOTIPO	9
1.3.1.	Colza	9
1.3.2.	Berenjena	11
1.3.3.	Pimiento	12
2.	OBJETIVOS	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1.	MATERIAL VEGETAL.....	17
3.2.	CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS DONANTES.....	17
3.3.	CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS	18
3.3.1.	Cultivo de microsporas aisladas en colza.....	18
3.3.1.1.	Recolección de las yemas y selección de las anteras	18
3.3.1.2.	Aislamiento de las microsporas	19
3.3.1.3.	Conteo	20
3.3.1.4.	Inducción	21
3.3.1.5.	Cultivo	21
3.3.2.	Cultivo de microsporas aisladas en berenjena	21
3.3.2.1.	Recolección de las yemas y selección de las anteras	21
3.3.2.2.	Aislamiento de las microsporas	21

3.3.2.3.	Conteo	22
3.3.2.4.	Inducción	23
3.3.2.5.	Cultivo	23
3.3.3.	Cultivo de microsporas aisladas en pimiento	23
3.3.3.1.	Recolección de las yemas y selección de las anteras	23
3.3.3.2.	Aislamiento de las microsporas	24
3.3.3.3.	Conteo	24
3.3.3.4.	Inducción	25
3.3.3.5.	Cultivo	25
3.4.	ENSAYOS CON ALCOHOL BENCÍLICO	26
3.5.	SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN.....	27
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1.	EFFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA	31
4.1.1.	Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones.....	31
4.1.2.	Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras	31
4.1.3.	Efecto del alcohol bencílico en la embriogénesis	34
4.2.	EFFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE BERENJENA...38	
4.2.1.	Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones.....	46
4.2.2.	Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras	47
4.2.3.	Efecto del alcohol bencílico en callos	49
4.3.	EFFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE PIMIENTO	46
4.3.1.	Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones.....	46
4.3.2.	Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras	47
4.3.3.	Efecto del alcohol bencílico en embriones o callos	49
4.4.	Consideraciones finales	50
5.	CONCLUSIONES	53
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la embriogénesis gametofítica.....	3
Figura 2. Inducción de androgénesis a partir de microsporas.	5
Figura 3. Metodologías para obtener dobles haploides a partir de microsporas: cultivo de anteras y cultivo de microsporas aisladas.	6
Figura 4. Factores que influyen en la inducción de la embriogénesis de microsporas.	8
Figura 5. Promedio de producción 2004-2014. Se recoge la producción por continentes para la producción de colza.	10
Figura 6. Promedio de producción por continentes de berenjena, entre 2004-2014.	11
Figura 7. Promedio de producción 2004-2014. Se recoge la producción por continentes para la producción de pimiento.	13
Figura 8. Pasos generales y particularidades en los protocolos de aislamiento y cultivo de microsporas aisladas.	18
Figura 9. Selección de anteras de colza según el tamaño de las mismas.	19
Figura 10. Selección de anteras de berenjena según el tamaño de las mismas.	21
Figura 11. Microsporas vacuoladas en azul (A) y microsporas vivas en rojo (B).	22
Figura 12. Selección de anteras de pimiento según la relación de la longitud del cáliz con respecto a la longitud total de la yema (círculo morado) y pigmentación púrpura (flecha).	24
Figura 13. Diferencias entre una estructura organizada y desorganizada.	28
Figura 14. Clasificación basada en el número de núcleos.	29
Figura 15. Diferencias en el porcentaje de divisiones para las distintas concentraciones de BOH8 en colza.	31
Figura 16. Porcentaje de la desorganización y su error para cada una de las concentraciones empleadas en colza.	32
Figura 17. Diferencias en las estructuras observadas entre el control (A), 100 μ M de alcohol bencílico (B) y 500 μ M de alcohol bencílico (C)	33
Figura 18. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en colza.	34
Figura 19. Efecto del alcohol bencílico en el número de embriones.	35
Figura 20. Efecto del BOH en el número de embriones para cada uno de los tratamientos, en colza.	35
Figura 21. Efecto del alcohol bencílico en la velocidad de desarrollo de los embriones de colza	36

Figura 22. Embriones de colza obtenidos tras 3 semanas de cultivo, observados a lupa y aumentos de 1x.....	37
Figura 23. Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones en berenjena.	39
Figura 24. . Efecto del alcohol bencílico en la organización en berenjena	39
Figura 25. Estructuras observadas en presencia de alcohol bencílico desde día cero para berenjena.....	40
Figura 26. Estructuras observadas en el control (A-C) y en los tratamientos con alcohol bencílico tras la inducción (D-L) para berenjena	41
Figura 27. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en berenjena.	42
Figura 28. Efecto del alcohol bencílico en el número de callos en berenjena.	43
Figura 29. Efecto del alcohol bencílico en porcentaje de callos mayores a 1mm en berenjena.	44
Figura 30. Efecto del alcohol bencílico desde día 0 en el tamaño y el número de callos, en berenjena	44
Figura 31. Callos de berenjena obtenidos tras 4 semanas de cultivo.	45
Figura 32. Diferencias en el porcentaje de divisiones para las distintas concentraciones de alcohol bencílico, en pimiento.	47
Figura 33 Efecto del alcohol bencílico sobre la desorganización de las estructuras observadas.	47
Figura 34. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en pimiento.	48
Figura 35. Estructuras observadas en pimiento en pimiento.....	49
Figura 36. Estructuras observadas en lupa tras el tratamiento del cultivo de las microsporas de pimiento con alcohol bencílico.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de las cámaras de cultivo de colza.....	17
Tabla 2. Composición del medio NLN.	20
Tabla 3. Composición del medio de cultivo de berenjena.	23
Tabla 4. Composición del medio de ayuno de pimiento.	25
Tabla 5. Composición de los medios de cultivo de pimiento.....	26
Tabla 6. Experimentos aplicados según especie.....	27
Tabla 7. Resumen que recoge los grupos de homogeneidad para los caracteres de porcentaje de divisiones y de desorganización, así como de tipos de estructuras observadas en colza.	37
Tabla 8. Grupos de homogeneidad obtenidos para el número d embriones en los distintos tratamientos en colza.....	38
Tabla 9. Grupos de homogeneidad para porcentaje de divisiones y desorganización, así como tipos de estructuras observadas en berenjena.	45
Tabla 10. Grupos de homogeneidad para número de callos y porcentaje de callos de tamaño mayor a 1 mm observados en berenjena.	46
Tabla 11. Resumen de los grupos de homogeneidad obtenidos en el análisis estadístico de los parámetros relacionados con divisiones y estructuras observadas, en pimiento.	50

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MEJORA GENÉTICA VEGETAL

Desde el punto de vista de los objetivos, la mejora vegetal puede definirse como “una moderna tecnología con base científica para la manipulación genética de las plantas dirigida hacia objetivos económicos”; por lo tanto, la mejora vegetal pretende obtener nuevos cultivares que deben tener un valor económico superior a los ya existentes. La obtención de híbridos de elevado valor comercial es la principal técnica empleada en mejora por su elevada eficacia (Cubero, 2003), eficacia que es debida tanto al elevado rendimiento como a la homogeneidad de estos híbridos. Por un lado, la descendencia híbrida presentará un alto rendimiento consecuencia de la manifestación de la heterosis o vigor híbrido. El fenómeno de heterosis fue definido por Shull (1911) como “la superioridad del genotipo heterocigoto con respecto a uno o más caracteres, en comparación con los correspondientes homocigotos”. El vigor híbrido ya fue aprovechado en los primeros híbridos comerciales de maíz que aparecieron en el s. XX (Atanassova y Georgiev, 2006). Por otro lado, la descendencia híbrida será extraordinariamente homogénea. Lo que quiere decir que si dos parentales son homocigotos para un determinado carácter, los individuos híbridos generados mediante el cruce entre ambos serán todos heterocigotos, uniformes para ese carácter. Por consiguiente, en mejora se busca conseguir individuos que sean homocigotos para todos los caracteres, y a estos se les denomina líneas puras.

La importancia de estas líneas puras en el campo de la mejora genética es máxima, ya que son la base en la obtención de estos híbridos que serán homogéneos o uniformes para todos sus caracteres. La principal desventaja de un programa de mejora tradicional es que se necesitan 7 o más ciclos de autofecundación y selección para conseguir desarrollar una línea pura, haciendo que este sea un proceso largo y laborioso que condiciona lo que se tardaría en sacar un nuevo híbrido al mercado. Este hecho se debe a que el número de cultivos que se pueden hacer al año se ve limitado en función de la especie, de tal forma que la obtención de una línea pura puede llevar hasta 10 años (Asif, 2013a).

Aquí es donde juegan un papel importante las técnicas biotecnológicas de cultivo *in vitro*, y más concretamente la obtención de dobles haploides. Estos dobles haploides son individuos 100% homocigotos, es decir, líneas puras que se obtendrían en una sola generación sin necesidad de realizar sucesivos ciclos de autofecundación (Dwivedi *et al.*, 2015).

1.1.1. Haploides y dobles haploides

Los individuos dobles haploides son individuos totalmente homocigotos para todos sus *loci* obtenidos por duplicación cromosómica, espontánea o artificial, de un genoma haploide. Un individuo haploide es aquel que tiene el mismo número de cromosomas que el gameto de la especie de la que procede. En realidad, los haploides no son importantes desde un punto de vista aplicado sino básico ya que los haploides no pueden realizar una correcta meiosis, incapacidad que es debida a que los cromosomas están sin sus correspondientes homólogos y no se produce un apareamiento absoluto (Cubero, 2003). Esto les convierte en individuos

estériles que impiden la propagación de la planta, haciendo que sea necesario conseguir la duplicación cromosómica para obtener un individuo doble haploide, es decir una línea pura que permitirá fijar los productos recombinantes de un cruce en homocigosis (Germanà, 2011a). Estos dobles haploides serían los realmente importantes desde un punto de vista aplicado, tal como se detalla a continuación.

1.1.1.1. Utilización de dobles haploides en programas de mejora

La obtención de dobles haploides es una herramienta biotecnológica que supone un gran ahorro de tiempo y recursos en la obtención de híbridos comerciales con las características de interés, ya que como se ha dicho anteriormente permiten desarrollar una línea pura u homocigótica para todos sus *loci* en una sola generación (Dunwell, 2010, Bhojwani y Dantu, 2003). Además, estos individuos serán absolutamente homocigóticos, es decir que presentarán un 100% de homocigosis (Germanà, 2011a) frente al 98% de homocigosis que se conseguiría en las líneas puras obtenidas mediante ciclos de autofecundación (Ferrie y Möllers, 2011). Por último, cabe destacar la especial importancia a la hora de fijar caracteres que están regulados por genes recesivos. Los dobles haploides permiten llevar a cabo una selección más eficiente y facilitan la fijación de alelos recesivos beneficiosos (Seguí-Simarro, 2010) y también permitirían la eliminación automática de alelos recesivos letales o deletéreos, cuyo efecto no se va a ver enmascarado por la presencia de alelos dominantes (Cubero, 2003).

1.1.1.2. Utilización de dobles haploides en mutagénesis

La mutación es importante en un programa de mejora ya que es fuente de variación y ha sido empleada de manera tradicional mediante tratamiento de semillas con agentes mutagenizantes. Pese a la utilidad que ha tenido, requiere mucho tiempo para la detección y evaluación de los mutantes y presenta una clara desventaja que es la obtención de quimeras (Asif, 2013a, Forster *et al.*, 2007). Como alternativa al método tradicional y solución a sus problemas nos encontramos con los dobles haploides que constituyen un sistema ideal para la mutagénesis. El cambio que se haya producido en el ADN se habrá fijado en un individuo homocigoto, hecho de vital importancia a la hora de detectar mutaciones de carácter recesivo ya que no se verán afectadas por relaciones de dominancia (Ferrie y Möllers, 2011).

1.1.1.3. Utilización de dobles haploides en transformación genética

Las células haploides, que se obtienen durante la producción de dobles haploides, son una herramienta útil en la transformación genética. Si se lleva a cabo la transformación sobre microsporas o embriones haploides, se podría fijar esa transformación en homocigosis tras la duplicación del material genético. Esto quiere decir que se puede acelerar la regeneración de una planta transformada que presente el transgen en ambos cromosomas homólogos, es decir que es homocigota para el mismo (Jähne y Lörz, 1995, Ferrie y Möllers, 2011, Germanà, 2011a).

1.1.1.4. Utilización de dobles haploides en investigación genómica

Por último, las poblaciones de dobles haploides son de gran utilidad en estudios genómicos como puede ser la elaboración de poblaciones de mapeo (Germanà, 2011b): Los

individuos dobles haploides son importantes en la identificación de genes candidatos, ya que permiten elaborar mapas genéticos de gran precisión. Por ejemplo, mediante poblaciones F2, poblaciones de retrocruzamiento o RILs (Recombinant Inbred Lines) se han podido identificar múltiples QTLs (Dunwell, 2010). Sin embargo, las poblaciones de dobles haploides permiten una identificación de QTL mucho más rápida y con una gran ventaja (Asif, 2013a): como estas poblaciones son “inmortales” se pueden repetir ensayos en diferentes ambientes, lo que permite encontrar la interacción entre el QTL de interés y el ambiente, o medir la expresión fenotípica de un QTL para un ambiente concreto.

1.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DOBLES HAPLOIDES

Para obtener haploides y dobles haploides se pueden emplear técnicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Germanà, 2011b). Dentro de las primeras, se encuentran los métodos de hibridación interespecífica; mientras que dentro de las segundas se engloban las tecnologías basadas en el cultivo de gametofitos inmaduros como son la ginogénesis y androgénesis, que aparecen representadas en la figura 1. En esta figura podemos ver la diferencia entre ambas técnicas, que estriba en que se obtenga un individuo haploide a partir de ovarios u óvulos inmaduros (ginogénesis, cuadrado azul de la figura 1) o del precursor del gametofito masculino (androgénesis, cuadrado rojo de la figura 1).

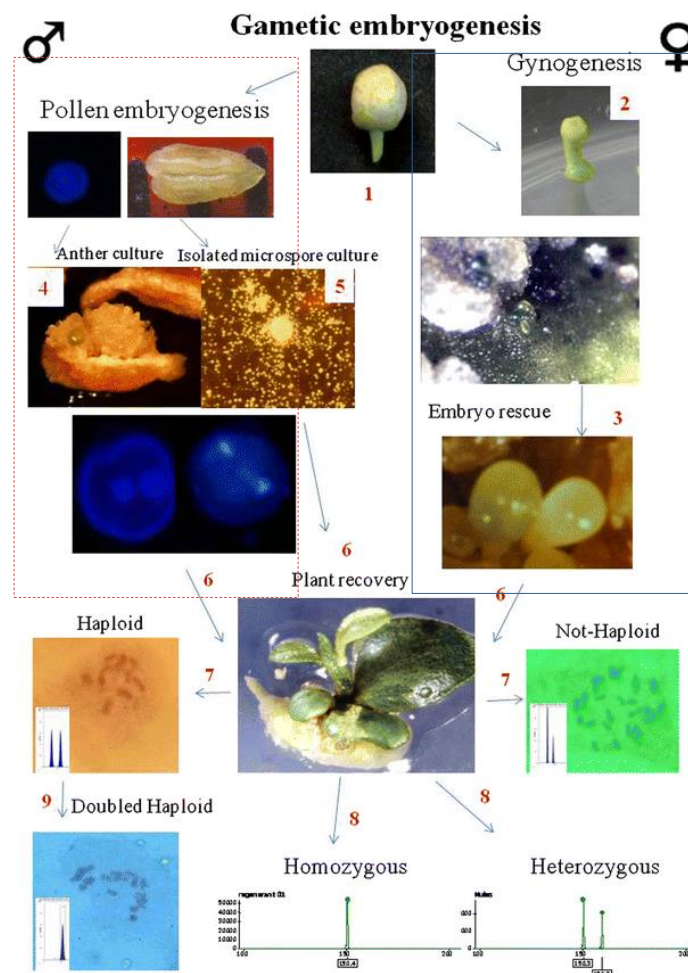


Figura 1. Representación esquemática de la embriogénesis gametofítica. Primero se realizaría una selección de yemas (1). En el caso de la ginogénesis (2) se pondría los ovarios u óvulos inmaduros en medio de cultivo hasta que aparezca el embrión y se

realiza rescate de embriones (3). En el caso de la androgénesis existen dos alternativas que son el cultivo de anteras (4) o de microsporas (5). Se lleva a cabo la regeneración de la planta (6) para cualquiera de los métodos y se comprueba que sea un haploide (7) para así descartar que sea un regenerante somático doble haploide (8). Por último es necesaria la duplicación cromosómica de haploides regenerados (9). Tomada de (Germanà, 2011b).

Hibridación interespecífica: la formación de individuos haploides ocurre de manera espontánea, tras la hibridación. En este caso, sí que germina el polen pero no participa en la formación del embrión, sino que este se va a originar a partir de la célula huevo u otro tipo de células. O bien, puede producirse el cruce entre dos especies lo suficientemente distantes. En este caso, los cromosomas del parental donador del polen van a ser eliminados, generándose un embrión que tendrá por lo tanto los cromosomas del parental femenino, que se duplicarán posteriormente (Asif, 2013b, Dwivedi *et al.*, 2015, Germanà y Chiancone, 2001).

Ginogénesis: esta técnica consiste en la regeneración de un individuo haploide a partir de un gametofito femenino que no ha sido fecundado. Dentro de esta, nos encontramos con el uso de polen irradiado o triploide que es capaz de germinar en el estigma pero incapaz de fertilizar la célula huevo, induciendo de este modo la partenogénesis. Por otro lado, se encuentran el cultivo *in vitro* de ovarios u óvulos inmaduros y no fecundados, capaces de dar lugar a un embrión haploide. Esta técnica es la menos empleada debido a su baja eficiencia. Por ello, solamente se emplea en aquellos casos en los que tecnologías más eficientes no dan resultado (Bohanec, 2009, Germanà, 2011b).

Androgénesis: se define como el conjunto de vías biológicas que dan lugar a un individuo cuyo fondo genético proviene exclusivamente de un núcleo de origen masculino (Seguí-Simarro, 2010). De modo que esta técnica se basa en la regeneración *in vitro* de individuos haploides a partir de la reprogramación de la ruta normal de desarrollo del precursor del gametofito masculino, como se explica más detalladamente a continuación.

1.2.1. Androgénesis

Inicialmente, la androgénesis estaba ligada a un proceso espontáneo en el cual se producía la eliminación o inactivación del material genético de origen femenino, una vez la célula huevo había sido fecundada. Actualmente existen dos alternativas más que son la formación de callos derivados de meiocitos y la embriogénesis o callogénesis de microsporas, que consiste en desviarlas de su ruta gametofítica hacia callogénesis o embriogénesis (Seguí-Simarro, 2010).

Pese a que es una técnica que presenta altas eficiencias cuando está optimizada; presenta algunas desventajas, siendo su principal limitación que no está optimizada para muchas especies. También existen problemas de regeneración de las plantas haploides y dobles haploides, se pueden originar embriones aberrantes y, por último la baja tasa de duplicación que existe en algunos casos (Dunwell, 2010).

1.2.1.1. Androgénesis a partir de microsporas

La embriogénesis de microsporas fue descrita por Guha y Maheshwari (1964), investigadores que descubrieron que se podía obtener plantas con un número haploide de cromosomas a partir del cultivo de anteras inmaduras.

En la embriogénesis de microsporas, estas se desvían de su patrón normal de desarrollo de tal forma que son inducidas a formar un embrión o callo haploide mediante un procedimiento *in vitro*. Dos son los procesos claves para conseguir individuos haploides mediante androgénesis (Bhojwani y Dantu, 2003, Seguí-Simarro y Nuez, 2008a):

- La **inducción** de la androgénesis, es decir que la microspora se desvíe de su ruta gametofítica hacia embriogénesis o calogénesis (flechas verdes de la ruta azul, figura 2). Cuando las microsporas son inducidas, parte de ellas morirán, parte de ellas darán lugar a embriones derivados de microspora, y también pueden dar lugar a estructuras tipo callo.

- La **regeneración** de la planta haploide, que se puede dar a partir de un embrión (ruta amarilla, figura 2) o de los callos obtenidos (ruta verde, figura 2). Posteriormente, esta planta regenerada tendrá que ser aclimatada a las condiciones *ex vitro*.

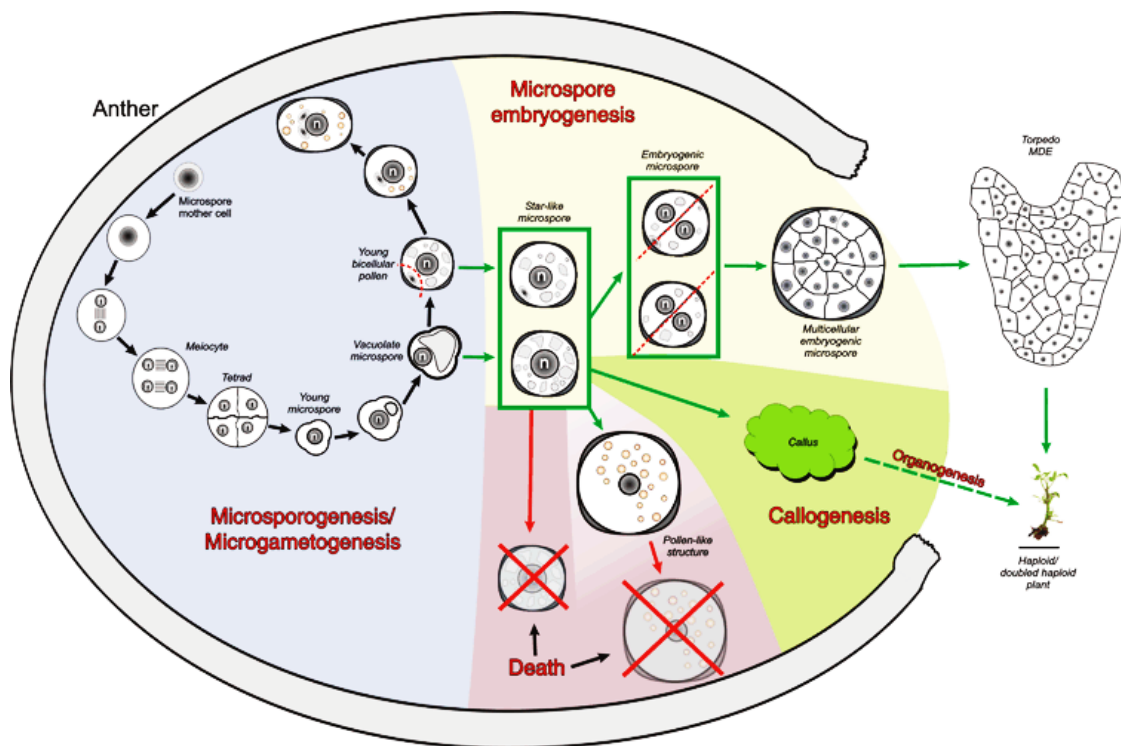


Figura 2. Inducción de androgénesis a partir de microsporas. Tomada de (Seguí-Simarro y Nuez, 2008a).

Como se recoge en la figura 3, existen dos técnicas diferenciadas metodológicamente que son usadas para la obtención de haploides androgénicos: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas. Como se puede ver en el esquema de la izquierda, el cultivo de microsporas requiere el aislamiento de las mismas y la separación del tejido de la antera, para su posterior cultivo en medio líquido. En el caso del cultivo de anteras (esquema de la derecha), estas se ponen directamente en el medio de cultivo y pueden ocurrir dos cosas: o se regenera la planta haploide directamente, o es necesario regenerar la misma a partir de callo.

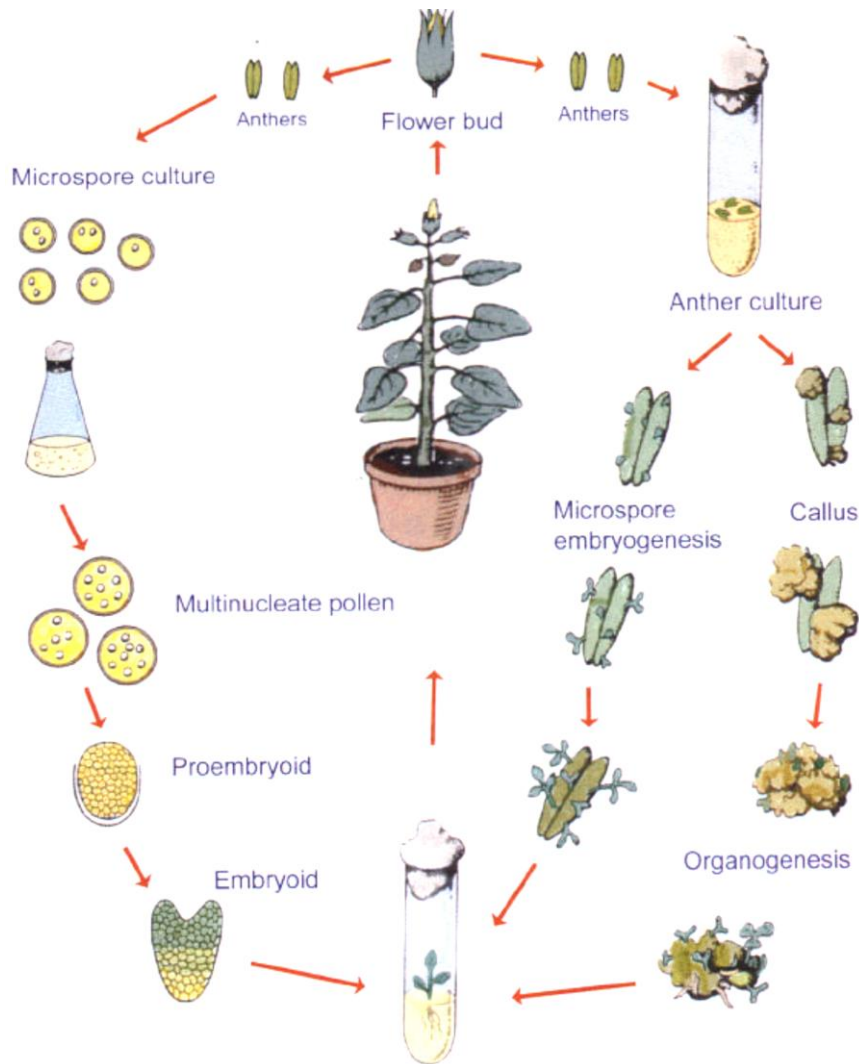


Figura 3. Metodologías para obtener dobles haploides a partir de microsporas: cultivo de anteras y cultivo de microsporas aisladas. Tomada de (Reynolds, 1997). Las anteras se ponen en medio de cultivo sólido y darán lugar a regenerantes somáticos del tejido de la antera que hay que diferenciar de las plantas dobles haploides que han surgido a partir de la embriogénesis de microsporas. Estos haploides pueden surgir directamente de la antera o partir de callos que habría que regenerar. En el caso del cultivo de microsporas, se aíslan del tejido de la antera y se ponen en medio de cultivo líquido hasta que se obtengan embriones haploides o, en su defecto callos.

1.2.1.1.1. Cultivo de anteras

Esta es una técnica sencilla, ya que las anteras se cultivan directamente en un medio de cultivo sólido o semisólido. Esto hace que sea la principal técnica utilizada para obtener plantas haploides derivadas de microsporas, y ya ha sido descrita con éxito en más de 170 especies de angiospermas. Los embriones haploides o dobles haploides emergen directamente de la antera (Reynolds, 1997) pero su principal inconveniente es que existe la posibilidad de que surjan regenerantes somáticos. Esto quiere decir que pueden originarse plántulas a partir del tejido somático de la antera, y estas deben diferenciarse de aquellas que son realmente haploides y han surgido a partir de las microsporas.

1.2.1.1.2. Cultivo de microsporas aisladas

En este caso, las microsporas tienen que ser aisladas de la antera y se cultivan en medio líquido. Es un método técnicamente más complejo, ya que requiere del aislamiento de las microsporas y su recolección mediante centrifugación. La eliminación del tejido somático de la antera es un paso crítico (Ferrie y Caswell, 2011), puesto que su presencia afecta negativamente a las microsporas por la segregación de compuestos fenólicos. Además, este tejido de la antera puede dar lugar a la formación de callos o embriones diploides que habría que diferenciar de los haploides que proceden de las microsporas, como ya se ha explicado. Esta técnica presenta más ventajas frente al cultivo de anteras como pueden ser la mayor eficiencia a la hora de obtener dobles haploides y una mayor frecuencia en la duplicación cromosómica espontánea del material genético, entre otras. Pese a todas sus ventajas, la puesta a punto de un protocolo eficiente resulta compleja y solo se ha conseguido para algunas especies. Por lo tanto, actualmente es una metodología con una gran limitación en cuanto a su aplicación práctica. Sin embargo, puesto que presenta una mayor eficiencia a la hora de obtener dobles haploides, será el método por excelencia para aquellas especies donde se haya puesto a punto como son colza (Custers, 2003), arroz (Mishra y Rao, 2016), trigo (Jähne y Lörz, 1995) o cebada (Hoekstra *et al.*, 1992).

1.2.1.2. Factores que afectan a la inducción

Existen una serie de factores que influyen en la embriogénesis de microsporas (Jähne y Lörz, 1995, Pratap *et al.*, 2009, Ferrie y Möllers, 2011, Dwivedi *et al.*, 2015, Mishra y Rao, 2016): genotipo, condiciones de la planta donante, grado de desarrollo de las microsporas, tratamientos previos de inducción, composición del medio de cultivo y condiciones del cultivo. Todos estos factores deben ser optimizados, en función del genotipo y especie, para conseguir explotar esta técnica de manera eficaz.

En cuanto al **estadio** de desarrollo del polen, generalmente se encuentra en torno a la primera mitosis del polen; o lo que es lo mismo, entre la microspora vacuolada y el polen bicelular joven (Dunwell, 2010, Seguí-Simarro y Nuez, 2008b, Mishra y Rao, 2016). Esto se debe a que la microspora se encuentra en estado proliferativo y no ha sido totalmente diferenciada, por lo tanto su capacidad de inducción es mayor (Germanà, 2011a).

En cuanto a las **condiciones de crecimiento** de la planta donante, así como su estado fisiológico, hay que destacar que se han encontrado diferencias en la respuesta en función de la estación (Germanà, 2011a) y también se ha visto una disminución de la respuesta androgénica conforme aumenta la edad de la planta (Dwivedi *et al.*, 2015). También influyen factores como el fotoperiodo, la intensidad de la luz o la temperatura de crecimiento, entre otros (Alpsoy y Seniz, 2007).

También habría que destacar todos aquellos parámetros que están relacionados con las **condiciones de cultivo**, como puede ser la composición del medio de cultivo o la aplicación de diversos estreses. La **composición** del medio de cultivo puede ser un factor importante, ya que hay genotipos que requieren un medio basal concreto para la concentración y fuente de carbono o la composición de las hormonas, principalmente. Señalar también la importancia que puedan tener otras condiciones de cultivo, sobre todo en lo referido a la exposición a la

luz y a la temperatura de incubación (Smykal, 2000, Bhojwani y Dantu, 2003, Germanà, 2011a, Feher, 2015, Mishra y Rao, 2016).

Pero dentro de los parámetros relacionados con las condiciones de cultivo, el pretratamiento o **estrés** sería el más importante de todos (Ferrie y Caswell, 2011) y es en el que nos vamos a centrar en este trabajo. La necesidad de aplicación de un estrés, para que haya respuesta embriogénica, ha sido demostrada en muchos genotipos. Existe una gran variedad de estreses que se recogen en el figura 4, desde el ayuno al choque térmico que es considerado el tratamiento más efectivo para inducir la ruta embriogénica, pasando por compuestos alcohólicos (Shariatpanahi *et al.*, 2006, Islam y Tuteja, 2012).

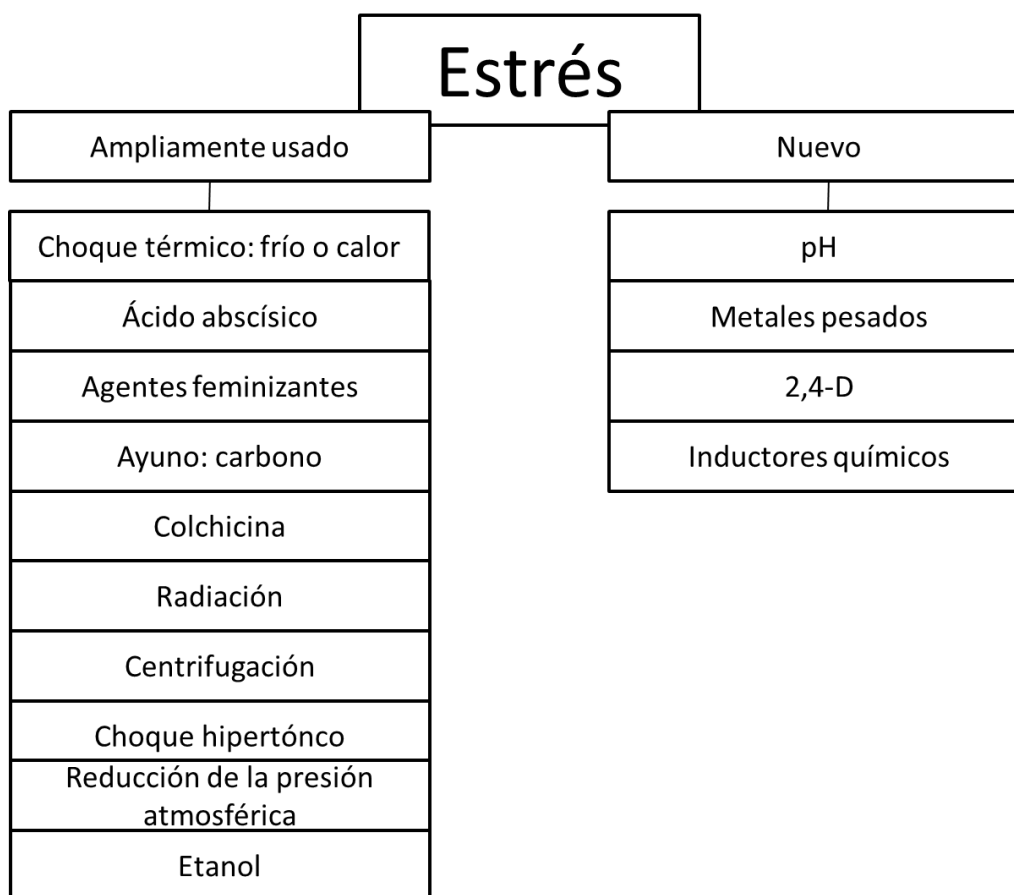


Figura 4. Factores que influyen en la inducción de la embriogénesis de microsporas. Modificado de Shariatpanahi *et al.*, (2006).

Uno de estos compuestos alcohólicos inductores del estrés es el **alcohol bencílico**, ya que tiene un papel como fluidizador de membrana (Örvar *et al.*, 2000). El alcohol bencílico es una molécula anfifílica que actúa a nivel de los canales de calcio de las membranas celulares, induciendo una elevación de los niveles de calcio citosólicos (Shigapova *et al.*, 2005, Saidi *et al.*, 2009). Pauls *et al.*, (2006) ya postularon que el alcohol bencílico podía imitar el efecto del choque térmico, actuando a nivel de la fluidez de las membranas celulares durante la inducción de la formación de embriones de colza. Además, en nuestro grupo también se ha trabajado en el posible efecto que puede tener el alcohol bencílico en el cultivo de microsporas aisladas de colza (Parra-Vega *et al.*, 2015): Este compuesto hace que aumenten los niveles de calcio citosólicos en las microsporas (poniéndose de manifiesto su actuación a nivel de la fluidez de la membrana), y por tanto la deposición de calosa en la *subintinal layer*.

Todo esto provocaría un aumento en la cantidad de embriones, ya que se facilitaría la reprogramación de las microsporas hacia el programa embriogénico.

Por último, puesto que el **genotipo** juega el papel más importante en lo que a respuesta embriogénica se refiere, será desarrollado más ampliamente en el siguiente apartado.

1.3. GENOTIPO

La respuesta a la inducción está altamente correlacionada con el genotipo, y esto se ha observado en el hecho de que se hayan encontrado diferencias tanto entre genotipos, como entre cultivares dentro de genotipos o individuos dentro de cultivar (Bajaj, 1990, Jähne y Lörz, 1995, Smykal y Pechan, 2000, Germanà, 2011a, Feher, 2015, Dwivedi *et al.*, 2015).

Tal es el efecto del genotipo que, pese a que hay especies que se usan como modelo experimental, la mayoría de las especies son recalcitrantes ya que todavía no es posible obtener dobles haploides de manera eficaz. Dentro de las especies en las que se va a centrar este trabajo, nos encontramos con el caso de la colza que es una especie empleada como modelo por ser más sensible a la embriogénesis a partir de microsporas aisladas. Y, por otro lado nos encontramos con la berenjena y el pimiento, especies que se emplean como sistema experimental para estudiar la recalcitrancia ya que, pese a ser especies de gran interés agronómico, todavía no existe una metodología eficaz que permita la obtención de dobles haploides.

1.3.1. Colza

La colza cultivada es un anfiploide ($2n=4x=38$) perteneciente a las angiospermas, caracterizado por el alto contenido en aceite de sus semillas, característica que hace que este sea su principal uso (Flakelar *et al.*, 2015). Se engloba dentro de la clase *Dicotyledoneae*, orden *Capparales*, familia *Cruciferae*, tribu *Brassicaceae*, subtribu *Brassicinae*, género *Brassica* y especie *Brassica napus* (Lim, 2013). *B. napus* ha surgido por diversos sucesos independientes de hibridación entre *B. rapa* y *B. oleracea* (Lim, 2013) que están ampliamente distribuidas por Europa. Debido a esto, Europa es considerada el centro de origen de esta especie (Allender y King, 2010), además de ser el principal productor de este cultivo. Tal como se observa en la figura 5, Europa se encuentra seguida por Asia con un 37,2 y un 35,8% de la producción global, respectivamente. También en términos de volúmenes globales de producción, queda patente el hecho de que los principales países productores son tanto China como Canadá; y ya dentro de España la producción sería mínima, ocupando la posición 31 si hablamos en términos de volúmenes globales de producción en el año 2014 (FAO, 2016).

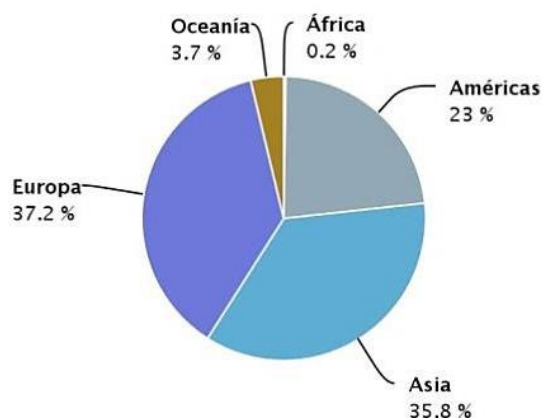


Figura 5. Promedio de producción 2004-2014. Se recoge la producción por continentes para la producción de colza.

El primer protocolo para obtener individuos haploides de colza fue publicado en el año 1975, donde se describía la producción de haploides mediante cultivo de anteras (Thomas y Wenzel, 1975). A este, le siguieron estudios acerca de cómo aumentar la eficiencia de esta metodología (Keller *et al.*, 1983). Pese a verse incrementada de manera rápida (Lichter, 1981, Lichter, 1982), seguía siendo muy baja en comparación con la eficiencia del cultivo de microsporas (Zaki y Dickinson, 1990). De esta forma, el cultivo de microsporas será la metodología más empleada en el caso de la colza aunque no existe un protocolo único y universal. Esto es debido a que existen múltiples factores que influyen en la inducción de la embriogénesis (Shmykova *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 1991) y distintas combinaciones de los mismos pueden resultar exitosas. Dentro de estos factores, podemos destacar el efecto del crecimiento de las plantas donantes a bajas temperaturas, selección de las microsporas en el estadio adecuado, composición del medio de cultivo basada en altos niveles de glucosa o estrés térmico consistente en altas temperaturas. Este estrés térmico no solo es un paso clave para poder inducir la ruta embriogénica en colza, sino que Dunwell (1985) informaron de que también afectaba al potencial de regeneración, tanto en cultivo de anteras como de microsporas. La importancia del estrés térmico por altas temperaturas también ha sido demostrado en otros múltiples trabajos como en los llevados a cabo por Custers *et al.* (1994), Telmer *et al.* (1993) o Binarova *et al.* (1997); aunque Gu *et al.* (2004) y Prem *et al.* (2012) también han demostrado que el estrés por bajas temperaturas también permite la obtención de plantas haploides de manera eficiente.

Desde un punto de vista comercial, el principal uso de esta tecnología está enfocado hacia la obtención de líneas puras o líneas completamente homocigotas que actúen como parentales en el programa de mejora (Pink *et al.*, 2008). Estas líneas parentales dobles haploides se seleccionaran atendiendo a la finalidad del cultivo, siendo el fitomejoramiento y la obtención de aceite los principales fines. La obtención de dobles haploides está ampliamente extendida a la hora de desarrollar cultivares en los que la composición de ácidos grasos haya sido modificada. Por ejemplo, se ha empleado para desarrollar cultivares de alto contenido en ácido oleico y bajo contenido de linoléico (Touraev *et al.*, 2009), y actualmente casi todo el aceite de colza canadiense se ha obtenido de variedades en las que se ha empleado la tecnología de los dobles haploides (Ferrie y Möllers, 2011).

1.3.2. Berenjena

Se trata de una especie diploide con número cromosómico $2n=24$, que pertenece a las angiospermas, y se engloba dentro de la clase *Magnoliopsida*, subclase *Lamiidae*, superorden *Solananae*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, subfamilia *Solanoideae*, tribu *Solaneae*, género *Solanum*, subgénero *Leptostemonum*, sección *Melongena*, serie *Incaniformia*, especie *Solanum melongena* L (S., 2005). En cuanto al origen, Lester y Hasan (1991) consideran que *Solanum incanum* podría ser el parental silvestre de *Solanum melongena* L. Sin embargo, los estudios llevados a cabo por Meyer *et al.* (2012) sugieren que el ancestro silvestre de la berenjena sería *S. insanum*, ya que presentan numerosas similitudes morfológicas y se obtiene descendencia fértil mediante el cruzamiento interespecífico entre ellas (Devi *et al.*, 2015). Continuando con el origen, India es considerada el centro de origen y China sería considerada un centro secundario de diversidad (Devi *et al.*, 2015), además de ser el principal productor a nivel mundial como se observa en la figura 6 y según datos de la FAO (FAOSTAT, 2016).

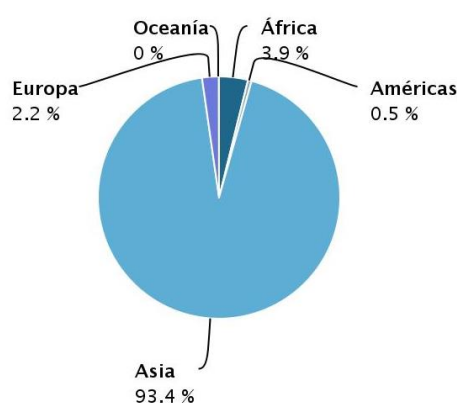


Figura 6. Promedio de producción por continentes de berenjena, entre 2004-2014.

Por otro lado, a nivel europeo cabe destacar el papel de Italia y de España dentro de la producción. Ambos países suman más del 60% de la producción europea (FAO, 2016). En cuanto a la producción en España, está centralizada en Almería ya que supone más del 90% de la producción española, según Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2016).

El cultivo de anteras ha sufrido grandes avances, haciendo que actualmente sea posible inducir el desvío de la microspora hacia un embrión haploide o doble haploide. Este proceso fue descrito por primera vez por Raina y Iyer (1973), investigadores que consiguieron inducir la proliferación de callos a partir de anteras y su posterior regeneración a planta. Según los propios autores, es posible que estos callos tuvieran un origen somático. Aunque hubo otros muchos trabajos realizados en este ámbito, no fue hasta el año 1982 cuando se describió un protocolo general y reproducible para obtener embriones haploides y plantas dobles haploides a partir del cultivo de anteras. Dumas de Vaultx *et al.* (1982) fueron los que establecieron este protocolo basado en la aplicación de estrés térmico y un medio de cultivo constituido de sacarosa, 2, 4-D o kinetina. Pese a que es posible la obtención de embriones dobles haploides, la eficiencia está muy limitada (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Este problema podría ser superado si se consiguiera desarrollar un protocolo eficaz para obtener dobles haploides a partir del cultivo de microsporas aisladas, pero al emplear esta técnica nos encontramos con la aparición de estructuras semejantes a callos en lugar de embriones. El primer intento fue llevado a cabo

por Miyoshi (1996) quien describió que los embriones revertían a un estado indiferenciado dando lugar a callos. Pese a los estudios realizados en esta especie (Bal *et al.*, 2009, Pechan y Keller, 1988, Cao *et al.*, 1995), todavía no se ha logrado obtener ningún protocolo que permita regenerar plantas completas sin pasar previamente por la fase de callo. En nuestro grupo se ha trabajado tanto en el desarrollo de protocolo que produzcan plantas dobles haploides de manera más eficaz a partir del cultivo de microsporas aisladas (Corral-Martínez *et al.*, 2008, Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2010, Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012) como en los estudios de organogénesis a partir de callos (Rivas-Sendra *et al.*, 2015).

La obtención de haploides y dobles haploides en berenjena presenta un gran potencial a la hora de desarrollar material de interés que se vaya a emplear en un programa de mejora porque permite obtener de manera rápida líneas parentales homocigotas con características agronómicas útiles (Salas *et al.*, 2012). El cultivo de anteras es un técnica que ha tenido aplicabilidad a la hora obtener híbridos derivados de líneas dobles haploides, híbridos que han permitido determinar las bases genéticas de caracteres tales como la presencia de espinas o el color del fruto (Rotino, 1996). Además, mediante el empleo de esta técnica también se han desarrollado cultivares con resistencias incorporadas, como puede ser la resistencia a *Fusarium* (Rotino *et al.*, 2005); cultivares de alto rendimiento (Rotino, 1996) o tolerancia a diversos estreses abióticos (Kashyap *et al.*, 2003).

1.3.3. Pimiento

El pimiento cultivado se engloba dentro de clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, superorden *Solananae*, orden *Solanales*, familia *Solanaceae*, subfamilia *Solanoideae*, tribu *Capsiceae* y género *Capsicum* (Heiser y Smith, 1953), siendo las especies cultivadas *Capsicum annum*, *Capsicum chinense*, *Capsicum frutescen*, *Capsicum baccatum* y *Capsicum pubescens* (Ortiz *et al.*, 2010). Todas las especies del género se originaron en los trópicos, pero concretamente México sería el centro de diversidad de la especie más importante cultivada o *Capsicum annum* L (Ortiz *et al.*, 2010, Pickersgill, 1997), que junto con *Capsicum chinense* y *Capsicum frutescens* constituye el “complejo annum”, cuyo posible progenitor sea *C. chacoense* (Crosby, 2008, Ibiza *et al.*, 2012).

En cuanto al proceso de domesticación fue llevado a cabo por culturas precolombinas, ya que restos arqueológicos la sitúan en México en torno al 7.000 a. C. Kraft *et al.* (2014). Posteriormente su llegada a Europa se produciría con los viajes de Colón (Crosby, 2008). Pese a que tanto Europa como América tienen una producción muy similar, juntas no sumarían ni una tercera parte de la cantidad producida en Asia, como se puede ver en la figura 7 (FAO, 2016). Finalmente, dentro de España es Almería el mayor productor ya que representa un 63 % de la producción total según Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA, 2016).

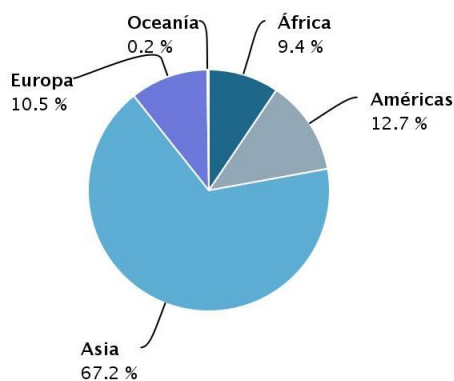


Figura 7. Promedio de producción 2004-2014. Se recoge la producción por continentes para la producción de pimienta.

Los primeros trabajos acerca de la obtención de haploides en pimienta fueron llevados a cabo en el año 1973, y la metodología empleada fue el cultivo de anteras. George y Narayanaswamy (1973) o Wang *et al.* (1973) describieron protocolos para la obtención de dobles haploides en pimienta asiático, y en el año 1974 se describió en variedades de pimienta europeo (Novak, 1974). Inicialmente, el cultivo de anteras permitió obtener callos que podían regenerarse mediante organogénesis pero actualmente se han descrito protocolos que permiten la inducción de la embriogénesis sin pasar por esta fase (Dumas de Vaulx *et al.*, 1981) como muestran los resultados de nuestro grupo para pimienta dulce (Parra-Vega *et al.*, 2013b). Pese a que se ha conseguido esta embriogénesis directa, esta técnica conlleva muchos problemas asociados que hacen que no dé buenos resultados en esta especie (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Debido a lo cual, se plantea el cultivo de microsporas aisladas como una buena alternativa para solucionarlos pero la eficiencia estará fuertemente condicionada por el tipo de cultivar (dulce o picante) puesto que en esta existe una fuerte influencia del genotipo (Seguí-Simarro *et al.*, 2011). En experimentos llevados a cabo en pimienta picante, se ha conseguido inducir la formación de embriones cuya calidad y cantidad se vería fuertemente influenciada por el genotipo (Supena *et al.*, 2006). Kim *et al.* (2008) llevaron a cabo un protocolo de cultivo de microsporas en pimienta picante, basado en la combinación de choque térmico y ayuno como estrés, consiguiendo embriones haploides con formas aberrantes y una eficiencia realmente baja. Posteriormente, el grupo de Cheng *et al.* (2013) ha recalcado la importancia que jugarían las hormonas en la inducción de la embriogénesis. En cuanto al pimienta dulce, Lantos *et al.* (2012) han demostrado la importancia que tienen los reguladores del crecimiento en la inducción de la embriogénesis y la necesidad de mejorar la calidad de los embriones obtenidos, hecho que también ha quedado patente en los estudios llevados a cabo en nuestro grupo (Parra-Vega *et al.*, 2010).

Los métodos de selección tradicional requieren mucho tiempo y gran trabajo debido a la polinización incontrolada de esta especie, problema que podría ser solucionado mediante el desarrollo de líneas dobles haploides que actuaran como parentales. Estas líneas dobles haploides serían la base para generar diversidad genética que permitiera crear nuevas variedades comerciales con mayor adaptabilidad, productividad o resistencias (Pickersgill, 1997, Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Actualmente las líneas haploides y dobles haploides de pimienta son empleadas en programas de mejora con el fin de mapear de genes e identificar de genes de carácter recesivo (Irikova *et al.*, 2016). No obstante sigue siendo una metodología

que aún presenta gran cantidad de limitaciones que sería necesario solventar para poder incorporarla de una forma útil en programas de mejora (Irikova *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

Con base en todos los estudios anteriores, podríamos concluir que el cultivo de anteras ha demostrado ser una técnica viable que ha permitido obtener embriones dobles haploides en las tres especies, pero con limitaciones en el caso de la berenjena y pimiento. Estas limitaciones en la eficacia de la metodología podrían ser superadas mediante la puesta a punto del cultivo de microsporas aisladas, pero esta metodología solamente ha demostrado ser eficaz en el caso de la colza, ya que tanto en el caso de pimiento como en el de berenjena se originan estructuras semejantes a callos. Por lo tanto, queda claro que el genotipo juega un papel muy importante la eficiencia a la hora de obtener embriones dobles haploides a partir del cultivo de microsporas. Otro de los factores clave sería la aplicación de estreses, de tal forma que realizar estudios sobre la aplicación de distintos estreses puede ser un paso importante para intentar solventar el problema al que nos enfrentamos en especies recalcitrantes cuando se emplea el cultivo de microsporas como metodología para obtener dobles haploides. Como se ha comentado en la introducción, uno de estos estreses puede ser generado por la aplicación de alcohol bencílico al medio líquido de cultivo. De hecho, en estudios previos preliminares llevados a cabo en nuestro grupo sobre cultivos de microsporas aisladas de colza, también se observó que el alcohol bencílico podría actuar como posible inductor de la división celular y de la formación de embriones.

Por este motivo, nos planteamos un tratamiento de estrés basado en la adición de alcohol bencílico al medio de cultivo. El objetivo de este trabajo será poder comprobar el papel del alcohol bencílico como posible inductor tanto de la división celular como de la embriogénesis. Este estudio se va a llevar a cabo, y de forma paralela, en las tres especies a las que nos hemos referido con anterioridad: una especie modelo que sería la colza, y las dos especies de solanáceas recalcitrantes, que son berenjena y pimiento.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

En este estudio se utilizaron la línea doble haploide DH4079 derivada de la variedad Topas de colza, la línea doble haploide DH36 de berenjena y plantas de pimiento del cultivar Herminio. La línea doble haploide de colza es una línea de alta respuesta androgénica, al igual que la línea DH36. Esta última línea fue desarrollada por el laboratorio de biología celular del Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana (COMAV) a partir del híbrido comercial Bandera, ya descatalogado en la Casa comercial Seminis Vegetable Seeds Ibérica. Por último, la variedad Herminio pertenece a la casa comercial Syngenta Seeds.

3.2. CONDICIONES DE CULTIVO DE LAS PLANTAS DONANTES

Todas las semillas se pusieron a germinar en semilleros con sustrato que consistía en una mezcla de turbas de diferentes grados de descomposición que lleva incorporados todos los fertilizantes necesarios para el crecimiento de las plantas (Humin Sustrato N3). Estas semillas se mantuvieron en cámaras de cultivo bajo condiciones controladas, hasta que tuvieron al menos 2 hojas verdaderas. Cuando las plántulas de berenjena y pimiento hubieron crecido lo suficiente, se trasplantaron a macetas de 30 cm de diámetro con un sustrato de la marca Hortimix consistente en una mezcla de turbas con otros componentes de origen vegetal, y se mantuvieron en los invernaderos del COMAV, dentro del Campus de Vera de la Universitat Politècnica de València. Durante todo el ciclo se empleó luz natural, de manera que el fotoperiodo era dependiente de la época del año, y se realizó un aporte de agua y nutrientes mediante riego por goteo. En cuanto al cuidado de las plantas, estas fueron entutoradas y sometidas a podas regulares para así facilitar su aireación y la captación de la luz solar, acompañado de la eliminación de frutos ya cuajados y flores que estuvieran completamente abiertas. Cuando las plántulas de colza estaban en un estado de crecimiento óptimo, se pasaron a macetas de 17 cm de diámetro con sustrato Hortimix y se mantuvieron en cámara de cultivo para inducir la floración. Una vez estas plantas ya habían florecido, se pasaron a una cámara de diferentes condiciones para mantener su crecimiento. En estas cámaras se mantuvieron controladas las condiciones de luz, temperatura y humedad, tal como aparece en la tabla 1:

	Colza floración	Colza crecimiento
Temperatura día	10°C	20°C
Temperatura noche	10°C	20°C
Luz	16h	18h
Oscuridad	8h	6h
Humedad	40-60%	50-65%

Tabla 1. Condiciones de las cámaras de cultivo de colza.

3.3. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS

Existía un esquema general para el aislamiento de microsporas que presentaba una serie de matizaciones técnicas según la especie, y que aparecen recogidas en la figura 8.

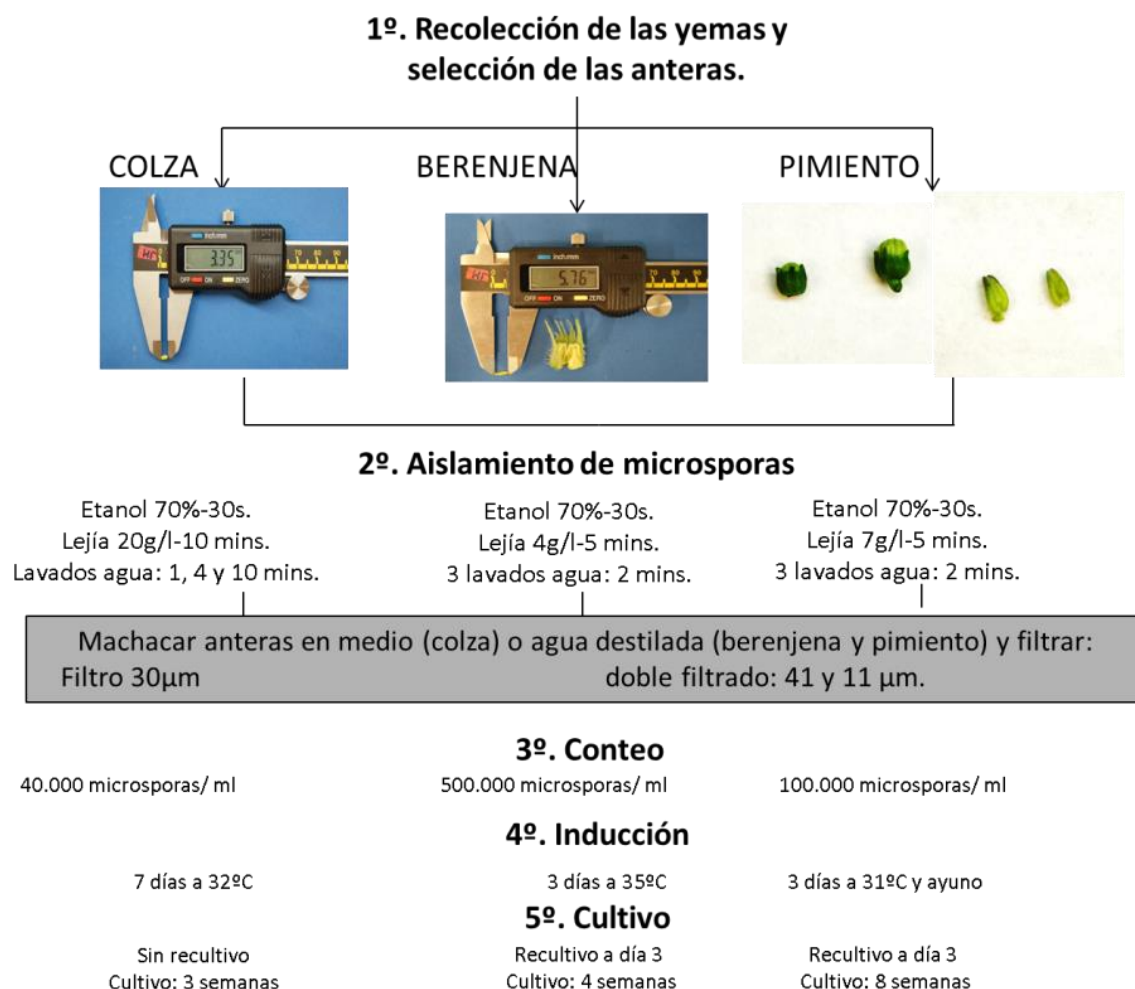


Figura 8. Pasos generales y particularidades en los protocolos de aislamiento y cultivo de microsporas aisladas.

3.3.1. Cultivo de microsporas aisladas en colza

3.3.1.1. Recolección de las yemas y selección de las anteras

Se recolectaron manualmente las yemas florales y se conservaron a 4°C mientras se llevaba a cabo una selección basada en el tamaño de la yema óptimo (Custers, 2003), como se puede observar en la figura 9. El tamaño de yema es un indicativo de aquellas anteras con mayor porcentaje de microsporas vacuoladas o polen bicelular joven, que son los estadios generalmente aceptados como los más adecuados para la inducción de la androgénesis (Touraev *et al.*, 2001, Seguí-Simarro, 2010). El tamaño de yema para el genotipo empleado oscila entre 3 y 3,4 mm, haciéndose una separación en dos intervalos de longitud que irían de 3 a 3,2 mm y de 3,2 a 3,4 mm.



Figura 9. Selección de anteras de colza según el tamaño de las mismas.

3.3.1.2. Aislamiento de las microsporas

Una vez se seleccionaron las anteras, se llevó a cabo su esterilización por lo que se trabajó en cabina de flujo laminar a partir de este momento. El primer paso a realizar fue la inmersión de las anteras en etanol a 70% durante 30 segundos, seguida de una inmersión en una solución de hipoclorito sódico a 20g/l con unas gotas de Tween 20 durante 10 minutos, finalizando con tres lavados en agua destilada estéril de 1, 4 y 10 minutos cada uno. Todas estas soluciones habían sido previamente enfriadas a 4 °C.

Tras la esterilización de las anteras, estas se secaron en papel de filtro estéril y se pasaron a un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de medio. Para proceder a la liberación de las microsporas, las anteras se machacaron con un émbolo de jeringuilla de 50 ml. Una vez estas microsporas se habían liberado, se tenían que aislar del resto de tejidos de la antera por lo que el contenido del vaso se filtró a un tubo de 15 ml de volumen que presentaba un filtro de 30µm de tamaño de poro. Las microsporas pasarían a través del filtro hacia el tubo donde quedarían disueltas en el medio. Este medio de cultivo estaba compuesto por medio NLN (Duchefa Biochemie B.V.), cuya composición aparece en la tabla 2, suplementado con sacarosa a una concentración de 130 g/l y nitrato de calcio tetrahidratado a una concentración de 0,5 g/l. Tras la preparación del medio de cultivo, se ajustó el pH a 5,7 y se realizó un filtrado mediante filtros de 0,22µM (ACEFESA).

Macronutrientes	mg/l	mM
KH_2PO_4	125,00	0,92
KNO_3	125,00	1,24
MgSO_4	61,00	0,51
Micronutrientes	mg/l	µM
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,025	0,11
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,10
FeNaEDTA	36,70	100,00

H₃BO₃	10,00	161,73
MnSO₄·H₂O	18,95	111,94
Na₂MoO₄·2H₂O	0,25	1,03
ZnSO₄·7H₂O	10,00	34,78
Vitaminas	mg/l	μM
D(+)-Biotina	0,05	0,21
Ácido Fólico	0,50	1,13
L-Glutamina	800,00	5.473,83
Glutati3n reducido	30,00	97,61
Glicina	2,00	26,64
Myo-Inositol	100,00	554,94
Ácido Nicotínico	5,00	40,62
Pyridoxina HCl	0,50	2,43
L-Serina	100,00	951,57
Tiamina HCl	0,50	1,48

Tabla 2. Composici3n del medio NLN (Nitsch y Nitsch, 1969).

Una vez teníamos la suspensi3n de microsporas, se llevaron a cabo una serie de lavados mediante centrifugaci3n en centrífuga Centrifuger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio. Esta centrifugaci3n tenía una duraci3n de 4 minutos a 870 r.p.m para así poder eliminar los restos de tejido que pudieran aún estar presentes. Las células depositadas tras la centrifugaci3n se resuspendieron en 10 ml de medio, y se repiti3 el procedimiento de lavado otras dos veces más. En la tercera y última centrifugaci3n, el pellet se resuspendió en 5 ml de medio.

3.3.1.3. Conteo

Para ajustar la densidad de microsporas en el cultivo, se realizó un conteo de las células mediante un hemacitómetro de tipo Improved Neubauer, y posteriormente se diluyeron en medio las microsporas hasta alcanzar la concentraci3n óptima de 40.000 microsporas/ml. Se plaquearon en placas Petri con un volumen de 1 ml cada una y estas placas se sellaron con Parafilm, reservándose una placa para determinar el porcentaje de microsporas vacuoladas o que estaban en el estadio adecuado para la inducci3n así como su viabilidad. Para determinar la viabilidad se ańadieron 5 μl de diacetato de fluoresceína por cada ml de cultivo, se dejó incubar durante 10 minutos en oscuridad y se contó el porcentaje de células vivas al microscopio de fluorescencia.

3.3.1.4. Inducción

Para inducir la androgénesis de las microsporas de colza, se incubaron las placas en oscuridad durante 7 días a 32°C, y se realizaron dos experimentos en paralelo: la aplicación de un estrés térmico en presencia y en ausencia de alcohol bencílico.

3.3.1.5. Cultivo

Tras los 7 días en oscuridad, se sacaron las placas de la estufa y se mantuvieron también en oscuridad pero a temperatura de 25°C y durante un periodo de 3 semanas. Durante este tiempo se revisaban las placas para comprobar la presencia o ausencia de contaminaciones o el surgimiento de embriones.

3.3.2. Cultivo de microsporas aisladas en berenjena

3.3.2.1. Recolección de las yemas florales y selección de las anteras

Se recolectaron manualmente las yemas florales y se conservaron a 4°C, mientras se realizó una selección de las anteras que contenían un mayor porcentaje de microsporas vacuoladas o polen bicelular joven como ya se ha explicado. Esta selección se hizo basándose en el tamaño de la antera óptimo (Salas *et al.*, 2012) que para el genotipo empleado oscila entre 5,2 y 5,9 mm, como se puede observar en la figura 10.



Figura 10. Selección de anteras de berenjena según el tamaño de las mismas.

3.3.2.2. Aislamiento de las microsporas

Una vez se seleccionaron las anteras, se procedió a la extracción de las microsporas, y para preservar las condiciones de asepsia se trabajó en cabina de flujo laminar a partir de este momento. Primeramente se realizó una esterilización de las anteras mediante su inmersión en una serie de soluciones enfriadas previamente a 4 °C. La primera inmersión se realizó en alcohol a 70% durante 30 segundos, seguida de una inmersión de 5 minutos en una solución de hipoclorito sódico 4g/l con unas gotas de Tween 20 y tres lavados sucesivos en agua destilada estéril, de 2 minutos cada uno.

Una vez realizada la esterilización de las anteras, estas se secaron en papel de filtro estéril y se pasaron a un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de agua estéril. Para conseguir

la liberación de las microsporas era necesario machacar las anteras con un émbolo de jeringuilla de 50 ml y, posteriormente aislarlas del resto de tejidos de la antera. En este último paso se necesitaba un doble filtrado de la solución en la que se encontraban las microsporas disueltas: primeramente a través de un filtro de 41 μ m de poro, donde quedaría retenido la mayor parte de tejido de la antera; y posteriormente a través de un filtro de 11 μ m, que es donde quedarían retenidas las microsporas. Una vez se encontraban las microsporas retenidas en el filtro de 11 μ m, este se lavaba en agua destilada estéril para que las microsporas quedasen disueltas. Una vez teníamos las microsporas suspendidas en el vaso de precipitados, se distribuyeron en tubos de plástico estériles de 15ml para llevar a cabo una serie de lavados mediante centrifugación en centrífuga Centrifuger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio. Esta centrifugación tenía una duración de 4 minutos a 870 r.p.m para así poder eliminar los restos de tejido que pudieran aún estar presentes. Las células depositadas tras la centrifugación se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril y se repitió el procedimiento de lavado otras dos veces más. En la tercera y última centrifugación, el pellet se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril.

3.3.2.3. Conteo

Para medir la concentración de células se utilizó un hemacitómetro de tipo Improved Neubauer. Tras el conteo, las microsporas aisladas se diluyeron en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración óptima de 500.000 microsporas/ml. Una vez ya se tenían las suspensiones celulares a la concentración óptima, se plaquearon en placas Petri con un volumen de 1 ml cada una y estas placas se sellaron con Parafilm. Tras el plaqueo, el porcentaje de microsporas vacuoladas o que estaban en el estadio adecuado para la inducción (marcadas en azul en la figura 11-A) se contó observando la placa en un microscopio invertido. Además, se contó la viabilidad de las microsporas tanto antes como después de la inducción: para ello, se añadieron 5 μ l de diacetato de fluoresceína a 1 ml de cultivo y esto se dejó incubar durante 10 minutos en oscuridad. Tras la incubación se contó el porcentaje de células vivas al microscopio de fluorescencia, marcadas en rojo en la figura 11-B.

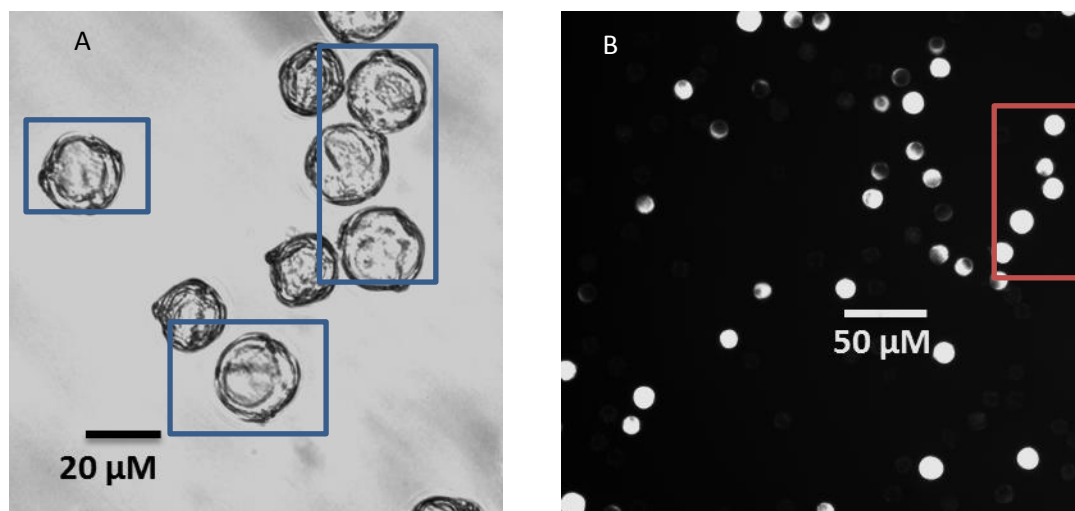


Figura 11. Microsporas vacuoladas en azul (A) y microsporas vivas en rojo (B).

3.3.2.4. Inducción

Para inducir la androgénesis en berenjena, se incubaron las placas en oscuridad y se aplicó un estrés térmico que consistía en el sometimiento de las microsporas a 31°C durante 3 días. Además del estrés térmico, hay que diferenciar que se llevaron a cabo dos experimentos en paralelos según si se combinaba el estrés térmico con la presencia de alcohol bencílico o bien simplemente se aplicaba estrés térmico sin presencia de alcohol bencílico durante el periodo de inducción.

3.3.2.5. Cultivo

Tras el periodo de inducción se llevó a cabo un procedimiento de recultivo para transferir las microsporas a medio de cultivo. Para ello, se recogió la suspensión celular de cada placa en tubos de plástico estériles de 15 ml y se centrifugó durante 4 minutos a 870 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el mismo volumen de medio, que tenía la composición de la tabla 3, cuyo pH era de 5,7 y que había sido filtrado mediante filtros de 0,22 µM (ACEFESA). La suspensión se devolvió a las placas, que se sellaron de nuevo con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 4 semanas. Las placas fueron revisadas con relativa frecuencia bajo una lupa binocular que permitía detectar posibles contaminaciones, observar el desarrollo y advertir de la presencia de embriones y callos.

Medio Cultivo Berenjena	Concentración
Medio NLN	
Sacarosa	20 g/l
Ácido naftalenacético	0,5 mg/l
Benziladenina	0,5 mg/l

Tabla 3. Composición del medio de cultivo de berenjena (Miyoshi, 1996).

3.3.3. Cultivo de microsporas aisladas en pimiento

3.3.3.1. Recolección de las yemas y selección de las anteras

Se recolectaron manualmente las yemas florales y se conservaron a 4°C. Como se observa en la figura 12, para pimiento se realizó una selección basada en dos marcadores de tipo morfológico: relación de la longitud del cáliz con respecto a la longitud total de la yema y pigmentación de las anteras en su parte cóncava, tal como se recoge en (Parra-Vega *et al.*, 2013a). La relación debía ser del 80%, y la coloración púrpura debía presentarse solamente en el extremo apical de la antera, sin que esta se hubiera extendido a la totalidad de la misma. Por lo tanto, las anteras completamente blancas o púrpuras serían descartadas.



Figura 12. Selección de anteras de pimiento según la relación de la longitud del cáliz con respecto a la longitud total de la yema (círculo morado) y pigmentación púrpura (flecha).

3.3.3.2. Aislamiento de las microsporas

Tras la selección de las anteras se procedió a la extracción de las microsporas en condiciones de esterilidad, por lo que se trabajó en cabina de flujo laminar a partir de este momento. Primeramente se realizó una esterilización de las anteras mediante su inmersión en una serie de soluciones enfriadas previamente a 4°C. La primera inmersión se realizó en alcohol a 70% durante 30 segundos, seguida de una inmersión de 5 minutos en una solución de hipoclorito sódico 7 g/l con unas gotas de Tween 20 y tres lavados sucesivos en agua destilada estéril, de 2 minutos cada uno.

Tras la esterilización de las anteras, estas se secaron en papel de filtro estéril y se pasaron a un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de agua estéril. Las anteras se machacaron con un émbolo de jeringuilla de 50 ml para liberar las microsporas, que una vez liberadas se tenían que aislar del resto de tejidos de la antera. Para ello se realizó un doble filtrado del contenido del vaso a un matraz de vidrio estéril de 100 ml: las microsporas pasaron a través de un filtro de 41 μm de poro que retendría la mayor parte de tejido de la antera y, posteriormente la solución donde estaban suspendidas las microsporas se volvió a filtrar a través de un filtro de 11 μm , que es donde quedarían retenidas las microsporas. Por lo tanto, en este último caso es necesario lavar el filtro en agua destilada estéril para que las microsporas queden disueltas. Una vez teníamos la suspensión de microsporas, se distribuyó en tubos de plástico estériles de 15ml para poder llevar a cabo una serie de lavados mediante centrifugación en centrífuga Centrifriger-BL II (J.P. Selecta) con rotor basculante de 9,5 cm de radio. Esta centrifugación tenía una duración de 4 minutos a 870 r.p.m, para así poder eliminar los restos de tejido que pudieran aún estar presentes y separarlos de las microsporas que quedarían depositadas en el fondo del tubo. Tras la centrifugación, se resuspendieron en 10 ml de agua destilada estéril y se repitió el procedimiento de lavado otras dos veces más. En la tercera y última centrifugación, el pellet se resuspendió en 5 ml de agua destilada estéril.

3.3.3.3. Conteo

Para medir la densidad celular, se utilizó un hemacitómetro de tipo Improved Neubauer. Tras realizar el conteo, las microsporas aisladas se diluyeron en medio de ayuno estéril a pH de 5,7 cuya composición aparece en la tabla 4, hasta alcanzar la concentración óptima de 100.000 microsporas/ml.

Medio de ayuno	Concentración
Manitol	67,4 g/l
CaCl₂·2H₂O	1,47 g/l
MgSO₄·7H₂O	0,246 g/l
KNO₃	0,101 g/l
cefotaxima	0,3 g/l
KH₂PO₄	0,0272 g/l
KI	16,6·10 ⁻⁵ g/l
CuSO₄·5H₂O	2,5·10 ⁻⁵ g/l

Tabla 4. Composición del medio de ayuno de pimiento (Kim *et al.*, 2008).

Una vez ya se tenían las suspensiones celulares a la concentración óptima, se plaquearon en placas Petri de 3 cm de diámetro con un volumen de 1 ml en cada una y estas placas se sellaron con Parafilm. Tras el plaqueo, el porcentaje de microsporas vacuoladas o que estaban en el estadio adecuado para la inducción se contó observando la placa en un microscopio invertido, y se midió la viabilidad de las microsporas tanto antes como después de la inducción. Para ello, se añadieron 5 µl de diacetato de fluoresceína a 1 ml de cultivo, y se incubó durante 10 minutos en oscuridad, y después se observó al microscopio de fluorescencia.

3.3.3.4. Inducción

Para inducir la androgénesis en pimiento, se cultivaron las placas en oscuridad y se aplicó un estrés basado en la combinación de ayuno con estrés térmico, que consistía en el sometimiento de las microsporas a temperaturas de 31°C durante 3 días.

3.3.3.5. Cultivo

Tras el periodo de inducción se llevó a cabo un procedimiento de recultivo para transferir las microsporas a medio de cultivo. Para ello, se recogió la suspensión celular de cada placa en tubos de plástico estériles de 15 ml y se centrifugó durante 4 minutos a 870 r.p.m. Estas células se resuspendieron en el mismo volumen de medio de cultivo, cuya composición aparece en la tabla 5, de pH igual a 5,7 y que había sido filtrado mediante filtros de 0,22 µM (ACEFESA). Estas placas se sellaron de nuevo con parafilm y se incubaron en oscuridad a 25 °C durante 8 semanas. Las placas fueron revisadas con relativa frecuencia bajo una lupa binocular que permitía detectar posibles contaminaciones, observar el desarrollo y advertir de la presencia de embriones o callos.

Medio Cultivo Pimiento	Concentración
Medio NLN	
Sacarosa	100 g/l
Cefotaxima	0,3 g/l
KI	0,83 g/l

Tabla 5. Composición de los medios de cultivo de pimiento (Parra-Vega *et al.*, 2010).

3.4. ENSAYOS CON ALCOHOL BENCÍLICO

Para cada una de las especies se preparó su correspondiente medio de cultivo y se realizaron tres tipos de experimentos cuya diferencia fundamental era la presencia o ausencia de alcohol bencílico durante y/o tras la inducción. En un tipo de experimentos, una vez se distribuían las microsporas en las placas para llevar a cabo el tratamiento de inducción, se añadían los microlitros correspondientes de una solución stock de alcohol bencílico 0,1 M hasta alcanzar la concentración utilizada en el experimento. Es decir, el estrés aplicado para inducir la androgénesis consistía en una combinación de altas temperaturas con la presencia de alcohol bencílico en el medio. Dentro de este caso, hay que diferenciar entre aquellos experimentos donde el alcohol bencílico se retiraba tras la inducción (solamente realizado en colza) y aquellos experimentos donde el alcohol bencílico estaba presente durante todo el cultivo. En el último tipo de experimentos, el estrés aplicado para inducir la androgénesis solamente consistía en la aplicación de altas temperaturas. Por consiguiente, los microlitros correspondientes de una solución stock de alcohol bencílico 0,1 M se añadían al medio de cultivo tras el proceso de inducción, hasta alcanzar la concentración utilizada en el experimento. A parte de las placas suplementadas con alcohol bencílico, se ponían replicas con medio control que se emplearon como referencia con la que comparar los resultados de las placas suplementadas. Uno de los criterios a la hora de hacer los cultivos era que hubiese un mínimo de tres réplicas de cada tratamiento y un mínimo de tres repeticiones de cada experimento, experimentos que aparecen recogidos en la tabla 6.

	Concentración de alcohol bencílico en inducción (μM)	Concentración de alcohol bencílico tras inducción (μM)
COLZA		
Control	0	0
Tratamiento 1	100	100
Tratamiento 2	500	500
Tratamiento 3	0	100
Tratamiento 4	100	0
Tratamiento 5	500	0
BERENJENA		
Control	0	0
Tratamiento 1	0	10
Tratamiento 2	0	100

Tratamiento 3	0	1000
Tratamiento 4	10	10
Tratamiento 5	100	100
Tratamiento 6	1000	1000
PIMIENTO		
Control	0	0
Tratamiento 1	0	10
Tratamiento 2	0	100
Tratamiento 3	0	1000

Tabla 6. Experimentos aplicados según especie: para cada uno de los casos se indica tanto si hay presencia o ausencia de alcohol bencílico durante la inducción o tras la misma, así como la concentración de alcohol bencílico empleada.

3.5.SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN

Tras el cultivo se realizó un seguimiento de las estructuras que iban apareciendo en las placas que consistió en contar el número de divisiones para las distintas concentraciones de alcohol bencílico. Para ello se realizó una tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) de las microsporas tomándose únicamente una muestra para cada concentración o lo que es lo mismo, solamente se teñía muestra de una de las 3 réplicas de cada tratamiento. El día óptimo para medir las divisiones también variaba en cuanto a la especie siendo el día 5 para la colza, el día 8 para la berenjena y el día 14 para el pimiento. Al día correspondiente, se tomaba muestra en la cabina de flujo laminar para cada una de las condiciones y la cantidad de muestra también era variable puesto que dependía de la especie. De esta manera, se tomaban 100 μ l de muestra para berenjena y colza y 200 μ l de muestra si se teñían microsporas de pimiento. Esta muestra se depositaba en el interior de un eppendorf de 1,5 ml y se centrifugaba a 8000 r.p.m durante un tiempo de 2,5 minutos. Tras retirar el sobrenadante se añadían 8 μ l de DAPI al pellet, que presentaba una concentración de 2,5 μ g/ml cuando se empleaba para teñir microsporas de colza y pimiento, y una concentración de 7,5 μ g/ml cuando se empleaba para teñir microsporas de berenjena. Tras homogeneizar con el pellet, las muestras se depositaban en un portaobjetos y se cubrían con un cubreobjetos. Una vez se tenían las muestras teñidas se dejaban reposar en oscuridad y se contaban las divisiones en el microscopio de fluorescencia, contando como mínimo 300 células en 3 campos a 20 o 40 aumentos según la especie. Se realizó una clasificación basada tanto en el número de núcleos como en la organización de las estructuras, entendiéndose por organizada aquella estructura compacta que conserva intacta la pared de exina aun cuando presente gran número de núcleos (imagen A de la figura 13) ya que llegaría un momento en el que el embrión empieza a desorganizarse debido a la propia proliferación celular, y como desorganizada aquella estructura cuya pared de exina estaba rota de forma prematura. En este último caso se pueden diferenciar las estructuras desorganizadas en aquellas que pueden ser estructuras compactas pero cuyo contenido empieza a liberarse a través de la pared de exina que está poco fragmentada (flecha roja de la imagen B de la figura 13) o bien estructuras cuya pared de exina está completamente rota y se ha empezado a liberar una célula alargada hacia el medio (círculo rojo de la imagen C de la figura 13).

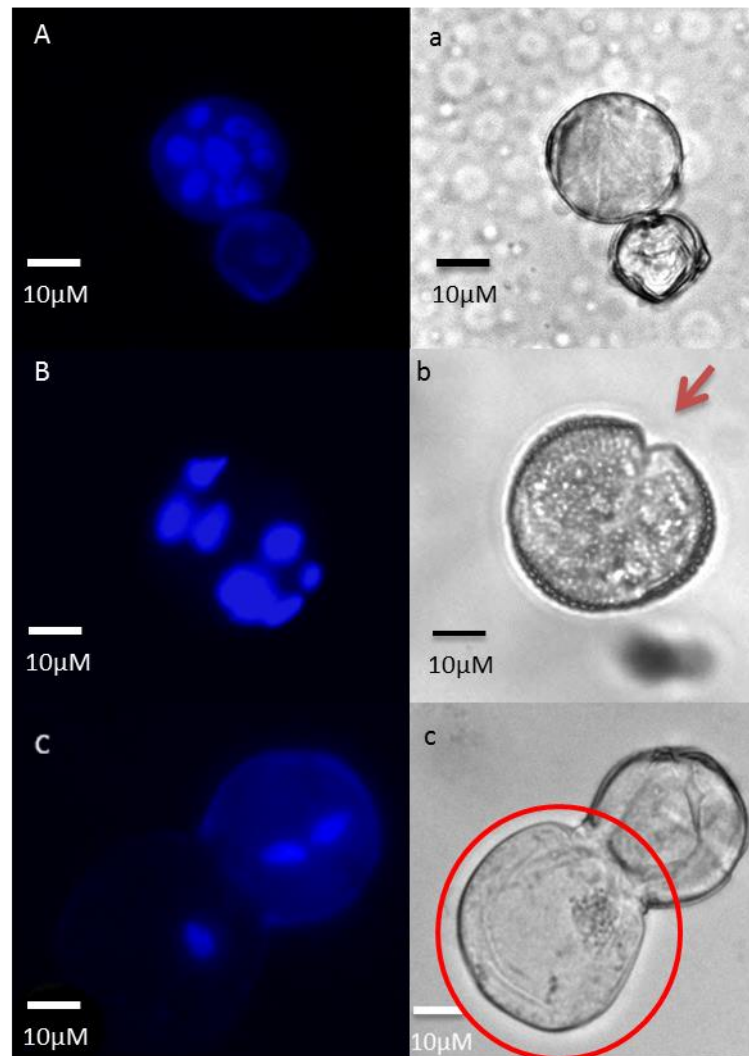


Figura 13. Diferencias entre una estructura organizada y desorganizada. A estructura organizada, compacta y con la pared de exina intacta. B estructura desorganizada, con la pared de exina fragmentada prematuramente porque aún tiene pocos núcleos y compacta. C estructura desorganizada con la pared de exina fragmentada una célula emerge del interior. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases.

En cuanto al número de núcleos, la presencia de estructuras con menos de 4 núcleos se establece como un criterio indicativo de que no se ha inducido la proliferación celular. Se toma este criterio porque generalmente solo se habrá producido una división celular en el control, siendo este tipo de estructuras las más abundantes. Por lo tanto, se hizo una clasificación en estructuras con menos de 4 núcleos y con más de 4 núcleos. A su vez estas últimas se diferenciaron en aquellas estructuras con un número de núcleos comprendido entre 4 y 8, y con más de 8 núcleos para representar aquellos casos en los que se observó una gran proliferación celular y la presencia de proembriones. Las distintas categorías se recogen en la figura 14.

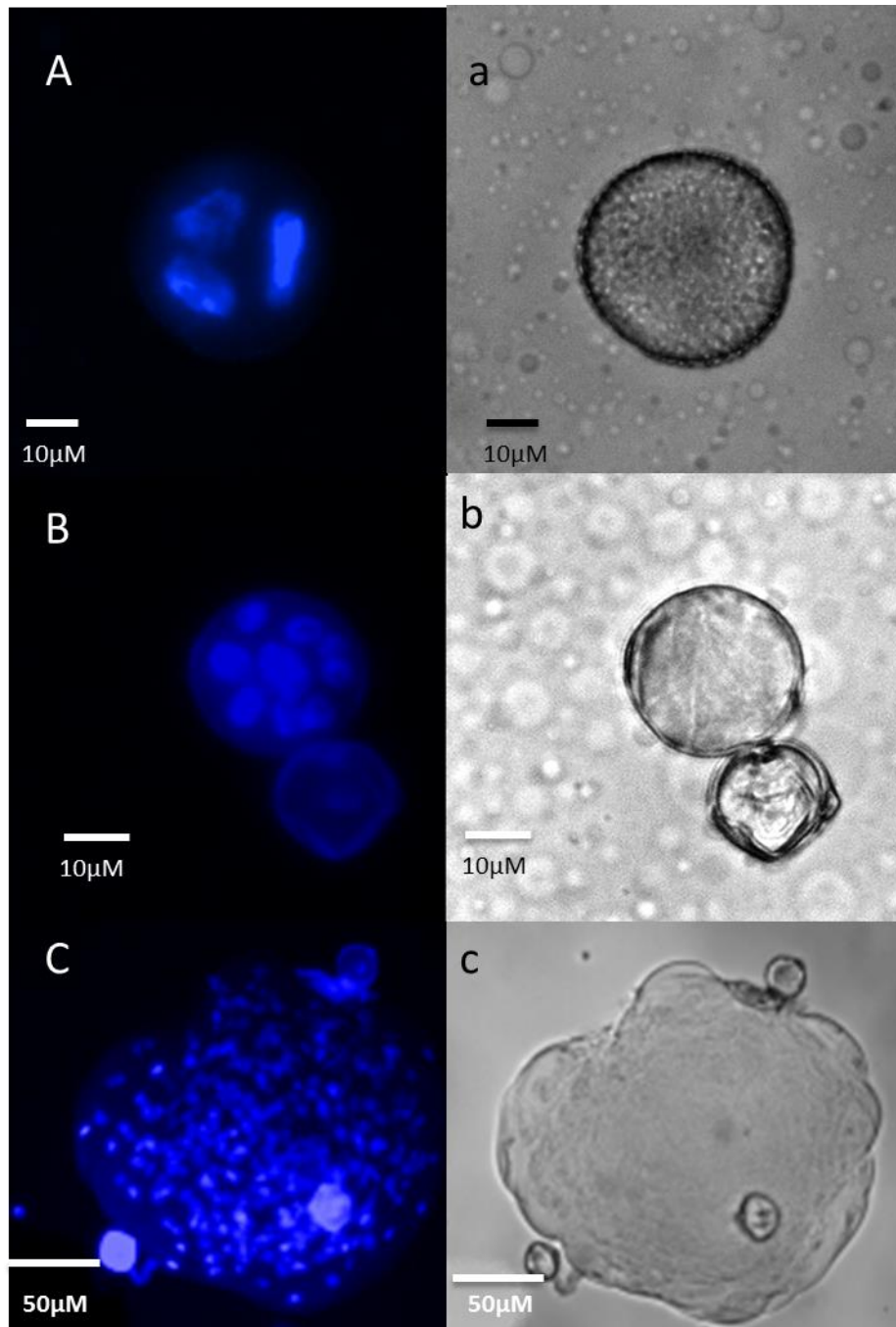


Figura 14. Clasificación basada en el número de núcleos. A menor a 4 núcleos. B de 4 a 8 núcleos. C mayores a 8 núcleos. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases.

Finalmente se llevó a cabo una última caracterización de las estructuras obtenidas al final del cultivo:

-Se contaron los embriones obtenidos para la colza pasadas 3 semanas, diferenciando aquellos embriones que presentaban una arquitectura normal de los que presentaban una arquitectura aberrante y haciendo una clasificación de los distintos estadios de desarrollo.

-Se contaron los callos obtenidos para el caso de la berenjena tras pasar 4 semanas, y se anotaban aquellos callos que presentaban tamaño superior a 1mm de diámetro.

-Se observó si aparecía algún tipo de estructura en el caso del pimiento.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron procesados y analizados con el programa *StatGraphics Centurión* para poder determinar si la presencia de distintas concentraciones de alcohol bencílico en el medio tenía un efecto estadísticamente significativo respecto al control en cuanto a la inducción de la división celular y de la embriogénesis, y para poder determinar si esas diferencias observadas eran o no debidas a la composición del medio. El análisis estadístico que se empleó fue un ANOVA tipo General Linear Model o GLM, análisis estadístico en el cual la varianza queda particionada en ciertos componentes debidos a diferentes variables explicativas. Para poder emplear un GLM se comprobó tanto la normalidad como la homocedasticidad de los datos, es decir que los grupos no podían tener mucha dispersión en sus propios datos. En los casos en los que se obtenían valores residuales cuando se analizaba la normalidad de todos los datos en conjunto, se comprobó que estos presentaban normalidad dentro de su grupo. Puesto que se cumplía el criterio, no fue necesario realizar una transformación de los datos. Se considera que existen diferencias significativas cuando el *p-value* es menor a 0,05 y que dos tratamientos son diferentes significativamente si se encuentran en distinto grupo de homogeneidad. Los grupos de homogeneidad se realizan mediante intervalos LSD con un nivel de confianza del 95% .

En todos aquellos tratamientos en los que se observase tanto la presencia de estructuras desorganizadas como proliferación celular, se comprobó si podía existir asociación entre ambas variables mediante el coeficiente V de Cramer. Este es un coeficiente que indica si la desorganización se puede deber a la presencia de mayor número de núcleos en las estructuras, y se considera que hay asociación entre variables si el valor del coeficiente es muy alto (mayor a 0,8). En caso contrario, no habría relación entre variables y por lo tanto, la desorganización sería consecuencia de la presencia de alcohol bencílico.

Por último, los datos relacionados con los estadios de los embriones fueron analizados mediante un test Chi-cuadrado aplicado en el número total de embriones o embriones de las tres sesiones en conjunto. Este análisis permite determinar si existe o no una relación de dependencia entre el tratamiento y el estadio con un nivel de significación de 0,05. Con este análisis se pretende comprobar si el alcohol bencílico afecta a nivel de la velocidad de desarrollo de los embriones.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de microsporas está basado en el aislamiento de las microsporas en su estadio óptimo, y el sometimiento de las mismas a un tratamiento de estrés para que tenga lugar la reprogramación hacia una ruta de desarrollo esporofítico. Existen muchos tipos de estreses, pero en este caso se quiere comprobar el papel que desempeña el alcohol bencílico como inductor de la embriogénesis. Para ello, se propuso realizar un experimento que permitiera evaluar distintas concentraciones de alcohol bencílico, añadidas en distintas etapas del cultivo y en distintas especies.

4.1. EFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE COLZA

4.1.1. Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones

A los 5 días de cultivo, se realizó una tinción con DAPI para comprobar tanto el porcentaje de divisiones como los tipos de estructuras que aparecían a las distintas concentraciones de alcohol bencílico respecto al control. En cuanto al primer parámetro se observó que, pese a que la adición de alcohol bencílico parece causar un mayor porcentaje de divisiones que en el control, no existían diferencias significativas entre tratamientos (*p-value* 0,2149) como se observa en la figura 15.

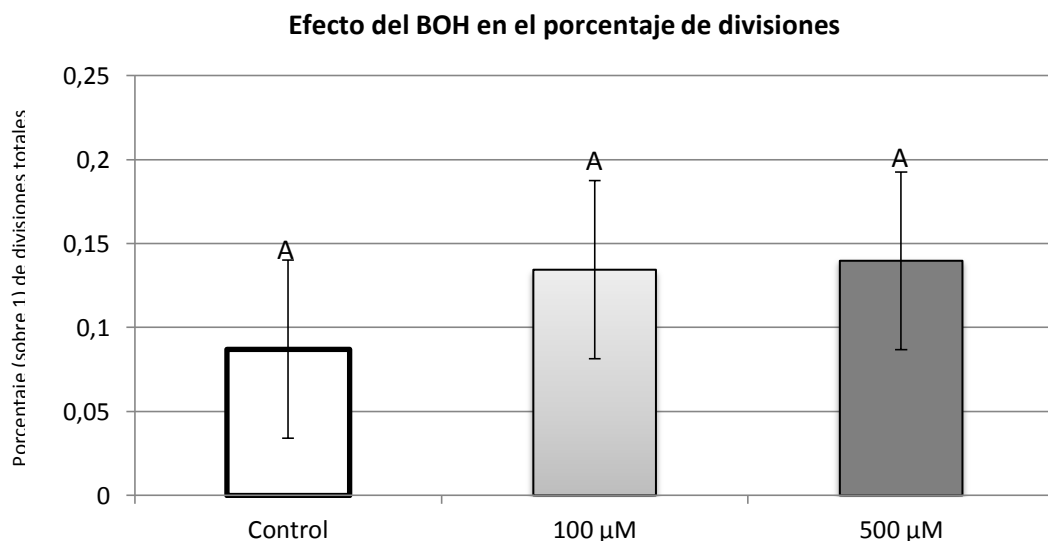


Figura 15. Diferencias en el porcentaje de divisiones para las distintas concentraciones de BOH, en colza. Las letras indican los grupos de homogeneidad.

4.1.2. Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras

Por otro lado, a los 5 días también se analizó el efecto que tuvo el alcohol bencílico tanto en la desorganización como en la proliferación celular. La concentración más alta de alcohol bencílico (500 µM) causó un porcentaje significativamente más alto de estructuras con la pared de exina fragmentada (*p-value* 0,0331) como se puede ver en la figura 16.

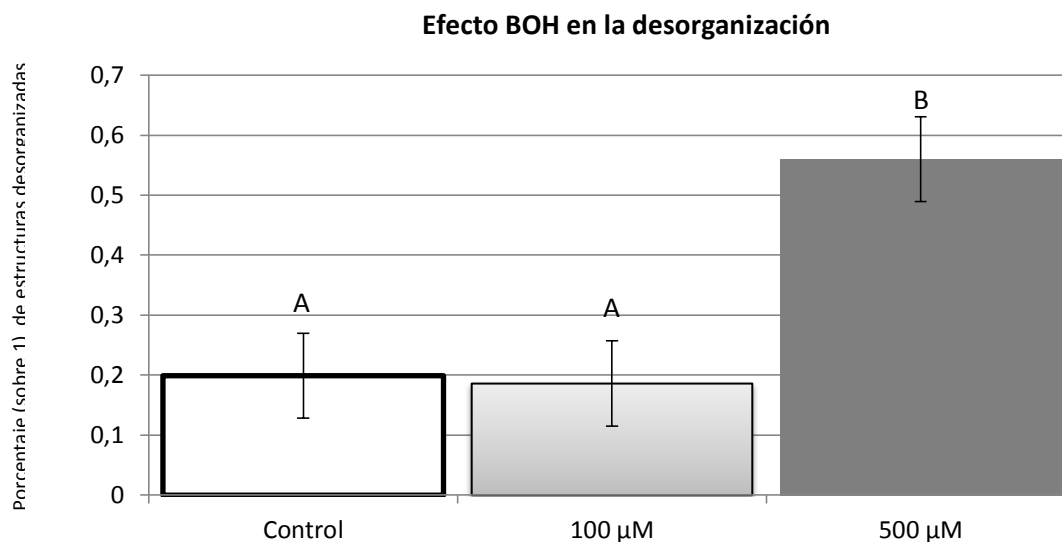


Figura 16. Porcentaje de la desorganización y su error para cada una de las concentraciones empleadas en colza. El control y 100 µM se encuentran en el mismo grupo de homogeneidad (A) y la concentración de 500 µM en otro (B).

En la figura 17b podemos ver que el alcohol bencílico a una concentración de 100 µM presenta las paredes de exina intactas como el control (figura 17a). En la figura 17c se observa el efecto contrario: el alcohol bencílico a una concentración de 500 µM genera la fragmentación de la pared de exina por varios puntos (flechas rojas). Este resultado tendría especial interés ya que si se encontrase la concentración óptima de alcohol bencílico que indujese la división celular manteniendo la organización de dichas estructuras, se podría facilitar la aparición de estructuras compactas precursoras de embriones en mayor medida que el control.

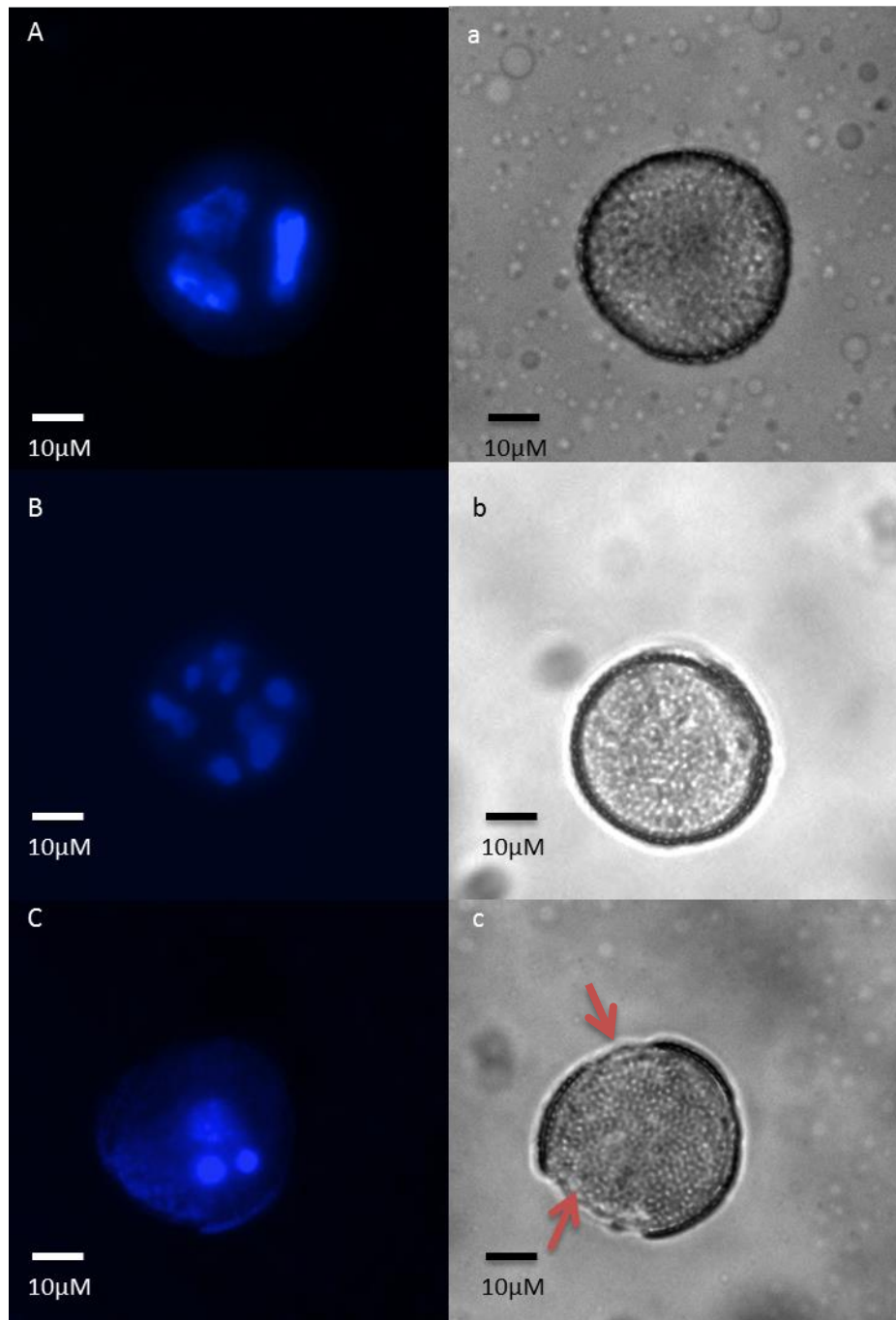


Figura 17. Diferencias en las estructuras observadas entre el control (A), 100 μM de alcohol bencílico (B) y 500 μM de alcohol bencílico (C). Las flechas rojas indican los puntos de ruptura de la pared de exina. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases.

Por otro lado, no existen diferencias significativas para las distintas categorías establecidas en función del número de núcleos que presentan las estructuras. Tal como se observa en la figura 18, tanto para las estructuras de menos de 4 núcleos ($p\text{-value}$ 0,2406), de 4 a 8 núcleos ($p\text{-value}$ 0,1503) como de más de 8 núcleos ($p\text{-value}$ 0,7899), todos los tratamientos se encuentran en los mismos grupos de homogeneidad.

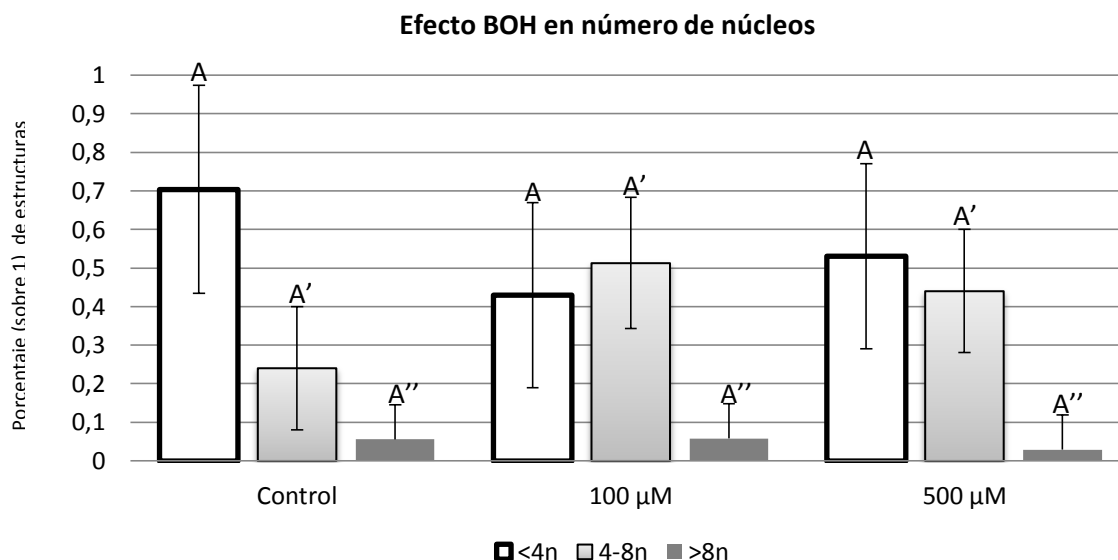


Figura 18. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en colza. A grupo de homogeneidad para estructuras que presentan menos de 4 núcleos, A' grupo de homogeneidad para estructuras que presentan de 4 a 8 núcleos y A'' grupo de homogeneidad para estructuras con más de 8 núcleos.

Todos estos resultados analizados globalmente indicarían que la mejor concentración de las dos ensayadas para la colza sería 100 μM ya que mantiene la organización y compactación de las estructuras que darán lugar a embriones, sin embargo no existen diferencias significativas con el control en cuanto al porcentaje de divisiones o proliferación. Por lo tanto no se puede decir que haya una concentración de las ensayadas que dé resultados mejores que el control en cuanto a estos parámetros.

4.1.3. Efecto del alcohol bencílico en la embriogénesis

A las 3 semanas se observó el número de embriones para cada uno de los tratamientos concluyéndose que, pese a que el análisis estadístico determinó que existen diferencias significativas en este parámetro (*p-value* 0,028), ninguno de los tratamientos dio un mayor rendimiento en el número de embriones obtenidos con respecto al control. En la figura 19 se puede observar que concentraciones de alcohol bencílico de 500 μM , añadido tanto durante la inducción como después de esta, afecta negativamente al número de embriones obtenidos. Por otro lado, no existen diferencias significativas para el número de embriones entre el control y los distintos tratamientos con alcohol bencílico a una concentración óptima de 100 μM . Estos datos también muestran que retirar el alcohol bencílico tras la inducción da los mismos resultados que si se mantiene en el cultivo desde el momento del aislamiento de las microsporas. Asimismo, añadir alcohol bencílico tras la inducción no modifica el rendimiento del cultivo en condiciones control. La conclusión que se puede obtener de estos datos es que el alcohol bencílico únicamente ejerce su efecto durante el periodo de inducción.

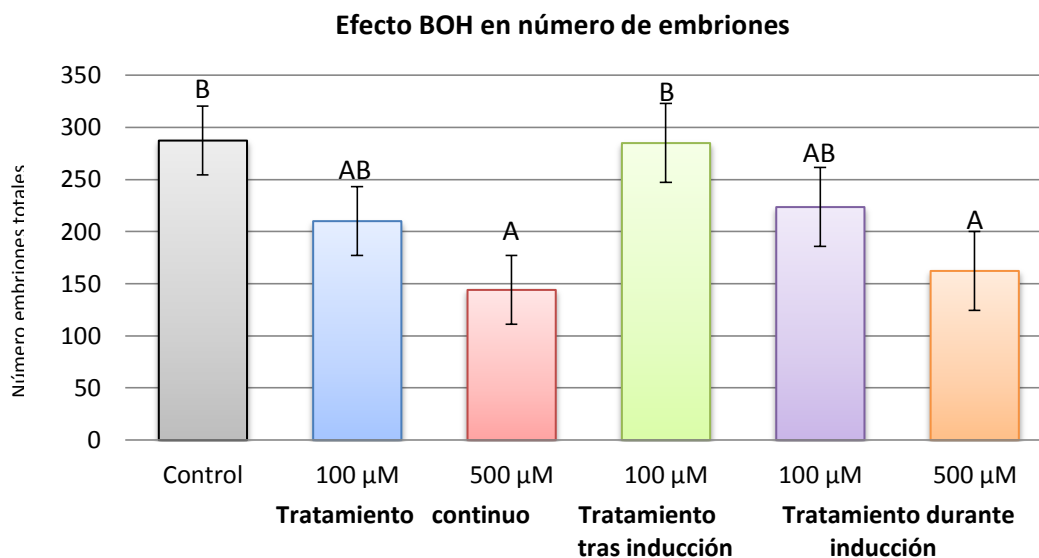


Figura 19. Efecto del BOH en el número de embriones para cada uno de los tratamientos, en colza. Los tratamientos de 500 µM son significativamente menores (grupo de homogeneidad A) al control y a 100 µM aplicado tras la inducción (grupo de homogeneidad B).

Tal como se puede observar en la figura 20, el número de embriones presentes a concentraciones de 500 µM (imágenes C y F) era menor que el resto de tratamientos a 100 µM (imágenes B, D y E) o que el control (imagen A). Además, también se puede ver que el tratamiento de 100 µM aplicado sólo en inducción por choque térmico (imagen E) presenta embriones en estadios de desarrollo más avanzados, ya que son mucho más grandes que los embriones presentes tanto en los otros tratamientos como en el control.

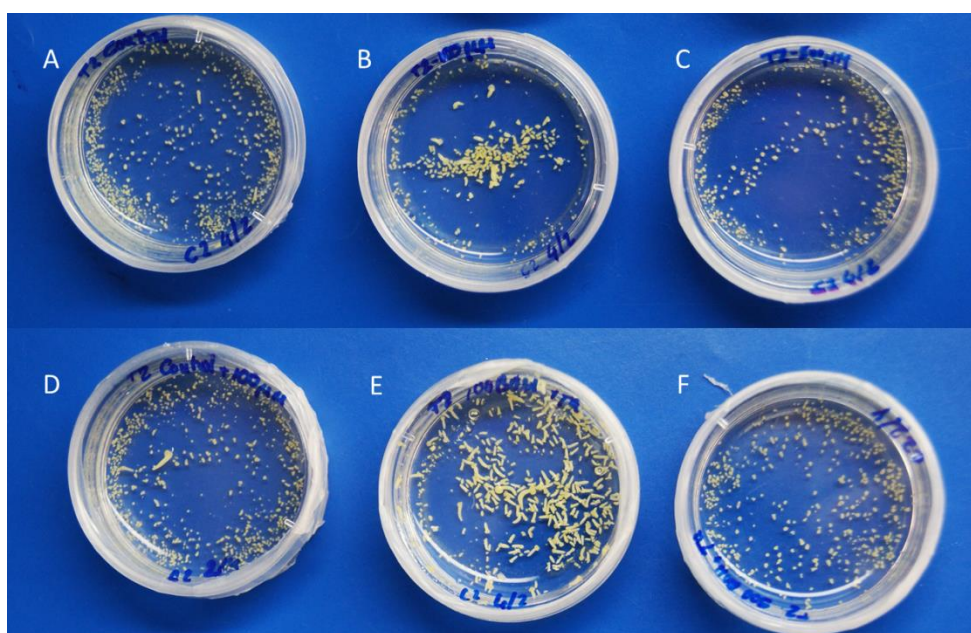


Figura 20. Efecto del alcohol bencílico en el número de embriones. A control, B 100 µM desde el día 0, C 500 µM desde el día 0, D 100 µM de alcohol bencílico tras inducción, E 100 µM de alcohol bencílico solo en inducción, F 500 µM de alcohol bencílico solo en inducción.

Por lo tanto, se decidió analizar los estadios de desarrollo en los que se encontraban los embriones para comprobar si el alcohol bencílico podía inducir una mayor velocidad en el desarrollo de los mismos. Este análisis solamente se llevó a cabo en aquellas concentraciones que no presentaron diferencias significativas con el control en el número de embriones totales, que son los tratamientos de 100 μM aplicado de manera continua, solo en inducción o tras la inducción. El motivo por el que no se analizaron los datos de los tratamientos a concentraciones de 500 μM es que eran embriones aberrantes (véase figura 22), y por lo tanto su clasificación resultaba subjetiva. El análisis Chi-cuadrado concluyó que existe dependencia entre el tratamiento y el número de embriones presentes en cada uno de los estadios ($p\text{-value}$ 0), y que las diferencias observadas en la velocidad de desarrollo son causadas por los tratamientos aplicados (figura 21). Por lo tanto, aunque el tratamientos con alcohol bencílico no afecte al rendimiento final en el número de embriones, añadir 100 μM de alcohol bencílico, especialmente durante la inducción, permitiría conseguir embriones cotiledonares, y de ellos plantas doble haploides, en menor tiempo.

Efecto del BOH en la velocidad de desarrollo de los embriones

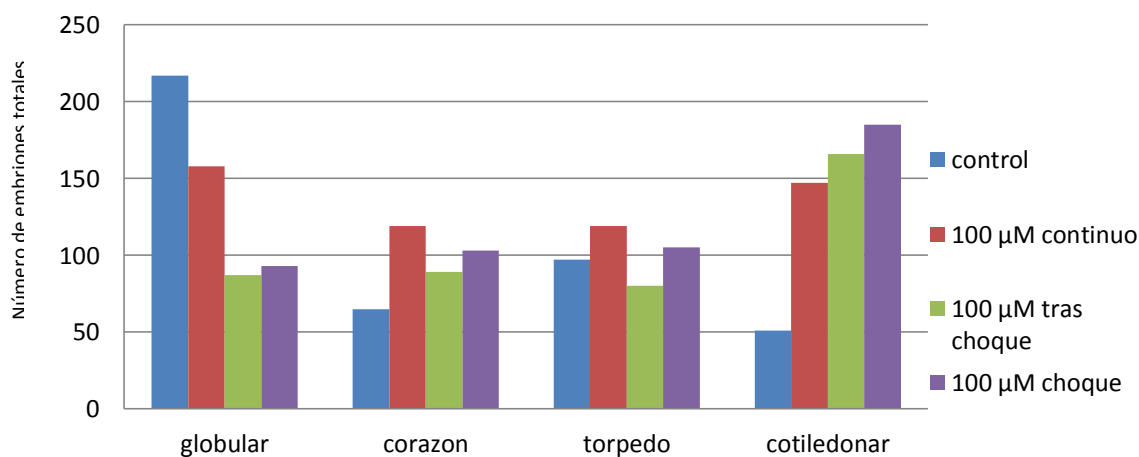


Figura 21. Efecto del alcohol bencílico en la velocidad de desarrollo de los embriones de colza.

Como ya se ha dicho, los embriones que se obtenían a concentraciones de 500 μM presentaban formas aberrantes o defectos como los bordes irregulares o que no se diferenciaban muy bien los cotiledones. Este efecto era equivalente tanto para los embriones obtenidos en medio de cultivo con alcohol bencílico desde el día cero de cultivo como para ensayos en los que el alcohol bencílico se añadía tras la inducción, tal como aparece en las imágenes C y F de la figura 22.

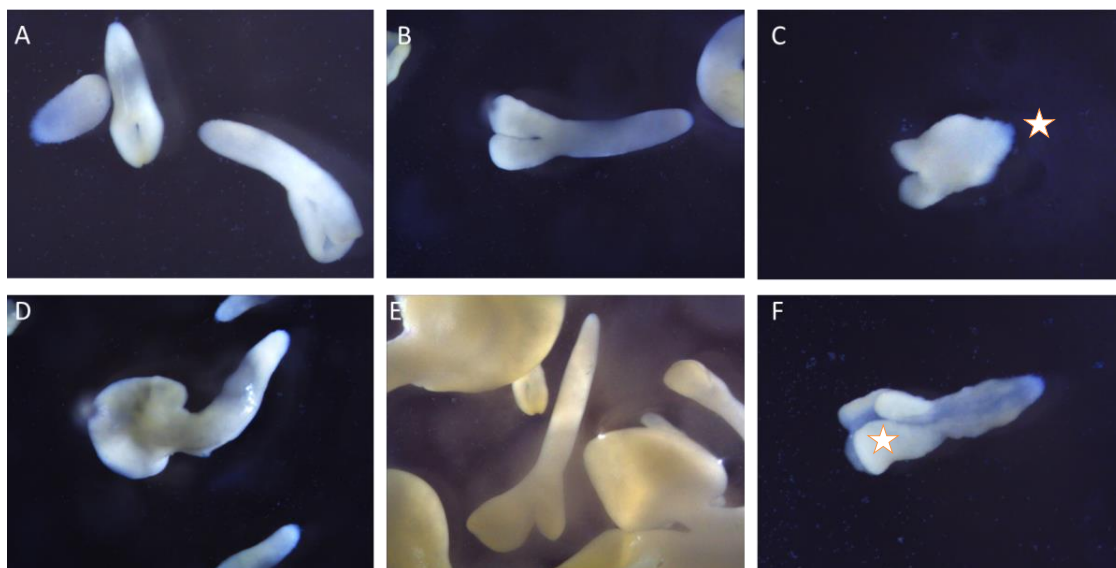


Figura 22. Embriones de colza obtenidos tras 3 semanas de cultivo, observados a lupa y aumentos de 1x. A: control, B: 100 μM desde día 0, C: 500 μM desde día 0, D: 100 μM tras inducción, E: 100 μM solo en inducción y F: 500 μM solo en inducción. En la imagen C se puede ver un embrión aberrante que presenta bordes irregulares (estrella) y en la imagen F se puede ver un embrión tanto con bordes irregulares como cotiledones aberrantes (estrella).

Considerando un nivel de significación de 0,05 y los resultados obtenidos que aparecen recogidos en la tabla 7, donde se muestra un resumen de los grupos de homogeneidad obtenidos para cada uno de los caracteres, se concluyó que el alcohol bencílico a elevadas concentraciones podría tener un efecto tóxico para las células ya que se ha observado tanto la ruptura de la pared de exina como la presencia de embriones aberrantes y en menor cantidad.

Por otro lado, se ha observado un posible efecto positivo del alcohol bencílico aplicado a menor concentración sobre la división celular y la proliferación, aunque las diferencias respecto al control no llegan a ser significativas. Esto contrasta con los estudios realizados por Kobayashi *et al.* (2000) en los que no se había podido demostrar que análogos del alcohol bencílico afectasen a la proliferación celular de células no embriogénicas o embriogénicas no diferenciadas. Puesto que el efecto de 500 μM resulta tóxico, y el de 100 μM parece prometedor, sería interesante realizar ensayos futuros a concentraciones comprendidas entre 100 μM y 500 μM , y comprobar los efectos que podrían tener estas nuevas concentraciones en los parámetros estudiados.

	% divisiones	% desorganización	Proliferación		
			<4 núcleos	4-8 núcleos	8 núcleos
Control	A	A	A	A'	A''
100 μM	A	A	A	A'	A''
500 μM	A	B	A	A'	A''

Tabla 7. Resumen que recoge los grupos de homogeneidad para los caracteres de porcentaje de divisiones y de desorganización, así como de tipos de estructuras observadas en colza. La letra en rojo indica que es un tratamiento peor que el control.

Además, los tratamientos a concentraciones de 100 μM facilitarían el mantenimiento de la organización de las estructuras y podrían así facilitar también el proceso de desarrollo embriogénico, puesto que no se observaron embriones aberrantes en ninguno de los tratamientos para esa concentración (figura 22). Pese a estos resultados, no se observaron diferencias significativas en el número de embriones obtenidos con respecto al control, como se recoge en la tabla 8 y como ya había sido patente en otros resultados obtenidos en colza (Pauls *et al.*, 2006). Este mismo efecto también había sido observado en la embriogénesis somática de zanahoria, ya que el alcohol bencílico afectaba al número final de embriones de tal manera que este se reducía conforme aumentaba la concentración del mismo (Kobayashi *et al.*, 2000), al igual que otros análogos del mismo. El número de embriones se reduce cuando el alcohol bencílico está presente desde el día cero hasta el final del cultivo para una concentración de 100 μM y cuando se aplica solamente en inducción para la misma concentración, mientras que añadido tras la inducción el número de embriones obtenidos se encontraba en el mismo grupo de homogeneidad que el control (figura 19). Sin embargo, en el presente estudio se ha demostrado que la adición de alcohol bencílico a una concentración de 100 μM tras el periodo de inducción acelera el desarrollo de los embriones de colza en cultivo de microsporas. Este resultado podría ser interesante de forma aplicada, ya que el tratamiento permitiría reducir el tiempo que se tardaría en obtener una planta doble haploide de interés.

	Control	Tratamiento				
		Tratamiento continuo		tras inducción	Tratamiento solo inducción	
		100 μM	500 μM	100 μM	100 μM	500 μM
Número de embriones	B	AB	A	B	AB	A

Tabla 8. Grupos de homogeneidad obtenidos para el número d embriones en los distintos tratamientos en colza. Las letras verdes indican los mejores tratamientos y las rojas los tratamientos que presentan peores resultados.

4.2. EFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE BERENJENA

4.2.1. Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones

A los 8 días de cultivo se realizó una tinción con DAPI para comparar el porcentaje de divisiones entre los tratamientos y el control. En general, la aplicación de alcohol bencílico tras la inducción produjo un incremento del porcentaje de divisiones, y el tratamiento con alcohol bencílico 1000 μM añadido tras la inducción incrementó este parámetro de forma estadísticamente significativa (figura 23). La adición de alcohol bencílico tras la inducción podría tener un efecto similar pero más moderado, siendo necesarias concentraciones más altas para conseguir ligeros incrementos en el porcentaje de microsporas en división.

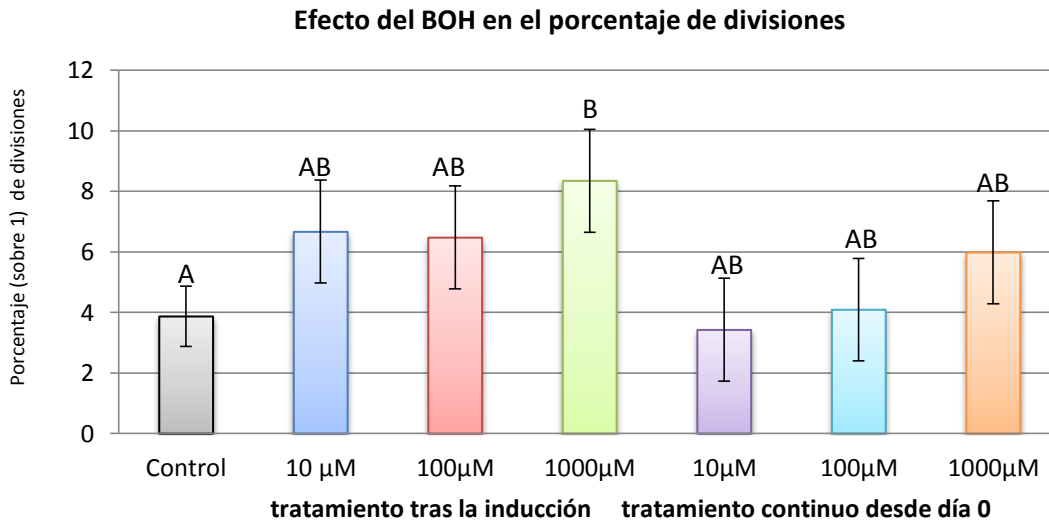


Figura 23. Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones en berenjena. Las letras representan los distintos grupos de homogeneidad.

4.2.2. Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras

También se llevó a cabo una clasificación de todas las estructuras en división atendiendo al número de núcleos y a la organización. La aplicación de alcohol bencílico a 100 µM tras la inducción causó un incremento estadísticamente significativo de estructuras desorganizadas respecto al control (figura 24). Sin embargo, el porcentaje de desorganización cuando el alcohol bencílico está presente desde el día cero es muy pequeño y semejante al control. En las figuras 25 y 26 puede observarse cómo con la aplicación del tratamiento desde el momento del aislamiento parece tener una tendencia a conseguir estructuras más organizadas que cuando se aplica tras la inducción.

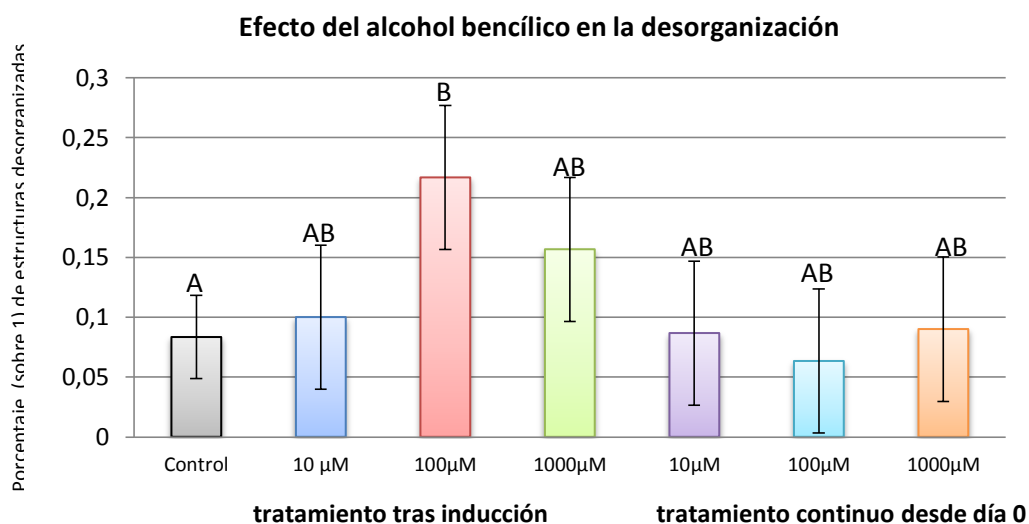


Figura 24. Efecto del alcohol bencílico en la organización en berenjena. El tratamiento control y 100 µM aplicado tras la inducción se encuentran en distinto grupo de homogeneidad (A y B, respectivamente).

En cuanto a los tratamientos aplicados desde día cero, concentraciones de 100 μM y de 1000 μM permiten que las estructuras se desarrollen sin daños en la pared de exina incluso cuando hay un gran número de núcleos, como aparece en las figuras 25f y 25i. Además estas estructuras presentan un tamaño mayor que las estructuras que aparecen en el control (figura 25C) y son estructuras compactas.

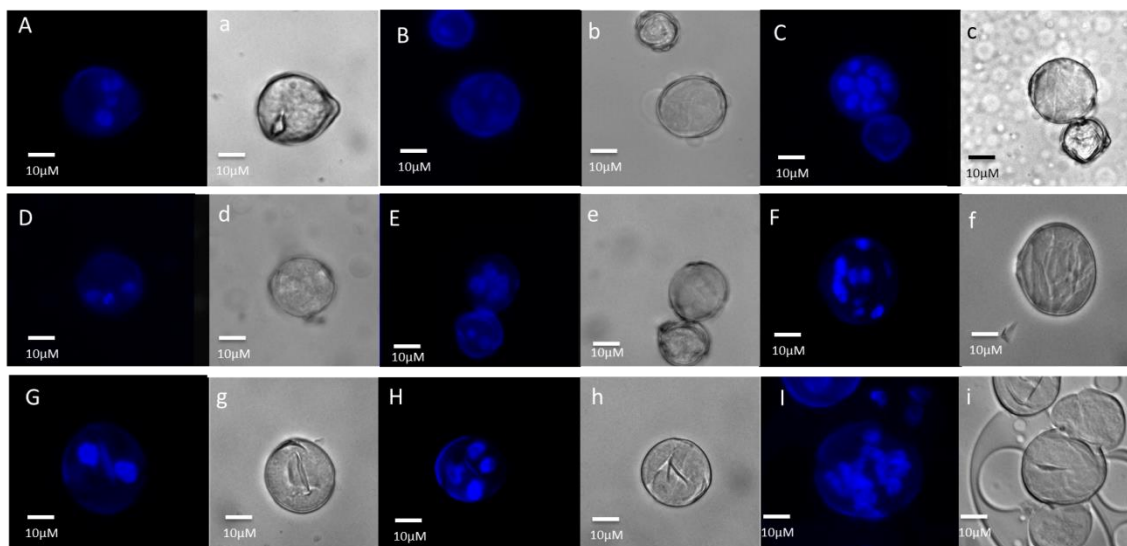


Figura 25. Estructuras observadas en presencia de alcohol bencílico desde día cero para berenjena. Las imágenes A, B y C se corresponden a las estructuras observadas en el control con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las imágenes D, E y F se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 100 μM con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las imágenes G, H e I se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 1000 μM con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases.

Por el contrario, se observaron estructuras de bajo número de núcleos que presentaban desorganización para las concentraciones anteriores pero aplicadas tras la inducción, como se puede ver en las figuras 26H y 26J (concentraciones de 100 μM y 1000 M, respectivamente). Por otro lado, también se observaron estructuras que presentan gran número de núcleos o proembriones. Estas estructuras embriogénicas que son organizadas también aparecieron a concentraciones de 100 μM (imagen I de la figura 26) como de 1000 μM (imágenes L y I de la figura 25); pero no se observaron a concentraciones de 10 μM . Pese a ello, a esta última concentración sí que aparecieron estructuras desorganizadas tanto de gran número de núcleos (imágenes F y f de la figura 26) como de pocos núcleos (imagen e de la figura 26).

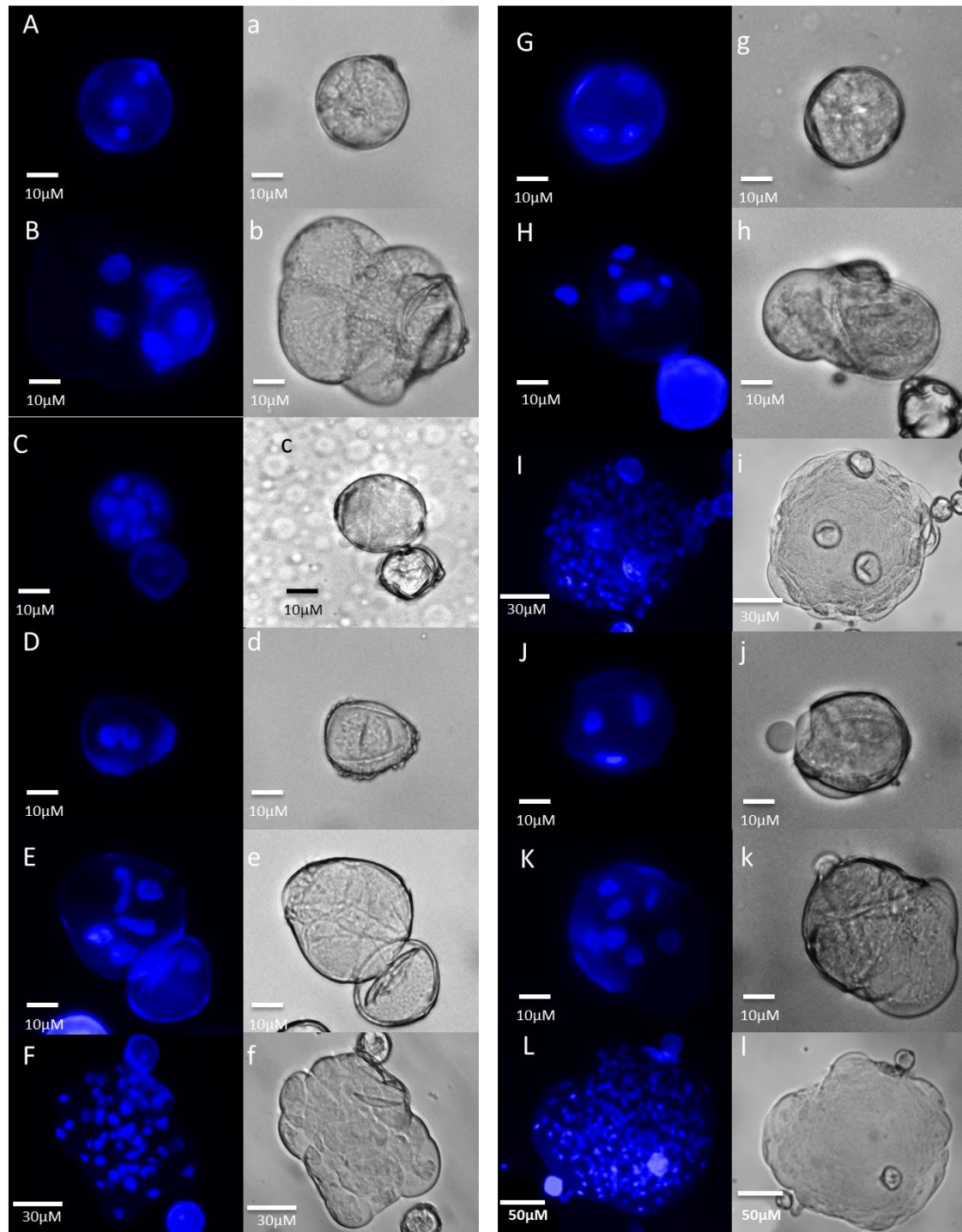


Figura 26. Estructuras observadas en el control (A-C) y en los tratamientos con alcohol bencílico tras la inducción (D-L) para berenjena. Las imágenes A, B y C se corresponden a las estructuras observadas en el control con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las imágenes D, E y F se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 10 μM con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las imágenes G, H e I se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 100 μM con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las imágenes J, K y L se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 1000 μM con 2-3 núcleos, de 4 a 8 núcleos y más de 8 núcleos, respectivamente. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases. Además, las imágenes E H y J representan una estructura desorganizada de pocos núcleos. Las imágenes I y L representan estructuras embriogénicas de gran número de núcleos y organizadas.

Por otro lado también se observó el número de núcleos que presentaban las estructuras en división entre los tratamientos, y se determinó que no había diferencias significativas en el porcentaje de estructuras con menos de 4 núcleos (p -value 0,0924), de 4 a 8 núcleos (p -value 0,3781) o más de 8 núcleos (p -value 0,6853) como se puede observar en la figura 27. Pese a ello, la adición de 100 y 1000 μ M, especialmente cuando se aplican desde el aislamiento, parecen capaces de inducir la proliferación celular en comparación a otros tratamientos puesto que presentan mayor porcentaje de estructuras con más de cuatro núcleos. Sin embargo, como se ha mostrado anteriormente, 100 μ M de alcohol bencílico añadido tras la inducción causa la ruptura prematura de la pared de exina, que es un efecto negativo si se pretende que estas estructuras consigan dar lugar al desarrollo de embriones haploides. Por lo tanto, los tratamientos aplicados desde el día cero podrían ser una mejor opción, ya que parecen tener una cierta tendencia a inducir ligeramente la proliferación sin causar desorganización en las estructuras.

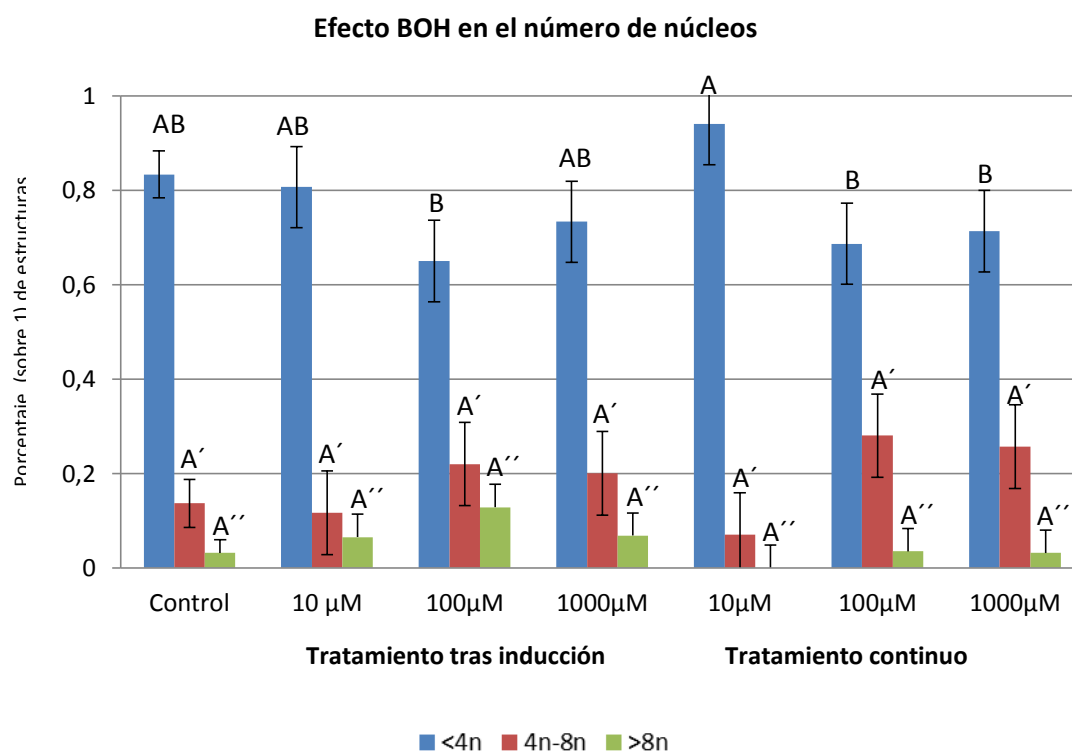


Figura 27. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en berenjena.

Para concluir con estos parámetros, sería importante destacar que no existe un efecto de dependencia entre el número de núcleos y la desorganización presente en las estructuras observadas para el tratamiento de 100 μ M aplicado tras la inducción. Esto quiere decir que la proliferación celular no es responsable de que se produzca la ruptura de la pared de exina, tal como indica el coeficiente de Cramer (0,4840).

4.2.3. Efecto del alcohol bencílico en la formación de callos

A las 4 semanas se observó tanto el número de callos presentes en cada placa como el tamaño de los mismos, clasificándose como callos de tamaño grande aquellos que superaban 1 mm de diámetro. Se pretendía determinar si el alcohol bencílico actuaba como inductor de la

formación de callos o sobre el tamaño de los mismos. En lo que al número de callos se refiere, ningún tratamiento tuvo mayor rendimiento que el control (figura 28). De hecho, se observó el efecto contrario, ya que los tratamientos de 10 y 100 μM desde día cero dieron un número de callos significativamente menor que en el control. En cambio, la aplicación de alcohol bencílico tras la inducción no tuvo este efecto tóxico sobre los cultivos.

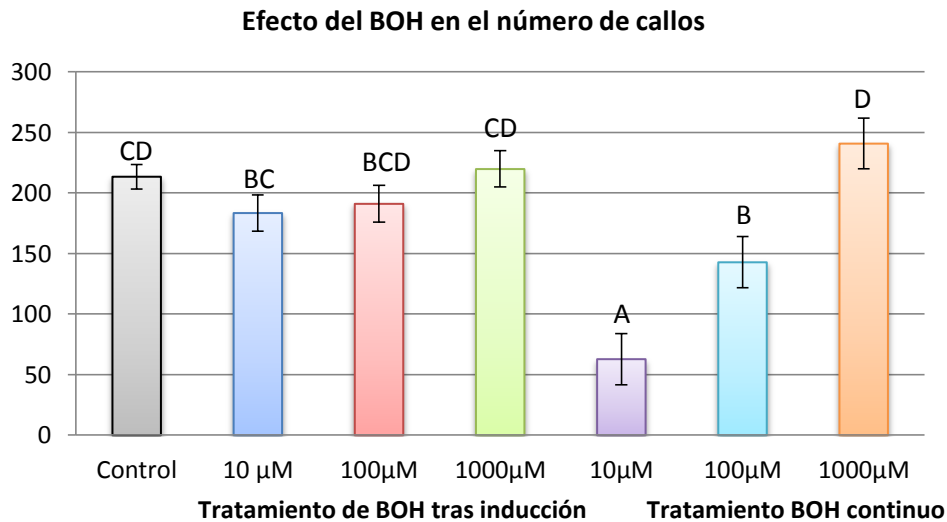


Figura 28. Efecto del alcohol bencílico en el número de callos en berenjena. Las letras representan los grupos de homogeneidad y permiten determinar dos tratamientos (A y B) con un número de callos significativamente menor que el control (CD).

Además del número total de callos obtenidos, también es importante considerar el tamaño que tienen esos callos, ya que los callos de gran tamaño facilitan la regeneración de una planta doble haploide a partir del mismo. Por lo tanto, pese a que un tratamiento no dé mayor rendimiento en el número de callos puede ser interesante si estos callos son de mayor tamaño que en el control. Por este motivo se analizó el porcentaje de callos mayores a 1mm. La aplicación de alcohol bencílico desde el aislamiento tuvo un efecto positivo sobre el tamaño de los callos, y la adición de alcohol bencílico 100 μM desde día cero causó un incremento estadísticamente significativo respecto al control (figura 29).

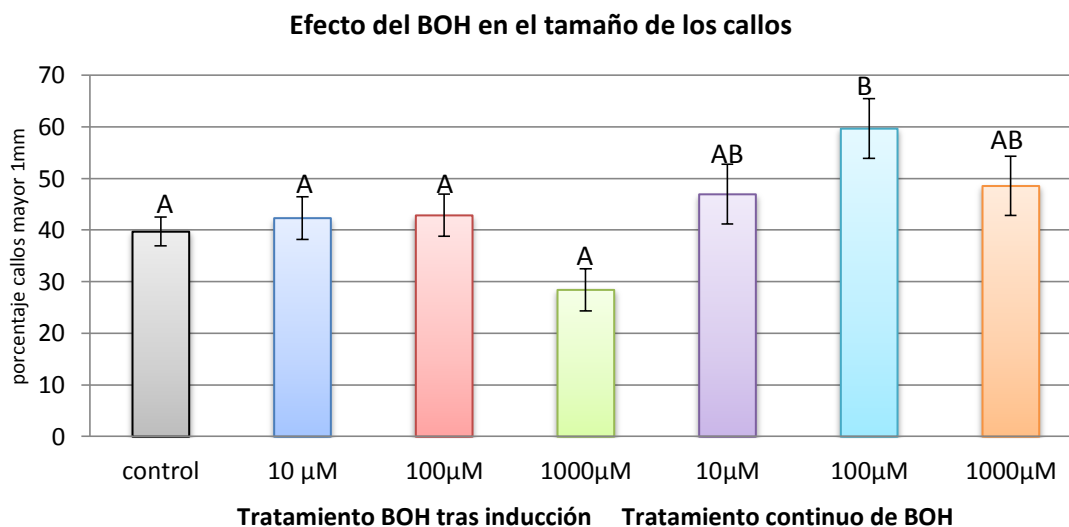


Figura 29. Efecto del alcohol bencílico en porcentaje de callos mayores a 1mm en berenjena. La aplicación de alcohol bencílico 100 μM desde día cero (B) presenta un porcentaje de callos de tamaño grande significativamente mayor que el control (A).

Es decir, pese a que el número de callos obtenidos a 100 μM añadido en el medio de cultivo desde el día 0 sea significativamente menor que el control, estos callos tendrían una ventaja ya que facilitarían la regeneración de la planta doble haploide por ser de mayor tamaño (figura 30).

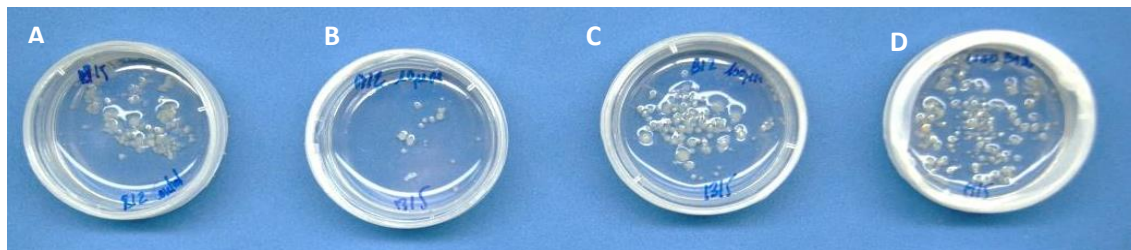


Figura 30. Efecto del alcohol bencílico desde día 0 en el tamaño y el número de callos, en berenjena. A control, B 10 μM , C 100 μM y D 1000 μM .

A parte de ser de mayor tamaño, los callos obtenidos en presencia de alcohol bencílico presentan mayor organización y compactación que los callos obtenidos en el control (figura 31). Por lo tanto, esto podría tener cierta aplicación práctica puesto que se traduciría en un incremento en la eficiencia a la hora de la obtención de plantas dobles haploides mediante cultivo de microsporas de berenjena.

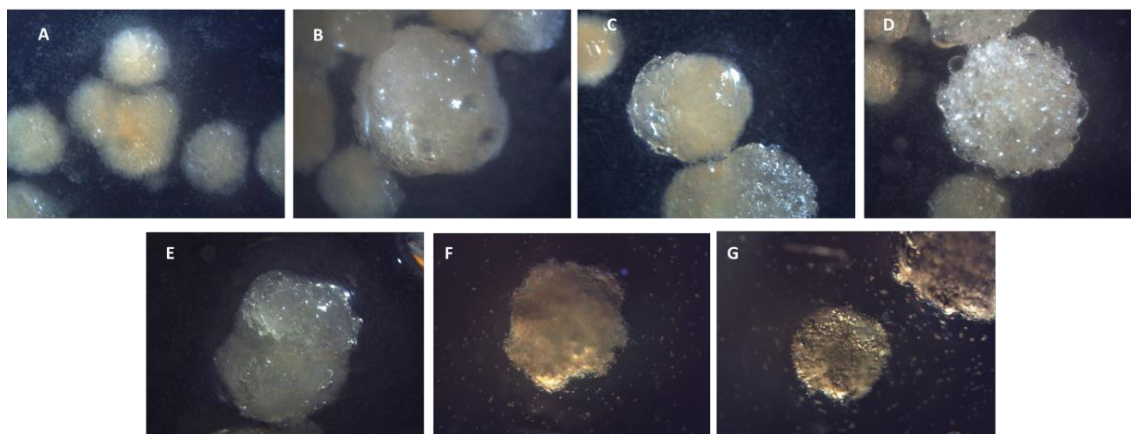


Figura 31. Callos de berenjena obtenidos tras 4 semanas de cultivo: en ausencia de alcohol bencílico (A) que son callos grandes pero con tienen bordes irregulares, en presencia de alcohol bencílico a 10, 100 y 1000 μM desde día 0 (B, C y D) y en presencia de alcohol bencílico a 10, 100 y 1000 μM desde día 3 (E, F y G). Los callos en presencia de alcohol bencílico con redondos y compactos, con bordes regulares. Todas las imágenes han sido tomadas con lupa de 1x.

Los resultados obtenidos en berenjena confirmaron que el alcohol bencílico afecta tanto a nivel de división celular, como recoge el resumen de la tabla 9, como a nivel de número y tamaño de los callos, como recoge el resumen de la tabla 10. Es importante destacar que, pese a que el mejor tratamiento sería la presencia de alcohol bencílico a una concentración de 1000 μM tras la inducción puesto que aparece mayor porcentaje de estructuras en división que en el control, estas estructuras presentan bajo número de núcleos y se originan callos de un tamaño significativamente menor que en el control. Por otro lado, los tratamientos de 100 μM y 1000 μM desde día cero presentan mismo porcentaje de divisiones que el control, pero el porcentaje de las mismas que son menores a 4 núcleos es significativamente mayor que en otros tratamientos. Además, los datos concluyen que el alcohol bencílico presente desde el día cero genera menos desorganización que si se añade tras el tratamiento por choque térmico, por lo que serían más interesantes estos dos últimos tratamientos.

	% divisiones	% desorganización	<4 núcleos	Proliferación	
				4-8 núcleos	8 núcleos
Control	A	A	AB	A'	A''
Tras inducción					
10 μM	AB	AB	AB	A'	A''
100 μM	AB	B	B	A'	A''
1000 μM	B	AB	AB	A'	A''
Tratamiento continuo					
10 μM	AB	AB	A	A'	A''
100 μM	AB	AB	B	A'	A''
1000 μM	AB	AB	B	A'	A''

Tabla 9. Grupos de homogeneidad para porcentaje de divisiones y desorganización, así como tipos de estructuras observadas en berenjena. Las letras rojas indican resultados negativos y las verdes positivos.

Por otro lado, no solo es interesante obtener un mayor rendimiento en el número de callos sino que también es interesante, desde un punto de vista práctico, que se obtengan callos de mayor tamaño. Esto es importante porque la eficiencia en la regeneración de las plantas haploides sería mayor. Por consiguiente, se podría concluir diciendo que el tratamiento óptimo sería 100 μM presente en el medio de cultivo desde el día cero ya que:

-presenta el mismo porcentaje de divisiones que el control.

-no provoca desorganización en las estructuras, al contrario que los tratamientos aplicados tras la inducción.

-presenta mayor proliferación celular que otros tratamientos.

- Aunque el número de callos sea menor que el control, el tamaño de estos es mayor. Esto tiene cierta aplicación práctica ya que permitiría obtener un mayor rendimiento final en las plantas dobles haploides regeneradas.

	Control	Tratamiento tras inducción			Tratamiento continuo		
		10 μM	100 μM	1000 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
Número de callos	CD	BC	BCD	D	A	B	CD
% Callos grandes	A	A	A	A	AB	B	AB

Tabla 10. Grupos de homogeneidad para número de callos y porcentaje de callos de tamaño mayor a 1 mm observados en berenjena. Las letras rojas indican resultados con efecto negativo y las verdes con efecto positivo.

4.3.EFECTO DEL ALCOHOL BENCÍLICO EN EL CULTIVO DE MICROSPORAS DE PIMIENTO

4.3.1. Efecto del alcohol bencílico en el porcentaje de divisiones

A los 14 días de cultivo, se realizó una tinción con DAPI para comprobar los tipos de estructuras que aparecían al aplicar las distintas concentraciones de alcohol bencílico respecto al control. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de divisiones (*p-value* 0,2715) comparando todos los tratamientos, tal como aparece en la figura 32.

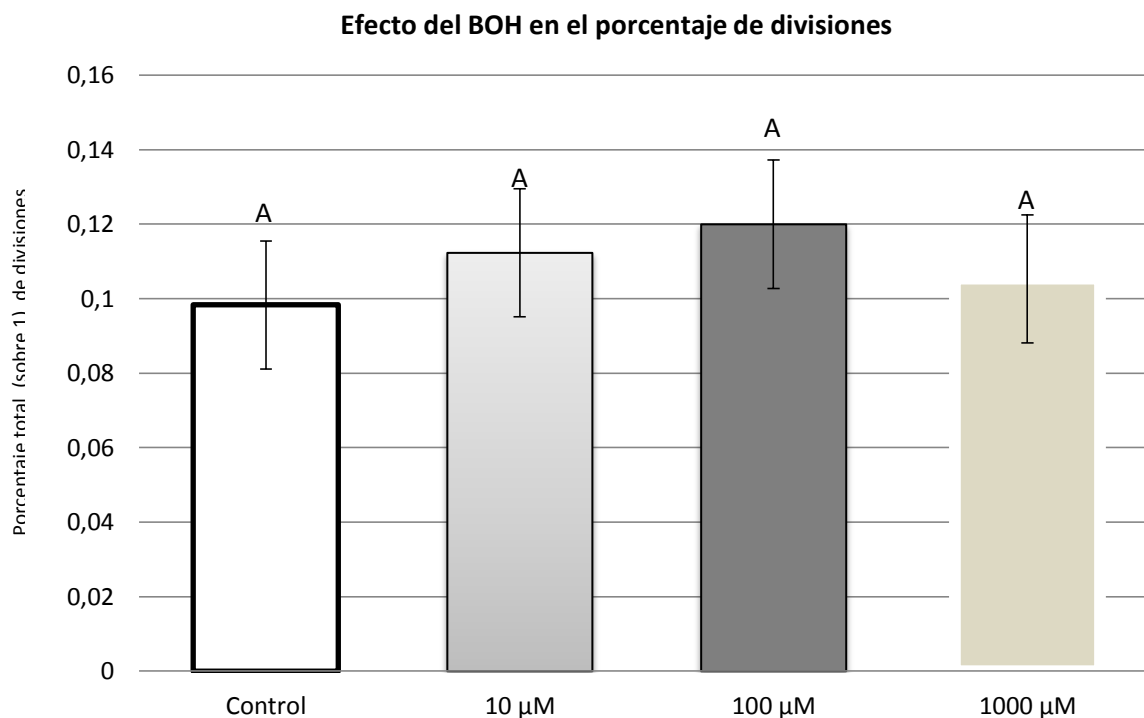


Figura 32. Diferencias en el porcentaje de divisiones para las distintas concentraciones de alcohol bencílico, en pimiento.

4.3.2. Efecto del alcohol bencílico en los tipos de estructuras

A los 14 días de cultivo, se tomaron datos tanto de número de núcleos como de organización de las estructuras. El análisis estadístico concluyó que el alcohol bencílico causa desorganización o ruptura de la pared de exina, tal como se observa en la figura 33.

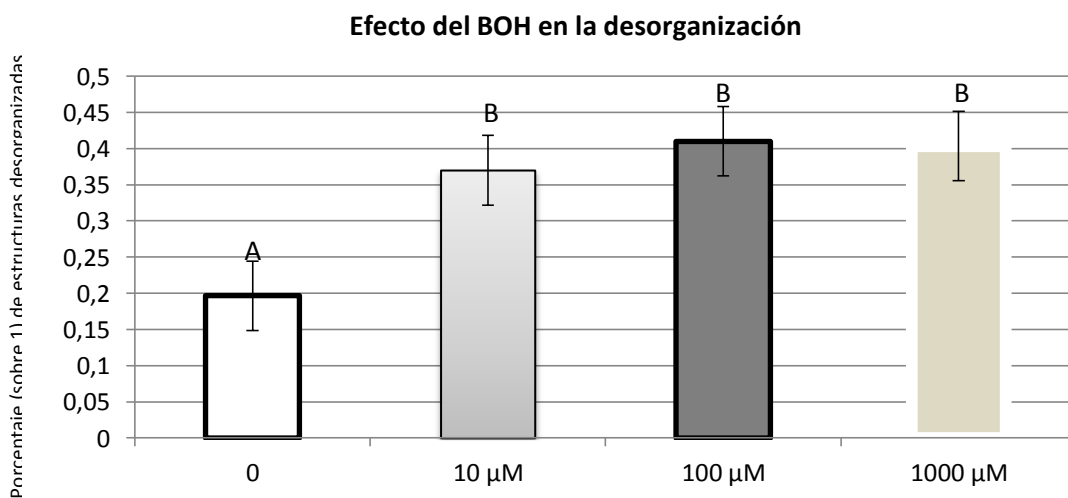


Figura 33. Efecto del alcohol bencílico sobre la desorganización de las estructuras observadas en pimiento.

En cuanto al número de núcleos, los experimentos mostraron que el alcohol bencílico tiene un efecto en la inducción de la proliferación celular en el caso del pimiento, ya que existen diferencias significativas entre tratamientos (figura 34). Los tratamientos con alcohol

bencílico 100 μM y 1000 μM presentan un porcentaje significativamente menor al control de estructuras con menos de 4 núcleos. Además, alcohol bencílico a 1000 μM presenta un número significativamente superior al control de estructuras entre 4 y 8 núcleos. Por último, no existen diferencias significativas en estructuras con un número mayor a 8 núcleos.

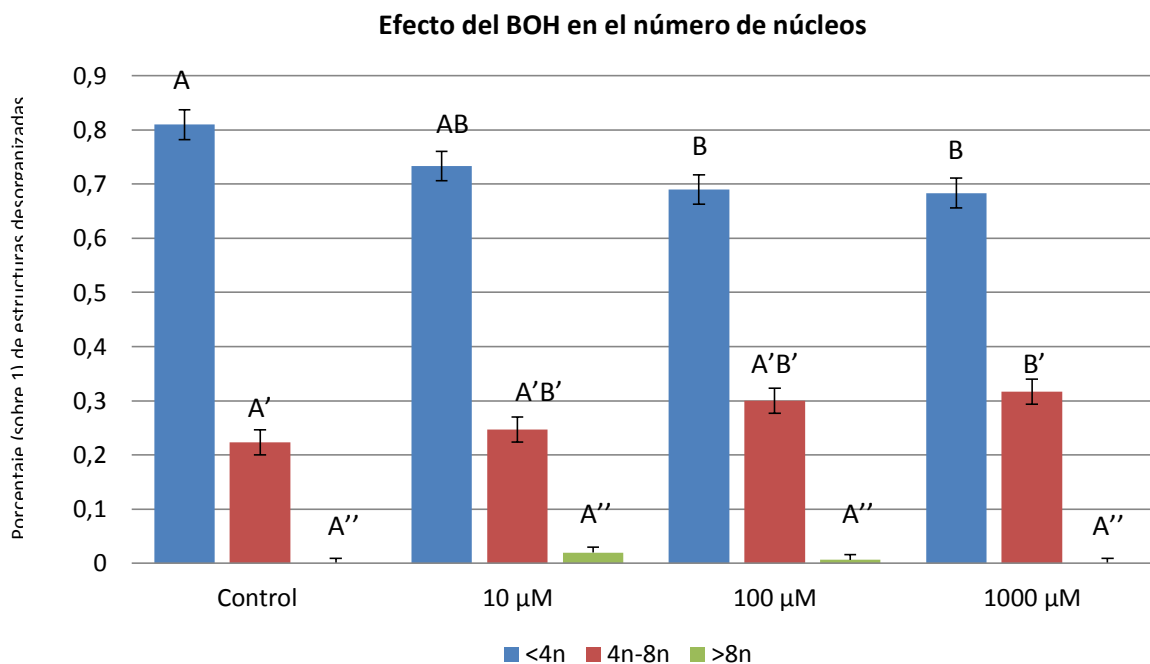


Figura 34. Efecto del alcohol bencílico en el número de núcleos en pimienta.

Puesto que para las concentraciones de 100 μM y 1000 μM aumenta el porcentaje de estructuras desorganizadas y también el porcentaje de estructuras con mayor número de núcleos (imágenes I y L de la figura 35, respectivamente), se comprobó si podría existir asociación entre ambas variables mediante el coeficiente de Cramer. Este coeficiente concluyó que a desorganización era debida solamente a la presencia de alcohol bencílico en el medio y no al tamaño de las estructuras, ya que el valor fue de 0,6094 y de 0,4688 para las concentraciones de 100 y 1000 μM , respectivamente. Es decir, que la desorganización de las estructuras era más acusada y con mayor prevalencia en presencia del alcohol bencílico (imágenes F, I y L de la figura 35) en comparación con el control (imagen C de la figura 35), independientemente del número de núcleos.

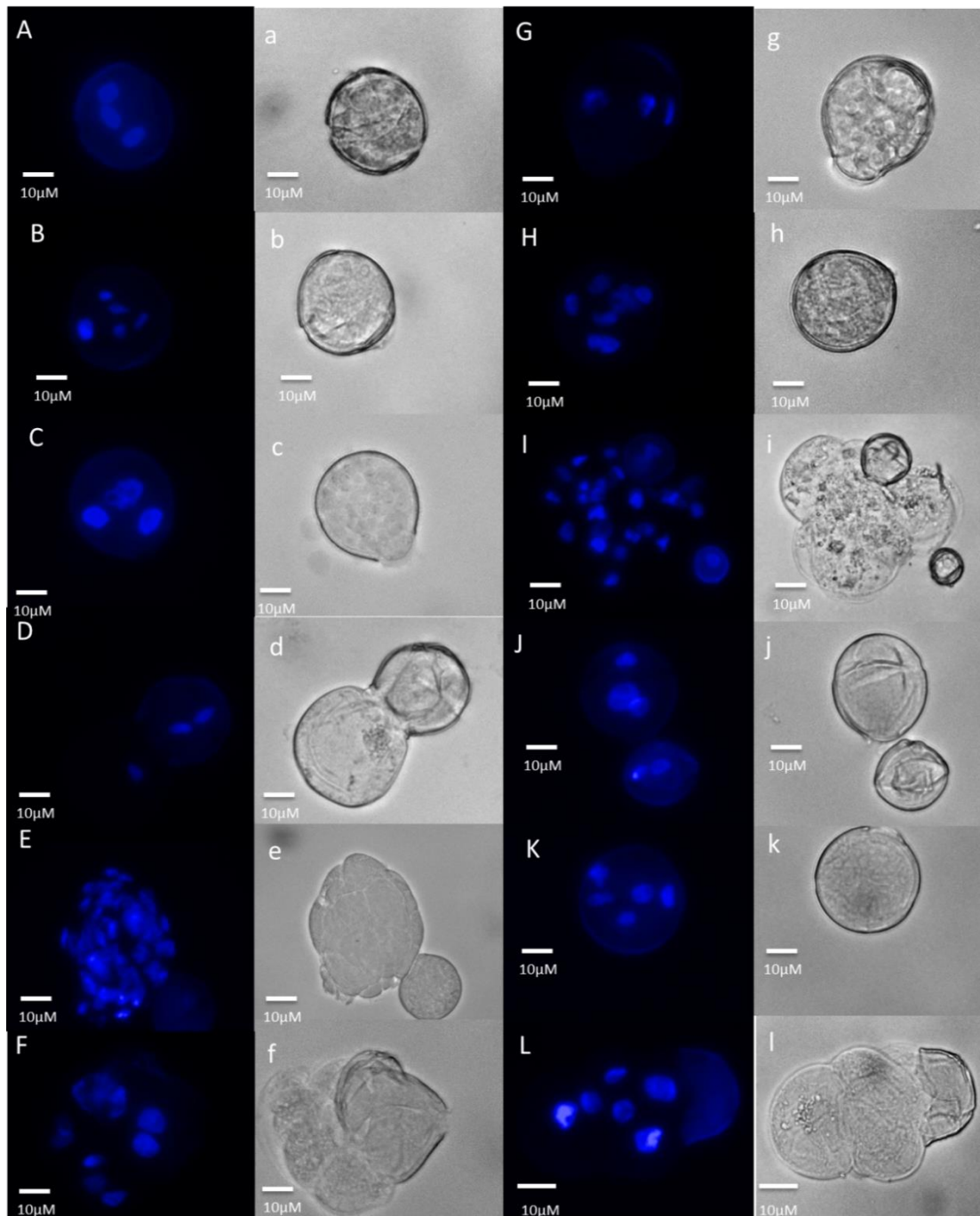


Figura 35. Estructuras observadas en pimienta. Las imágenes A, B y C se corresponden a las estructuras observadas en el control con 2-3 núcleos, más de 4 núcleos y organizada y más de 4 núcleos y desorganizada, respectivamente. Las imágenes D, E y F se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 10 μM con 2-3 núcleos, más de 4 núcleos y organizada y más de 4 núcleos y desorganizada, respectivamente. Las imágenes G, H e I se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 100 μM con 2-3 núcleos, más de 4 núcleos y organizada y más de 4 núcleos y desorganizada, respectivamente. Las imágenes J, K y L se corresponden a las estructuras observadas a una concentración de 1000 μM con 2-3 núcleos, más de 4 núcleos y organizada y más de 4 núcleos y desorganizada, respectivamente. Las mayúsculas se corresponden con imágenes tomadas en microscopio de fluorescencia y las minúsculas es la misma imagen en contraste de fases.

4.3.3. Efecto del alcohol bencílico en embriones o callos

Por último, el pimienta no presentó respuesta androgénica salvo para las concentraciones de 100 μM y 1000 μM del primer cultivo realizado. Esta respuesta fue

mínima, ya que se obtuvieron un total de 10 callos para 100 μM , y un embrión y 19 callos para la concentración de 1000 μM (figura 36). El resto de cultivos dejó patente la gran recalcitrancia de esta especie a la inducción de una respuesta embriogénica, y la baja eficiencia del cultivo de microsporas como alternativa al cultivo de anteras para la obtención de individuos dobles haploides.

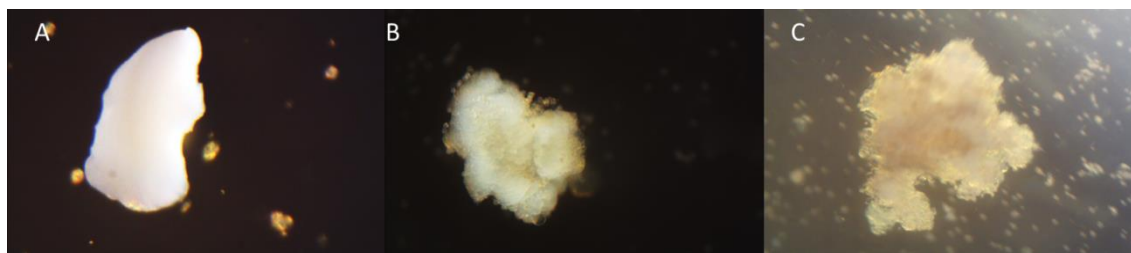


Figura 36. Estructuras observadas en lupa tras el tratamiento del cultivo de las microsporas de pimiento con alcohol bencílico. A embrión obtenido en medio con una concentración de 1000 μM (lupa 9x), B callo obtenido en medio con una concentración de 1000 μM (lupa 4x), C callo obtenido en medio con una concentración de 100 μM (lupa 3x).

Con todos estos resultados se concluye que el alcohol bencílico no tiene un efecto en la inducción de embriogénesis en el cultivo de microsporas de pimiento, pero aumenta la parece aumentar la proliferación celular y causar desorganización en las estructuras en división. Es importante determinar la concentración óptima, puesto que si se sobrepasa podría tener un efecto tóxico que reduciría la división celular y la proliferación. En el caso del pimiento se estableció la cantidad de alcohol bencílico óptima como 1000 μM puesto que aparecen estructuras con mayor número de núcleos (tal como se recoge en el resumen de la tabla 11), pese a presentar el mismo porcentaje de divisiones que el control,. Es decir que las posibles estructuras evolucionan con mayor rapidez que el control, pero es importante considerar que aumenta la desorganización de las mismas tanto para esta como para menores concentraciones de alcohol bencílico.

	% divisiones	% desorganización	Proliferación		
			<4 núcleos	4-8 núcleos	8 núcleos
Control	A	A	A	A'	A''
10 μM	A	B	AB	A'B'	A''
100 μM	A	B	B	A'B'	A''
1000 μM	A	B	B	B'	A''

Tabla 11. Resumen de los grupos de homogeneidad obtenidos en el análisis estadístico de los parámetros relacionados con divisiones y estructuras observadas, en pimiento. Las letras rojas reflejan los resultados negativos y las letras verdes los positivos.

4.4. Consideraciones finales

A la hora de interpretar todos los resultados expuestos anteriormente es importante tener en cuenta que los caracteres analizados presentan una amplia variabilidad y su error de estimación es elevado. Esto se debe a que solamente se realizaron tres repeticiones para cada uno de los parámetros analizados, lo que genera una elevada dispersión de los datos. Este efecto es especialmente importante en los parámetros relacionados con las divisiones ya que

solamente se tiene un dato de cada uno de los cultivos para cada tratamiento. El hecho de que para cada experimento se hayan empleado plantas cultivadas en distintas épocas del año también incrementa la dispersión, puesto que se genera una respuesta variable que queda patente en el efecto de la sesión. Es decir, que la época del año afecta a la respuesta de las microsporas a la inducción de la androgénesis, debido a la importancia de los factores ambientales y condiciones de crecimiento de la planta donante (Dwivedi, 2015). Por lo tanto, sería interesante realizar estudios futuros con mayor número de datos que permitieran ganar consistencia de cara al análisis estadístico y así poder confirmar tanto los resultados obtenidos como las tendencias prometedoras observadas en estos estudios preliminares.

Teniendo en cuenta todas estas limitaciones, lo que sí se ha podido demostrar es que el alcohol bencílico causa desorganización de las estructuras y esto se puede deber a que actúa a nivel de las membranas celulares. Los estudios llevados a cabo por Ashcroft *et al.* (1977) o Ebihara *et al.* 1979 demostraron que el alcohol bencílico reduce el espesor de las mismas. También el alcohol bencílico afecta a los canales de calcio y aumentan los niveles de calcio citosólicos (Saidi, 2009), lo que podría hacer que se incremente el volumen de la microspora. Estos efectos podría facilitar la ruptura de la pared de exina y la liberación del contenido al exterior.

El resto de resultados depende de la especie, por ejemplo en el caso de la colza el alcohol bencílico podría tener un efecto sobre la inducción de la embriogénesis, aumentando el porcentaje de microsporas en división. Además, la interpretación del análisis estadístico permitió determinar que el alcohol bencílico causa desorganización en las estructuras y reduce el rendimiento en número de embriones. Sin embargo, tiene un importante efecto positivo aumentando la velocidad de desarrollo de los embriones de colza. Los gradientes de calcio son importantes en la inducción de la embriogénesis en microsporas (Reynolds, 2000) y en el establecimiento de la polaridad del embrión (Hause *et al.*, 1994), y este efecto podría traducirse en un incremento de la velocidad de desarrollo de los embriones. Además, se confirmó que altas concentraciones de alcohol bencílico (500 μM) tienen efectos negativos, como demuestran tanto los embriones aberrantes como las estructuras desorganizadas obtenidas.

En el caso de la berenjena se observa que una concentración alta (1000 μM) de alcohol bencílico actúa sobre la inducción de embriogénesis, incrementando el porcentaje de microsporas en división. Este efecto es especialmente significativo cuando se añade tras la inducción. Sin embargo, los tratamientos aplicados tras la inducción tienen un efecto negativo sobre la organización de las estructuras, que es más moderado cuando el alcohol se añade desde el día 0. También se observó que el alcohol bencílico podría tener efecto inductor de la proliferación, aunque sería necesario realizar más pruebas para confirmarlo. Aplicado desde el aislamiento, el alcohol bencílico tuvo un efecto negativo sobre el rendimiento en el número de callos, pero causó un incremento de tamaño que puede mejorar la regeneración de plantas doble haploides.

Por último, en el caso del pimiento se pudo determinar que el alcohol bencílico afecta a nivel de la proliferación celular y de la desorganización. Sin embargo, pese a la elevada

recalcitrancia de esta especie, los resultados no se tradujeron en un rendimiento final en la obtención de callos o embriones.

|

5. CONCLUSIONES

1. El alcohol bencílico a una concentración óptima podría actuar como inductor de la embriogénesis de microsporas, como se ha confirmado en el caso de la berenjena.
2. El alcohol bencílico causa un incremento significativo de la proliferación celular en el caso del pimiento.
3. El alcohol bencílico induce la ruptura de la pared de exina, probablemente debido al aumento de la permeabilidad de las membranas celulares.
4. En el caso de la berenjena, aplicar alcohol tras la inducción causa mayor desorganización de las estructuras que si se aplica desde el aislamiento.
5. La desorganización no es una consecuencia de la proliferación celular.
6. Concentraciones altas de alcohol bencílico parecen tener un efecto tóxico sobre el desarrollo de los embriones de colza.
7. El alcohol bencílico afecta negativamente al rendimiento en embriones de colza y callos de berenjena. Sin embargo, el alcohol bencílico incrementa la velocidad de desarrollo de los embriones de colza y el tamaño de los callos de berenjena.
8. Para aprovechar todas las posibles ventajas que pueda tener el uso de alcohol bencílico en cultivos de microsporas aisladas, es importante determinar para cada especie la concentración óptima de alcohol bencílico, así como el momento en el que debe aplicarse al medio de cultivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALPSOY, H.C. y SENIZ, V. (2007). Researches on the *in vitro* androgenesis and obtaining haploid plants in some eggplant genotypes. *Acta Horticulturae*, 729: 137-141.
- ALLENDER, C.J. y KING, G.J. (2010). ROesreiagrchi nartsic leof the amphiploid species *Brassica napus* L. investigated by chloroplast and nuclear molecular markers. *BMC Plant Biology*, 10:
- ASIF, M. (2013a). Applications and uses of haploids, en: *Progress and opportunities of doubled haploid production*. (ed.)^(eds.). SpringerBriefs in Plant Science.
- ASIF, M. (2013b). History, production methods, and typesm of haploids, en: *Progress and opportunities of doubled haploid production*. Asif, M. (ed.)^(eds.). Asif, M.ial SpringerBriefs in Plant Science. 1-6.
- ASHCROFT, R.G.; COSTER, H.G.L. YSMITH J.R. (1977). The molecular organisation of bimolecular lipid membranes. The effect of benzyl alcohol on the structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,469: 13-22.
- ATANASSOVA, B. y GEORGIEV, H. (2006). Expression of heterosis by Hybridization. , en: *Genetic improvement of Solanaceous Crops*. (ed.)^(eds.). Science Publishers. Enfield, NH, USA. 113-151.
- BAJAJ, Y.P.S. (1990). *In vitro* production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding, en: *Haploids in crop improvement I*. Bajaj, Y.P.S. (ed.)^(eds.). Bajaj, Y.P.S.ial Springer-Verlag. Berlin, 3-44.
- BAL, U.; ELLIALTIOGLU, S. y ABAK, K. (2009). Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured *in vitro*. *Scientia Agricola*, 66: 535-539.
- BHOJWANI, S.S. y DANTU, P.K. (2003). Androgenesis, en: *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. (ed.)^(eds.). Springer. India, 93-111.
- BINAROVA, P.; HAUSE, G.; CENKLOVA, V.; CORDEWENER, J.H.G. y VAN LOOKEREN-CAMPAGNE, M.M. (1997). A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. *Sexual Plant Reproduction*, 10: 200-208.
- BOHANEC, B. (2009). Doubled Haploids via Gynogenesis, en: *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Touraev, A.F., BP Jain, SM (ed.)^(eds.). Touraev, A.F., BP Jain, SMial Springer. 35-46.
- CAO, M.Q.; LI, Y.; LIU, F.; JIANG, T. y LIU, G.S. (1995). Application of anther culture and isolated microspore culture to vegetable crop improvement. *Acta Horticulturae*, 392: 27-38.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P.; NUEZ, F. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2008). Recent advances in eggplant microspore culture for production of androgenic doubled haploids, en: *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs*. Prohens, J. y Badenes, M.L. (ed.)^(eds.). Prohens, J. y Badenes, M.L.ial Editorial de la Universitat Politècnica de València. Valencia, Spain, 104-108.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010). Improvement in doubled haploids production through *in vitro* culture of isolated eggplant microspores, en: *Advances in genetics and breeding of Capsicum and Eggplant*. Prohens, J. y Rodríguez-Burruezo, A.

- (ed.)^(eds.). Prohens, J. y Rodríguez-Burruezo, A.ial Editorial de la Universitat Politècnica de València. Valencia, Spain, 369-374.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*, 187: 47-61.
- CROSBY, K.M. (2008). Pepper, en: *Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae*. Prohens, J. y Nuez, F. (ed.)^(eds.). Prohens, J. y Nuez, F.ial Springer New York. New York, NY, 221-248.
- CUBERO, J.I. (2003). *Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Spain. pp.
- CUSTERS, J. (2003). Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.), en: *Doubled haploid production in crop plants*. Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. y Szarejko, I. (ed.)^(eds.). Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P. y Szarejko, I.ial Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 185-193.
- CUSTERS, J.B.M.; CORDEWENER, J.H.G.; NÖLLEN, Y.; DONS, J.J. y VAN LOOKEREN-CAMPAGNE, M.M. (1994). Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13: 267-271.
- CHENG, Y.; MA, R.; JIAO, Y.; QIAO, N. y LI, T. (2013). Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.)☆. *South African Journal of Botany*, 88: 306-309.
- DEVI, C.P.; MUNSHI, A.D.; BEHERA, T.K.; CHOUDHARY, H.; VINOD.; GURUNG, B. y SAHA, P. (2015). Cross compatibility in interspecific hybridization of eggplant, *Solanum melongena*, with its wild relatives. *Scientia Horticulturae*, 193: 353-358.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. y POCHARD, E. (1981). *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) anthers. High-rate plant production from different genotypes by +35°C treatments. *Agronomie*, 1: 859-864.
- DUMAS DE VAULX, R.; POCHARD, E. y CHAMBONNET, D. (1982). Distribution of TMV-susceptible and resistant doubled haploid lines from anther culture of heterozygous L⁺/L¹ hybrids. *Capsicum Newsletters*, 1: 52-53.
- DUNWELL, J.M. (1985). Embryogenesis from pollen in vitro, en: *Biotechnology in plant science, relevance to agriculture in the eighties*. Zaitlin, M., Day, P. y Hollaender, A. (ed.)^(eds.). Zaitlin, M., Day, P. y Hollaender, A.ial Academic Press Inc. San Diego, New York, 49-76.
- DUNWELL, J.M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8: 377-424.
- DWIVEDI, S.L.; BRITT, A.B.; TRIPATHI, L.; SHARMA, S.; UPADHYAYA, H.D. y ORTIZ, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*, 33: 812-829.
- EBIHARA, L.; HALL, J. E.; MACDONALD, R.C.; MCINTOSH, T.J. y S A SIMON. (1979). Effect of benzyl alcohol on lipid bilayers. A comparisons of bilayer systems. *Biophysical journal* 28(2): 185-196.
- FEHER, A. (2015). Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1849: 385-402.
- FERRIE, A. y CASWELL, K. (2011). Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 301-309.

- FERRIE, A. y MÖLLERS, C. (2011). Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. for genetic and genomic research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 375-386.
- FLAKELAR, C.L.; LUCKETT, D.J.; HOWITT, J.A.; DORAN, G. y PRENZLER, P.D. (2015). Canola (*Brassica napus*) oil from Australian cultivars shows promising levels of tocopherols and carotenoids, along with good oxidative stability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 42: 179-186.
- FORSTER, B.P.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.J. y TOURAEV, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12: 368-375.
- GEORGE, L. y NARAYANASWAMY, S. (1973). Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. *Protoplasma*, 78: 467-470.
- GERMANÀ, M.A. (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 283-300.
- GERMANÀ, M.A. (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30: 839-857.
- GERMANÀ, M.A. y CHIANCONE, B. (2001). Gynogenetic haploids of *Citrus* after in vitro pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 59-66.
- GU, H.H.; HAGBERG, P. y ZHOU, W.J. (2004). Cold pretreatment enhances microspore embryogenesis in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Growth Regulation*, 42: 137-143.
- GUHA, S. y MAHESHWARI, S.C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.
- HAUSE, B.; VAN VEENENDAAL, W. L. H.; HAUSE, G. Y VAN LAMMEREN, A. A. M. Expression of polarity during early development of microspore-derived and zygotic embryos of *Brassica napus* L cv. Topas. *Botanica Acta*, 107(6):407-415.
- HEISER, C.B. y SMITH, P.G. (1953). The Cultivated *Capsicum* Peppers. *Economic Botany*, 7: 214-227.
- HOEKSTRA, S.; VANZIJDVELD, M.H.; LOUWERSE, J.D.; HEIDEKAMP, F. y VANDERMARK, F. (1992). Anther and Microspore Culture of *Hordeum-Vulgare* L Cv Igri. *Plant Science*, 86: 89-96.
- HUANG, B.; BIRD, S.; KEMBLE, R.; MIKI, B. y KELLER, W. (1991). Plant regeneration from microspore-derived embryos of *Brassica napus*: Effect of embryo age, culture temperature, osmotic pressure, and abscisic acid. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 27: 28-31.
- IBIZA, V.P.; BLANCA, J.; CAÑIZARES, J. y NUEZ, F. (2012). Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59: 1077-1088.
- IRIKOVA, T.; GROZEVA, S. y RODEVA, V. (2011). Anther culture in pepper (*Capsicum annum* L.) in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1559-1570.
- IRIKOVA, T.P.; KINTZIOS, S.; GROZEVA, S. y RODEVA, V.N. (2016). Pepper (*Capsicum annum* L.) anther culture: fundamental research and practical applications. *Turkish Journal of Biology*, 40: 719-726.
- ISLAM, S.M.S. y TUTEJA, N. (2012). Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science*, 182: 134-144.
- JÄHNE, A. y LÖRZ, H. (1995). Cereal microspore culture. *Plant Science*, 109: 1-12.

- KASHYAP, V.; KUMAR, S.V.; COLLONNIER, C.; FUSARI, F.; HAICOUR, R.; ROTINO, G.L.; SIHACHAKR, D. y RAJAM, M. (2003). Biotechnology of eggplant. *Scientia Horticulturae*, 97: 1-25.
- KELLER, W.A.; ARMSTRONG, K.C. y I., D.L.R.A. (1983). The Production and Utilization of Microspore-Derived Haploids in *Brassica* Crops, en: *Plant Cell Culture in Crop Improvement*. Sen, S.K. y Giles, K.L. (ed.)^(eds.). Sen, S.K. y Giles, K.L.ial Springer US. 169-183.
- KIM, M.; JANG, I.-C.; KIM, J.-A.; PARK, E.-J.; YOON, M. y LEE, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27: 425-434.
- KOBAYASHI, T.; HIGASHI, K. y KAMADA, H. (2000). Inhibitory effects of *p*-hydroxybenzyl alcohol on somatic embryogenesis in carrot cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*, 17: 87-92.
- KOBAYASHI, T.; HIGASHI, K. y KAMADA, H. (2001). Stimulatory and inhibitory conditioning factors that regulate cell proliferation and morphogenesis in plant cell cultures. *Plant Biotechnology Journal*, 18: 93-99.
- KRAFT, K.H.; BROWN, C.H.; NABHAN, G.P.; LUEDELING, E.; LUNA RUIZ, J.D.J.; COPPENS D'EECKENBRUGGE, G.; HIJMANS, R.J. y GEPTS, P. (2014). Multiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in Mexico. *PNAS*, 111: 6165-6170.
- LANTOS, C.; JUHASZ, A.G.; VAGI, P.; MIHALY, R.; KRISTOF, Z. y PAUK, J. (2012). Androgenesis induction in microspore culture of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Biotechnology Reports*, 6: 123-132.
- LESTER, R.N. y HASAN, S.M.Z. (1991). Origin and domestication of the brinjal-eggplant, *Solanum melongena*, from *S. incanum* in Africa and Asia, en: *Solanaceae III: taxonomy, chemistry, evolution*. Hawkes, J.H., Lester, R.N., Nee, M. y Estrada, N. (ed.)^(eds.). Hawkes, J.H., Lester, R.N., Nee, M. y Estrada, N.ial The Royal Botanic Gardens Kew. Richmond, UK, 369-387.
- LICHTER, R. (1981). Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 103: 229-237.
- LICHTER, R. (1982). Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 105: 427-434.
- LIM, T.K. (2013). en: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. (ed.)^(eds.). Springer Netherlands. 72-104.
- MEYER, R.S.; KAROL, K.G.; LITTLE, D.P.; NEE, M.H. y LITT, A. (2012). Phylogeographic relationships among Asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 63: 685-701.
- MISHRA, R. y RAO, G.J.N. (2016). In-vitro androgenesis in rice: Advantages, constraints and future prospects. *Rice Science*, 23: 57-68.
- MIYOSHI, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.
- NITSCH, J.P. y NITSCH, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- NOVAK, F.J. (1974). Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* sp. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung - Journal of Plant Breeding*, 72: 46-54.

- ORTIZ, R.; DELGADO DE LA FLOR, F.; ALVARADO, G. y CROSSA, J. (2010). Classifying vegetable genetic resources—A case study with domesticated *Capsicum spp.* *Scientia Horticulturae*, 126: 186-191.
- ÖRVAR, B.L.; SANGWAN, V.; OMANN, F. y DHINDSA, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23: 785-794.
- PARRA-VEGA, V.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; RIVAS-SENDRA, A. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (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: 1018.
- PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2013a). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum L.*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 627-633.
- PARRA-VEGA, V.; PALACIOS-CALVO, N.; CORRAL-MARTÍNEZ, P. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010). Establishment of isolated microspore cultures in pepper of the California and Lamuyo types, en: *Advances in genetics and breeding of Capsicum and Eggplant*. Prohens, J. y Rodríguez-Burruezo, A. (ed.)^(eds.). Prohens, J. y Rodríguez-Burruezo, A.ial Editorial de la Universitat Politècnica de València. Valencia, Spain, 411-415.
- PARRA-VEGA, V.; RENAU-MORATA, B.; SIFRES, A. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2013b). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum L.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112: 353-360.
- PAULS, K.P.; CHAN, J.; WORONUK, G.; SCHULZE, D. y BRAZOLOT, J. (2006). When microspores decide to become embryos - cellular and molecular changes. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84: 668-678.
- PECHAN, P.M. y KELLER, W.A. (1988). Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 74: 377-384.
- PICKERSGILL, B. (1997). Genetic resources and breeding of *Capsicum spp.* *Euphytica*, 96: 129-133.
- PINK, D.; BAILEY, L.; MCCLEMENT.; P., H.; E., M.; BUCHANAN-WOLLASTON, V.; ASTLEY, D.; KING, G. y TEAKLE, G. (2008). Double haploids, markers and QTL analysis in vegetable brassicas. *Euphytica*, 164: 509-514.
- PRATAP, A.; GUPTA, S.K. y TAKAHATA, Y. (2009). Microsporogenesis and haploidy breeding, en: *Biology and Breeding of Crucifers*. Gupta, S.K. (ed.)^(eds.). Gupta, S.K.ial CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 293-307.
- PREM, D.; SOLÍS, M.T.; BÁRÁNY, I.; RODRÍGUEZ-SANZ, H.; RISUEÑO, M.C. y TESTILLANO, P.S. (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:
- RAINA, S.K. y IYER, R.D. (1973). Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena L.* *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung - Journal of Plant Breeding*, 70: 275-280.
- REYNOLDS, T.L. (2000). Effects of calcium on embryogenic induction and the accumulation of abscisic acid, and an early cysteine-labeled metallothionein gene in androgenic microspores of *Triticum aestivum*. *Plant Science*, 150(2):201-207.

- REYNOLDS, T.L. (1997). Pollen embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 33: 1-10.
- RIVAS-SENDRA, A.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2015). Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122: 759-765.
- ROTINO, G.L. (1996). Haploidy in eggplant, en: *In vitro haploid production in higher plants*. Jain, S.M., Sopory, S.K. y Veilleux, R.E. (ed.)^(eds.). Jain, S.M., Sopory, S.K. y Veilleux, R.E.ial Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 115-141.
- ROTINO, G.L.; SIHACHAKR, D.; RIZZA, F.; VALE, G.; TACCONI, M.G.; ALBERTI, P.; MENNELLA, G.; SABATINI, E.; TOPPINO, L.; D'ALESSANDRO, A. y ACCIARRI, N. (2005). Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27: 723-733.
- S., S.A.V.S. (2005). *Taxonomy of Angiosperms*. I. K. International Publishing House. New Delhi. pp.
- SAIDI, Y.; FINKA, A.; MURISSET, M.; BROMBERG, Z.; WEISS, Y.G.; MAATHUIS, F.J.M. y GOLOUBINOFF, P. (2009). The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *Plant Cell*, 21: 2829-2843.
- SALAS, P.; RIVAS-SENDRA, A.; PROHENS, J. y SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184: 235-250.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010). Androgenesis revisited. *The Botanical Review*, 76: 377-404.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V. y GONZÁLEZ-GARCÍA, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30: 765-778.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F. (2008a). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. y NUEZ, F. (2008b). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetic and Genome Research*, 120: 358-369.
- SHARIATPANAHI, M.E.; BAL, U.; HEBERLE-BORS, E. y TOURAEV, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127: 519-534.
- SHIGAPOVA, N.; TÖRÖK, Z.; BALOGH, G.; GOLOUBINOFF, P.; VÍGH, L. y HORVÁRTH, I. (2005). Membrane fluidization triggers membrane remodeling which affects the thermotolerance in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328: 1216-1223.
- SHMYKOVA, N.A.; SHUMILINA, D.V. y SUPRUNOVA, T.P. (2016). Doubled Haploid Production in *Brassica L.* Species. *Russian Journal of Genetics*, 6: 68-77.
- SHULL, G.H. (1911). Experiments with maize. *Botanical Gazette*, 52: 480-483.
- SMYKAL, P. (2000). Pollen embryogenesis - the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum*, 43: 481-489.

- SMYKAL, P. y PECHAN, P.M. (2000). Stress, as assessed by the appearance of sHsp transcripts, is required but not sufficient to initiate androgenesis. *Physiologia Plantarum*, 110: 135-143.
- SUPENA, E.D.J.; MUSWITA, W.; SUHARSONO, S. y CUSTERS, J.B.M. (2006). Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107: 226-232.
- TELMER, C.A.; NEWCOMB, W. y SIMMONDS, D.H. (1993). Microspore development in *Brassica napus* and the effect of high temperature on division in vivo and in vitro. *Protoplasma*, 172: 154-165.
- THOMAS, E. y WENZEL, G. (1975). Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Z Pflanzenzucht*, 74: 77-81.
- TOURAEV, A.; FORSTER, B.P. y JAIN, S.M. (2009). *Advances in haploid production in higher plants*. Springer Science + Business Media. New York. pp.
- TOURAEV, A.; PFOSSER, M. y HEBERLE-BORS, E. (2001). The microspore: A haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109.
- WANG, Y.-Y.; SUN, C.-S.; WANG, C.-C. y CHIEN, N.-F. (1973). The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Scientia Sinica*, 16: 147-151.
- ZAKI, M.A. y DICKINSON, H.G. (1990). Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 156: 149-162.