

UNIVERSITAT DE POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA - UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Ambiente

Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana

Máster en Mejora Genética Vegetal



Estudio del efecto del TSA en cultivos de microsporas de colza y pimiento

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Autora: **Mireia Albiñana Palacios**

Director: José María Seguí Simarro

Directora experimental: Alba Rivas i Sendra

València, septiembre de 2016



FORMULARIO DEPÓSITO TRABAJO FINAL DE MÁSTER

AUTOR	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	DNI/NIE
	Albiñana	Palacios	Mireia	20856061-Y
DIRECTOR/ES	1 ^{er} APELLIDO	2 ^o APELLIDO	NOMBRE	
	Seguí	Simarro	José María	
	Rivas	Sendra	Alba	
UNIVERSIDAD		MÁSTER		
UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA		Mejora Genética Vegetal		
TÍTULO DE LA TESIS				
Estudio del efecto del TSA en cultivos de microsporas de colza y de pimiento				
RESUMEN	<p>El cultivo de microsporas es una técnica muy útil en mejora vegetal para obtener individuos dobles haploides de forma más rápida y económica que mediante cruces convencionales. Esta técnica se ha estudiado en muchas especies y se ha confirmado que depende de diversos factores como el genotipo, las condiciones de cultivo, de la planta donante de microsporas, etc. La eficiencia del cultivo de microsporas se puede mejorar modificando los factores anteriores, pero también mediante el uso de compuestos que la aumentan. Uno de estos compuestos es la tricostatina A (TSA). Es un inhibidor de la histona desacetilasa, lo que provoca un cambio en la epigenética de la célula y activa algunos genes. Además, provoca un aumento de la eficiencia en embriogénesis, aumentando el número de embriones y de células en división en el cultivo. En el presente trabajo se evalúan los efectos, tanto a nivel de respuesta embriogénica como a nivel celular, del TSA en cultivos de microsporas de colza y de pimiento.</p> <p>Por ello, se realizaron diversos cultivos de microsporas de colza y de pimiento y se aplicaron diferentes tratamientos (control, con DMSO, con 0'05 µM de TSA y con 0'5 µM de TSA). Las microsporas se procesaron para ser cortadas y observadas mediante microscopía óptica, aplicando cuatro tinciones distintas: azul de toluidina, azul coomassie, yodo-yoduro potásico o lugol (lugol) y Sudan Black.</p>			
	(español)	<p>Microspore culture is a useful tool to produce doubled haploid individuals for plant breeding in a way cheaper and faster than through conventional crosses. This technique has been studied in many species and it depends on several factors, such as genotype, culture and donor plant conditions, etc. Efficiency of microspore cultures can be improved by modifying the above factors, but also by using compounds that increase such efficiency. One of these compounds is trichostatin A (TSA). It is a histone deacetylase inhibitor, which causes a change in the cell epigenetics and activates some genes. Also causes an increase in embryogenesis efficiency, increasing the number of embryos and dividing cells in culture. In this research, the effects of TSA, in terms of embryogenesis efficiency and at the cellular level, have been evaluated in cultured microspores of rapeseed and pepper.</p> <p>For this, rapeseed and pepper microspore cultures were subjected to different treatments (control, DMSO, 0.05 µM TSA and 0.5 µM TSA). Cultured microspores were processed and sectioned for observation at the light microscope, stained with four different dyes: toluidine blue, coomassie blue, iodine-potassium iodide and Sudan Black.</p>		
(inglés)				



PALABRAS CLAVE	DESCRIPTORES EN ESPAÑOL											
	Cultivo de microsporas ; colza ; pimiento ; TSA ; dobles haploides ; lípidos. (mínimo tres)											
	DESCRIPTORES EN INGLÉS											
	Microspores culture ; rape ; pepper ; TSA ; doubled haploid; lipids. (mínimo tres)											
CLASIFICACIÓN DE LA UNESCO	Códigos UNESCO: http://tecnura.udistrital.edu.co/downloads/formatos/Codigos_UNESCO.pdf											
	<table border="1"><thead><tr><th>CAMPO</th><th>DISCIPLINA</th><th>SUBDISCIPLINA</th></tr></thead><tbody><tr><td>31</td><td>7</td><td>6</td></tr><tr><td>24</td><td>9</td><td>91</td></tr><tr><td>24</td><td>17</td><td>92</td></tr></tbody></table> (máximo tres áreas de conocimiento)	CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA	31	7	6	24	9	91	24	17
CAMPO	DISCIPLINA	SUBDISCIPLINA										
31	7	6										
24	9	91										
24	17	92										

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de la realización de este trabajo me han apoyado muchas personas y, sin ellas, dicho trabajo no hubiera sido posible. Por ello, creo que es necesario dedicarles una parte del trabajo como agradecimiento.

En primer lugar, agradecer el apoyo a mi familia, que siempre me han animado a seguir esforzándome más y a superarme. En segundo lugar, mencionar los ánimos recibidos por mis amigos y mis compañeros del máster, en especial a Bea, Estefanía y Alberto. Gracias a ellos, han aumentado el número de recuerdo agradables en estos dos años.

Por supuesto, agradecer a Jose María Seguí por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio y de ampliar mis conocimientos. También me gustaría dar las gracias a mis compañeros de laboratorio, Alberto, Alba, Edgar, Buse, Estefanía, Patricia y Merche, pero en especial a Alba y Edgar quienes me recibieron con los brazos abiertos y han dedicado mucho tiempo a enseñarme, a analizar los resultados y a resolver los problemas que surgieron durante la realización del trabajo.

Por último, agradecer a Nando todo su apoyo, no sólo durante la realización del TFM, sino a lo largo de toda la vida universitaria.

**Estudio del efecto del TSA en
microsporas de colza y pimiento**

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. <i>Mejora Genética vegetal: las líneas puras.</i>	1
1.2. <i>Haploides y dobles haploides.</i>	2
1.2.1. <i>Importancia de los haploides y los dobles haploides.</i>	2
1.2.2. <i>Obtención de dobles haploides.</i>	3
1.3. <i>Colza.</i>	5
1.3.1. <i>Taxonomía.</i>	5
1.3.2. <i>Características botánicas.</i>	6
1.3.3. <i>Importancia económica y científica.</i>	6
1.3.4. <i>Avances y estado actual en colza.</i>	7
1.4. <i>Pimiento dulce.</i>	8
1.4.1. <i>Taxonomía.</i>	8
1.4.2. <i>Características botánicas.</i>	8
1.4.3. <i>Importancia económica y científica.</i>	10
1.4.4. <i>Avances y estado actual en pimiento.</i>	11
1.5. <i>Métodos de inducción de embriogénesis en microsporas.</i>	11
1.5.1. <i>Cultivo de anteras.</i>	12
1.5.2. <i>Cultivo de microsporas aisladas.</i>	13
1.6. <i>Tricostatina A (TSA).</i>	14
2. OBJETIVOS.	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	19
3.1. <i>Material vegetal.</i>	19
3.1.1. <i>Colza.</i>	19
3.1.2. <i>Pimiento.</i>	19
3.2. <i>Condiciones de cultivo.</i>	19
3.2.1. <i>Colza.</i>	19
3.2.2. <i>Pimiento.</i>	19
3.3. <i>Cultivo de microsporas.</i>	20
3.3.1. <i>Colza.</i>	20
3.3.2. <i>Pimiento.</i>	21
3.4. <i>Estudio del número de núcleos.</i>	23
3.5. <i>Preparación de compuestos tóxicos.</i>	23
3.5.1. <i>Preparación de tetróxido de osmio.</i>	24
3.5.2. <i>Preparación de resina SPURR.</i>	24
3.6. <i>Fijación de la muestra.</i>	25
3.7. <i>Postfijación con tetróxido de osmio.</i>	25
3.8. <i>Inclusión en gelatina.</i>	25
3.9. <i>Inclusión en resina.</i>	26
3.10. <i>Realización de cortes para microscopía óptica.</i>	27
3.10.1. <i>Preparación de cuchillas de vidrio.</i>	27
3.10.2. <i>Mecanismo y uso del ultramicrotomo.</i>	28
3.11. <i>Tinciones.</i>	31
3.11.1. <i>Azul de toluidina (TB).</i>	31
3.11.2. <i>Azul coomassie (CB).</i>	31
3.11.3. <i>Sudan Black (SB).</i>	31
3.11.4. <i>Yodo-Yoduro potásico o lugol (L).</i>	32
3.12. <i>Visualización de la muestra.</i>	33

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	35
4.1. Estudio de la tinción con DAPI.	35
4.2. Colza.	36
4.2.1. Resultado de las tinciones.	42
4.2.2. Comparación de muestras teñidas con Sudan Black y sin teñir.	44
4.2.3. Comparación de muestras postfijadas con osmio y sin postfijar.	46
4.3. Pimiento.	48
4.3.1. Comparación de muestras teñidas con Sudan Black y sin teñir.	49
4.3.2. Comparación de muestras post-fijadas con osmio y sin post-fijar.	51
4.3.3. Tinción con lugol.	54
5. CONCLUSIONES.	57
6. BIBLIOGRAFÍA.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distintas rutas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora o polen hacia la androgénesis	4
Figura 2 - Flores y yemas de las plantas de colza del laboratorio de Biología Celular del COMAV	6
Figura 3 - Yemas y anteras de las plantas de pimiento del laboratorio de Biología Celular del COMAV	9
Figura 4 – Esquema de la inducción de androgénesis a partir de microsporas	12
Figura 5 – Mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica.....	14
Figura 6 - Cortador de barras de vidrio y partes del mismo	27
Figura 7 - Ultramicrotomo y partes del mismo	28
Figura 8 - Ultramicrotomo y proceso de realización de cortes.....	30
Figura 9 - Microsporas de colza pertenecientes al grupo control y al tratamiento con DMSO. Fotos de campo claro y fluorescencia para el DAPI	35
Figura 10 - Diferentes estructuras presentes en los cultivos de microsporas de colza.	36
Figura 11- Diferentes tipos de glóbulos identificados en el interior de las células de colza con microscopía electrónica de transmisión	39
Figura 12 - Detalle de las estructuras de colza obtenidas con tratamientos con DMSO, con 0,05 μ M de TSA y con 0,5 μ M de TSA	40
Figura 13 - Microsporas de colza tratadas con DMSO postfijadas con OsO_4 , en las que no se aprecia polarización de glóbulos y almidón, y en las que sí.....	41
Figura 14 - Embriones de colza obtenidos tras el tratamiento con DMSO y 0,05 μ M de TSA....	41
Figura 15 - Resultado de las tinciones realizadas sobre microsporas de colza tratadas con tres tratamientos distintos.	43
Figura 16 – Comparación de estructuras de colza teñidas con Sudan Black y no teñidas.....	44
Figura 17 – Microsporas de colza pertenecientes al tratamiento control, postfijadas con tetróxido de osmio. Sin teñir y teñidas con Sudan Black.	45
Figura 18 - Microsporas de colza tratadas con DMSO y postfijadas con tetróxido de osmio. Sin teñir y teñidas con Sudan Black	46

Figura 19 – Microsporas de colza postfijadas con OsO ₄ y no fijadas.	47
Figura 20 - Microsporas de colza correspondientes al tratamiento control y al tratamiento con DMSO. Teñidas con Sudan Black y sin teñir	48
Figura 21 – Microsporas de colza del tratamiento control, tratadas con DMSO, tratadas con 0,05 μM de TSA y tratadas con 0,5 μM de TSA. Todas las muestras han sido postfijadas con OsO ₄	50
Figura 22 – Microsporas de pimiento del tratamiento control, tratadas con DMSO, tratadas con 0,05 μM de TSA y tratadas con 0,5 μM de TSA. Ninguna de las muestras ha sido postfijada con OsO ₄	52
Figura 23 - Microsporas de pimiento tratadas con 0,05 μM de TSA, sin postfijar con OsO ₄ y postfijadas	53
Figura 24 - Microsporas de pimiento tratadas con 0,5 μM de TSA. Se señalan pequeños glóbulos	53
Figura 25 - Microsporas de colza y de pimiento tratadas con 0,5 μM de TSA. En la primera columna se muestran las fotos en campo claro y en la segunda, en contraste de fases.	54
Figura 26 - Microsporas de colza del tratamiento control, tratadas con DMSO, tratadas con 0,05 μM de TSA y tratadas con 0,5 μM de TSA. Ninguna de las muestras ha sido postfijada con OsO ₄	55

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 - Producción mundial de colza entre los años 1994 y 2014	7
Gráfica 2 - Rendimiento mundial de colza entre los años 1994 y 2014.....	7
Gráfica 3 - Producción mundial de chiles, pimiento picante y pimiento (verde) entre los años 1994 y 2014.....	10
Gráfica 4 - Rendimiento mundial de colza entre los años 1994 y 2014.....	10
Gráfica 5 - Porcentaje de estructuras en no división y en división en cada tratamiento y cultivo de colza.....	38
Gráfica 6 - Porcentaje de las estructuras de colza que no muestran divisiones.....	38
Gráfica 7 - Porcentaje de las diferentes estructuras de colza en división respecto al total de estructuras que muestran divisiones	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Clasificación taxonómica de la colza	5
Tabla 2 - Clasificación taxonómica del pimiento dulce	8
Tabla 3 - Componentes del medio para el cultivo de microsporas de colza.....	21
Tabla 4 - Componentes de los medios utilizados para el cultivo de microsporas de pimiento ..	23
Tabla 5 - Componentes y cantidades para la preparación de resina SPURR	24
Tabla 6 - Pasos realizados para la inclusión en resina SPURR, tanto de forma manual como con el procesador de tejidos.....	26

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Mejora Genética vegetal: las líneas puras.

Se podría decir que la mejora vegetal se inició al mismo tiempo que la agricultura. El ser humano pretendía abastecerse sin alejarse mucho del hogar, por lo que, al principio de forma inconsciente, se produjo una coevolución en la que se mejoraba de forma conjunta la especie cultivada como la forma de trabajarla, ya sean herramientas o técnicas. Con el paso de los siglos, los genotipos domesticados han ido transformándose según el objetivo de los agricultores: mayor número de frutos, mayor tamaño de éstos, mayor resistencia a estreses abióticos y/o bióticos, mejor características organolépticas... Gracias a los descubrimientos y a los conocimientos adquiridos en las últimas décadas, esta mejora se puede dirigir para obtener un mejor resultado en menor tiempo.

El objetivo de la mejora genética vegetal es, mediante la detección, selección y/o manipulación de los genes de las especies, obtener individuos mejorados en el aspecto deseado y que permita una necesidad de la población, o bien solucionar un problema.

Debido a que, en sus inicios, las selecciones de las mejores características eran más bien intuitivas, los individuos seleccionados de un cultivo eran heterocigotos y heterogéneos entre sí. La ventaja de tener un cultivo heterogéneo es que, ante un cambio brusco en las condiciones de cultivo, cuya causa más probable es el clima, ofrece una alta posibilidad de supervivencia o adaptación a esas nuevas condiciones. Por otra parte, un cultivo homogéneo tiene otras ventajas apreciadas por los agricultores, como la homogeneidad en la floración, maduración y recolección en la cosecha, así como en otros estadios del cultivo. La producción también suele ser estable a lo largo de los años de cultivo, o más bien, las diferencias que se aprecian en la producción suelen ser debidas en mayor parte a la variación ambiental y no genética. Por estas razones, desde hace ya unos años, se están explotando lo que se conoce como líneas puras.

Una línea pura es un conjunto de individuos, los cuales son homocigotos para todos sus loci, característica que es transmitida a la descendencia. Estas líneas se llevan usando desde el siglo XX para eliminar genes indeseados o en programas de mejora de selección recurrente. A pesar de esto, se prefiere el uso de individuos heterocigotos debido a su vigor híbrido. Este concepto, que también es conocido como heterosis, hace referencia a la superioridad, en lo que a caracteres de interés se refiere, de un individuo obtenido mediante el cruce de otros dos individuos alejados entre sí. Es decir, es la idea contraria a la consanguinidad. La heterosis se puede estudiar y utilizar en los programas de mejora mediante el cruzamiento de dos líneas puras. Mediante este cruce se obtendría híbridos homogéneos entre sí, ya que dicho cruce produciría siempre la misma combinación genética (Cubero 2003).

El hecho de utilizar híbridos obtenidos mediante un cruce entre dos líneas puras, ofrece ciertos puntos positivos. Uno de ellos, respecto a los agricultores, es la homogeneidad del cultivo. Otro punto, respecto a los productores de semillas, es que la siguiente generación al híbrido sería una generación heterogénea y heterocigota, debido a la segregación de los distintos

1. *Introducción.*

genes. Esto favorece la compra de semillas híbridas y, por tanto, el mantenimiento de las líneas puras que actúan como parentales resulta muy importante.

Tradicionalmente, las líneas puras se han obtenido mediante varios ciclos de fecundación de los individuos seleccionados de una población. Este método, a pesar de ser costoso en tiempo, dinero y personal, ya que hasta la obtención de la línea pura final pasan varios años, es el método más usado y más aceptado en la población. No obstante, mediante estos ciclos de autofecundación no se obtiene un individuo 100% homocigoto, ya que algunos genes se encuentran muy ligados entre sí, siendo imposible (o muy poco frecuente) la recombinación y, por tanto, lograr una completa homocigosis (Martín 2002). Actualmente, existen métodos alternativos a los ciclos de autofecundación con los que es posible obtener individuos 100%. Uno de esos métodos consiste en la obtención de individuos dobles haploides, el cual se explica a continuación.

1.2. *Haploides y dobles haploides.*

Para la obtención de dobles haploides, primero es necesario obtener individuos haploides. Estos son individuos que cuentan con la mitad de la dotación cromosómica que otro miembro de su especie, es decir, tienen la mitad de cromosomas de los que debería. Por lo general, todas las células de un organismo tienen un número de copias par de cromosomas, a excepción de los gametos. Es necesario que estos cuenten con la mitad de cromosomas para mantener constante la dotación cromosómica de las especies a lo largo de las generaciones. En la naturaleza, la fusión de gametos produce un nuevo organismo con una nueva combinación genética, pero puede darse el caso de no producirse la fusión y obtenerse un individuo haploide. Este individuo puede tener dos orígenes: se puede haber originado a partir del gameto femenino, proceso que se llama ginogénesis, o a partir del gameto masculino, proceso denominado androgénesis.

Si el individuo haploide producido, sufre una duplicación cromosómica, pasaría a tener la misma dotación cromosómica que los otros miembros de su especie que han sufrido la fusión de gametos con la diferencia que sería un individuo 100% homocigoto. Este nuevo individuo es lo que se conoce como un doble haploide (Germanà 2006). Este proceso de duplicación puede producirse de forma natural, es decir, espontánea en la naturaleza, o mediante inducción.

1.2.1. *Importancia de los haploides y los dobles haploides.*

El principal uso de haploides es la obtención de líneas doble haploides para su uso en el marco de programas de mejora o para estudios de investigación básica. Como ya se ha comentado anteriormente, la obtención de individuos homocigotos mediante ciclos de fecundación necesita varias generaciones para conseguir un nivel de homocigosis suficientemente alto (unas 7 u 8 generaciones). Esto conlleva mucho tiempo, además de un gasto económico importante. Con la obtención de dobles haploides, el tiempo necesario para la obtención de un individuo 100% homocigoto es únicamente de una generación, lo que conlleva además una reducción de los costes. Otra utilidad de los dobles haploides es que son útiles en el mapeo de genes complejos como es la producción. También son utilizados en transgénesis, ya que

permite la transformación de un gen, el cual, al sufrir después la duplicación cromosómica, se encontrará en homocigosis (Seguí-Simarro 2010).

En lo que respecta a la investigación básica, estas líneas son útiles en estudios de distancias génicas y de frecuencias de recombinación entre genes. Es cierto que estos estudios también se pueden realizar con líneas que no sean dobles haploides, pero éstas cuentan con la ventaja de que pueden ser mantenidas mediante autofecundaciones. También son interesantes como herramienta de búsqueda y selección de genes mutantes recesivos, los cuales se verían enmascarados en individuos heterocigotos (Wedzony, *et al.* 2009). Los dobles haploides también son utilizados como sistemas modelos en estudios del desarrollo de embriones *in vitro* sin que el tejido materno interfiera en el estudio (Seguí-Simarro 2010).

1.2.2. Obtención de dobles haploides.

Los individuos haploides aparecen de forma espontánea en algunas especies, aunque con una frecuencia extremadamente baja y difícil de predecir. Actualmente se conocen condiciones que permiten inducir la obtención de estos individuos. A partir de este punto nos centramos sólo en el proceso de obtención de dobles haploides, ya que tienen una mayor importancia que los individuos haploides en los proyectos de mejora genética vegetal por su homocigosis y su consecuente uso en la producción de híbridos.

Existen diversas estrategias para la obtención de los dobles haploides, pero la mayoría explotan la totipotencia de las células vegetales. La totipotencia es una cualidad de las células vegetales que permite que una célula diferenciada se diferencia y siga después cualquier otro patrón distinto de crecimiento. Esta reprogramación, la cual se induce en los óvulos o microsporas, puede dar lugar a un nuevo individuo debido a la regeneración de sus órganos vegetativos (organogénesis) o debido a que estos gametofitos entran en una ruta embriogénica (embriogénesis). Hay que tener en cuenta la frecuencia de duplicación cromosómica para la obtención de dobles haploides, ya que en muchos casos será necesaria la aplicación de tratamientos, como la colchicina, para dicha duplicación en condiciones de laboratorio (Seguí-Simarro 2010).

Dependiendo de si se parte del gameto femenino o del gameto masculino para la obtención de dobles haploides, se produce la ginogénesis o la androgénesis (Dunwell 2010).

La ginogénesis se utiliza en especies donde las otras técnicas de inducción de dobles haploides no funcionan o es poco eficiente, como es el caso de la remolacha azucarera o de la cebolla. En esta técnica, se cultivan los óvulos inmaduros dentro del saco embrionario que es donde se desarrolla el embrión haploide. En su mayoría, estos embriones proceden de la célula huevo, pero en algunos casos puede desarrollarse a partir de las células sinérgidas o antipodales. Debido a este desarrollo, los embriones suelen ser haploides, por lo que es necesario aplicar tratamientos para la duplicación cromosómica. Una ruta similar puede inducirse en cruces entre especies sexualmente incompatibles, en cuyo caso se induce el desarrollo de un embrión haploide proveniente del gameto femenino. Otra estrategia para inducir haploides a partir de gametos femenino es mediante la inducción de la partenogénesis con polen irradiado (Touraev, *et al.* 2009; Seguí-Simarro 2010).

1. Introducción.

Por otro lado, la androgénesis es la técnica que consiste en la obtención de haploides o dobles haploides mediante la inducción del gameto masculino o de sus precursores. En la naturaleza, la androgénesis tiene una baja frecuencia, pero es posible inducirla para obtener dobles haploides. En la Figura 1 se muestran las diferentes rutas posibles para la obtención de dobles haploides mediante la reprogramación del desarrollo gametofítico, ya sea del polen o de la microspora, hacia la androgénesis. En la ruta 1, el doble haploide se forma a partir de la fertilización del gameto femenino sin que se produzca la fusión núcleo, debido a la inactivación del material genético del núcleo femenino. En la ruta 2, la androgénesis es inducida, mediante tratamientos estresantes, a partir del estadio de microspora vacuolada o polen bicelular joven. Por último, en la ruta 3, se puede obtener haploides y dobles haploides a partir de meiocitos, aunque por lo general se obtienen individuos heterocigotos a partir de la fusión de dos meiocitos (Seguí-Simarro 2010; Corral-Martínez, *et al.* 2011).

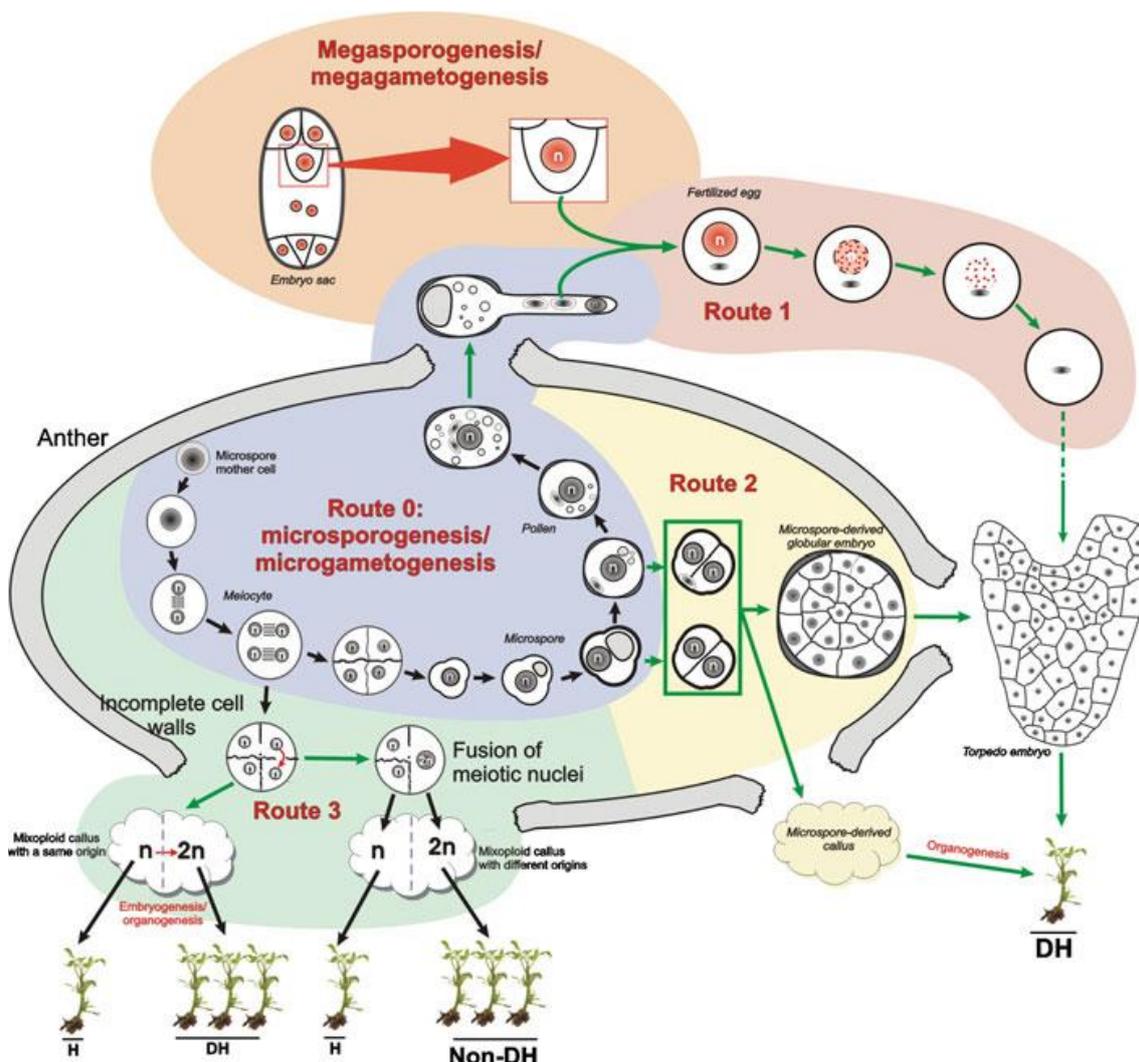


Figura 1 - Distintas rutas para la reprogramación del desarrollo gametofítico de la microspora o polen hacia la androgénesis. Ruta 1: desactivación del genoma de la célula huevo una vez ocurrida la fecundación. Ruta 2: embriogénesis o callogénesis a partir de microspora vacuolada o polen bicelular joven. Ruta 3: formación de individuos dobles haploides (duplicación genómica en un meiocito) y de no dobles haploides (fusión de dos meiocitos) (Seguí-Simarro 2010).

La androgénesis es la técnica más utilizada para la obtención de dobles haploides. Algunas de las ventajas que ofrece esta técnica son: su mayor eficiencia debido el alto número de microsporas que se obtienen de una única yema floral, la cantidad de protocolos que se encuentran a punto en un gran número de especie y la mayor frecuencia en la que se produce la duplicación cromosómica en los individuos, por lo que no es necesario en algunos casos el uso de tratamientos para provocar la duplicación cromosómica (Parra-Vega 2015). Como toda técnica, ésta también cuenta con una serie de inconvenientes. Uno de los inconvenientes es la existencia de especies recalcitrantes en las que aún no se ha conseguido desarrollar un protocolo eficiente de inducción de microsporas, como ocurre en tomate (Palmer, *et al.* 2005; Seguí-Simarro, *et al.* 2011). Esta es una limitación hasta el momento insalvable. Otros inconvenientes son la formación de embriones malformados en algunas ocasiones, debido principalmente a un mal desarrollo del meristemo caulinar (Kim, *et al.* 2008), la distorsión en la segregación debido a la existencia de marcadores ligados a genes implicados en el desarrollo gametofítico o esporofítico haploide (Dufour, *et al.* 2001), y la limitación en la regeneración de plantas completas a partir de callos o embriones androgénicos (Rivas-Sendra, *et al.* 2015).

Debido a la importancia de la androgénesis, en concreto de la embriogénesis en microsporas, se explica con mayor detalle en el apartado *Métodos de inducción de embriogénesis en microsporas*. En dicho apartado, también se explica la importancia de la colza en cultivos de microsporas, por lo que, a continuación, se describirá brevemente esta especie.

1.3. Colza.

1.3.1. Taxonomía.

La clasificación taxonómica de la colza (Tabla 1) (USDA, NRCS Plants database) es la siguiente:

NIVEL TAXONÓMICO	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
Reino	<i>Plantae</i>	Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>	Plantas con semilla
División	<i>Magnoliophyta</i>	Plantas con flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	Dicotiledóneas
Subclase	<i>Dilleniidae</i>	
Orden	<i>Capparales</i>	
Familia	<i>Brassicaceae / Cruciferae</i>	Familia de la mostaza
Género	<i>Brassica</i> L.	Mostaza
Especie	<i>Brassica napus</i> L.	Colza

Tabla 1 - Clasificación taxonómica de la colza (USDA, NRCS Plants database).

Las plantas del género *Brassica* son herbáceas anuales, aunque raramente también pueden ser bianuales. Algunas de las especies que se encuentran dentro de este género, además de la colza o canola, son las mostazas (negra, india y asiática), la coliflor, el nabo, la col de Bruselas, el brócoli... Son especies cuya importancia principal se encuentra en el ámbito de la alimentación, aunque no es el único.

1. Introducción.

1.3.2. Características botánicas.

Es una planta anual o bienal, cuya raíz es fusiforme y axonomorfa, es decir, ésta se hunde verticalmente en la tierra. Aunque su raíz es pivotante, también tiene buena aptitud para ramificar en raíces secundarias, lo cual suele ser debido a la presencia de obstáculos cuando la raíz principal profundiza en el suelo. Respecto al tallo, puede alcanzar el metro y medio, y es ramificado, sobre todo en la parte superior de la planta. Las hojas pueden ser de hasta 40 cm, de color verde claro, sin pelos y pueden ser ciliadas en los nervios. Las hojas inferiores son pecioladas, las superiores lanceoladas y enteras (Guerrero, 1999).



Figura 2 - Flores (izquierda) y yemas (derecha) de las plantas de colza del laboratorio de Biología Celular del COMAV.

Las flores (Figura 2) se agrupan por racimos terminales, pudiendo estar compuestos de 20 a 60 flores. Cuando las flores se abren, no lo hacen todas a la vez, sino que se abren empezando por las inferiores, siendo las últimas en abrirse las que se encuentran en el ápice del racimo. El tamaño de los sépalos es de 5-10 mm, son erectos y glabros, como las hojas y el tallo. El número de pétalos es de 4. Son amarillos y de entre 8 y 18 mm (Lim 2013).

Los frutos son silicuas que tiene entre 5 y 6 cm de largo y 2,5-4 mm de ancho. Son sésiles y suberectos. El número de semillas por vaina es de unos 20-25.

Las semillas son muy pequeñas, de entre 2 y 2,5 mm de diámetro, esféricas y de un color pardo oscuro (Guerrero, 1999).

De las semillas se obtiene el aceite de colza, muy usado, sobre todo, en el norte de Europa. Dicho aceite se utiliza tanto en alimentación como con fines industriales. En el caso del aceite destinado a la alimentación, es considerado como un aceite muy saludable.

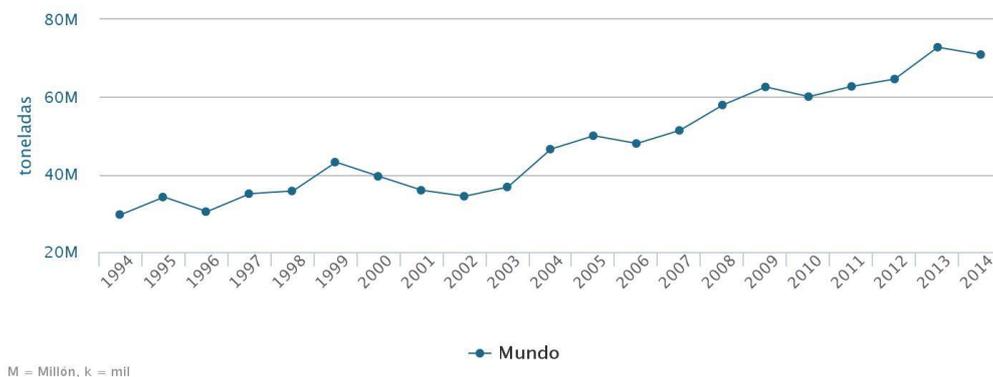
1.3.3. Importancia económica y científica.

La colza es el principal cultivo oleaginoso de Europa (Riaz, 2001). De este cultivo se obtiene el aceite de colza que puede ser destinado para usos industriales o para la alimentación.

Desde el año 1994 hasta el año 2014, la producción de colza a nivel mundial ha aumentado en 40 millones de toneladas y, en 2014, la producción mundial es de 70 millones de toneladas (Gráfica 1). Al descomponer dicha producción según los continentes, se observa que los mayores productores son Europa y Asia, aunque recientemente Europa ha desbancado a Asia como el mayor productor.

El rendimiento también ha aumentado, aunque no a un ritmo tan rápido como la producción. Durante el mismo periodo de tiempo, el rendimiento aumentó en menos de 10.000

hectogramos por hectárea (Gráfica 2). Los cinco países que obtienen un mayor rendimiento en colza son europeos.



Gráfica 1 - Producción mundial de colza entre los años 1994 y 2014 (FAOSTAT 2014).



Gráfica 2 - Rendimiento mundial de colza entre los años 1994 y 2014 (FAOSTAT 2014).

La colza es un cultivo importante, pero no lo es sólo por los productos que se obtienen. La colza es un organismo modelo en los estudios de embriogénesis de microsporas por su alta respuesta. Debido a estos, se han realizado diversos estudios de embriogénesis en esta especie (Seguí-Simarro, *et al.* 2008; Seguí-Simarro 2010). Los avances realizados en la colza se describen en el siguiente apartado.

1.3.4. Avances y estado actual en colza.

Como ya se ha comentado, la colza es un cultivo importante del que se produce un aceite de alta calidad. Dicho aceite puede ser usado en la industria o en el ámbito de la alimentación. Los objetivos de los estudios en colza se centran en el aceite de las semillas, en las diferentes variedades, pero también en las variedades que tienen ciclos cortos, de forma que permiten un mayor número de selecciones al año. Otros caracteres que se han tenido en cuenta para la mejora son la alta fertilidad, una maduración rápida de la semilla y la ausencia de latencia en la semilla. Algunos ejemplos de mejora para la calidad el aceite son los siguientes. Se ha mejorado y seleccionado para una cobertura de semilla de color amarillo. Las manchas negras que pueda tener la semilla tienen una función de defensa frente a condiciones adversas durante el desarrollo. La selección de la semilla amarilla se ha realizado porque al ser de este color, el grosor de la cobertura es más fina y contiene menos compuestos perjudiciales para la salud.

1. Introducción.

También se ha transformado plantas de colza para aumentar la cantidad de resveratrol, compuesto que proporciona resistencia a enfermedades de plantas (Hüsken *et al.*, 2005).

La segunda gran utilidad que tiene *Brassica napus* es que es una planta modelo en estudios de embriogénesis debido a su alta respuesta. Gracias a esto se han realizado muchos estudios y se ha puesto a punto un gran número de técnicas y procedimiento para aumentar la eficiencia. Se han estudiado los cambios estructurales durante las divisiones de los embriones debido a cultivos de microsporas (Zaki *et al.*, 1990). También se ha comprobado que se necesita un tratamiento de estrés para inducir la embriogénesis en microsporas de colza (Binarova, Hause *et al.* 1997). En este estudio se consiguió mediante un tratamiento de estrés.

Además, también se ha estudiado el efecto del TSA, compuesto utilizado para aumentar el rendimiento embriogénico, en cultivos de colza. Se ha comprobado que en el gametofito masculino dicho compuesto promueve su totipotencia (Li, *et al.* 2014). En el presente trabajo se ha querido comprobar dos cosas: si dichos efectos también se producen en una especie recalcitrante como es el pimiento (el cual se explica a continuación), y comprobar que efectos produce en la estructura de las células inducidas mediante un cultivo de microsporas.

1.4. Pimiento dulce.

1.4.1. Taxonomía.

La clasificación taxonómica del pimiento (Tabla 2) (USDA, NRCS Plants database) es la siguiente:

NIVEL TAXONÓMICO	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN
Reino	<i>Plantae</i>	Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i>	Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>	Plantas con semilla
División	<i>Magnoliophyta</i>	Plantas con flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i>	Dicotiledóneas
Subclase	<i>Asteridae</i>	
Orden	<i>Solanales</i>	
Familia	<i>Solanaceae</i>	
Género	<i>Capsicum L.</i>	
Especie	<i>Capsicum annuum L.</i>	Pimiento

Tabla 2 - Clasificación taxonómica del pimiento dulce (USDA, NRCS Plants database).

Dentro del género *Capsicum* hay 27 especies, aunque sólo se han domesticado y las que se cultivan actualmente 5: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*. Estas especies son originarias de América Central y Sudamérica y, debido a su diversidad, el uso de estas especies es muy diverso (Ramirez, *et al.* 2001).

1.4.2. Características botánicas.

El pimiento es una planta cultivada como anual, aunque puede volverse bianual en ciertas condiciones, como pueden ser las que se encuentran en el norte de África. Es herbácea, pero

con el crecimiento se vuelve leñosa de forma que el tallo sea lo suficientemente fuerte como para soportar el peso de la parte aérea. Cuando se cultiva en invernadero, el desarrollo de la planta es más vigoroso y el tamaño de los frutos es mayor, por lo que el uso de tutores se vuelve necesario para evitar que las ramas se dañen con el peso.



Figura 3 - Yemas (izquierda) y anteras (derecha) de las plantas de pimienta del laboratorio de Biología Celular del COMAV.

Es de porte erguido y la altura de la planta está determinada por la longitud de los entrenudos. Dichos entrenudos pueden ser cortos, los cuales son más convenientes para el cultivo en campo, o pueden ser del tipo que produce ramificaciones de manera desigual, lo que es más conveniente para cultivo en invernadero.

Respecto a las raíces, la planta cuenta con una raíz principal y una cabellera de raíces laterales. Normalmente, la mayor parte de las raíces se encuentran a un máximo de 25 cm del suelo, pero pueden llegar a profundizar hasta unos 60-70 cm.

Sus hojas son ovales, elípticas o lanceoladas. Suelen ser glabras, es decir, están cubiertas de pelos. Son de color verde, tanto claro como oscuro, y pueden llegar a tener un color violáceo. El número de hojas y su superficie varía de una planta a otra.

Las flores del pimienta son solitarias, aunque en el caso del pimienta picante pueden aparecer en grupos pequeños. Pueden aparecer tanto en el ápice de las ramas como en la parte axilar de las hojas, siendo más numerosas en el tallo principal que en las ramas secundarias. La autofecundación es más frecuente en aquellas variedades que producen frutos grandes y la alogamia en aquellas variedades que se obtienen frutos pequeños o alargados. Respecto al número de flores, la planta puede producir centenares de flores con un cuajado del 100% cuando las condiciones son favorables. A medida que la flor se aleja del tallo principal, el porcentaje de cuajado disminuye, pudiendo llegar al 10% en las flores de las ramas laterales. En la Figura 3 se muestran yemas y anteras de pimienta.

Por último, los frutos son bayas huecas que se pueden desarrollar total o parcialmente erguido o péndulo. Es habitual que el fruto se desarrolle con rapidez, aunque la velocidad de desarrollo depende de la variedad y de las condiciones de crecimiento. La forma del fruto depende del número de carpelos y de semillas, y el número de éstas depende de la polinización y de la fecundación; menos semillas en un fruto implica que éste va a ser de un tamaño menor. En ciertas condiciones puede darse la partenocarpia. En el caso del cultivo, el grosor del pericarpio es importante, ya que va a depender de la forma en que va a ser consumido el fruto (FAO, 2002).

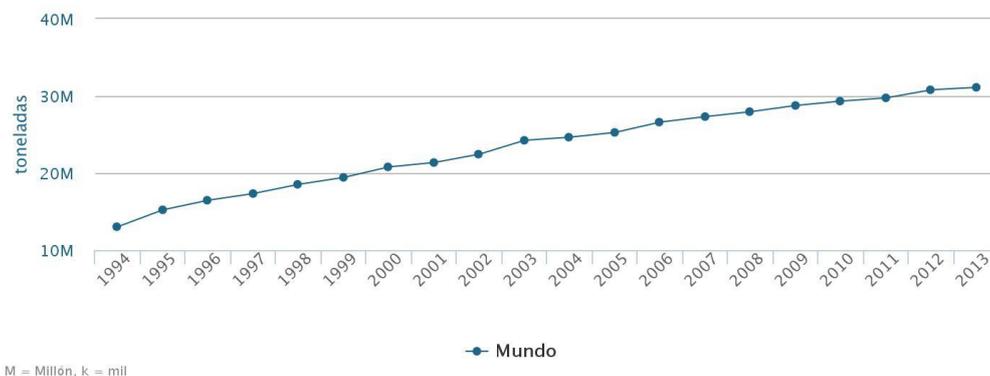
1. Introducción.

1.4.3. Importancia económica y científica.

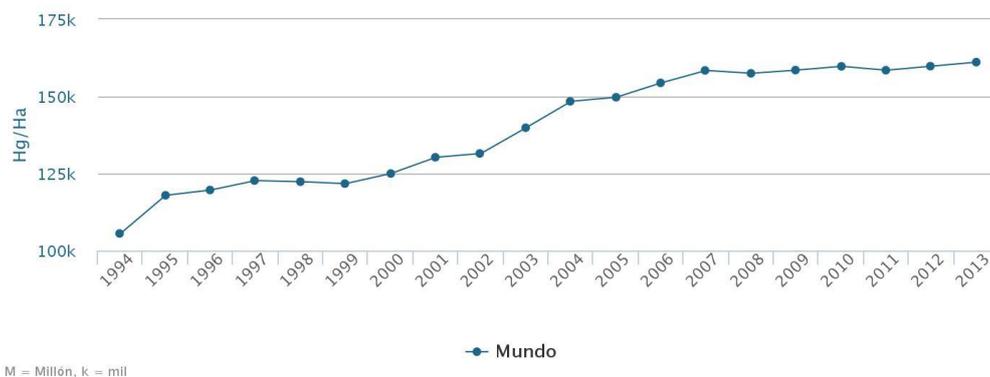
El nombre científico del pimiento es *Capsicum annum* L. El género del pimiento es uno de los que tiene mayor variabilidad dentro de las especies hortícolas. Los frutos de este género varían tanto en sabor (picante, dulce y todos los grados intermedios), como en color, en tamaño, etc. Es uno de los cultivos más extendidos a nivel mundial y se utiliza tanto como verdura, como ingrediente para salsas, como para condimentar la comida, o incluso tiene aplicaciones farmacéuticas (Cheng, *et al.* 2013).

Entrando en datos económicos, del año 1994 al 2014 se ha producido un incremento de casi 20 millones de toneladas en la producción de pimiento a nivel mundial y en 2014 la producción mundial es de 30 millones de toneladas (Gráfica 3). El mayor productor, y con mucha diferencia, es Asia (FAOSTAT 2014).

Respecto al rendimiento, también aumenta a lo largo de los mismos 20 años (Gráfica 4). El incremento es estable excepto entre los años 2000 y 2004, en los cuales el incremento es más acusado. Como en el cultivo de colza, la mayoría de los países que cuentan con los mayores rendimientos en 2014 son del norte de Europa (FAOSTAT 2014).



Gráfica 3 - Producción mundial de chiles, pimiento picante y pimiento (verde) entre los años 1994 y 2014 (FAOSTAT 2014).



Gráfica 4 - Rendimiento mundial de colza entre los años 1994 y 2014 (FAOSTAT 2014).

Como ya se ha comentado, el pimiento es uno de los cultivos más extendidos e importantes a nivel mundial, por lo que los proyectos de mejora son numerosos. Los caracteres a mejorar son

muchos y diversos. A continuación se describen algunos de los éxitos en la mejora del pimiento.

1.4.4. Avances y estado actual en pimiento.

Una de las características más deseadas de los agricultores es la uniformidad, la cual se conseguido y mantenido mediante la autopolinización del cultivo. Dado que el pimiento es un cultivo importante por su uso en la alimentación, se ha mejorado para la forma del fruto, para el sabor, la apariencia y para caracteres relacionados con el rendimiento (Crosby 2008).

Los primeros proyectos de mejora se centraban en la mejora del aspecto del fruto, es decir, que fuera apetecible a la vista y tuviera el aspecto de un fruto sano. En cambio, durante los últimos años, los proyectos de mejora se centran más en la calidad nutricional, es decir, se basan en aquellos compuestos que son saludables para las personas, como son el ácido ascórbico, los flavonoides o los carotenos (Lee et al, 2005; Welch et al, 2002).

Un problema, no sólo en el cultivo de pimiento, sino en todos los cultivos, son las enfermedades y las plagas. Los programas de mejora también se centran en encontrar resistencias genéticas a las plagas y enfermedades que afectan a los cultivos e introducirlos en las variedades cultivadas de gran importancia, de forma que se disminuyan las pérdidas y los gastos en los productos que se aportan al cultivo para luchar contra estos problemas. Algunos ejemplos de búsqueda de resistencia en la mejora de pimiento son los siguientes. Se ha visto que existe una resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas adultas de pimiento obtenidas a partir de cruces entre Criollo de Morellos 334, Agronómico 10-G y Yolo Wonder, siendo los dos últimos susceptibles (Reifschneider et al., 1992). En 2000, se encontraron algunas ascensiones de *C. annuum* en las cuales se vio que se producía una baja incidencia de los síntomas de begomovirus en ensayos en Nuevo México (Bosland, et al. 2000). Se han encontrado resistencias en *C. annuum* y en algunas accesiones asiáticas de pimiento contra el Virus del Mosaico del Pepino, resistencia que en el caso de *C. annuum* puede ser específica y poligénica recesiva (Crosby 2008).

Los objetivos de mejora pueden ser obtenidos más rápidamente con la obtención de dobles haploides al evitarse las generaciones de autofecundación. Por esta razón, son importantes los métodos de obtención de haploides y dobles haploides, sobre todo el cultivo de microsporas. El pimiento es una especie recalcitrante, es decir, se obtiene una baja respuesta mediante dicho cultivo. Se conoce el efecto del TSA en colza, una de las especies modelo en embriogénesis, pero no se conoce tan bien su efecto en pimiento.

1.5. Métodos de inducción de embriogénesis en microsporas.

La embriogénesis de microsporas consiste en la reprogramación inducida de los granos de polen o de las microsporas hacia la embriogénesis. En la Figura 4 se muestra las diferentes rutas que puede seguir una microsporas hasta obtenerse una planta haploide o doble haploide.

1. Introducción.

El primer éxito se consiguió en *Datura innoxia*, una solanácea, en la década de los 60 (Guha, et al. 1964). Con el paso de los años se ha conseguido realizar cultivo de anteras en más especies, pero sólo existen cuatro especies que se pueden considerar modelo por su alta eficiencia: colza (*Brassica napus*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*). Existen especies donde la inducción de la androgénesis es difícil o imposible por razones aún desconocidas (Seguí-Simarro, et al. 2008; Seguí-Simarro 2010).

Existen dos métodos distintos para inducir la embriogénesis en microsporas: mediante el cultivo de microsporas o mediante el cultivo de anteras.

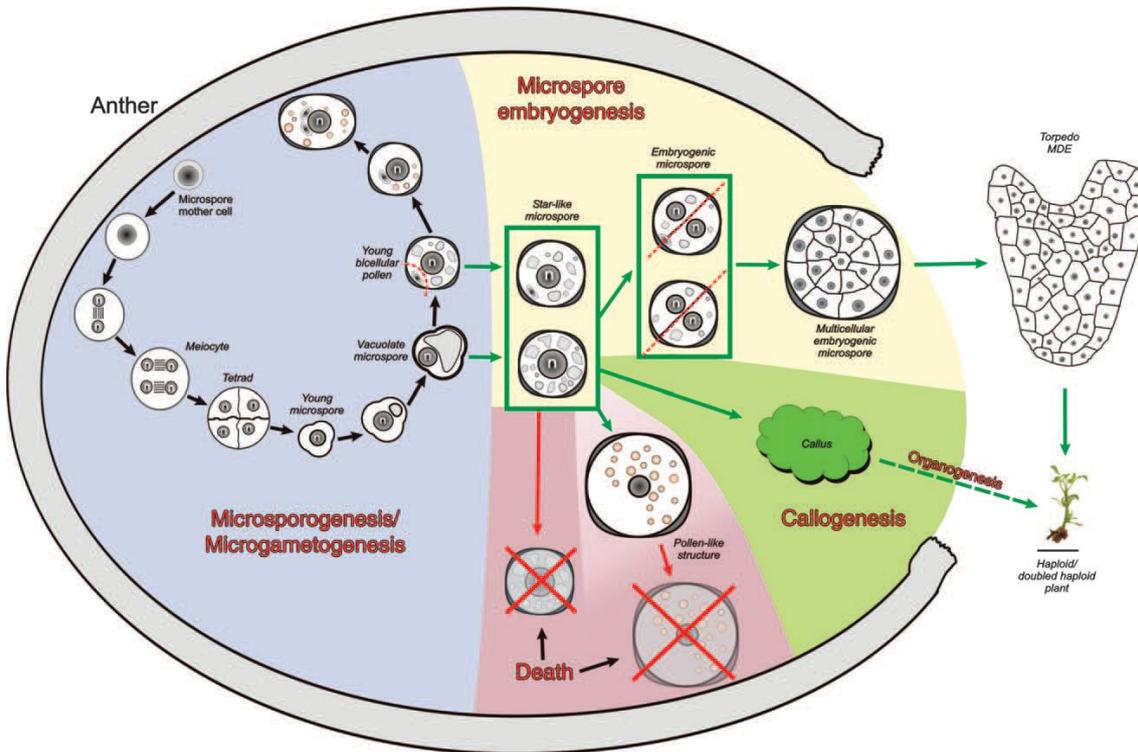


Figura 4 – Esquema de la inducción de androgénesis a partir de microsporas (Seguí-Simarro, et al. 2008).

1.5.1. Cultivo de anteras.

Esta técnica consiste en la recolección de las yemas florales que contengan las microsporas en el estadio adecuado y en la extracción y cultivo de las anteras. Es un método más fácil que con el cultivo de microsporas aisladas, método que se describe en el siguiente punto, ya que, al cultivarse junto con el tejido de la antera, éste aporta nutrientes y proporciona un ambiente más adecuado para el cultivo (Seguí-Simarro, et al. 2008). Debido a esto, el medio sólido utilizado no necesita ser tan específico o exigente como en el caso del cultivo de microsporas aisladas, aunque también significa que no existe un control sobre las condiciones del medio de cultivo (Seguí Simarro 2010). Otra ventaja es que la manipulación del material vegetal es menor. El inconveniente de esta técnica es que los individuos obtenidos pueden proceder de la microsporas (lo deseable) o del tejido de la antera (no deseable), por lo que es necesario un análisis para comprobar la procedencia de cada individuo. Además, esta técnica cuenta con una eficiencia menor, es decir, un menor número de embriones por antera, que la que se describe a continuación (Forster, et al. 2007).

1.5.2. Cultivo de microsporas aisladas.

Mediante esta técnica, las microsporas se cultivan en medio líquido directamente, es decir, se extraen de las anteras. El proceso se encuentra detallado en el apartado de *Material y métodos*. Al encontrarse las microsporas fuera de la antera, ésta ya no le aporta ni los nutrientes ni las condiciones adecuadas para el cultivo, por lo que el medio líquido es más complejo. Este hecho implica que se conocen las condiciones del medio de cultivo, al contrario que con el cultivo de anteras. Además, es posible obtener una mayor eficacia en el número de embriones al encontrarse las microsporas aisladas en el medio. Aunque es cierto que esto lo convierte en una técnica más difícil, o menos fácil y rápida, se consigue resolver algunos de los inconvenientes del cultivo de anteras. Otra ventaja con la cuenta esta técnica es que, al no encontrarse presente la antera, no se obtienen individuos procedentes del tejido, es decir, todos los individuos obtenidos son haploides o dobles haploides, lo que elimina la necesidad de estudiar su origen (Forster, *et al.* 2007). Además, la frecuencia con la que se produce la duplicación cromosómica de forma espontánea es mayor que con el cultivo de anteras. Aunque con este método se obtiene una eficiencia mayor, no está puesto a punto en un gran número de especie (Seguí-Simarro, *et al.* 2007).

Para ambos cultivos es importante conocer los factores que afectan a la inducción, ya que van a afectar al cultivo. Hay que tener en cuenta que existen factores que aún no se conocen y/o no sé conoce como afectan a al cultivo. Los factores más importantes se describen a continuación (Seguí-Simarro, *et al.* 2008).

Dos de los factores más importantes son los relacionados con la planta: el genotipo y las condiciones de éste (Wang, *et al.* 2000). Se ha comprobado que existe especies dónde la inducción de microsporas es difícil, las cuales se denominan como especies recalcitrantes. No sólo existen diferencias entre especies, sino también entre genotipos de una misma especie. Además, no sólo importa el genotipo, sino las condiciones de la planta, como pueden ser la edad, la temperatura a la que se encuentra o ha crecido, el fotoperiodo, los nutrientes (tanto en cantidad como en tipo de éstos), el lugar de cultivo de la planta y el periodo del año en el que se realiza la inducción (Seguí Simarro 2010).

Dado que se va a inducir las microsporas, el estadio de éstas es un factor a tener en cuenta, ya que no va a responder igual una microspora que se encuentre en un estadio adecuado que otra que no esté en dicho estadio. Como ya se ha comentado con anterioridad, el estadio adecuado para la inducción de las microsporas es durante la transición de microspora vacuolada a polen bicelular joven (Seguí Simarro 2010).

El último factor importante está relacionado con las condiciones del cultivo. No sólo es importante inducir a las microsporas, sino asegurarse de que se encuentran en unas condiciones adecuadas para que sigan viviendo y respondiendo. La composición del medio, tanto líquido como sólido, las condiciones de luz, de temperatura, las velocidades de centrifugación, los tratamientos estresantes, el pH del medio... Todos estos factores deben ser los adecuados para realizar un cultivo en condiciones (Seguí Simarro 2010).

Existen compuestos que se pueden añadir al medio de cultivo para aumentar la respuesta de las especies al cultivo de microsporas. Der esta forma, se puede aumentar el número de embriones que se obtiene en un cultivo y, por tanto, el número de plantas regenerantes.

1. Introducción.

1.6. Tricostatina A (TSA).

Muchas células de las plantas son capaces de regenerar en un organismo completo a partir de una única célula o de un trozo de tejido, proceso denominado totipotencia y que ya se ha descrito en el apartado de *Obtención de dobles haploides*. En los cultivos de microsporas, se induce la totipotencia de las células para que éstas entren en división, ya sea de manera directa o indirecta mediante callos. De esta forma, también se pueden obtener embriones (Li, *et al.* 2014).

En un cultivo se induce la totipotencia mediante tratamientos estresantes o mediante la adición de compuestos que aumenten la obtención de embriones. Uno de estos compuestos, la tricostatina A o TSA, afecta a la regulación genética de las células en cultivo. Llegados a este punto, la regulación dinámica de la expresión génica en la cromatina cobra mucha importancia. Aquellas regiones del genoma que contiene genes que no se están transcribiendo se encuentran compactadas y estabilizadas con la ayuda de las histonas, las cuales se unen al DNA gracias a su carga positiva, contraria a la del DNA. Por tanto, si se quisiera activar la transcripción en una zona del genoma que se encuentra en un nucleosoma, sería necesario descompactarla y desacoplar las histonas primero. Para ellos, existen dos maneras. Una es mediante la remodelación de la cromatina mediante proteínas que utilizan ATP para eliminar los nucleosomas. La segunda forma es mediante la modificación de las histonas, que son las proteínas que se encuentran estabilizado el DNA en las zonas que no se están transcribiendo. Esta modificación se puede realizar mediante la alteración química de aminoácidos de las histonas que quedan expuestos, de forma que la interacción entre histonas y DNA se vuelve más débil. La metilación de lisinas, o las deacetilaciones de histonas son algunos de los ejemplos de estas modificaciones (Li, *et al.* 2014).

La epigenética hace referencia a aquellos factores genéticos, que son influidos por el ambiente y que también son heredables, que afectan a los genes (Lorea-Conde, 2015), como pueden ser la metilación, la fosforilación, ubiquitinación o la acetilación del DNA (Figura 5). Todos estos métodos generan marcas epigenéticas que afectan a la expresión genética alterándola.

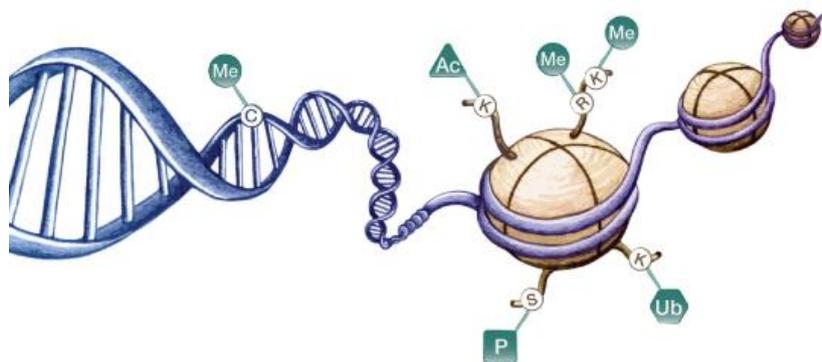


Figura 5 –Mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica. Me: Metilación. Ac: acetilación. P: fosforilación. Ub: ubiquitinación (Protocols & applications guide, promega).

El TSA es un inhibidor de la desacetilación de las histonas H3 y H4, es decir, inhibe la inhibición de los genes y, por tanto, permite la activación ciertos de genes y causa un aumento del número de las histonas H3 y H4. Se ha observado que cuando el uso de este compuesto se combina con el tratamiento estresante por calor para inducir la embriogénesis en un cultivo de

microsporas de colza, la respuesta embriogénica es mayor que sólo con el tratamiento estresante. Se ha visto, además, que el TSA puede inducir totipotencia en especies de *Arabidopsis*, aunque la inducción no es suficiente como para la diferenciación de embriones (Li, *et al.* 2014). En este estudio observaron además que, el choque térmico utilizado para estresar las microsporas es necesario para que se produzca una proliferación al añadir TSA. Este estrés por calor afecta a la regulación de las histonas desacetilasas, provocando un cambio en el estado de acetilación de las histonas, lo que, a su vez, provoca la inducción embriogénica de las microsporas. En el mismo estudio vieron que los tratamientos con TSA inducían la expresión de genes asociados con la regulación del ciclo celular G1/S.

Uno de los objetivos de usar TSA es conseguir un mayor número de embriones, es decir, aumentar el rendimiento en el cultivo de microsporas. Cuando se observó los genes activos de los embriones obtenidos, se vio que aún estaban activos algunos genes de polen (Li, *et al.* 2014).

En otro estudio se observó que se producían cambios en la metilación y acetilación de histonas durante la reprogramación de las microsporas. En dicho estudio, se observó que aumentaba la acetilación de las histonas H3 y H4, sobre todo en el estadio de microspora vacuolada, hecho que está relacionado con una mayor actividad transcripcional (Rodríguez-Sanz, *et al.* 2014).

En un estudio realizado en el laboratorio de Biología Celular del COMAV, cuyos resultados todavía no se han publicado, se decidió observar las microsporas cultivadas al microscopio, por lo que se fijaron, postfijaron con tetróxido de osmio y se incluyeron en resina. Cuando se observaron, tanto en microscopía óptica como electrónica, se vieron unos depósitos oscuros en el interior de las microsporas, los cuales parecen ser más numerosos en las microsporas tratadas a mayor concentración de TSA. Estos no se habían observado anteriormente y se desconoce su naturaleza.

La colza es una especie de la que se obtiene mucha información y se ha estudiado como afecta el TSA a un cultivo de microsporas, pero no se conoce la naturaleza de los glóbulos observados en el estudio anterior ni si el TSA provoca los mismos efectos en una especie recalcitrante como es el pimiento. Ambas incógnitas son los objetivos del presente trabajo.

2. OBJETIVOS.

El trabajo que se presenta a continuación plantea los siguientes objetivos:

- Estudiar los efectos del TSA en una especie modelo como es la colza y en una recalcitrante, el pimiento. Dicho efecto se estudia tanto a nivel de rendimiento en obtención de embriones (respuesta al cultivo de microsporas) como a nivel de subcelular mediante microscopía óptica.
- Identificar la naturaleza de los depósitos observados en las microsporas y estudiar las diferencias que puedan existir dentro de las distintas estructuras presentes en el cultivo en todos los tratamientos. Además, se estudia si estos también se encuentran en la especie recalcitrante.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para lograr los objetivos propuestos se ha realizado un cultivo de microsporas por especie, los cuales se han fijado, postfijado con tetróxido de osmio y embebido en resina para poder ser cortados y examinados a través de la microscopía óptica y tinciones. Todos los procedimientos realizados, desde la obtención de muestra hasta el resultado final, se detallan a continuación.

3.1. Material vegetal.

3.1.1. Colza.

Los genotipos utilizados son DH12075 y DH4079. El primero es una línea doble haploide de baja respuesta androgénica (Bhowmik, *et al.* 2011), mientras que el segundo es una línea doble haploide de alta respuesta androgénica obtenido a partir de la variedad Topas.

3.1.2. Pimiento.

El genotipo utilizado es Herminio, el cual es un híbrido F1 que pertenece a la casa comercial Syngenta Seeds.

3.2. Condiciones de cultivo.

3.2.1. Colza.

Las semillas se sembraron en semillero y se mantuvieron a 20°C, 60% de humedad y con un ciclo de luz/oscuridad de 16h/8h hasta la germinación. Una vez ésta se produjo, se trasladaron a maceta para que crecieran en cámara con las mismas condiciones. Cuando la planta floreció, se trasladó a otra cámara, cuyas condiciones sólo diferían en la temperatura; 15°C en vez de 20°C. Las plantas se mantuvieron en floración continua mediante la eliminación de flores abiertas y frutos.

3.2.2. Pimiento.

Las condiciones de germinación son las mismas que en el caso de la colza. Cuando las plantas hubieron germinado, se trasladaron al invernadero. Las condiciones de éste son las siguientes: 20°C y luz natural, por lo que el fotoperiodo varía a lo largo del año. Se realizaron aportes nutricionales por fertirrigación. Las plantas se encontraban entutoradas y se realizaba de forma regular la poda de las mismas, con el objetivo de favorecer la aireación y la captación de luz. Igual que las plantas de colza, las plantas de pimiento se mantuvieron libres de flores y frutos para asegurar una producción continua de yemas.

3. Material y métodos.

3.3. Cultivo de microsporas.

3.3.1. Colza.

Las microsporas se encuentran dentro de las anteras y, éstas a su vez, están en el interior de las yemas.

Antes de convertirse en polen, las microsporas pasan por diversos estadios, los cuales no tienen una misma respuesta androgénica. Los estadios considerados como los más adecuados para el cultivo de microsporas son microspora vacuolada o el estadio justo después de la primera mitosis del polen (polen bicelular joven). La longitud de las yemas está relacionada con estos estadios (una yema más madura contiene un porcentaje más alto de microsporas en estadios más avanzados), pero este parámetro depende del genotipo, de las condiciones ambientales y del estadio de desarrollo de las plantas. Además, cuanto más homogéneo es el estadio de las microsporas puestas en cultivo, mayor es la eficiencia de la inducción (alta frecuencia de estructuras con más de tres núcleos), por lo que las yemas seleccionadas se separaron en tres intervalos de longitud de yema: 2,6-2,8 mm, 2,8-3,0 mm y 3,0-3,2 mm para el caso de DH4079 y 2,4-2,6 mm, 2,6-2,8 mm y 2,8-3,0 mm para las yemas de DH12075.

Las yemas, se mantuvieron todo el tiempo en hielo para ralentizar en todo lo posible su degradación.

Todo el proceso a partir de este punto se realizó en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Es posible obtener las microsporas de dos formas distintas: machacando la yema entera y aislando las yemas mediante filtrado, o bien extrayendo las anteras de las yemas previamente. Dado que en colza el tamaño de las yemas es muy pequeño, se machacaron las yemas completas y la suspensión resultante se filtró para aislar las microsporas.

Una vez separadas las yemas según los intervalos, éstas se colocaron dentro de pinzas de té y se esterizaron en cabina sumergiéndolas 10 min en hipoclorito sódico 20 g/l. Es necesario realizar lavados para que el hipoclorito sódico no perjudique a las microsporas por una elevada exposición. Se realizaron tres lavados con agua destilada a diferentes tiempos: 1 min, 4 min y 10 min. Todas las soluciones se utilizaron a 4°C para evitar la degradación de las microsporas, y tanto el agua como todo el material se esterilizó previamente mediante autoclavado.

Las yemas esterilizadas se sacaron de las pinzas de té y se depositaron en un vaso de precipitados junto con 2 ml de medio NLN-13, que es el medio usado para el cultivo (Tabla 3), donde fueron machacadas con el émbolo estéril de una jeringuilla. Los ml con las yemas machacadas, es decir, con las microsporas liberadas, se pasaron a través de dos filtros de 41 µm a un tubo. Mediante el filtrado se consigue la eliminación de tejidos y residuos de mayor tamaño que las microsporas. Con el fin de eliminar todos los residuos posibles, se realizaron tres lavados por centrifugación. En cada paso, se centrifugó a 4°C y 870 rpm durante 4 min, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 10 ml de medio.

Tras la última centrifugación y eliminación del sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en un ml de medio. 20 µl se utilizaron para conocer la densidad de microsporas. Para ello, se colocaron 20 µl en la cámara de Neubauer y se contaron las microsporas. La densidad deseada de

microsporas para el cultivo es de 40.000 microsporas/ml, por lo que es necesario diluir las microsporas para alcanzar dicha cantidad. Para obtener el valor del volumen final en cualquier cultivo de colza se utiliza la ecuación siguiente:

$$\text{Volumen medio} = \frac{\text{Número de microsporas} \times 5 \text{ cuadrículas} \times \text{volumen en el que se encuentra}}{40.000 \frac{\text{microsporas}}{\text{ml}} \times 0'0001 \text{ ml (volumen de la cámara)}}$$

Una vez se obtuvo la concentración de microsporas deseada, se separaron en diferentes tubos ya que se realizaron cuatro pruebas: tratamiento con 0,05 µM de TSA (0,5 µl de TSA por ml de cultivo) y 0,5 µM de TSA (5 µl de TSA por ml de cultivo), un control con DMSO (5 µl de DMSO por ml de cultivo) y un control sin suplementos. Tras añadir los compuestos adecuados en cada caso, los tubos se sellaron con parafilm y se incubaron en horizontal, a 32,5 °C y en oscuridad, durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se centrifugaron los tubos para eliminar el medio con los tratamientos, se añadió el mismo volumen de medio fresco sin suplementos y se distribuyeron los diferentes tratamientos en placas de distintos tamaños, dependiendo del volumen final de cada cultivo realizado (1, 3 y 10 ml en las placas de 3, 6 y 9 cm de diámetro, respectivamente). Dichas placas de cultivo se mantuvieron dos días más a 32,5 °C. Pasados dos días, las placas se pasaron a 25°C en oscuridad hasta el día 7, siendo el primer día, el día 0.

Los primeros tres días correspondieron al periodo de inducción de las microsporas y el resto de días correspondieron al cultivo.

En total, se han realizado tres cultivos de colza: el primero en septiembre de 2013 (tratado con DMSO y ambas concentraciones de TSA), el segundo en febrero de 2016 y otro en julio de 2016 (tratamiento control y con DMSO). El control sin DMSO que se añadió en el segundo y tercer cultivo, se realizó por la necesidad de añadir un control al experimento.

Componente	Cantidad (g/l)
NLN Base Salt Mixture	0,39
NLN Base Vitamin Mixture	1,04
Sacarosa	130
Nitrato de calcio tetrahidratado	0,5

Tabla 3 - Componentes del medio para el cultivo de microsporas de colza.

3.3.2. Pimiento.

Como se ha explicado en el caso del cultivo de colza, se pueden obtener las microsporas directamente de la yema, o bien primero extrayendo las anteras y de estas obtener las microsporas. En este caso, las microsporas se obtuvieron tras la extracción de las anteras, debido a que las yemas del pimiento son más grandes que las de colza. La selección de las anteras adecuadas, las cuales están relacionadas con el estadio adecuado de las microsporas, se comprobó mediante el color de las anteras y el tamaño de las yemas. Para el genotipo Herminio, el tamaño del cáliz de las yemas debe ser del 80% respecto al tamaño total, aproximadamente (Parra-Vega, González-García et al. 2013). Las anteras muestran un color

3. Material y métodos.

blanquecino cuando están inmaduras y, durante la maduración, van adquiriendo una coloración azul-púrpura. Las anteras con el estadio adecuado para el cultivo son aquellas que muestran pigmentación sólo en la parte apical. La selección de las yemas se realizó en el invernadero y la de las anteras en el laboratorio.

Las anteras se mantuvieron todo el tiempo en hielo para ralentizar en todo lo posible su degradación, como se hizo con las yemas de colza. Todo el proceso a partir de este punto se realizó en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Una vez separadas las anteras, éstas se colocaron dentro de pinzas de té y se esterizaron en cabina sumergiéndolas 30 s en etanol al 70 % para permitir una mejor penetración de los compuestos durante la esterilización. Después se mantuvieron 5 min en hipoclorito sódico 7 g/l con unas gotas de Tween-20. Se realizaron tres lavados con agua destilada de 2 min cada uno. Todas las soluciones estaban frías (para evitar la degradación de las microsporas) y el agua y todo el material con el que se trabajó en cabina se esterilizó previamente mediante autoclavado.

Las anteras esterilizadas se sacaron de las pinzas de té y se depositaron en un vaso de precipitados junto con 2 ml de agua destilada estéril y fría, donde fueron machacadas con el émbolo estéril de una jeringuilla. Los ml con las anteras machacadas, es decir, con las microsporas liberadas, se pasaron a través de dos filtros, primero por uno de 41 μm y después por uno de 11 μm . El objetivo de este filtrado es eliminar los residuos de mayor y menor tamaño que las microsporas. Con el fin de eliminar todos los residuos posibles, se realizaron tres lavados por centrifugación, cuyas condiciones fueron: 4 °C y 870 rpm durante 5 min. En cada paso, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 10 ml de agua.

Tras la última centrifugación y eliminación del sobrenadante, el *pellet* se resuspendió en un ml de medio de ayuno (Tabla 4) y 20 μl se utilizaron para conocer la densidad de microsporas. Para ello, se colocaron 20 μl en la cámara de Neubauer y se contaron las microsporas. La densidad final de microsporas para el cultivo era de 100.000 microsporas/ml, por lo que fue necesario diluir las microsporas para alcanzar dicha cantidad. Cometí un error en este paso y la concentración de microsporas era la misma que en colza: 40.000 microsporas/ml. Para obtener el valor del volumen final, teniendo en cuenta el error, se utilizó la ecuación siguiente:

$$\text{Volumen medio} = \frac{\text{Número de microsporas} \times 5 \text{ cuadrículas} \times \text{volumen en el que se encuentra}}{40.000 \frac{\text{microsporas}}{\text{ml}} \times 0'0001 \text{ ml (volumen de la cámara)}}$$

Una vez se obtuvo la concentración de microsporas deseada, se separaron en diferentes tubos ya que se realizan cuatro pruebas: tratamiento con 0,05 μM de TSA (0,5 μl de TSA por ml de cultivo) y 0,5 μM de TSA (5 μl de TSA por ml de cultivo), un control con DMSO (5 μl de DMSO por ml de cultivo) y un control sin suplementos. Tras añadir los compuestos adecuados en cada caso, los tubos se sellaron con parafilm y se incubaron en horizontal, a 31 °C y en oscuridad, durante 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se centrifugaron los tubos para eliminar el medio con los tratamientos, se añadió el mismo volumen de medio fresco sin suplementos y se distribuyeron los distintos tratamientos en placas. Éstas se mantuvieron dos días más a 31 °C. Pasados dos días, se recogió el contenido de las placas en tubos, se centrifugaron para eliminar el medio de ayuno

3. Materiales y métodos.

y, tras eliminar el sobrenadante, se añadió el mismo volumen de medio de cultivo (Tabla 4) y se volvió a distribuir en las mismas placas. Se mantuvieron a 25°C en oscuridad hasta el día 14, siendo el primer día, el día 0.

Los primeros tres días correspondieron al tiempo de inducción de las microsporas y el resto de días, al cultivo.

El cultivo de pimienta se realizó en febrero de 2016.

MEDIO DE AYUNO		MEDIO DE CULTIVO	
Componente	Cantidad (g/l)	Componente	Cantidad (g/l)
Manitol	67,4	NLN Base Salt Mixture	0,39
CaCl ₂ 2H ₂ O	1,47	NLN Base Vitamine Mixture	1,04
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,246	Cefotaxima	0,3
KNO ₃	0,101	Sacarosa	100
Cefotaxima	0,3	KI	0,83
KH ₂ PO ₄	0,0272		
KI	16,6·10 ⁻⁵		
CuSO ₄ 5H ₂ O	2,5·10 ⁻⁵		

Tabla 4 - Componentes de los dos medios utilizados para el cultivo de microsporas de pimienta.

3.4. Estudio del número de núcleos.

A medida que se desarrollan los cultivos, sobre todo en el momento de la recogida de las muestras, es necesario observar el número de núcleos que tienen las estructuras. Cuantas más células con mayor número de núcleos haya, mejor, porque indica una alta respuesta androgénica por parte del cultivo.

Para observar los núcleos, se toman 200 µl del cultivo, se centrifugan a 8000 rpm durante 2 min, se elimina el sobrenadante y el pellet se resuspende en 10 µl de la solución de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración de 2,5 µg/µL. El DAPI es un marcador fluorescente que tiene afinidad por regiones genómicas enriquecidas en adenina y timina (Kapusinski, 2009). La suspensión se monta en un portaobjetos, se sella con un cubre y, tras 10 min de incubación, se observa al microscopio invertido *Axiovert 40 CFL* de la empresa *ZEISS*.

3.5. Preparación de compuestos tóxicos.

A continuación, se detalla los pasos necesarios para preparar la solución de tetróxido de osmio y la resina SPURR. La mayoría de los compuestos utilizados durante la realización del proyecto son tóxicos, por lo que es necesario trabajar con mucha precaución, en campana extractora, con guantes y con máscara respiratoria cuando sea necesario. Dado que los compuestos que se han nombrado al inicio del párrafo son bastante tóxicos, se ha decidido explicar a continuación su manipulación.

3. Material y métodos.

3.5.1. Preparación de tetróxido de osmio.

Se partió de ampollas de tetróxido de osmio (OsO_4) de 2 ml al 4% en cacodilato 0,025 M. Como este compuesto es sensible a la luz, se trabajó sólo con la luz necesario, de forma que se impidiera o se minimizara su precipitación. Para obtener OsO_4 al 2% en 0,025 M de cacodilato, sólo fue necesario tomar una ampolla de 2 ml y mezclarlo con 2 ml de cacodilato 0,025 M. Los 4 ml se dividieron en alícuotas de 500 μl .

Las alícuotas que no fueron necesarias, se congelaron a -20°C hasta que lo fueran, ya que este material puede ser conservado largos periodos de tiempo.

3.5.2. Preparación de resina SPURR.

Al contrario que ocurre con el OsO_4 , la resina no puede ser almacenada periodos de tiempos largos, ya que se forman agregados y no es bueno que esté en contacto con el oxígeno, ya que afecta a su composición. Por esta razón, la resina necesaria para cada procesado se prepara cada vez que se vaya a utilizar.

El kit utilizado de resina es *Low Viscosity Embedding Kit* de EMS. Dentro del kit de resina SPURR hay cuatro compuestos distintos: ERL-4221, D.E.R.-736 epoxy resin, NSA (*Nonenyl Succinic Anhydride Modified*) y DMAE (*2-(Dimethylamino) etanol Specific Gravity*), que es el acelerador necesario para la polimerización. Se mezclaron los compuestos en ese orden y la cantidad de cada uno dependió del volumen total de resina. Como ejemplo de la cantidad necesaria de cada compuesto, se utiliza un volumen final de 40 ml de resina, con y sin acelerador (Tabla 5).

	40 ml con acelerador	40 ml sin acelerador
ERL-4221	10 g	10 g
DER-736	8 g	8 g
NSA	25 g	25 g
DMAE (acelerador)	0,4 g	-

Tabla 5 - Componentes y cantidades para la preparación de resina SPURR, con y sin acelerador.

Los compuestos son viscosos, aunque el grado de viscosidad varía. Por este motivo, no se calculó el volumen de compuesto necesario, sino que se pesaron dentro de la campana extractora. En un vaso de precipitados, sobre la báscula ya equilibrada y protegida con papel de aluminio, se pesó el primer compuesto. Una vez conseguida la cantidad necesaria, se taró la báscula y se pesó el segundo compuesto. Estos pasos se repitieron hasta que se pesaron los cuatro compuestos, tres en el caso de la resina sin acelerador. Se mezcló con la ayuda de un agitador a baja potencia, para no producir burbujas, y se tapó con papel de aluminio como método de protección contra el oxígeno.

Una vez la mezcla era homogénea, la resina se utilizó en los pasos necesarios del procesado. En algunos casos, la resina se guardó, en tubos, a 4°C durante un máximo de 24 h.

3.6. *Fijación de la muestra.*

Tras varios días de cultivo (7 en el caso de la colza y 14 en el caso del pimiento), el cultivo se recogió de las placas y se centrifugó en las mismas condiciones utilizadas para el aislamiento. Las microsporas se resuspendieron en Karnowsky, el cual es un fijador químico formado por formaldehído y glutaraldehído. Tras 5 h de incubación a temperatura ambiente, se lavaron las muestras tres veces con tampón cacodilato 0,025 M (30 min cada lavado). Una vez realizado el último lavado, la muestra se guardó en tampón cacodilato a 4 °C hasta el próximo paso.

3.7. *Postfijación con tetróxido de osmio.*

Cuando la muestra ya estuvo fijada se procedió a la postfijación con tetróxido de osmio. Debido a su afinidad por los lípidos, se utiliza ampliamente para dar contraste en microscopia electrónica de transmisión, aunque no es su única utilidad. Este contraste también puede ser muy útil en microscopía óptica.

Para realizar el postfijado, se pasó una parte de las microsporas fijadas a un tubo cónico de 1,5 ml que contenía tetróxido de osmio 2% con cacodilato al 0,025M. El tiempo de incubación depende de la temperatura y de la muestra. En las postfijaciones que se realizaron, el tiempo varió entre 3 y 4 horas. Tras la incubación, cuando las microsporas adquirieron una tonalidad oscura, se realizaron tres lavados con cacodilato 0,025M de media hora cada uno. Una vez realizado el último lavado, las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el siguiente paso.

3.8. *Inclusión en gelatina.*

El objetivo de esta inclusión era evitar que las microsporas se perdieran durante los lavados y los distintos pasos del proceso, además de que se esparcieran por todo el bloque de resina durante la inclusión. Gracias a la gelatina, se consiguió tener toda la muestra concentrada en un punto y sin que se produjeran pérdidas durante el proceso completo.

Este proceso se realizó en dos días consecutivos.

El primer día, se introdujo la gelatina 15% en un baño seco a 37°C. La gelatina estaba diluida en cacodilato 0,025 M. Se eliminó el cacodilato de las microsporas mediante una centrifugación de un min a 800 rpm y se añadió un poco de gelatina a la muestra. Antes de que solidificará, se removió con un palillo para conseguir que toda la muestra estuviera en contacto con la gelatina, se centrifugó un min a 800 rpm para que las microsporas se agruparan en el fondo del tubo cónico de 1,5 ml y se dejó en hielo para que solidificara. Cuando la gelatina estuvo sólida, se añadieron 20 µl de formaldehído 1% en cacodilato para que la gelatina fraguara correctamente y se mantuvo a 4°C hasta el día siguiente.

Tras 24 horas, se eliminó el formaldehído, se extrajo la gelatina del tubo cónico de 1,5 ml y se cortó la gelatina en fragmentos más pequeños para poder incluirlos por separado. Los fragmentos se introdujeron en un tubo cónico de 1,5 ml con cacodilato 0,025M para que no se secase ni estropeará la muestra.

Se mantuvo la muestra a 4°C hasta el siguiente paso.

3. Material y métodos.

3.9. Inclusión en resina.

La resina utilizada en la inclusión es resina Spurr, la cual es una resina de tipo epoxi. Este grupo de resinas son polímeros que contienen grupos epóxido.

Se realizaron tres inclusiones: una manual y dos automatizadas con el procesador de tejidos *Leica EM TP*. Los tres procesados se llevaron a cabo durante una semana y con los mismos compuestos. Ambos diferían, a parte de la mecanización, en el tiempo de incubación de los diferentes compuestos.

Los tiempos de incubación y las diferentes diluciones que se utilizaron en ambos procedimientos se muestran en la Tabla 6.

<i>Día</i>	<i>Procedimiento manual</i>		<i>Procedimiento automático</i>		
	<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Paso</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Condiciones</i>
<i>Día 1</i>	Etanol 30%	2 h	Etanol 30%	7 h	T. ambiente
	Etanol 50%	2 h	Etanol 50%	8 h	T. ambiente
	Etanol 70%	o/n	Etanol 70%	8 h	T. ambiente
<i>Día 2</i>	Etanol 70% + 1% UA	2 h	Etanol 70% + 1% UA	2 h	T. ambiente
	Etanol 90%	10 min	Etanol 90%	10 min	T. ambiente + agitación
	Etanol 96%	30 min	Etanol 90%	1 h	T. ambiente
	Etanol 100%	1 h	Etanol 96%	1 h	T. ambiente
	Etanol 100%	1 h	-	1 min	T. ambiente + agitación
	Spurr 30% sin acelerador	3 h	Etanol 100%	1 h	T. ambiente
			Etanol 100%	1 h	4 °C + agitación
	Spurr 50% sin acelerador	o/n	Spurr 30%	6 h 49 min	4 °C + agitación
			Spurr 50%	9 h	4 °C + agitación
<i>Día 3</i>	Spurr 70% sin acelerador	3 h	Spurr 70%	10 h	4 °C + agitación
			-	5 min	4 °C + agitación
	Spurr 100% sin acelerador	o/n	Spurr 100% sin acelerador	3 h	4 °C + agitación
			Spurr 100% sin acelerador	8 h	4 °C + agitación
<i>Día 4</i>	Spurr 100% sin acelerador	3 h	Spurr 100% sin acelerador	11 h	4 °C + agitación
			-	5 min	4 °C + agitación
	Spurr 100% con acelerador	o/n	Spurr 100% con acelerador	3 h	4 °C + agitación
			Spurr 100% con acelerador	3 h	4 °C + agitación
			Spurr 100% con acelerador	9 h	4 °C + agitación
<i>Día 5</i>	Spurr 100% con acelerador	2 h		3 h 25 min	22 °C + agitación
	Encapsulado	-	Encapsulado	-	
	Estufa a 70 °C	48 h	Estufa a 70 °C	24 h	-
<i>Día 6</i>	-	-	Sacar las muestras del molde		
<i>Día 7</i>	Sacar los bloques del molde		-	-	-

Tabla 6 - Pasos realizados para la inclusión en resina SPURR, tanto de forma manual como con el procesador de tejidos.

Cuando los bloques estuvieron sólidos y enfriados, se guardaron en diferentes bolsas para no mezclar las diferentes muestras.

3.10. Realización de cortes para microscopía óptica.

Se realizaron cortes de las muestras embebidas en resina para su visualización. Dado que este es un proceso muy delicado y que necesita realizarse con sumo cuidado, se explican a continuación todos los pasos de preparación del material y uso del ultramicrotomo.

3.10.1. Preparación de cuchillas de vidrio.

Las cuchillas de vidrio se elaboraron a partir de una barra de vidrio *Leica*. Ésta, se lavó con agua y jabón para eliminar la suciedad que pudiera contener (Figura 6B). Se realizó un último lavado con etanol 96% y se dejó secar. Todo el manejo de la barra de vidrio se realiza con precaución para no dañar la barra ni tocar los bordes de la misma.

Una vez lavada la barra, se cortó en fragmentos más pequeños, primero para formar pequeños cuadrados y después para obtener triángulos que serían las cuchillas en sí. Para cortar la máquina se utiliza un cortador *Leica EM KMR2* (Figura 6A), cuyas partes se muestran en la (Figura 6).



Figura 6 - Cortador de barras de vidrio (A), barra de vidrio entera (B) y cortada (K), partes del cortador (C-J) y cuchillas de vidrio (L). Las diferentes partes y su funcionamiento se describen en el texto.

Se introdujo la barra en el cortador y se fijó para que está no se moviera (Figuras 6C-D). Estando la barra fijada y, a su vez, estabilizada, se cortó por la mitad. La barra se fijó gracias a una pestaña (Figura 6C-a), la cual tiene cuatro posiciones que permiten obtener fragmentos de

3. Material y métodos.

diferente tamaño. Esta pestaña se fue moviendo cada vez a una posición menor hasta obtener 16 cuadrados de cristal.

Para cortar estos cuadrados en dos y obtener las cuchillas, se fijaron los fragmentos en diagonal según la Figura 6I, se estabilizó dicho fragmento bajando el mecanismo unas 3 ó 4 veces y luego fijándolo (Figura 7E-d). Se hizo una muesca sacando hacia fuera el émbolo (Figura 6H-f), el cual se encontraba en la posición marcada por la raya pequeña (Figura 6J). La posición marcada con la raya más larga se utilizó para cortar la barra en fragmentos más pequeños (Figura 6F). Es mejor que ambos fragmentos se separen sólo al añadir presión y no forzándolos, por lo que, una vez se realizó la muesca sobre el vidrio, la palanca de la Figura H se giró poco a poco en sentido de las agujas del reloj. Lo que se consigue en este punto es que se ejerza presión a ambos lados de la muesca para que el vidrio se parta por la marca.

A partir de un fragmento anterior, se obtuvieron dos cuchillas de vidrio; una con el filo bueno y otra con el filo malo o robusto (Figura 6L). En el vértice que no tiene filo, había una meseta. Las mesetas de ambas cuchillas no son iguales, por lo que se pudo diferenciar las cuchillas por este criterio: la cuchilla con la meseta más grande, es la que contiene el filo bueno. Mientras que la cuchilla que contiene la meseta pequeña es la que contiene el filo malo o más robusto. La distinción de las cuchillas se realizó para utilizar las cuchillas con el filo malo para desbastar y las cuchillas con el filo bueno para realizar los cortes más limpios.

3.10.2. Mecanismo y uso del ultramicrotomo.

De forma general, el ultramicrotomo (Figura 7A) consta de la pieza A (Figura 7B), la pieza B (Figura 7C) y la pieza C (Figura 7D), la platina principal (Figura 7E), el brazo para sostener la muestra al cortar (Figura 7F), los binoculares (Figura 7G) y el panel de control (Figura 7H).

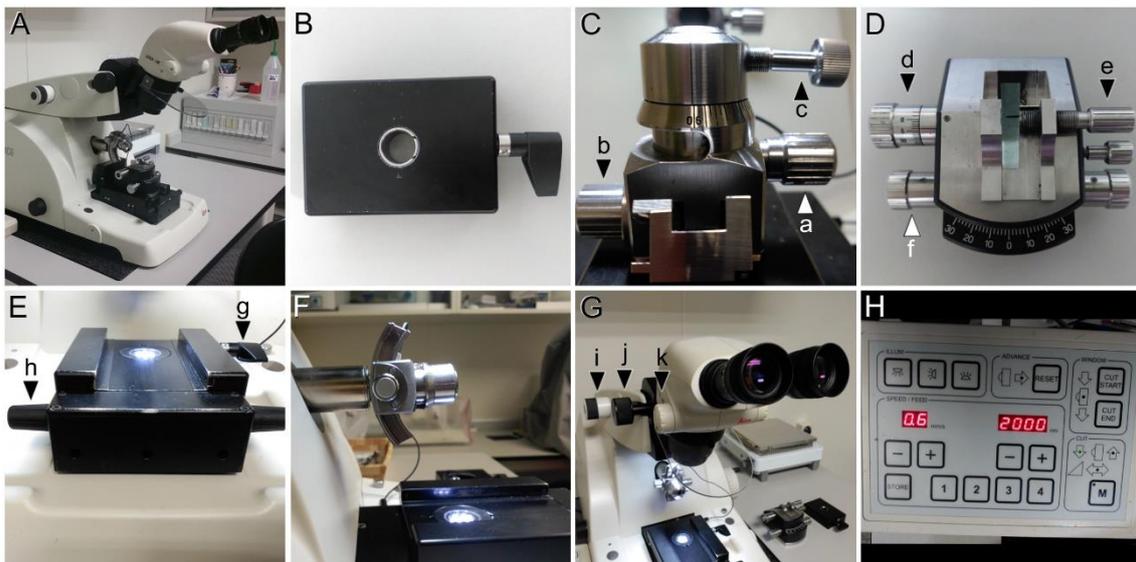


Figura 7 - Ultramicrotomo (A) y partes del mismo (B-H). La descripción y función de cada una de ellas se encuentra en el texto.

La pieza A se utiliza únicamente para fijar la pieza B a la platina principal del ultramicrotomo. El bloque de resina con la muestra se fija a la pieza B, de forma que se pueden realizar el frente y los cortes al estar el bloque sujeto de forma firme y estable.

La función de la pieza B es la de sujetar, de forma firme y estable, el bloque con la muestra, de forma que se pueden realizar el frente y los cortes. Esta pieza consta de tres roscas: la rosca a (permite rotar la muestra de forma circular) la rosca b (permite girar la muestra de forma longitudinal) y la rosca c (permite fijar la muestra a la pieza B).

La pieza C es donde se colocan las cuchillas y consta también por tres roscas: la rosca d, que ajusta el ángulo de corte (4° para óptica), la rosca e, que fija la cuchilla a la pieza, y la rosca f, que permite que la cuchilla se pueda mover de forma circular.

Sobre la platina principal del ultramicrotomo se colocan las piezas A y C, y se fijan mediante la palanca que se muestra en la Figura 7E-g. La cuchilla, colocada en la pieza C, se puede desplazar a ambos lados gracias a la rosca de la Figura E-h. Justo enfrente de la platina, desde el punto de vista del usuario, se encuentra el brazo que sostiene la pieza B que, a su vez, fija el bloque con la muestra y lo mantiene sujeto. Este brazo se mueve de arriba abajo para realizar los cortes y se desplaza hacia delante, en mayor o menor medida dependiendo del grosor de los cortes.

La última parte del ultramicrotomo que queda por describir, a parte del panel de control, son los binoculares (Figura 7G). Éstos permiten observar todo el proceso a través de ellos con o sin aumento. En la misma pieza en la que se encuentran los binoculares hay tres roscas: la rosca k (controla el nivel de aumentos), la rosca i (permite mover los binoculares hacia delante y hacia atrás) y la rosca j (permite enfocar la imagen).

Todos los movimientos del brazo móvil se controlan con la ayuda del panel de control (Figura 7H). En él se controla la velocidad, el grosor de los cortes, las luces y permite realizar los cortes de forma automáticamente, tras indicarle donde inicia y finaliza el frente del bloque. Además, cuenta con un sistema de reseteo del brazo móvil para que éste vuelva a su posición inicial.

Para realizar los cortes, primero se fijó la pieza A a la platina del ultramicrotomo, y la pieza B a la pieza A. En los casos que fuera necesario, antes de fijar la muestra a las piezas, se cortó la resina que se encontraba entre la muestra y el extremo del bloque. Se fijó la muestra y se procedió a realizar el frente con una cuchilla de metal (Figura 8B), el cual debe tener una forma de trapecio y contener la muestra en su centro. Cuando el frente estuvo hecho, se colocó la pieza B en el brazo móvil y, sobre la platina, se colocó la pieza C con una cuchilla con el filo malo.

Antes de empezar a cortar, es necesario orientar la muestra. Este proceso necesita de gran precisión o, por el contrario, los cortes no serán regulares y, hasta que lo sea, se perderá material. Para una buena orientación hay que tener en cuenta tres puntos. El primero, la base mayor del trapecio, que se sitúa en la parte inferior, y el filo de la cuchilla deben estar en paralelo. Para los otros dos puntos es necesario tomar como referencia la sombra de la cuchilla sobre el frente del trapecio. Para el segundo punto, se debe tener en cuenta que la sombra proyectada debe ser paralela a la base mayor del trapecio (si se ha hecho bien el frente, también debe ser paralela al frente menor del trapecio). Para comprobarlo se mueve hacia

3. Material y métodos.

arriba y hacia abajo el frente móvil, de forma que el movimiento ayuda a orientar el frente con respecto de la cuchilla. Para el último punto, se debe tener en cuenta que dicha sombra proyectada debe estar a la misma distancia en todos los puntos del frente. Si no estuviera, indica que el bloque se encuentra inclinado con respecto a la cuchilla y no todos los puntos del frente se hallan a la misma distancia de la cuchilla.

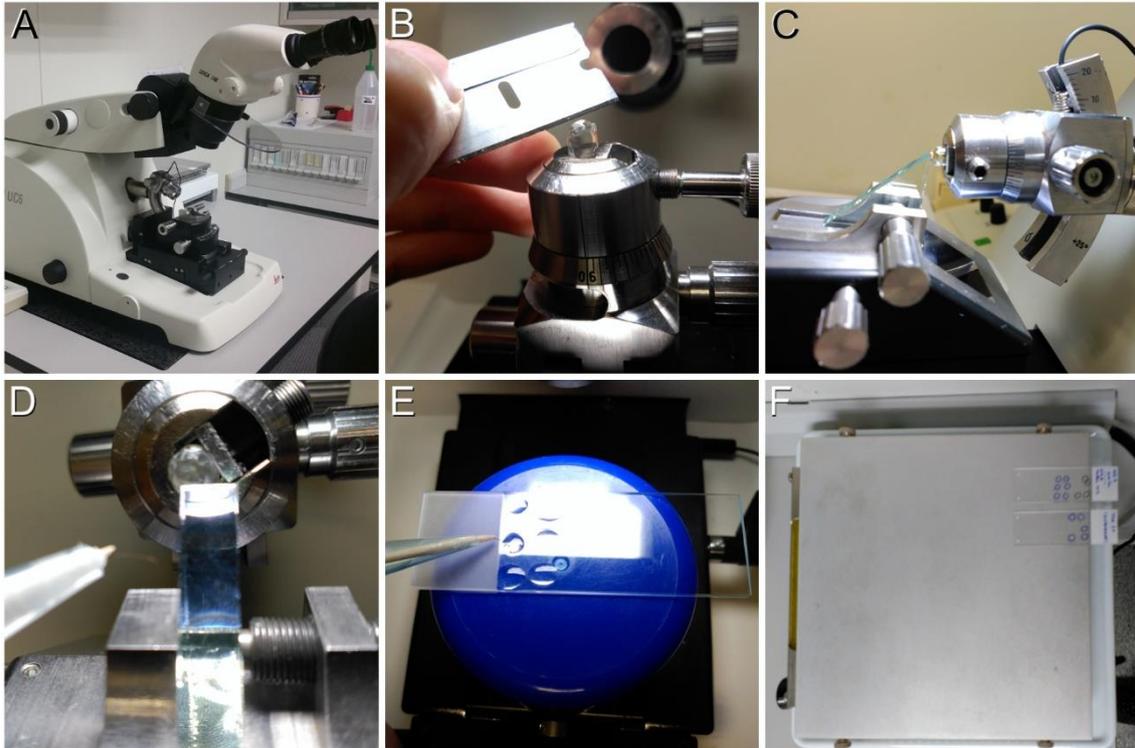


Figura 8 - Ultramicrotomo (A) y proceso de realización de cortes (B-F). Todas las partes y su funcionamiento se describen en el texto.

Una vez la orientación fue completada, se acercó la cuchilla hasta el frente, se indicó la ventana de corte y se empezaron a hacer cortes (Figura 8C). Al desbastar, el grosor del corte fue grueso, entre 3.000 y 5.000 nm. Cuando la muestra empezó a aparecer en los cortes, se volvió a realizar el frente en el caso de que se hubiera desgastado, se cambió la cuchilla por una con el filo bueno y se programó con el panel de control para realizar cortes automáticos a 2.000 nm de grosor y a una velocidad de 0,6 nm/s.

Una vez hecho el corte, éste se recogió con una punta de pipeta que tenía adherido en la punta un pelo de ceja (Figura 8D). Se utiliza este utensilio porque otros objetos, como pueden ser las pinzas, pueden dañar el filo de la cuchilla y/o el corte realizado. Con el pelo de ceja se puede manejar el corte con más cuidado evitando daños en el material. El pelo de ceja es lo suficientemente rígido para poder manejar el corte, pero tampoco es tan duro como para dañar la cuchilla. Una vez recogido, se pasa a una gota de agua que se encuentra sobre un portaobjetos, el cual ha sido lavado previamente con agua y jabón, y eliminado el polvo con un papel especial (*EMS lens Tissue*). La utilización de la gota de agua ayuda a extender el corte sobre ella, ya que algunas veces se pliega sobre sí mismo. Un inconveniente es que pueden formarse burbujas por debajo del corte. Para eliminarlas, se observó con los binoculares y, con la ayuda del pelo de ceja, se extendieron los cortes que estuvieran plegados y se eliminaron las burbujas que pudieran haber.

Cuando los cortes realizados estuvieron en condiciones, se depositó el portaobjetos sobre una placa calefactora que se encontraba a 40°C (Figura 8F). Gracias al calor, el agua se evaporó y los cortes quedaron extendido y adheridos al portaobjetos.

Llegados a este punto, los cortes estuvieron listo para su visualización (mediante el montaje con glicerol) y/o para la realización de tinciones.

3.11. Tinciones.

Para la identificación de la naturaleza de los glóbulos observados, se realizaron diferentes tipos de tinciones, siendo cada una de ellas específica para distintas biomoléculas (lípidos, proteínas o almidón). Las tinciones que se utilizaron, y su uso, se explica a continuación.

3.11.1. Azul de toluidina (TB).

De las tinciones que se utilizaron, esta se utilizó como control. Se trata de un colorante catiónico (básico) que tiene afinidad por estructuras basófilas como la cromatina. Puede tener dos comportamientos distintos: puede actuar como colorante ortocromático tiñendo de azul, o como colorante metacromático, tiñendo de color violeta-rojo. El comportamiento depende del pH y de la naturaleza química del material a teñir.

Para teñir las muestras, se depositó unas gotas sobre los cortes que se encontraban en el portaobjetos. El tiempo de tinción fue de 5 min y, pasados éstos, se lavaron los cortes con abundante agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Cuando estuvieron secos, los portaobjetos se montaron con glicerol y se observaron al microscopio óptico.

3.11.2. Azul Coomassie (CB).

Es un colorante derivado del trifenilmetano y es específico para proteínas. Uno de los mayores usos que se le da es en las electroforesis en gel, para teñir las bandas. Como indica su nombre, las muestras se tiñen de azul tras la exposición al colorante.

Para teñir las muestras, se dejó el portaobjetos con los cortes en una cámara húmeda con el colorante toda la noche. Al día siguiente se sacó y se lavó con agua para eliminar el exceso de colorante. Una vez secos los cortes, se montaron con glicerol para su observación.

3.11.3. Sudan Black (SB).

Los componentes de las tinciones sudan son compuestos sintéticos orgánicos y sirven para teñir lo que se conoce como sustancias sudanofílicas. El SB es un colorante relativamente termoestable que se utiliza para la tinción de lípidos. El resulta de esta tinción da un color azul-negro.

Esta tinción debe aplicarse fresca, es decir, debe prepararse la tinción justo cuando se necesita. Una tinción vieja causa problemas debido en la mayoría de casos a la precipitación del SB.

3. *Material y métodos.*

Lo primero fue preparar una dilución saturada de SB en etanol al 70%. Para ello, como la cantidad de colorante necesario suele ser de unos 10-15 ml, se añadió al etanol 70% el sudan black. Si al agitar el tubo aparecían precipitados, significaba que la dilución ya estaba saturada. Una vez conseguido esto, la mezcla se pasó por un filtro de papel Whatman doblado en forma de abanico, con lo que se consiguió aumentar la superficie de filtrado. Una vez realizado este paso, se realizó un segundo filtrado, pero esta vez con jeringa y un filtro de 0,22 μm especial para el etanol. La segunda filtración se realizó gota a gota para no romper el filtro. Una vez realizado el filtrado, el colorante estuvo preparado para su uso.

Para teñir las muestras, se depositaron unas gotas sobre los cortes y se dejó actuar el colorante durante el tiempo necesario. Este tiempo fue de entre 1-2 horas durante el verano de 2015 y de unos 5 min durante el verano de 2016. Durante este último verano, en algunos casos fue necesario añadir acetona 20% antes de la tinción, de forma que la acetona permitiera una mejor actuación del colorante. Cuando era necesario, se depositaba unas gotas de acetona 20% sobre los cortes y se dejaba actuar un min. Pasado este tiempo se lavaba, se dejaba secar y se procedía con la tinción de SB.

Es importante que durante la tinción los cortes siempre tengan colorante y no queden secos, pues podrían dañarse. Dado que, aunque se coloquen en una cámara húmeda, el etanol se evaporaba, era necesaria una revisión cada pocos minutos y, en caso de que fuera necesario, añadir más colorante.

Pasado el tiempo de tinción, se eliminó el colorante y se lavó con etanol 70% hasta que se apreciaba que de los cortes dejaba de emanar una cantidad importante de colorante. Un lavado excesivo podía dañar las muestras, incluso lavarlas completamente, por lo que el tiempo de lavado variaba dependiendo de la naturaleza de las muestras. El lavado de las muestras se realizó con precaución, pues el etanol es capaz de despegar los cortes del portaobjetos.

Debido a que los lavados se realizaron con etanol, las muestras teñidas con esta tinción (y con yodo-yoduro potásico) no se pudo secar con la placa calefactora, sino que se dejó secar encima de la bancada.

Una vez secado el portaobjetos con las muestras teñidas, se montó con glicerol y se visualizó al microscopio.

3.11.4. *Yodo-Yoduro potásico o lugol (L).*

Es una disolución de yodo molecular I_2 y yoduro potásico KI en agua destilada. Se utiliza para la detección de almidón.

El almidón es un compuesto muy frecuente en plantas y está constituido por amilosa y amilopectina. La estructura del almidón es una hélice y ésta permite la acumulación de yodo en su interior, hecho que permite su identificación en microscopía óptica. El resultado de la tinción varía según si el polímero de almidón es grande o pequeño: azul-negro si es grande y rojo-púrpura si es pequeño. Es decir, es una tinción metacromática.

3. *Materiales y métodos.*

Para teñir las muestras, se depositó unas gotas del colorante sobre los cortes y se dejó actuar durante unos 10-15 min. Pasado este tiempo, se lavó muy poco con agua destilada, ya que se podría perder la coloración. Para secar los cortes no se utilizó la estufa calefactora, ya que el calor hace que se formen cristales de KI.

Una vez secos los cortes, se montaron con glicerol para su visualización.

3.12. *Visualización de la muestra.*

Los cortes obtenidos se observaron con el microscopio *Nikon Eclipse E1000* y las fotos se realizaron con la cámara *Optika Microscopes Italy*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Estudio de la tinción con DAPI.

Para comprobar si el cultivo fue bien y ver cuántos núcleos tenían las estructuras obtenidas, se utilizó DAPI. En la Figura 9 se muestran estructuras del tratamiento control y del tratamiento con DMSO. Las estructuras provenían de cultivos de 5 días de microsporas de colza. Se observaron estructuras con un gran número de núcleos en ambos tratamientos. La presencia de este tipo de estructuras indicó que el cultivo respondió.

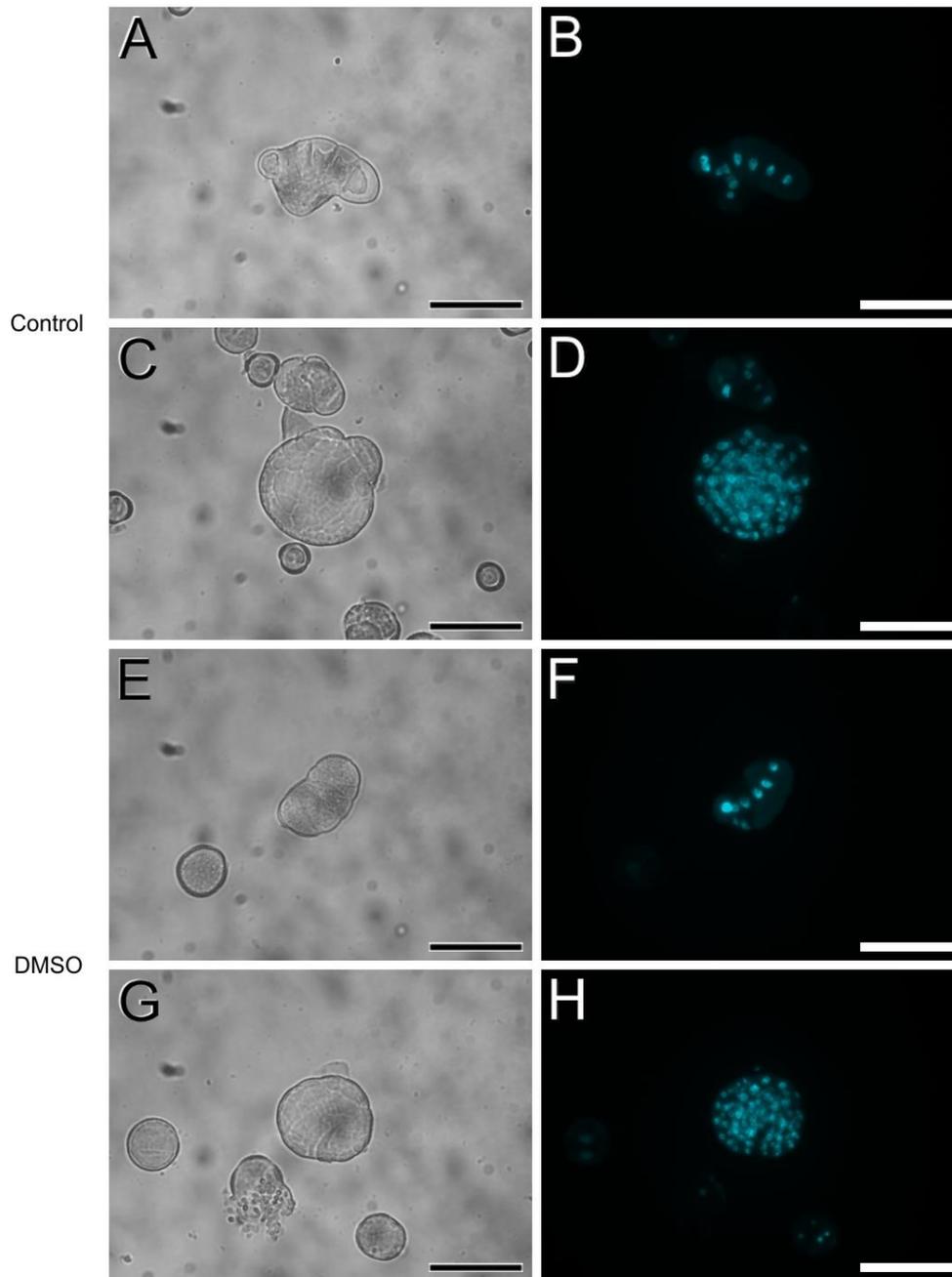


Figura 9 - Microsporas de colza pertenecientes al grupo control (A-D) y al tratamiento con DMSO (E-H). Fotos de campo claro (A, C, E y G) y fluorescencia para el DAPI (B, D, F y H). Las escalas de todas las fotos corresponden a 50 μm .

4. Resultados y discusión.

4.2. Colza.

Los resultados de este punto se han obtenido en colaboración con otra compañera de laboratorio, Verónica Parra-Vega.

Cuando se observaron las microsporas procedentes de los tratamientos con DMSO, 0,05 μ M de TSA y 0,5 μ M de TSA, se identificaron diferentes estructuras (Figura 10).

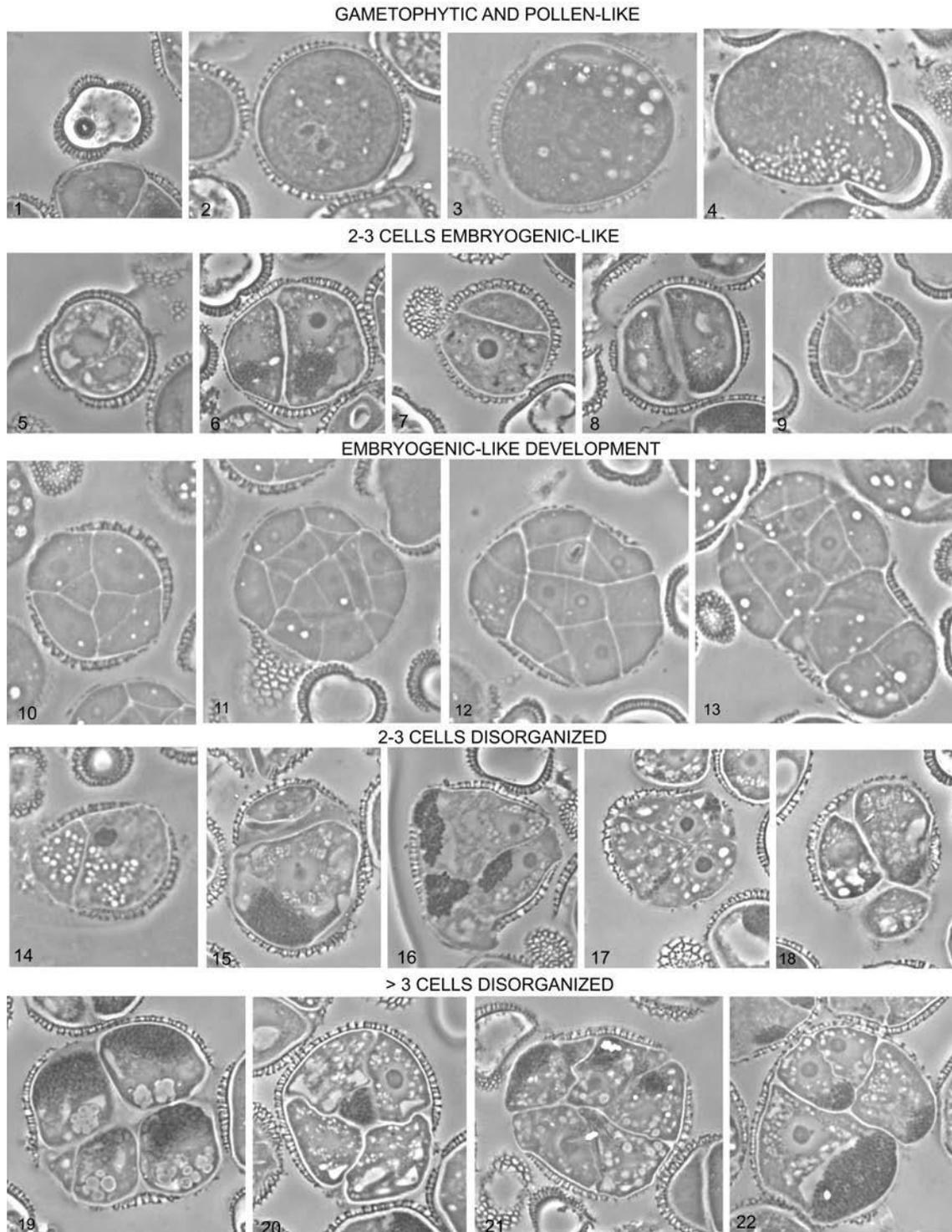


Figura 10 - Diferentes estructuras presentes en los cultivos de microsporas de colza.

Las estructuras identificadas fueron las siguientes:

Estructuras con desarrollo gametofítico y *pollen-like*. Dentro de esta categoría se incluyen estructuras que pueden haber seguido dos tipos de desarrollo. Por una parte, son microsporas que han parado su desarrollo y, por otro lado, microsporas que han seguido un desarrollo *pollen-like*. Éstas últimas son las estructuras que se van a denominar como *pollen-like* y aumentan drásticamente de tamaño. Además, de forma general, la exina se encuentra rota, ya sea parcial o completamente.

Desarrollo *embryogenic-like* de dos o tres células (pocas divisiones). Dentro de este grupo se encuentran aquellas microsporas que han seguido un desarrollo similar al de las células embriogénicas. Normalmente muestran una única división simétrica, aunque en ocasiones puede visualizarse una segunda división.

Desarrollo *embryogenic-like* (más divisiones que la categoría anterior). Dentro de esta categoría se encuentran los embriones de más de 3 células y los embriones con suspensor.

Estructuras con 2-3 células desorganizadas. Estructuras con divisiones que han tenido un desarrollo atípico. Suelen ser más grandes que las que han tenido un desarrollo *embryogenic-like*. Suelen mostrar un alto contenido en almidón y depósitos oscuros.

Estructuras con más de tres células desorganizadas. Las divisiones de estas estructuras son más numerosas y muestran un alto contenido en almidón y depósitos oscuros.

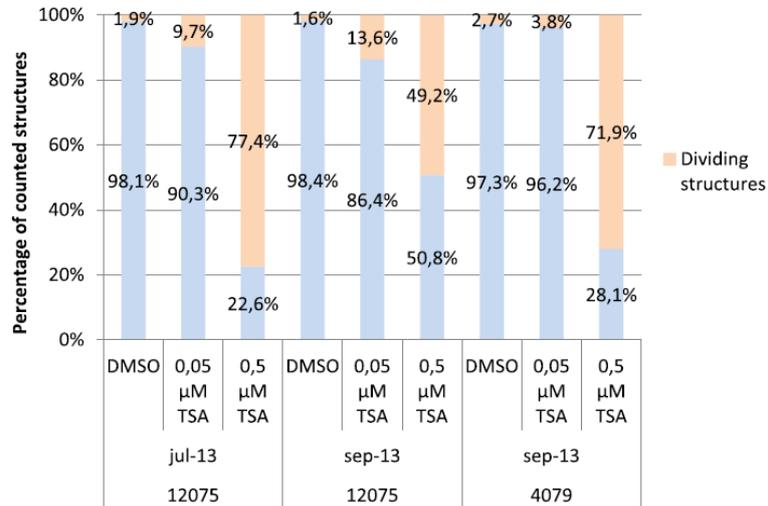
La naturaleza de los depósitos oscuros observados en el citoplasma, a los que hemos llamado glóbulos, se desconocía y fue uno de los motivos de este estudio. De todas las estructuras observadas, estos glóbulos están presentes con mayor frecuencia en las células en división y en las estructuras desorganizadas. Además, analizando las diferentes estructuras que aparecieron en los diferentes tratamientos, se observaron que no todas aparecían en todos los tratamientos. Ni que no todas las estructuras contenían glóbulos. En la Gráfica 5 se muestra el porcentaje de estructuras en división (rosa) y en no división (azul) en cada tratamiento y cultivo. Observando los tres cultivos, se puede ver un aumento de las estructuras en división cuando las microsporas se encuentran a la mayor concentración de TSA (0,5 μ M). La concentración menor también provocaba un aumento del número de estructuras de este tipo, aunque en menor cantidad.

Si se separa las estructuras que no muestran divisiones para un análisis, se obtiene la Gráfica 6. En esta Gráfica se observó como el porcentaje de estructuras de tipo polen y *pollen-like* es mayor en las muestras obtenidas en septiembre, lo que explica que en este cultivo se obtuviera una baja respuesta.

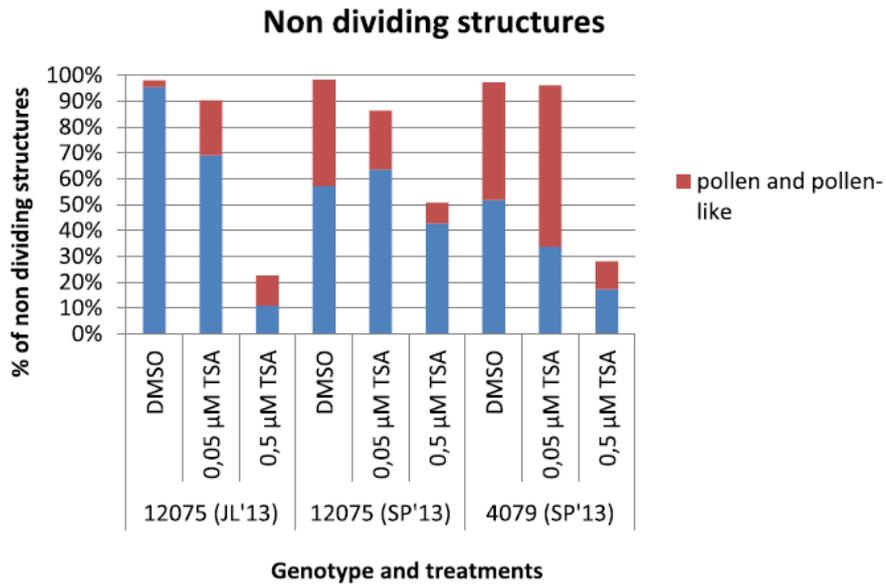
Si se separa las estructuras en división para un análisis, se obtiene la Gráfica 7. En esta Gráfica se observó como en el tratamiento con DMSO, el número de células en división fue muy bajo (alrededor de un 2%). En las muestras que fueron tratadas con la menor concentración de TSA, el número de este tipo de estructuras aumenta hasta el 15%. Por último, el número de estructuras en división de las muestras que habían sido tratadas con 0,5 μ M de TSA fue cercano al 80%. No aumentó el número de todas las estructuras en división, sino que el mayor aumento se produjo dentro del grupo de estructuras desorganizadas, ya fueron de pocas o muchas células. En las muestras obtenidas a partir de microsporas tratadas con la menor

4. Resultados y discusión.

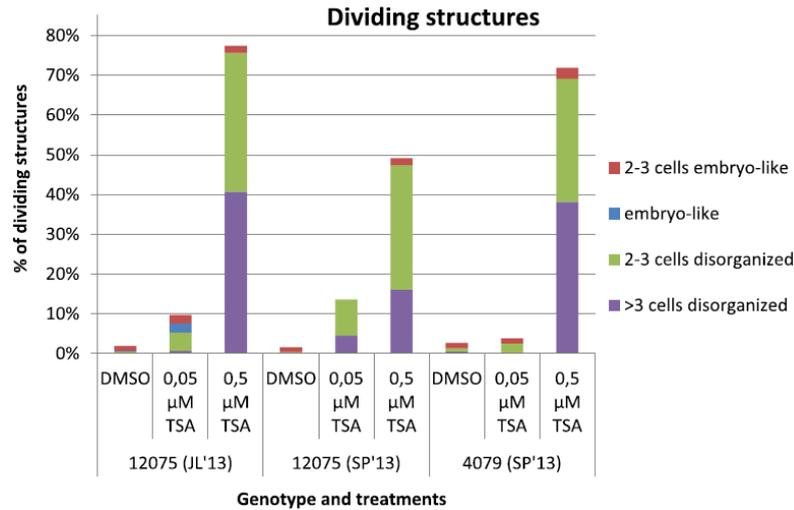
concentración de TSA fue donde se encontraba el mayor número de embriones. En cambio, en las muestras tratadas con la mayor concentración de TSA no aparecieron embriones. Esto es debido a que el TSA causa un mayor número de estructuras en división, pero desorganizadas.



Gráfica 5 - Porcentaje de estructuras en no división (azul) y en división (rosa) en cada tratamiento y cultivo de colza.



Gráfica 6 - Porcentaje de las estructuras de colza que no muestran divisiones. En rojo se muestra las estructuras tipo polen o pollen-like. En azul el resto.



Gráfica 7 - Porcentaje de las diferentes estructuras de colza en división respecto al total de estructuras que muestran divisiones.

Cuando las diferentes muestras se estudiaron al microscopio electrónico de transmisión, se observó acumulación de gránulos de almidón, presencia de glóbulos densos y polarización de estos glóbulos, de almidón y de los orgánulos. De todo esto, lo más extraño fue la presencia de los glóbulos densos, cuya naturaleza se desconoce. Se han identificado tres tipos de glóbulos (Figura 11). Los glóbulos de tipo 1 son más grandes y parece que son más homogéneos. Suelen ser poco numerosos dentro de las células. Los glóbulos de tipo 2 están distribuidos alrededor de la membrana plasmática. Es posible que estos glóbulos fueran en realidad ruido o manchas, por lo que no se analizaron en el presente trabajo. Por último, los glóbulos de tipo 3 son de menor tamaño que los de tipo 1, pero mucho más numerosos. Suelen estar agrupados y polarizados en un extremo de la célula. Es posible que los glóbulos empiecen formándose de este tipo y acaben fusionándose en otros más grande, que serían los de tipo 1, o viceversa.

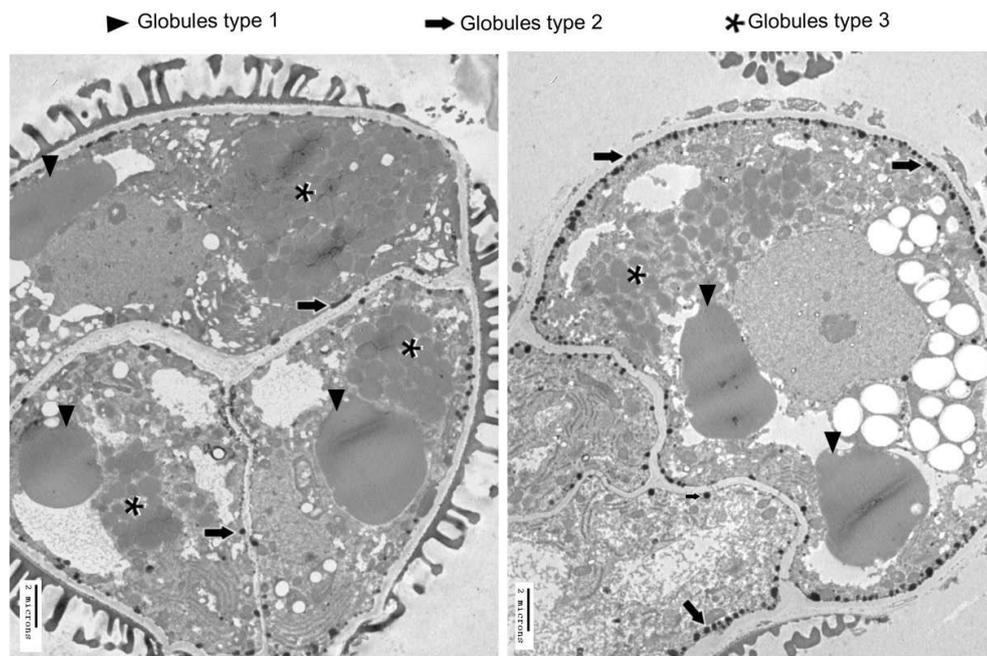


Figura 11- Diferentes tipos de glóbulos identificados en el interior de las células de colza con microscopía electrónica de transmisión. La escala de ambas fotos corresponde a 2 μm.

4. Resultados y discusión.

Al observar las muestras en microscopía óptica, se observó una polarización de los glóbulos oscuros y del almidón (Figura 12). La polarización se apreciaba de forma más clara en las muestras tratadas con la mayor concentración de TSA. Dos cosas son las que llaman la atención. Por una parte, el almidón se encuentra en un extremo y, en el polo opuesto de la célula, se encuentran los glóbulos. La polarización puede ser debida a ambos compuestos o sólo a uno, lo que significa que el almidón o los lípidos se desplazan hacia un extremo, obligando al otro compuesto a desplazarse hacia el espacio celular libre. En las células que contienen pocos glóbulos o estos son pequeños, el almidón se encuentra repartido por todo el espacio celular (Figura 13-a). A medida que el número de glóbulos aumenta y/o aumenta su tamaño, se aprecia como ambos compuestos empiezan a polarizarse (Figura 13-b). Por lo que una idea acertada sería decir que los glóbulos son los que se desplazan hacia un extremo, y que el almidón es el que es desplazado. Lo que también resulta interesante es que todas las células que se encuentran formando una estructura, tienen los glóbulos y el almidón polarizado hacia el mismo extremo, por lo que podría haber algún tipo de comunicación entre células que organice dicha orientación. Esto son hipótesis que convendría comprobar en estudios posteriores.

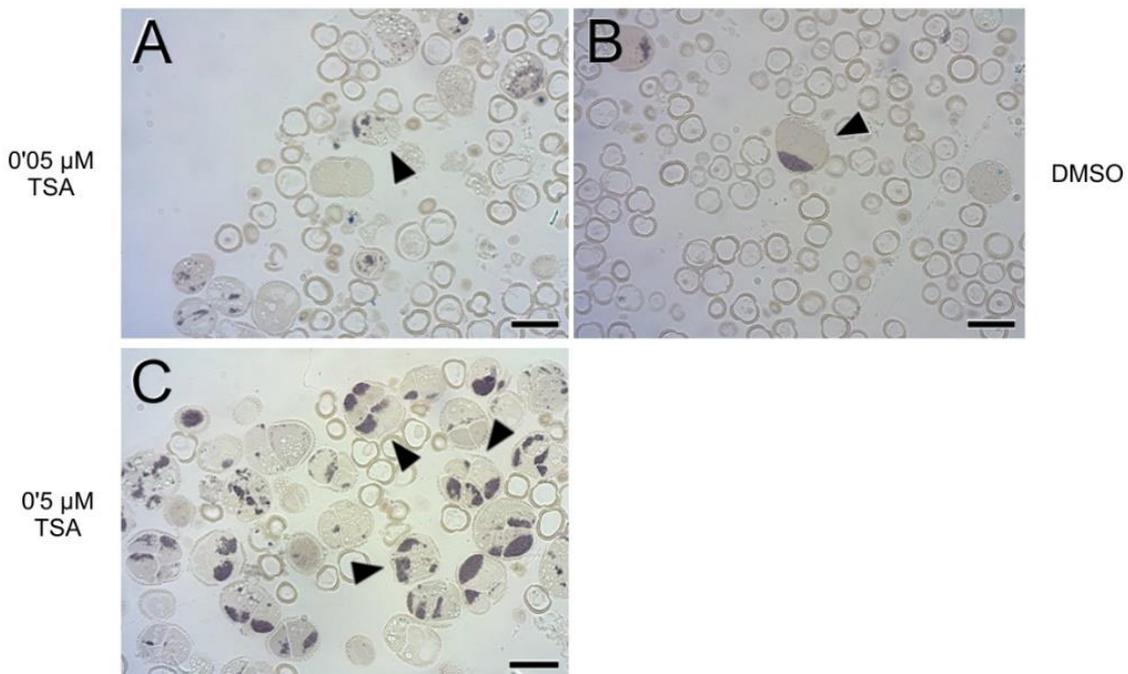


Figura 12 - Detalle de las estructuras de colza obtenidas con tratamientos con DMSO (A), con 0,05 μM de TSA (B) y con 0,5 μM de TSA (C). La escala de todas las fotos corresponde a 30 μm .

En los embriones no se observaron los glóbulos densos o bien, los que había, eran poco numerosos y de menor tamaño (Figura 14). Al analizar los diferentes cortes obtenidos, se ha llegado a la conclusión de que estos glóbulos se encuentran sobre todo dentro de aquellas estructuras que muestran respuesta al tratamiento, pero que las estructuras que van a dar lugar a un embrión, por alguna razón, eliminan dichos glóbulos.

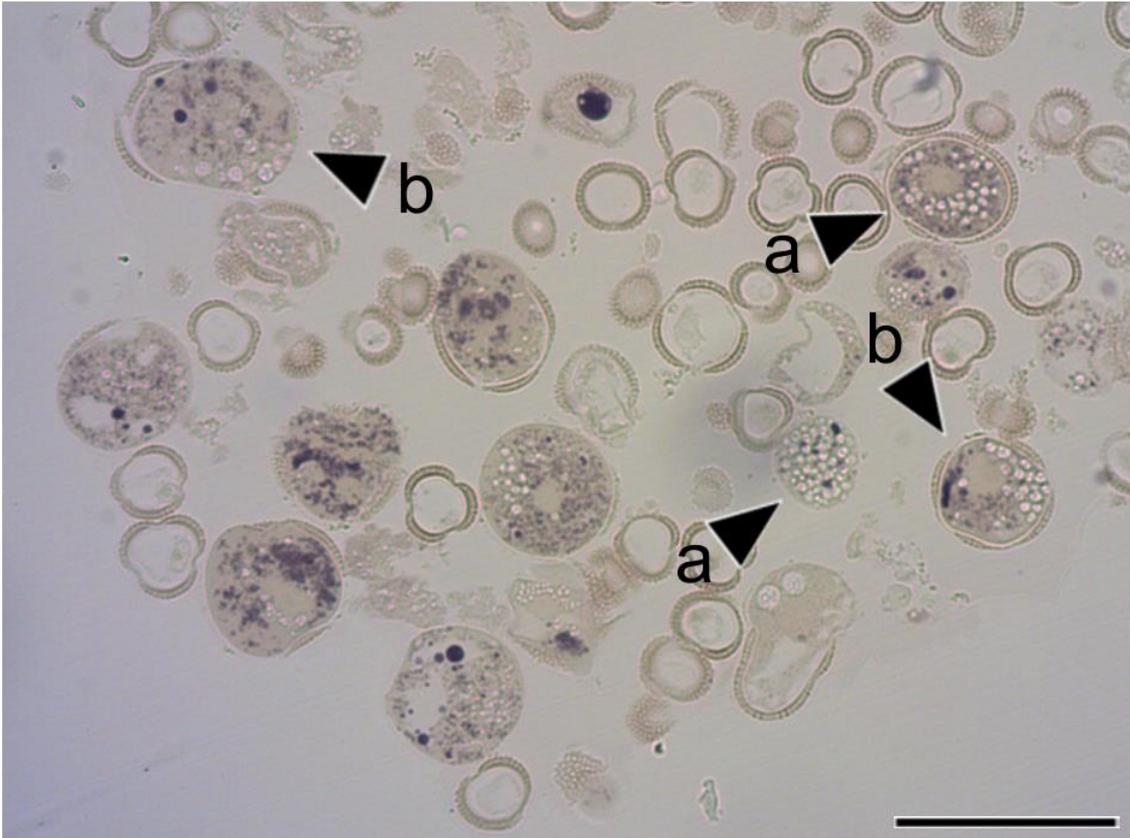


Figura 13 - Microsporas de colza tratadas con DMSO postfijadas con OsO_4 . Microsporas en las que no se aprecia polarización (a) y microsporas en las que se empieza a apreciar polarización de los glóbulos de lípidos y los gránulos de almidón (b). La escala corresponde a $20\ \mu m$.

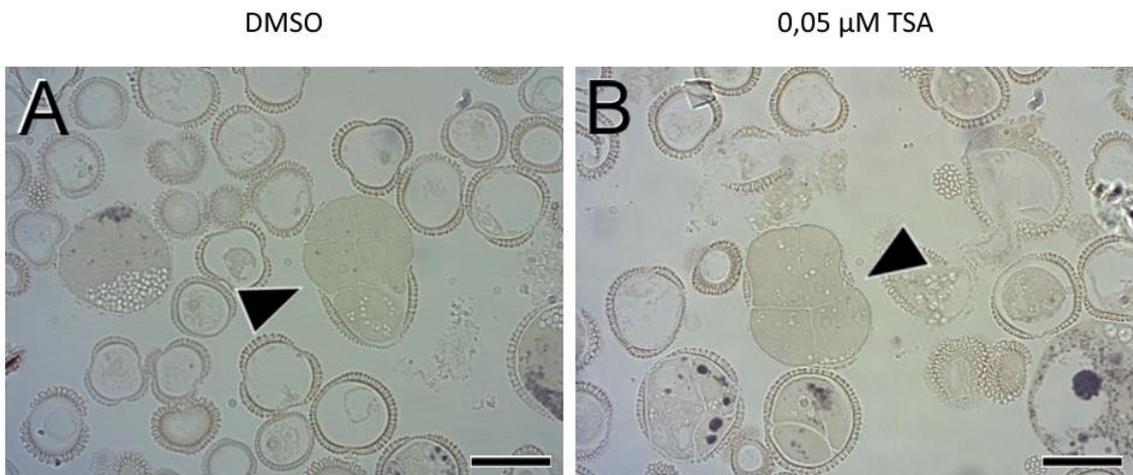


Figura 14 - Embriones de colza obtenidos tras el tratamiento con DMSO (A) y $0,05\ \mu M$ de TSA (B). No se observaron embriones cuando se trataba con la mayor concentración de TSA. La escala de todas las fotos corresponde a $20\ \mu m$.

4. Resultados y discusión.

4.2.1. Resultado de las tinciones.

Como se ha comentado en el apartado de *Materiales y métodos*, se han realizado cuatro tinciones para poder identificar la naturaleza de los glóbulos observados en el interior de las células. Las tinciones se realizaron a microsporas tratados con DMSO únicamente, 0,05 μM de TSA y 0,5 μM TSA.

En la Figura 15 se muestra el resultado de las tinciones en los diferentes tratamientos. Las fotos de las estructuras sin teñir sirvieron para comparar los diferentes resultados obtenidos.

La tinción con azul de toluidina se utilizó como control para comprobar que la tinción funciona con el tipo de muestra y resinas utilizadas. Se observa como se ha teñido el citoplasma y el núcleo de azul, por lo que la tinción funcionó.

Al teñir con lugol, los gránulos de almidón de dentro de las células se tiñeron de un color morado. Este resultado confirmó que dichos gránulos son almidón y, además, sirvió de control positivo para el resto de tinciones.

El colorante azul de Coomassie tiene afinidad por las proteínas. Con esta tinción se tiñó parte del citoplasma, pero lo que más llamó la atención es que también se tiñó la gelatina. Esto es debido a que la gelatina, utilizada para mantener las microsporas concentradas, está compuesta por proteínas, razón por la que se tiñó parte del fondo.

Por último, la tinción Sudan Black se utiliza en algunos casos para dar contraste a las muestras, ya que este colorante tiene afinidad por los lípidos y tiñe las membranas. Al comparar las estructuras teñidas con las no teñidas (Figura 16), se observó que los glóbulos densos tienen una tonalidad más oscura, lo que confirmaría que dichos glóbulos son lípidos. Además, se apreció como la resina adquiere una tonalidad azul causada por la tinción. Esto fue debido a que este tipo de resina, epoxi, tiene afinidad por el colorante Sudan Black.

Como este fue el primer cultivo realizado y no contenía un control real, en los demás cultivos sólo se realizaron dos tratamientos: un control sin DMSO y un tratamiento sólo con DMSO. De esta forma se pudo comparar con los datos obtenidos hasta ese momento y se obtuvo un control real del estudio. Estos cultivos fueron los que se utilizaron para los análisis que se describen en los dos puntos siguientes.

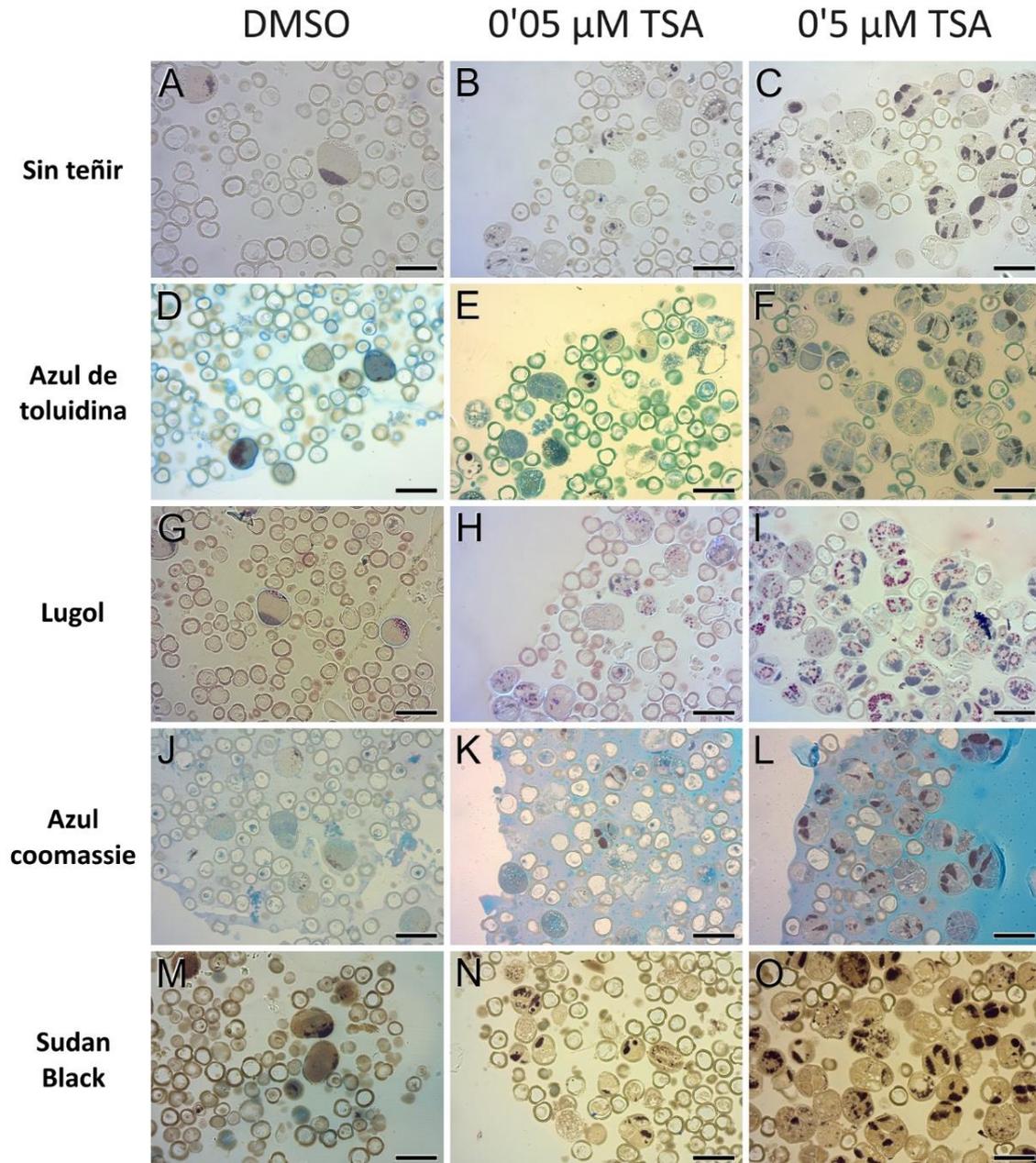


Figura 15 - Resultado de las tinciones realizadas sobre microsporas de colza tratadas con tres tratamientos distintos. Microsporas tratadas con DMSO (A, D, G, J y M), con 0,05 μ M de TSA (B, E, H, K y N) y con 0,5 μ M de TSA (C, F, I, L y O). Microsporas no teñidas (A, B y C), teñidas con azul de toluidina (D, E y F), teñidas con lugol (G, H e I), teñidas con azul Coomassie (J, K y L) y teñidas con Sudan Black (M, N y O). La escala de todas las fotos corresponde a 30 μ m.

4. Resultados y discusión.

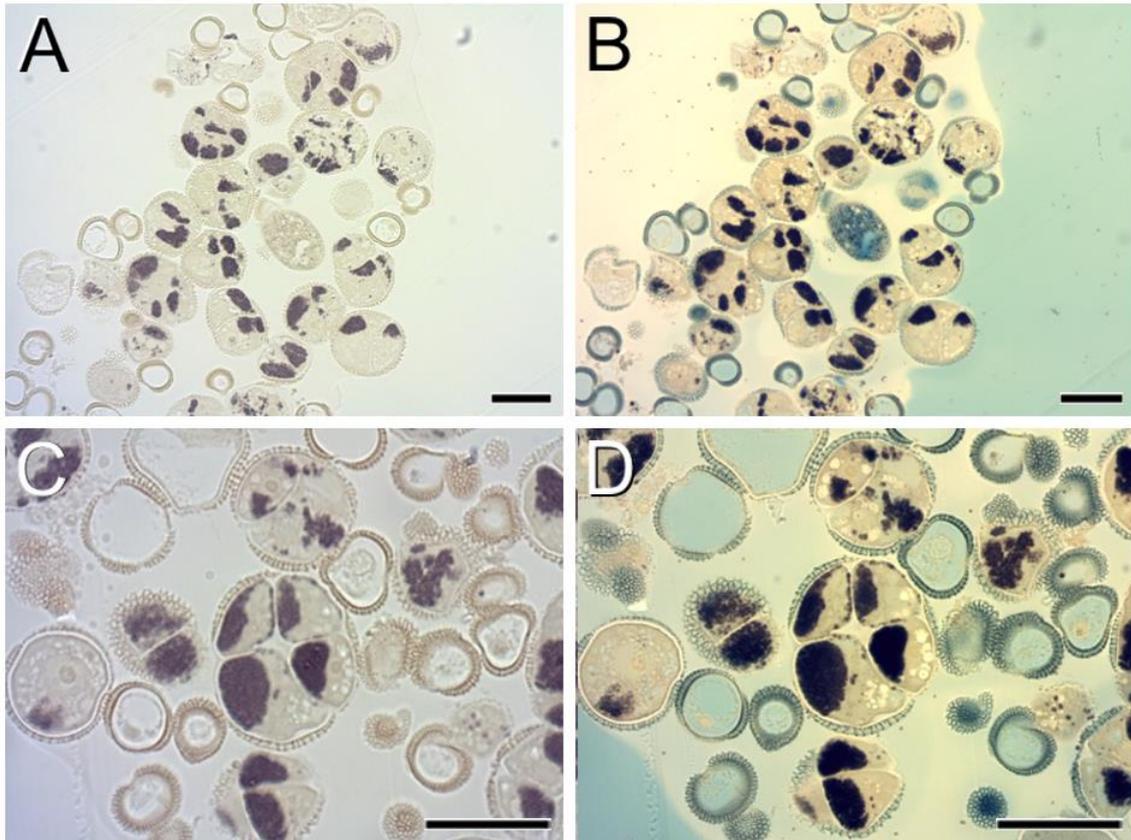


Figura 16 – Comparación de estructuras de colza teñidas con Sudan Black (B y D) y no teñidas (A y C). La escala de todas las fotos corresponde a 30 µm.

4.2.2. Comparación de muestras teñidas con Sudan Black y sin teñir.

Como se ha comentado, no se realizó un control sin DMSO desde el principio y se repitió el estudio para completarlo. Este control fue necesario para saber si la producción de estos glóbulos, que parecían ser lípidos, era causada por el TSA, por el DMSO o por ambos. En las Figuras 17 y 18 se muestran microsporas tratadas con DMSO y no tratadas, tanto sin teñir como teñidas. Estas microsporas han sido postfijadas con tetróxido de osmio.

En la Figura 17 (microsporas del tratamiento control) se pueden observar glóbulos dentro de las células, tanto en pequeñas o grandes acumulaciones. Cuando se tiñen con Sudan Black, toda la muestra adquiere una tonalidad azul, lo que afecta al análisis del resultado de la tinción. Los glóbulos se ven ligeramente más oscuros tras teñirse. Aunque, como ya son oscuros por el tetróxido de osmio utilizado, es posible que el análisis no sea totalmente fiable.

En la Figura 18 se muestran las microsporas que han sido tratadas con DMSO. En éstas también se observan los glóbulos y las conclusiones son las mismas que las anteriores.

Dado que en ambos tratamientos se observaron los glóbulos, ni el DMSO ni el TSA son los responsables de la formación de estos glóbulos. Como en las muestras procedentes de los tratamientos con TSA se observaron en mayor número, significa que estos compuestos provocaron el incremento de número de glóbulos.

Aquello que tiene afinidad por el Sudan Black se tiñó de un color azul-negro. Teniendo en cuenta que las muestras analizadas ya han sido postfijadas con tetróxido de osmio, lo que proporciona a los glóbulos el color oscuro, observar el resultado de la tinción puede ser complicado. Por esta razón, parte de la muestra obtenida no se post-fijó con tetróxido de osmio. El análisis de estas muestras se realiza en el punto siguiente.

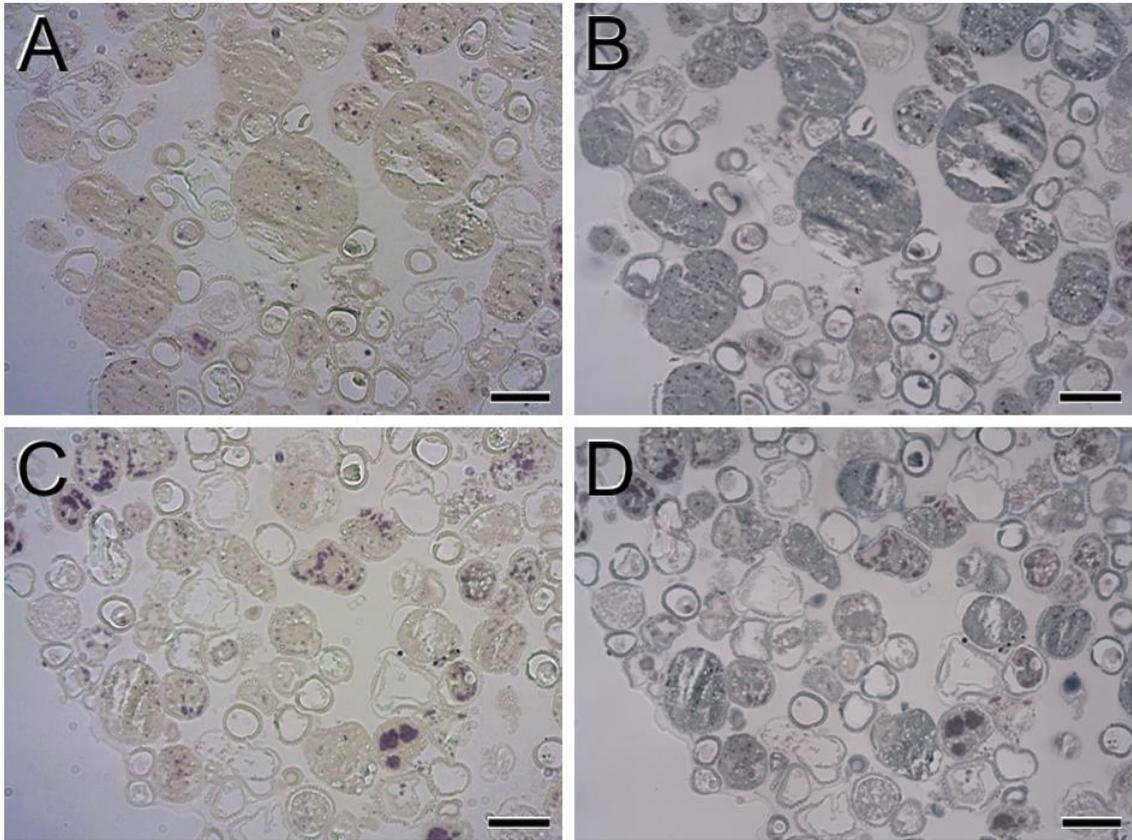


Figura 17 – Microsporas de colza pertenecientes al tratamiento control, postfijadas con tetróxido de osmio. Sin teñir (A y C) y teñidas con Sudan Black (B y D). Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μm .

4. Resultados y discusión.

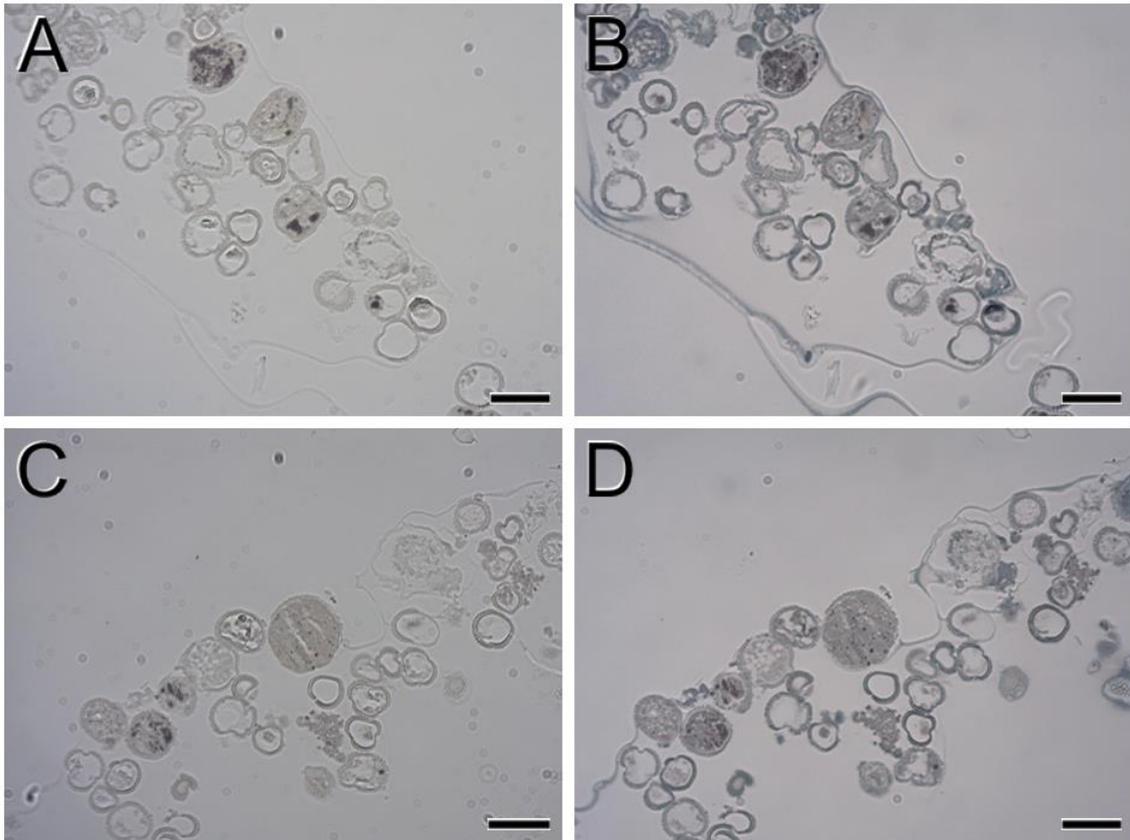


Figura 18 - Microsporas de colza tratadas con DMSO y postfijadas con tetróxido de osmio. Sin teñir (A y C) y teñidas con Sudan Black (B y D). Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 µm.

4.2.3. Comparación de muestras postfijadas con osmio y sin postfijar.

Como en el punto anterior, los tratamientos que se analizan en este apartado son el control y el tratamiento con DMSO.

En algunas fotos no se observó bien si la tinción con Sudan Black resultó positiva debido a que las muestras estaban postfijadas con tetróxido de osmio, por lo que primero fue comprobar si existe diferencia entre las muestras con y sin osmio en las que no se realizó ninguna tinción.

En la Figura 19 se muestra microsporas del grupo control y microsporas tratadas con DMSO que han sido postfijadas con OsO₄ y las que no han sido postfijadas. En las microsporas fijadas con osmio se observaron glóbulos que, en las que no fueron postfijadas, no aparecieron. Esto significa que dichos glóbulos eran lípidos y el osmio les proporcionaba el color oscuro. Dado que estos glóbulos aparecían tanto en el grupo control como en el tratamiento con DMSO, se confirmó otra vez la conclusión que se ha comentado en el punto anterior; ni el TSA ni el DMSO son los causantes de aparición de estos glóbulos. No obstante, sí pueden ser los causantes del incremento de estos glóbulos cuando se realizan tratamientos con mayores concentraciones de TSA.

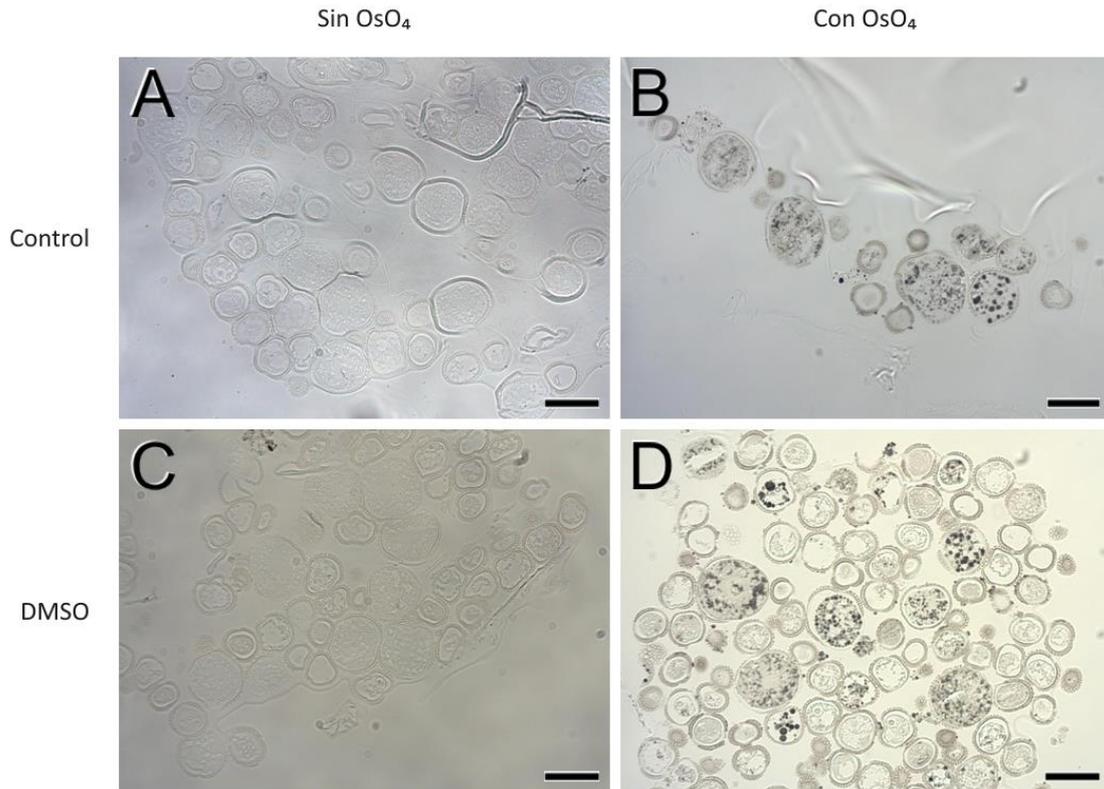


Figura 19 – Microsporas de colza postfijadas con OsO_4 (B y D) y no postfijadas (A y C). A y B corresponden al control. C y D corresponden al tratamiento con DMSO. Las escalas de todas las fotos corresponden a $30\ \mu\text{m}$.

En la Figura 20 se muestra el resultado de teñir con Sudan Black las microsporas del grupo control y las tratadas con DMSO cuando éstas no han sido postfijadas con OsO_4 . La gelatina retuvo parte del colorante, mostrando un fondo azul. Las microsporas también mostraban un tono azulado, permitiendo un mejor contraste que en las microsporas que no estaban teñidas. En el interior de las células no se observaron glóbulos de lípidos. Lo único que se apreció con claridad son los depósitos de almidón. La tinción con Sudan Black fue problemática y se realizaron diversas modificaciones en el protocolo para solventar los problemas. Es posible que esta sea la razón por la que no se teñieron los glóbulos.

De las tinciones realizadas, se podría decir que el colorante Sudan Black es el que ha teñido los glóbulos, pero dado que, durante los últimos meses la tinción no ha funcionado como debía, no se puede confirmar con exactitud. En cambio, en las muestras que se postfijaron con OsO_4 sí muestran glóbulos en su interior. Aunque la tinción haya fallado, esta postfijación confirma que la naturaleza de los glóbulos son lípidos.

4. Resultados y discusión.

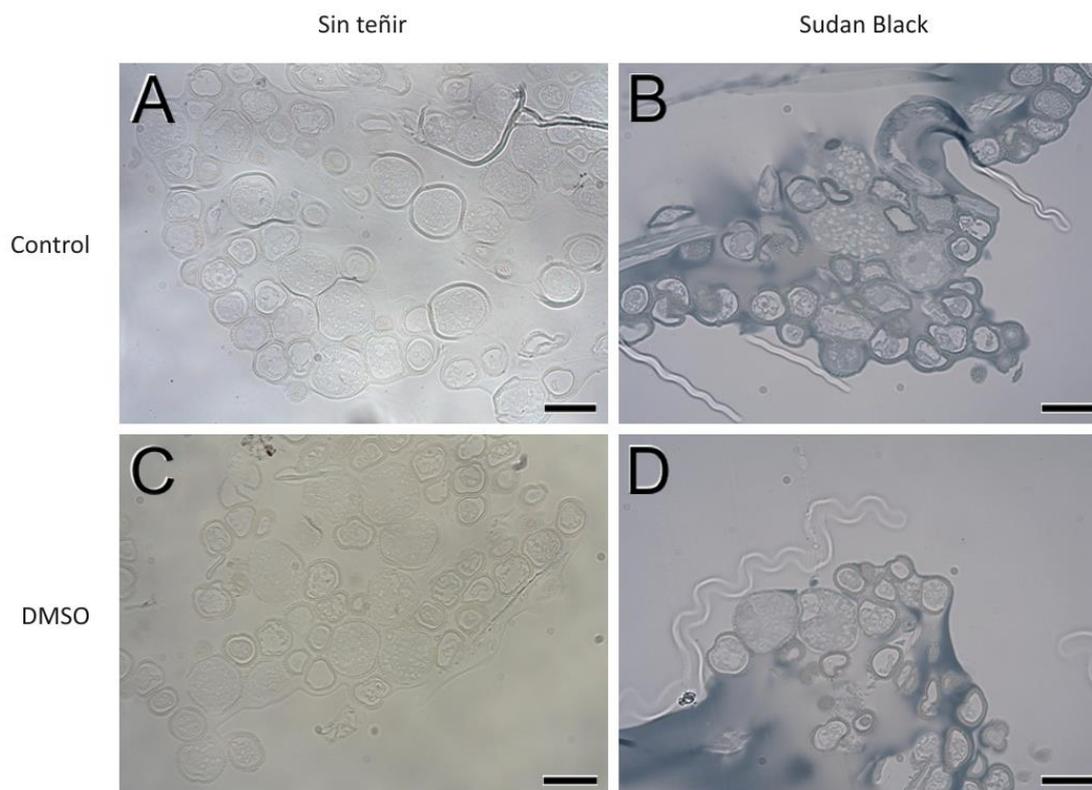


Figura 20 - Microsporas de colza correspondientes al tratamiento control (A y B) y al tratamiento con DMSO (C y D). Teñidas con Sudan Black (B y D) y sin teñir (C y D). Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μm .

Además, al encontrar glóbulos en todos los tratamientos, se confirma que ni el DMSO ni el TSA son los causantes de los depósitos lipídicos. Pueden aumentar su número, ya que a mayores concentraciones de TSA se observa un mayor número de glóbulos, pero no son su causa. Se ha llegado a dos causas hipotéticas de este incremento; o bien se produce por el TSA de forma directa, o bien se produce de forma indirecta porque el TSA provoca la división celular y, al estar dichos glóbulos en células en división, aumenta el número de depósitos de lípidos. Este análisis no se pudo completar durante la realización del TFM, por lo que sería algo a tener en cuenta para el futuro.

4.3. Pimiento.

Como se ha explicado en el apartado de *Materiales y métodos*, se eligió esta especie porque al ser recalcitrante, se quería comprobar si también se producen glóbulos con la adición de TSA y/o DMSO. Los tratamientos fueron los mismos que los que se realizaron en colza. Con el conocimiento previo de que los glóbulos son lípidos, sólo se realizaron estudios para comprobar su presencia. Parte de las muestras se postfijaron con OsO_4 y el resto se dejaron sin postfijar, de forma que al teñir con Sudan Black se pudiera observar con mayor claridad el resultado, el cual se describe a continuación.

4.3.1. Comparación de muestras teñidas con Sudan Black y sin teñir.

De los cultivos que se postfijaron con OsO_4 , se realizaron cortes y se teñieron con Sudan Black (Figura 21). Respecto al tratamiento control, no se observaron glóbulos, aunque es posible que fuera por el bajo número de células con respuesta que aparecieron dentro del campo de visión. Tras haber teñido la muestra, tampoco se observaron los glóbulos. En cambio, sí se observaron glóbulos en las muestras de los tratamientos con DMSO y con ambas concentraciones de TSA (marcados en la Figura 21, C-H). Aunque no eran tan grandes como los de colza, la presencia de estos implicaría que no son exclusivos de esta especie. La diferencia de tamaño podría deberse a la diferencia de especies, a que el pimiento es recalcitrante o bien a la diferente velocidad de desarrollo en cultivo (el pimiento necesita un mayor tiempo para responder al cultivo).

En lo que respecta a la tinción, toda la imagen tomó una tonalidad azul y los glóbulos se oscurecieron, lo que significa que la tinción funcionó. Pero como todo tomó un fondo más oscuro, es posible que confirmación de que la tinción funcionó sea un efecto óptico. Por esta razón, también se realizó la tinción en muestras que no fueron postfijadas con OsO_4 . El resultado de esto se describe en el punto siguiente.

4. Resultados y discusión.

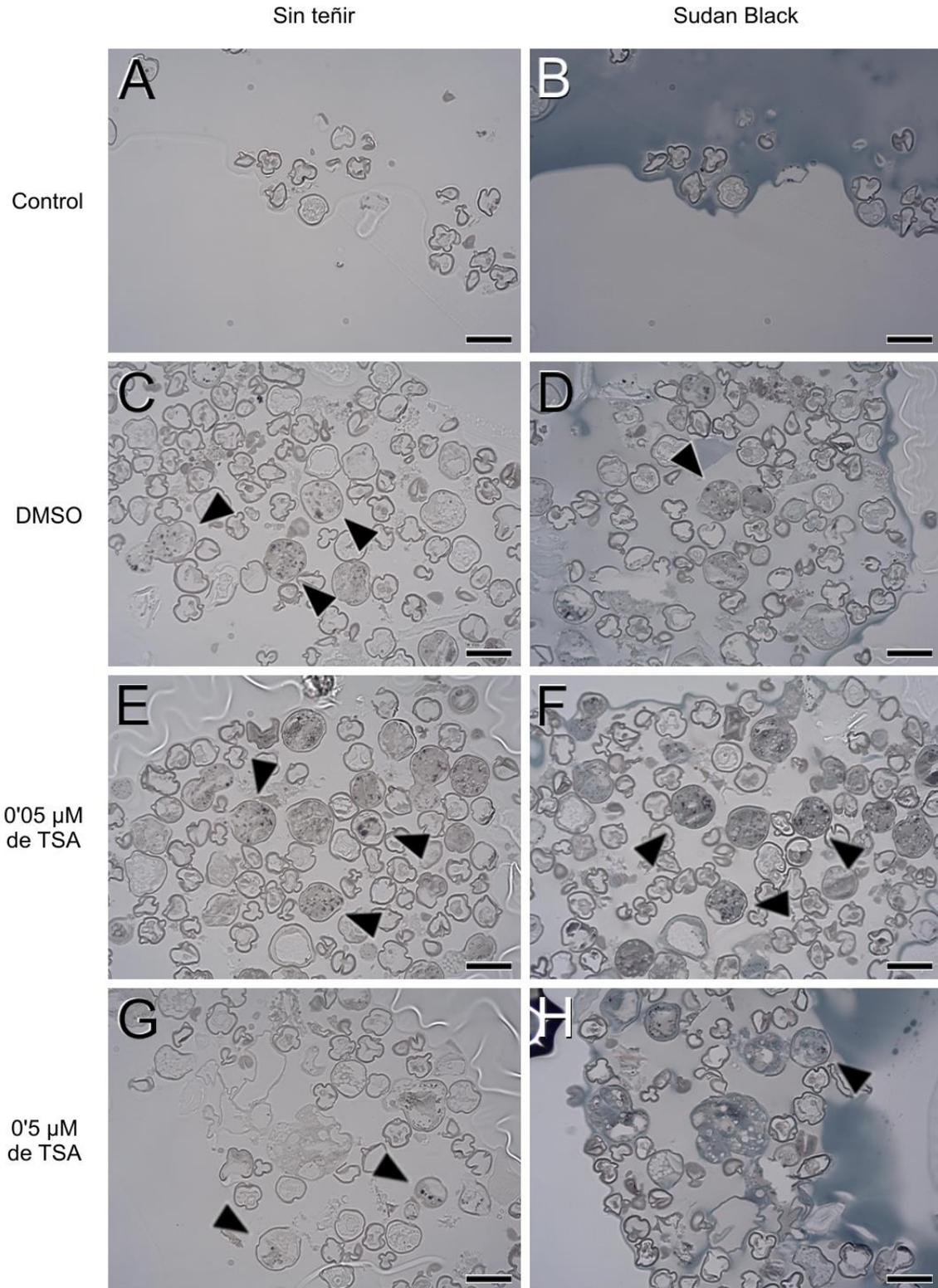


Figura 21 – Microsporas de colza del tratamiento control (A y B), tratadas con DMSO (C y D), tratadas con 0,05 μM de TSA (E y F) y tratadas con 0,5 μM de TSA (G y H). Todas las muestras han sido postfijadas con OsO_4 . La primera columna corresponde a las muestras sin teñir y la segunda columna a las teñidas con Sudan Black. Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μm .

4.3.2. Comparación de muestras postfijadas con osmio y sin postfijar.

En las muestras que no estaban postfijadas con OsO_4 no se observaron glóbulos (Figura 22), que es lo que esperaba al no oscurecerse los lípidos. Por otro lado, al teñirse con Sudan Black, tampoco se observaron los glóbulos de lípidos. Como en el caso anterior, la muestra sí se tiñó y todo el campo ha adquirido una tonalidad azul. No se apreciaron los depósitos de lípidos, pero sí los de almidón, las vacuolas y espacios vacíos de las células. Como en las muestras postfijadas sí se observaron glóbulos y en estas no, es posible que el problema se halle en la tinción con Sudan Black y no en la presencia o no de estos, como ya se ha comentado.

Al comparar una muestra postfijada y otra sin postfijar (Figura 23), se pudo ver como la primera tenía más contraste que la muestra sin postfijar. Además, como resultado de la postfijación, los glóbulos se volvieron visibles sin necesidad de otra tinción. Es decir, con el OsO_4 se observaron los glóbulos, por lo que en esta especie también hay glóbulos.

Respecto a la tinción con Sudan Black, durante la realización del trabajo se tuvo problemas que conllevaron a cambios en el protocolo y a la búsqueda de nuevas soluciones, las cuales se consiguieron. Pero, aun así, no considero que dicha tinción sea lo suficientemente fiable como para que, por ella misma, confirme el resultado. Es posible que el problema se encuentre en la incompatibilidad de la resina SPURR con el Sudan Black. Esta resina se suele utilizar para microscopia electrónica y no óptica, por lo que tinciones de este tipo pueden ser problemáticas. La razón del uso de esta resina fue que el primer cultivo se incluyó en resina Epon y la resina Spurr es del mismo tipo, resina epoxi. Se priorizó el uso del mismo tipo de resina para no interferir en la interpretación de los resultados. No obstante, aunque la tinción fue problemática, la postfijación con tetróxido de osmio fue un éxito y confirmó la naturaleza de los lípidos.

Aunque no se observaron los mismos glóbulos que en colza, sobre todo los del primer cultivo realizado de esta (Figura 12), en el interior de las células aparecieron dos tipos de glóbulos que llamaron la atención.

Por un lado, se observaron unos glóbulos muy pequeños (Figura 24) que se localizaron preferentemente en las vacuolas o demás espacios vacíos de las células. Aunque aparecieron en todos los tratamientos, se encontraron en mayor número en las microsporas tratadas con TSA, sobre todo en las células que crecieron bastante más que el resto.

Por otra parte, se observaron grandes depósitos de un color oscuro (Figura 25), distintos de los gránulos de almidón observados en colza. En algunas células, estos depósitos tenían una ligera tonalidad más clara. Cuando se observaron en contraste de fases, estos eran oscuros. En colza, los gránulos de almidón eran blancos y, cuando se observaban en contraste de fases, estos eran blancos y brillaban. Como se parecían los gránulos, se realizaron tinciones con lugol para comprobar si realmente eran almidón o no. El resultado de dichas tinciones se muestra en el siguiente punto.

4. Resultados y discusión.

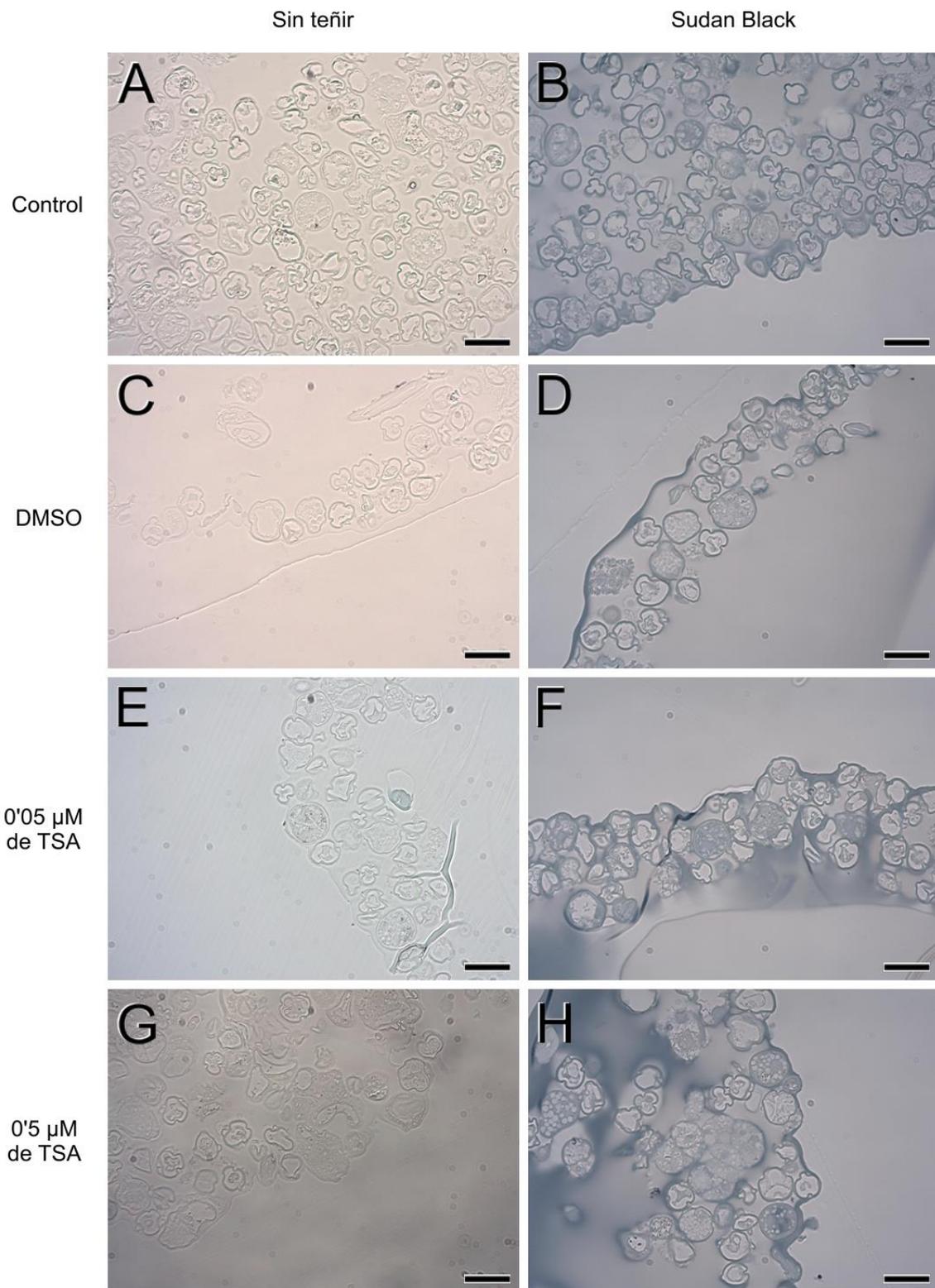


Figura 22 – Microsporas de pimienta del tratamiento control (A y B), tratadas con DMSO (C y D), tratadas con 0,05 μM de TSA (E y F) y tratadas con 0,5 μM de TSA (G y H). Ninguna de las muestras ha sido post fijada con OsO_4 . La primera columna corresponde a las muestras sin teñir y la segunda columna a las teñidas con Sudan Black. Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μm .

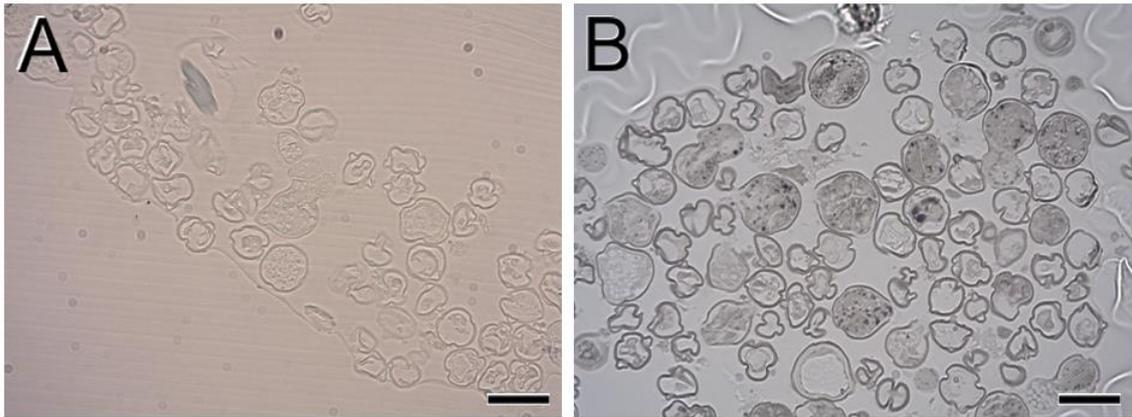


Figura 23 - Microsporas de pimienta tratadas con $0,05 \mu\text{M}$ de TSA, sin postfijar con OsO_4 (A) y postfijadas (B). Las escalas de todas las fotos corresponden a $30 \mu\text{m}$.

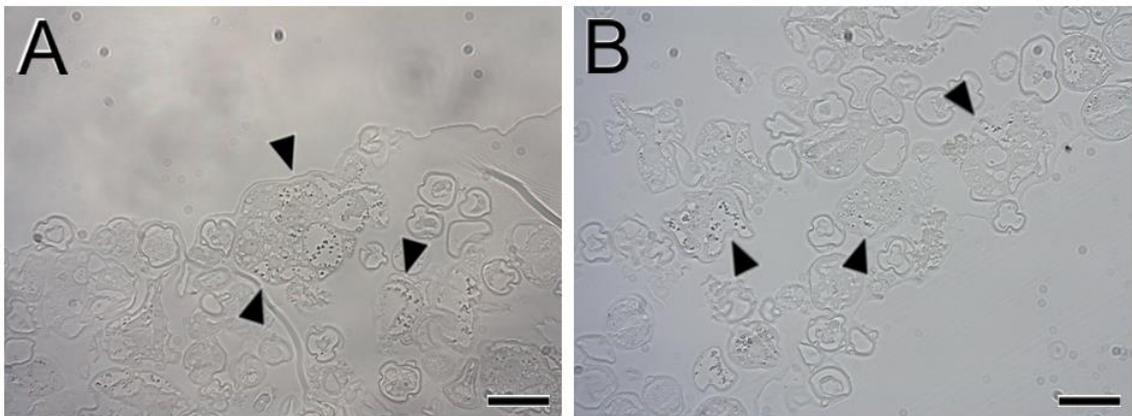


Figura 24 - Microsporas de pimienta tratadas con $0,5 \mu\text{M}$ de TSA (A y B). Se señalan pequeños glóbulos. Las escalas de todas las fotos corresponden a $30 \mu\text{m}$.

4. Resultados y discusión.

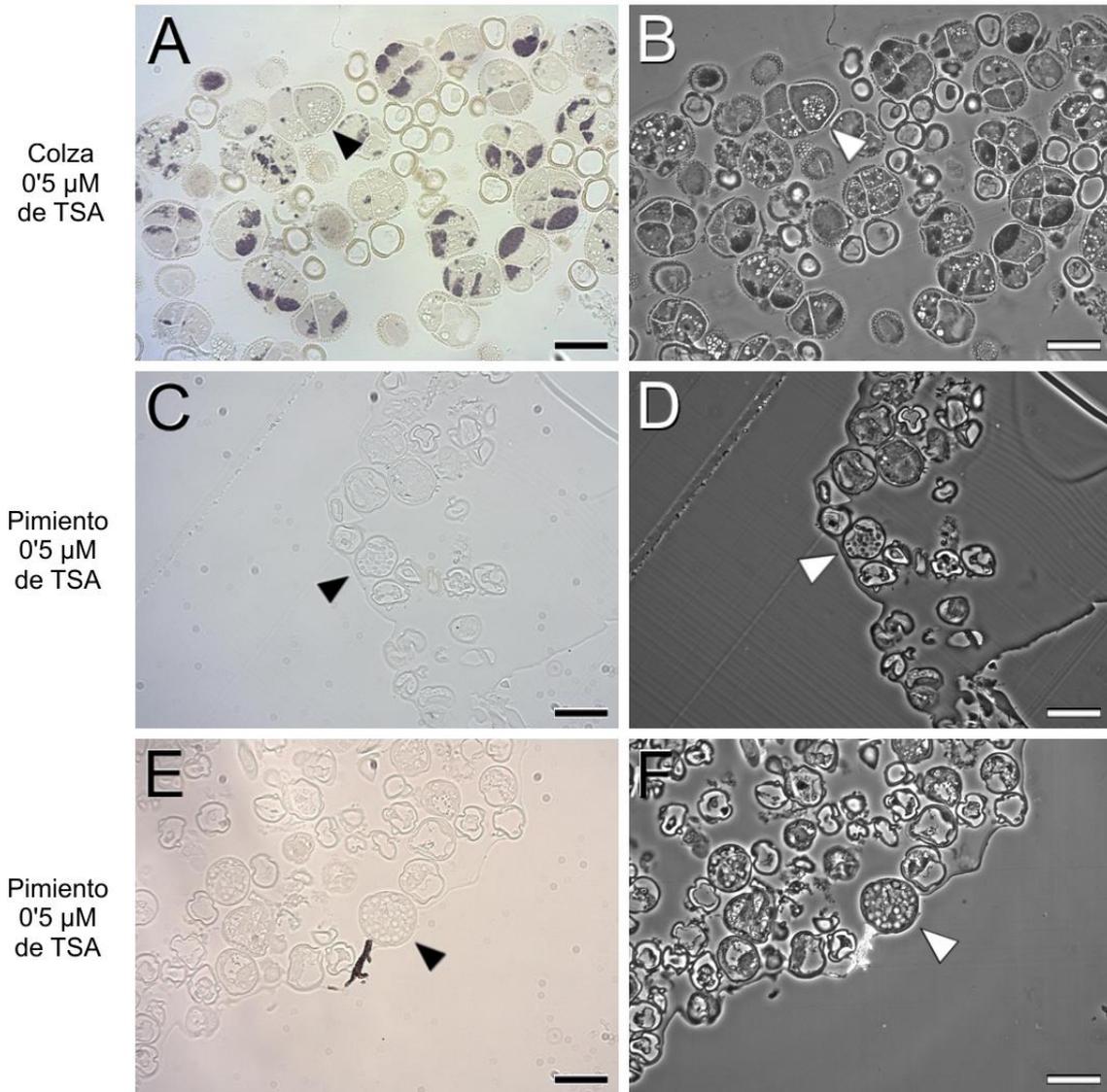


Figura 25 - Microsporas de colza (A y B) y de pimiento (C-F) tratadas con 0,5 μ M de TSA. En la primera columna se muestran las fotos en campo claro y en la segunda, en contraste de fases. Se marca en las fotos los gránulos de almidón de colza (A y B) y los gránulos observados en pimiento (C-F). Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μ m.

4.3.3. Tinción con lugol.

Como se ha comentado en el punto anterior, esta tinción se realizó a raíz de la aparición de unos depósitos que podrían ser almidón, pero que eran ligeramente distintos a los de colza. En la Figura 26 se muestran las microsporas de pimiento, teñidas y sin teñir con lugol, correspondientes a los cuatro tratamientos. Los depósitos o glóbulos que se observaban se tiñeron, por lo que se confirmó que estos eran gránulos de almidón, aunque fueran ligeramente diferentes a los de colza.

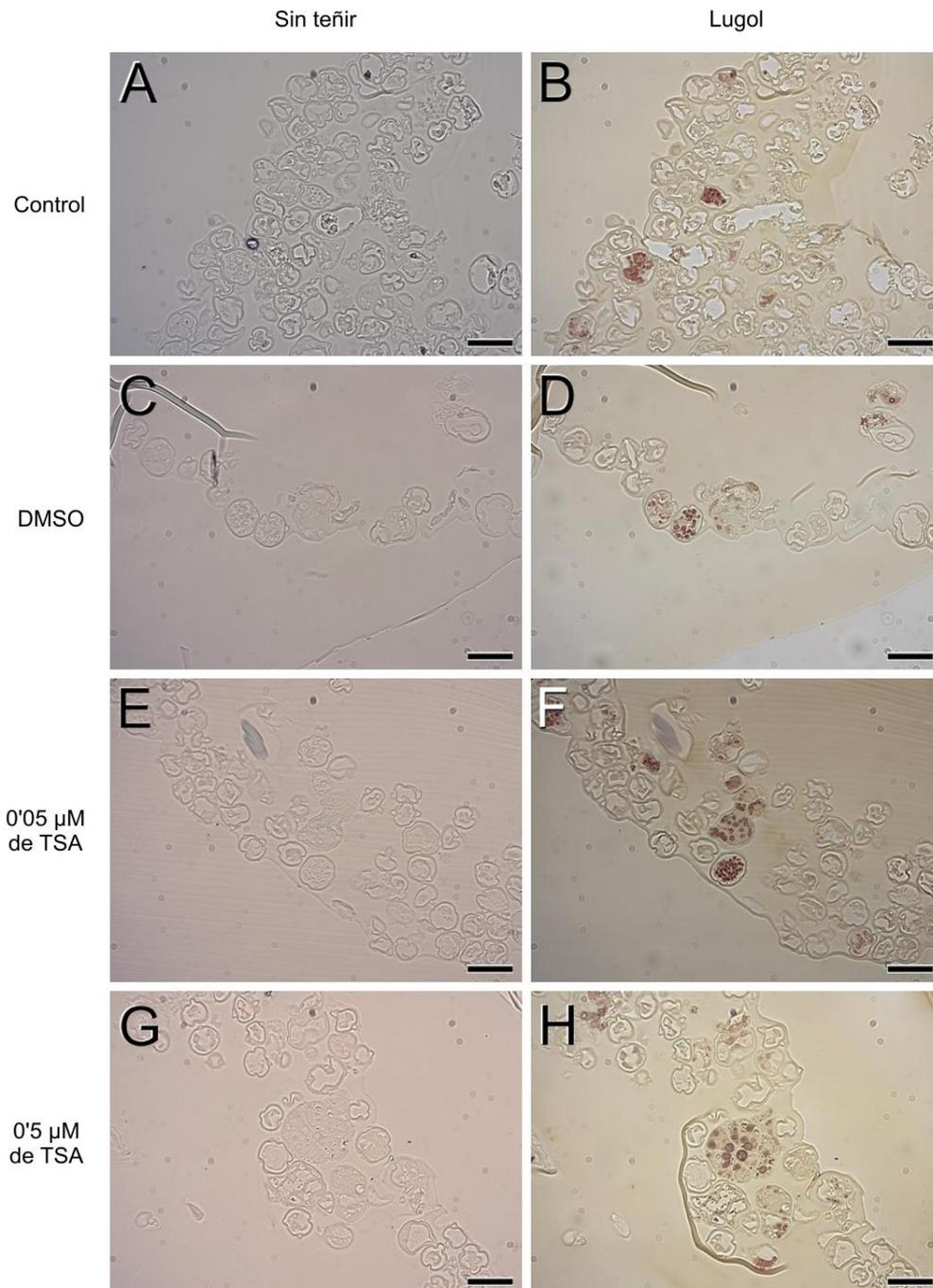


Figura 26 - Microsporas de colza del tratamiento control (A y B), tratadas con DMSO (C y D), tratadas con 0,05 μM de TSA (E y F) y tratadas con 0,5 μM de TSA (G y H). Ninguna de las muestras ha sido post fijada con OsO_4 . La primera columna corresponde a las muestras sin teñir y la segunda columna a las teñidas con lugol. Las escalas de todas las fotos corresponden a 30 μm .

Es posible que la existencia de estos pequeños glóbulos pudiera estar relacionada con los fenómenos de autofagia y limpieza del citoplasma asociados a la reprogramación hacia embriogénesis mediante estrés de los cultivos de microsporas (Corral-Martínez, et al. 2013). Por otro lado, la alta cantidad de almidón detectada en algunas células podría estar relacionada con el hecho de que, durante los primeros momentos de las estructuras embriogénicas tras la inducción, se encuentran activos genes correspondientes tanto a la ruta gametofítica y embriogénica {Seguí-Simarro, 2008 #5364}. Algunas de las características que definen al desarrollo gametofítico es la síntesis y acumulación en forma de depósitos

4. *Resultados y discusión.*

intracelulares. Es muy posible que en estos momentos iniciales en los que conviven ambos programas, los genes implicados en la síntesis y almacenamiento de almidón estén siendo activamente expresados.

5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones de los resultados obtenidos se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Tras las tinciones, se confirmó que los glóbulos observados son lípidos.
2. Ni el TSA ni el DMSO son los causantes de dichos glóbulos. No obstante, sí son los causantes de su aumento al utilizar mayores concentraciones de TSA.
3. En los embriones de colza no hay lípidos, aunque parece ser que los hubo durante las primeras divisiones.
4. Se observa una polarización de los glóbulos lipídicos y de los depósitos de almidón en los cultivos de colza.
5. Al observar las microsporas de pimiento postfijadas con OsO_4 también se observan glóbulos, aunque estos son distintos a los observados en colza.

Para estudios futuros, sería interesante analizar la causa exacta del aumento del número de glóbulos en las microsporas.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Bhowmik, P., J. Dirpaul, et al. (2011). "A high throughput *Brassica napus* microspore culture system: influence of percoll gradient separation and bud selection on embryogenesis." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **106**(2): 359-362.
- Binarova, P., G. Hause, et al. (1997). "A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L." Sexual Plant Reproduction **10**(4): 200-208.
- Bosland, P.W. and E.J. Votava. (2000). "Peppers: Vegetable and Spice Capsicums". CABI Publishing, Wallingford, UK., pp: 1-16.
- Corral-Martínez, P., F. Nuez, et al. (2011). "Genetic, quantitative and microscopic evidence for fusion of haploid nuclei and growth of somatic calli in cultured *ms10³⁵* tomato anthers." Euphytica **178**(2): 215-228.
- Corral-Martínez, P., V. Parra-Vega, et al. (2013). "Novel features of *Brassica napus* embryogenic microspores revealed by high pressure freezing and freeze substitution: evidence for massive autophagy and excretion-based cytoplasmic cleaning." Journal of Experimental Botany **64**(10): 3061-3075.
- Crosby, K. M. (2008). Pepper. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. J. Prohens and F. Nuez. New York, NY, Springer New York. **2**: 221-248.
- Cubero, J. I. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal, 2ª edición. Madrid, Spain, Ediciones Mundi-Prensa.
- Cheng, Y., R. Ma, et al. (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.
- Dufour, P., C. Johnsson, et al. (2001). "Segregation distortion at marker loci: variation during microspore embryogenesis in maize." Theoretical and Applied Genetics **100**2: 993-1001.
- Dunwell, J. M. (2010). "Haploids in flowering plants: origins and exploitation." Plant Biotechnology Journal **8**(4): 377-424.
- FAO. 2002. "El Cultivo Protegido en Clima Mediterráneo". ISBN 92-5-302719-3.
- FAOSTAT. (2014). "<http://faostat.fao.org> [last checked May 2014]."
- Forster, B. P., E. Heberle-Bors, et al. (2007). "The resurgence of haploids in higher plants." Trends in Plant Science **12**(8): 368-375.
- Germanà, M. A. (2006). "Doubled haploid production in fruit crops." Plant Cell, Tissue and Organ Culture **86**(2): 131-146.
- Guerrero, A., (1999). *Cultivos herbáceos extensivos*. Mundiprensa. ISBN: 9788471147974.

6. Bibliografía.

- Guha, S. and S. C. Maheshwari (1964). "In vitro production of embryos from anthers of *Datura*." Nature **204**: 497.
- Hüsken, A., Baumert, A., Milowski, C., Becker, H. C., Strack, D. and Möllers, C. (2005). "Resveratrol glucoside (Piceid) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L.)." Theoretical and Applied Genetics **111**(8): 1553-1562.
- Kapuscinski, J. (2009). "DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe". Biotechnic & Histochemistry **70** (5): 220-233.
- Kim, M., I.-C. Jang, et al. (2008). "Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture." Plant Cell Reports **27**(3): 425-434.
- Lee, J. J., Crosby, K. M., Pike, L. M., Yoo, K. S and Leskovar, D. I. (2005). "Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.)." Scientia Horticulturae **106**(3): 341-352.
- Li, H., M. Soriano, et al. (2014). "The Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Promotes Totipotency in the Male Gametophyte." The Plant Cell **26**(1): 195-209.
- Lim, T. K. (2013). Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants, Springer Netherlands. **5**: 72-104.
- Lorea-Conde, I. and Molero, P. (2015). "Implicaciones de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo y tratamiento de los trastornos de la personalidad". Actas Españolas de Psiquiatría **43**(2): 42-50.
- Martín, A. (2002). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Genómica y Mejora Vegetal. F. Nuez, J. M. Carrillo Becerril and R. Lozano. Sevilla, Mundi-Prensa: 37-63.
- Owens, D. K., Alerging, A. B., Crosby, K. C., Bandara, A. B., Westwood, J. H. and Winkel, B. S.J. (2008) "Functional Analysis of a Predicted Flavonol Synthase Gene Family in Arabidopsis". Plant Physiology **147**: 1046-1061.
- Palmer, C. E. and W. A. Keller (2005). Overview of haploidy. Haploids in crop improvement II. C. E. Palmer, W. A. Keller and K. J. Kasha. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **56**: 3-9.
- Parra-Vega, V. (2015). Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza, Universitat Politècnica de València.
- Parra-Vega, V., B. González-García, et al. (2013). "Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.)." Acta Physiologiae Plantarum **35**(2): 627-633.
- Protocols and Applications Guide, PROMEGA (promega.es).
- Ramirez, C., P. S. Testillano, et al. (2001). "The early microspore embryogenesis pathway in barley is accompanied by concrete ultrastructural and expression changes." International Journal of Developmental Biology **45**: S57-S58.

- Reifschneider, F. J. B., Boiteux, L. S., Della Vecchia, P.T., Poulos, J. M. and Kuroda, N. (1992). "Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper". Euphytica **62**(1): 45-49. doi: 10.1007/BF00036086.
- Riaz, A., Li, G., Quresh, Z., Swati, M. S. and Quiros, C. F. (2001). "Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines base on sequenced-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance." Plant Breeding **120**: 411-415.
- Rivas-Sendra, A., P. Corral-Martínez, et al. (2015). "Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis." Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) **122**(3): 759-765.
- Rodríguez-Sanz, H., J. Moreno-Romero, et al. (2014). "Changes in Histone Methylation and Acetylation during Microspore Reprogramming to Embryogenesis Occur Concomitantly with BnHKMT and BnHAT Expression and Are Associated with Cell Totipotency, Proliferation, and Differentiation in *Brassica napus*." Cytogenetic and Genome Research **143**(1-3): 209-218.
- Seguí-Simarro, J. M. (2010). "Androgenesis revisited." The Botanical Review **76**(3): 377-404.
- Seguí-Simarro, J. M., P. Corral-Martínez, et al. (2011). "Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops." Plant Cell Reports **30**(5): 765-778.
- Seguí-Simarro, J. M. and F. Nuez (2007). "Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of tomato isolated microspores and whole anthers." Journal of Experimental Botany **58**(5): 1119-1132.
- Seguí-Simarro, J. M. and F. Nuez (2008). "How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis." Physiologia Plantarum **134**: 1-12.
- Seguí Simarro, J. M. (2010). Biología y biotecnología reproductiva de las plantas. Valencia, Spain, Editorial Universitat Politècnica de València.
- Touraev, A., B. P. Forster, et al. (2009). Advances in haploid production in higher plants. New York, Springer Science + Business Media.
- USDA, NRCS Plants database (nrsc.usda.gov).
- Welch, R. M., and Graham, R. D. (2002). "Breeding crops for enhanced micronutrient content". Plant and Soil **245**(1): 205-214.
- Wang, M., S. van Bergen, et al. (2000). "Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding." Plant Physiology **124**(2): 523-530.
- Wedzony, M., B. P. Forster, et al. (2009). Progress in doubled haploid technology in higher plants. Advances in haploid production in higher plants. A. Touraev, B. P. Forster and S. M. Jain. Dordrecht, Netherlands, Springer: 1-33.

6. *Bibliografia.*

Zaki, M. A. M. and Dickinson, H. G. (1990). "Structural changes during the first division of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. Protoplasma **156**: 149-162.

