



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



ESTUDIO DE LA OSMOLALIDAD INTERNA Y DEL MEDIO EN CULTIVOS *IN VITRO* DE MICROSPORAS DE BERENJENA

Autora: Eva Segarra Martín

Tutor: José María Seguí-Simarro

Cotutora: Carolina Camacho Fernández

Localidad: Valencia

Fecha de entrega: 10 de julio de 2017

TÍTULO: ESTUDIO DE LA OSMOLALIDAD INTERNA Y DEL MEDIO EN CULTIVOS *IN VITRO* DE MICROSPORAS DE BERENJENA

ABSTRACT: Microspore embryogenesis is a process by which microspores switch their gametophytic development to a sporophytic pathway. When this occurs, the microspore starts to divide itself symmetrically and produces haploid embryos (that can become doubled haploids) or doubled haploid embryos directly. This process is very interesting from an agronomic point of view because it is a quick way to produce pure lines, that are essential to obtain hybrid seeds. For this reason, we are interested in studying this phenomenon in eggplant, a solanaceous species with a big agronomic interest in Spain. Nowadays, it is possible to obtain doubled haploids in eggplant through organogenesis or anther culture. But when microspore embryogenesis is induced, the embryos obtained end up becoming calli. These calli can regenerate into plants through organogenesis, but this process is less efficient than embryogenesis and consumes more time. For this reason, it is interesting to study under which conditions it would be possible to induce a proper embryogenic pathway for eggplant microspores. In this project we try to analyse which osmotic changes suffer the microspore when it is induced, to understand better what is going on inside it and try to discover which are the best conditions for its proper development.

RESUMEN: La embriogénesis de microsporas es un proceso mediante el cual las microsporas cambian su desarrollo gametofítico por un desarrollo esporofítico. De esta forma la microspora se divide de forma simétrica produciendo embriones haploides (que posteriormente se pueden convertir en dobles haploides), o embriones diploides directamente. Este proceso tiene un gran interés agronómico, pues es una forma rápida y barata de obtener líneas puras, esenciales para la producción de semillas híbridas. Por ello, se pretende estudiar este fenómeno en berenjena, una solanácea de gran interés agroalimentario en España. Actualmente en berenjena es posible obtener dobles haploides mediante cultivo de anteras o mediante organogénesis, pero cuando se induce la embriogénesis en microsporas cultivadas, los embriones derivados de las microsporas terminan transformándose en callos, nunca en embriones. Estos callos pueden transformarse en plantas dobles haploides mediante organogénesis pero este proceso no es tan eficiente como la embriogénesis de microsporas y requiere más tiempo. Por este motivo resulta interesante investigar sobre qué condiciones de cultivo se podría llegar a inducir la embriogénesis en especies como la berenjena y que lleguen a formar embriones. En este trabajo se pretende estudiar los cambios osmóticos que sufre la microspora cuando es inducida, para intentar vislumbrar por qué no es capaz de terminar su desarrollo embriogénico e intentar descubrir qué condiciones exactas harían falta para conseguirlo.

Keywords: osmotic pressure, microspores, eggplant, embryogenesis, organogenesis, calli, doubled haploids, *Solanum melongena*.

Palabras clave: presión osmótica, microsporas, berenjena, embriogénesis, organogénesis, callos, dobles haploides, *Solanum melongena*.

Autora: Eva Segarra Martín

Valencia, julio de 2017

Tutor académico: Prof. D. José María Seguí-Simarro

Cotutora: Dña. Carolina Camacho Fernández

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecer a José María Seguí-Simarro la oportunidad que me dio al permitirme colaborar en su laboratorio durante todo este curso. Gracias a él he podido tener un primer contacto con la investigación científica de calidad. Su perseverancia fue siempre un estímulo para seguir adelante a pesar de las dificultades que fueron surgiendo en el camino.

Durante todo este tiempo mi cotutora Carolina Camacho ha sido un apoyo continuo dando siempre un toque de positividad a cada percance que se nos ponía por delante. Su cercanía y su amabilidad hacía del laboratorio un lugar más acogedor.

Por supuesto, no me puedo olvidar del resto de mis compañeros, Tono, Alberto, Alba, Rosa y Abu, con los que pude compartir risas, agobios, estreses y logros.

Por último, quiero agradecer a mis padres su confianza en mí, por no dejarme caer cuando incluso yo pensaba que no llegaba a tiempo. Y también a mis amigas y mis compañeras de clase por compartir todo este proceso juntas, sacándome a tomar algo y compartir penas cuando lo veíamos todo negro.

Todos ellos han colaborado en mayor o menor medida a la persona que soy hoy, a la formación que he recibido en este tiempo y a que este proyecto pudiera salir adelante.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Biotecnología y mejora genética vegetal.....	1
1.2. Líneas híbridas y heterosis.....	1
1.3. Obtención de líneas puras.....	2
1.3.1. De forma tradicional.....	2
1.3.2. Obtención de dobles haploides <i>in vitro</i>	3
1.4. Androgénesis.....	4
1.5. Androgénesis en berenjena.....	7
1.6. Factores que influyen en el rendimiento de la embriogénesis de microsporas.....	9
2. OBJETIVO	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	11
3.1. Berenjena DH36	11
3.2. Instrumental	13
3.3. Mediciones control de osmolalidad de hoja	14
3.4. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo estándar	14
3.5. Mediciones control de osmolalidad de microsporas frescas.....	14
3.6. Cultivo de microsporas.....	15
3.7. Medición de osmolalidad de las microsporas cultivadas y de su medio a distintos tiempos de cultivo.....	17
3.7.1. Rotura de la pared celular de las microsporas con pistones.....	17
3.7.2. Rotura de la pared celular de las microsporas con microesferas de vidrio	18
3.7.3. Rotura de la pared celular de las microsporas combinando el uso de microesferas y un tampón de extracción	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Mediciones control de osmolalidad de hoja	19
4.2. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo estándar	21
4.3. Mediciones control de osmolalidad de microsporas frescas	21
4.4. Mediciones de osmolalidad de las microsporas cultivadas y de su medio a distintos tiempos de cultivo	23
4.4.1. Rotura de la pared celular de las microsporas con pistones	23

4.4.2. Rotura de la pared celular de las microsporas con microesferas de vidrio.....	26
4.4.3. Rotura de la pared celular de las microsporas combinando el uso de microesferas y un tampón de extracción	26
4.5. Medición de la osmolalidad del medio de cultivo	28
4.6. Propuestas para el futuro	28
5. CONCLUSIONES	29
6. BIBLIOGRAFÍA	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Valores de osmolalidad en extracto de hoja (mOsm/kg) y sus diluciones.....	19
Tabla 4.2. Valores de error cuadrático de cada una de las réplicas de hoja y de su media.....	20
Tabla 4.3. Valores de osmolalidad del medio de berenjena.....	21
Tabla 4.4. Valores de osmolalidad de microsporas frescas (sin diluir y diluidas).....	22
Tabla 4.5. Valores de R ² de cada una de las réplicas y de su media.....	22
Tabla 4.6. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo sin diluir y de las microsporas a días 0, 3 y 7 diluidas cinco veces.....	24
Tabla 4.7. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo sin diluir y aproximación de los valores de osmolalidad del interior de las microsporas sin diluir.....	24
Tabla 4.8. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo de berenjena que no han llegado a inducirse a días 0, 3, 7 y 14.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de la reprogramación embriogénica de la microspora.....	5
Figura 1.2. Evolución de embriogénesis de microspora y de embriogénesis cigótica.....	7
Figura 1.3. Desarrollo androgénico de las microsporas de berenjena.....	9
Figura 3.1. Variabilidad morfológica de la población de DH.....	12
Figura 3.2. Micro osmómetro, microesferas de vidrio y homogeneizador/agitador.....	13
Figura 4.1. Representación de los valores de osmolalidad del extracto de hoja frente a su dilución.....	20
Figura 4.2. Representación gráfica de la media de los valores de osmolalidad del extracto de hoja frente a su dilución.....	20
Figura 4.3. Valores de osmolalidad de microsporas frescas frente a sus diluciones.....	22
Figura 4.4. Representación de la media de las osmolalidades de las nueve réplicas frente a sus diluciones.....	23
Figura 4.5. Microsporas antes y después de la supuesta homogeneización.....	26

INTRODUCCIÓN

1.1. **Biotecnología y mejora genética vegetal**

La biotecnología es un área multidisciplinar que combina conocimientos de biología, química y procesos tecnológicos e industriales, y que utiliza organismos vivos para obtener productos de interés. Sus aplicaciones están extendidas en campos como la agricultura, farmacia, ciencia de los alimentos, ciencias forestales y medicina. Dentro de la agricultura, la biotecnología se emplea entre otras cosas, para mejora genética vegetal.

La mejora genética vegetal tiene como objetivo obtener variedades de plantas de cultivo que garanticen rendimientos de producción altos, estables y con la calidad requerida. Para ello se potencian los caracteres genéticos de cada especie que presentan un fenotipo acorde a las demandas del mercado.

1.2. **Líneas híbridas y heterosis**

Una de las aplicaciones biotecnológicas que resultan interesantes en producción agrícola es la obtención de líneas híbridas, es decir, individuos que presenten heterocigosis en todos sus loci. Estas líneas presentan superioridad fenotípica frente a otras que tengan algún grado de homocigosis en su genoma, y por ello son muy demandadas por empresas y agricultores. Esta superioridad fenotípica se conoce como heterosis o vigor híbrido (Shull, 1914). La heterosis en individuos híbridos fue constatada en 1764 comprobando que un híbrido entre dos variedades de tabaco crecía más que sus progenitores (Kölreuter, 1764). Un siglo después, Charles R. Darwin también observó este mismo fenómeno en más de 60 especies de plantas, en las que la estatura de los híbridos intraespecíficos era superior a la de sus líneas parentales, que se habían obtenido mediante sucesivas autofecundaciones (Darwin, 1876).

Esta superioridad se ha tratado de explicar suponiendo que las líneas puras son en ocasiones homocigóticas para alelos recesivos y ligeramente deletéreos, que son suprimidos en el híbrido por los correspondientes dominantes. Otra hipótesis se basa en que, en condiciones de codominancia, se expresan los dos alelos de un heterocigoto, con lo cual la expresión fenotípica es más diversa que en los individuos homocigotos, que sólo expresan su único alelo. También se han sugerido procesos basados en la epistasia o la pseudodominancia (Lippman y Zamir, 2007). Independientemente de cuáles sean los mecanismos responsables de este fenómeno, es innegable su alto interés económico y

social, ya que no sólo se favorecería la obtención de productos vegetales de mayor calidad, sino que además estos serían homogéneos entre sí (Duvick, 1959; Lacadena, 1970; Wright, 1980).

Para poder obtener estos individuos híbridos es necesario fecundar dos individuos parentales que sean totalmente homocigotos, denominados líneas puras. Las empresas están interesadas en contar con estos individuos homocigotos para poder obtener a partir de ellas semillas híbridas, lo que proporcionará al agricultor una descendencia híbrida con unas características de producción mejoradas y uniformes. En caso de que los agricultores quieran obtener más descendencias a partir del híbrido obtenido, se encontrarán con una generación F2 segregante, que generará una variabilidad de caracteres no deseables. Esto supone una clara ventaja para las empresas productoras de semilla ya que el agricultor debe comprar las semillas puras cada año (Cubero y Salmerón, 2013). A pesar de ello, el agricultor se ve compensado por la obtención de una producción elevada, homogénea, y con las mismas características a lo largo del tiempo.

1.3. Obtención de líneas puras

1.3.1. De forma tradicional

Una forma de producir individuos homocigotos de forma tradicional es mediante autofecundación entre individuos obtenidos a partir de parentales seleccionados sobre parámetros de adaptabilidad, agronómicos, productividad, etc. Tras sucesivas autofecundaciones entre los descendientes se generan individuos con cada vez más grado de homocigosis (98-99%), llegando a obtener lo que se conoce como líneas puras (Vega, 2015). Esta metodología fue fundamentada científicamente por el genetista danés Wilhelm Ludvig Johannsen, quien argumentaba que suponiendo una planta que se reproduce por autofecundación, considerando un único gen mendeliano con dos alelos, y partiendo de un parental heterocigoto, en la primera generación de descendientes sólo la mitad de los individuos serían heterocigotos. En la generación siguiente los descendientes homocigotos sólo tendrían hijos homocigotos e iguales a ellos, y sólo la mitad de los descendientes de los heterocigotos serían heterocigotos a su vez. Por tanto, la frecuencia de heterocigotos en la descendencia total sería la cuarta parte. Al cabo de n generaciones de autofecundación, la frecuencia de heterocigotos sería $\left(\frac{1}{2^n}\right)$ y la frecuencia de homocigotos $1 - \left(\frac{1}{2^n}\right)$. Por esta razón, en las especies de plantas que se reproducen por autofecundación tienden a formarse poblaciones de homocigotos, es decir, líneas puras (Johannsen, 1903).

La obtención de líneas puras mediante autofecundación es un proceso que resulta costoso tanto en tiempo como en recursos, ya que supone dejar crecer las plantas hasta poder fecundar varias generaciones, en general entre 7 y 10 en cultivos herbáceos. Por este motivo actualmente resulta interesante investigar cómo obtener líneas puras *in vitro* en una única generación mediante individuos dobles haploides (DHs).

1.3.2. Obtención de dobles haploides *in vitro*

Un DH es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un organismo haploide experimentan un proceso espontáneo o inducido artificialmente de duplicación cromosómica. Las ventajas que presenta el uso de DHs en mejora genética son principalmente la reducción del tiempo de obtención de líneas homocigotas y una mayor precisión de selección de las mismas.

Existen diversos métodos para la obtención de plantas DHs *in vitro*. Uno de los primeros en utilizarse fue la partenogénesis, que puede ser inducida tanto *in vivo* como *in vitro* mediante la polinización con granos de polen triploides o irradiados e inactivados por tratamientos físicos o químicos. De esta forma, se formaría un embrión sin la intervención del gameto masculino (Sestili y Ficcadenti, 1996; Ollitrault et al., 1996; Oiyama y Kobayashi, 1993; Germaná y Chiancone, 2001). También se utiliza la eliminación cromosómica para producir plantas haploides eliminando uno de los juegos cromosómicos de los parentales tras la fecundación con dos especies distintas (Jensen, 1983).

En cuanto a metodologías en las que la obtención de embriones haploides se consigue sin fusión de los núcleos de los gametos masculino y femenino encontramos tanto la ginogénesis como la androgénesis. La ginogénesis consiste en la formación de embriones que contienen solamente los cromosomas maternos. Se puede llevar a cabo *in vitro* mediante el cultivo de flores no fecundadas, ovarios y, en menor medida, de sacos embrionarios no polinizados o mediante el cultivo de células huevo aisladas (Keller y Korzun, 1996). Esta técnica actualmente es la menos empleada por su baja eficiencia, aunque sigue siendo útil para obtener plantas DHs en especies que no responden adecuadamente a la androgénesis.

En plantas superiores se pueden obtener plantas tanto haploides como DHs mediante androgénesis, bien por cultivo de anteras o por cultivo de microsporas aisladas en medios

nutritivos. Es importante destacar que la utilización de estos métodos en ocasiones generarán organismos DHs pero en otros casos se producirán organismos haploides. Estos últimos deben ser tratados con químicos como la colchicina para que puedan duplicar su genoma y convertirse en DHs (Wan et al., 1989; Zhou et al., 2002; Davies y Sidhu, 2017). Puesto que la colchicina se trata de un compuesto tóxico tanto para el ser humano como para el medio ambiente, actualmente se están utilizando también herbicidas antimitóticos como la pronamida o la orizalina con el mismo fin y resultados positivos; que aunque también son tóxicos, al poder usarse en dosis menores, son menos peligrosos (Liu et al., 2016).

1.4. Androgénesis

Mediante la androgénesis se obtienen plantas tanto haploides como DHs que derivan únicamente del núcleo masculino. Esto se consigue desviando la formación del grano de polen de la especie en cuestión en su paso de microspora vacuolada a polen bicelular temprano (Figura 1.1) para que de lugar a un embrión, sin necesidad de fecundar la célula huevo. Este proceso, también conocido como embriogénesis de microsporas, se produce sometiendo a la microspora a algún tipo de estrés, la cual, gracias a su estado proliferativo, es capaz de diferenciarse en célula embrionaria (Malik et al. 2007).

Guha y Masheshwari (1964) fueron los primeros en describir la formación de plantas mediante androgénesis a partir del polen del interior de las anteras. Este método es más sencillo que el cultivo de microsporas aisladas ya que únicamente hay que escindir las anteras de las yemas de la flor y cultivarlas en un medio semisólido. Tras varias semanas, las microsporas del saco polínico se transformarán en embriones derivados de microsporas (MDEs) y emergerán de la antera, que se va necrosando. Esta técnica es bastante rápida y barata, por lo que es de las que más se usan para producir DHs androgénicos, aunque también presenta ciertas desventajas. En ocasiones pueden aparecer embriones somáticos que provienen del tejido de la antera; otro inconveniente sería el efecto secretor e incontrolable de la capa del tapete que rodea al saco polínico, lo que nos hace perder el control sobre las condiciones del cultivo; además, la eficiencia de producción de MDEs es limitada, por lo que generalmente se obtienen unos pocos embriones por antera cultivada. Estas limitaciones se pueden vencer mediante el cultivo de microsporas aisladas (Seguí-Simarro, 2016).

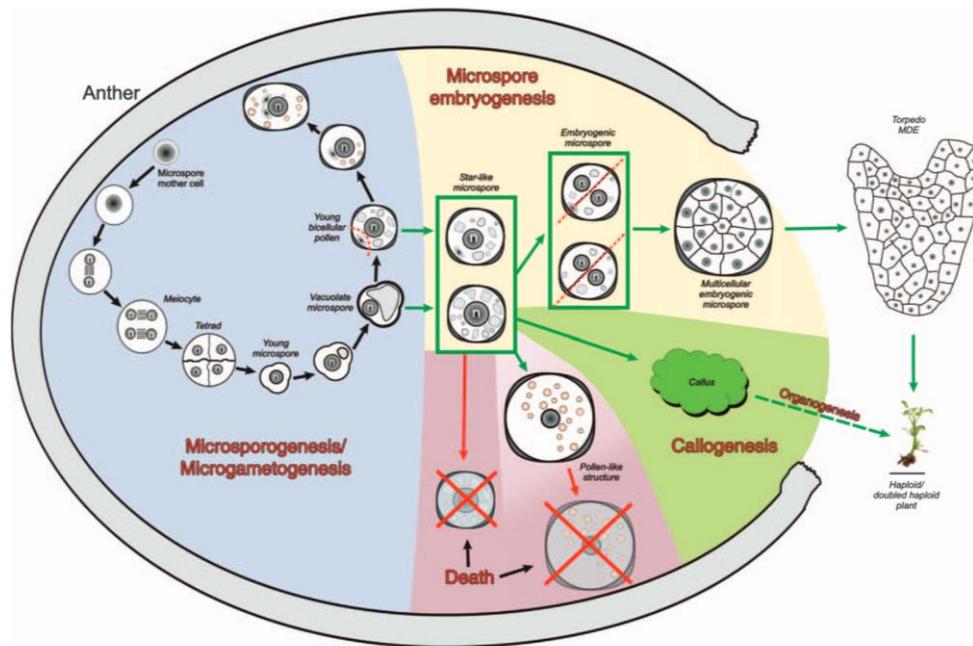


Figura 1.1. Representación esquemática de la reprogramación embriónica de la microspora. Se observa la producción de polen estándar, tal y como ocurre en la naturaleza (microgametogénesis); la desviación de este proceso hacia la embriogénesis de microspora, formando un MDE torpedo que finalmente producirá un embrión capaz de convertirse en planta DH; la organogénesis, tal y como ocurre en berenjena, donde el MDE torpedo no llega a formarse y degenera en una estructura conocida como callo, que posteriormente se puede convertir en planta DH; y las otras vías que toma la microspora al desviarse de la microgametogénesis, que le llevan a la muerte (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

La obtención de DHs a partir de microsporas presenta múltiples ventajas, empezando por el elevado número de estas células que se encuentran dentro de una sola antera (Maraschin et al., 2005). Además, existen protocolos optimizados en más de 250 especies entre las que se encuentran herbáceas de interés alimentario como el trigo, la cebada, la colza, o el maíz (Maluszynski, 2003).

Para poder inducir la embriogénesis de microsporas es importante someter a las mismas a ciertas condiciones de estrés. Los pretratamientos comúnmente practicados son el frío y los choques térmicos, el ayuno, los tratamientos con metales pesados y químicos, los cambios en el pH, la humedad, los niveles osmóticos y el estrés hídrico (Shariatpanahi et al. 2006).

Estas condiciones de estrés estimulan la inducción de las microsporas hacia la ruta embriónica, pero no por ello todas terminarán produciendo MDEs. Muchas de ellas no serán capaces de adaptarse a la nueva vía de desarrollo y morirán inmediatamente; otras seguirán un camino paralelo a la formación natural del polen en el que finalmente también acabarán muriendo; y algunas pocas responderán adecuadamente al tratamiento recibido. Según la especie de la que provengan, las microsporas correctamente inducidas

terminarán dividiéndose de forma adecuada y convirtiéndose en MDEs. Pero también existe la posibilidad de que en un punto dado de su desarrollo empiecen a desdiferenciarse y terminen formando estructuras desorganizadas conocidas como callos (Hosp et al., 2007).

Las microsporas correctamente inducidas sufren una serie de cambios en su estructura tales como un aumento de su tamaño, desplazamiento de su núcleo hacia el centro de la célula y disgregación de la vacuola en fragmentos más pequeños. Tras estas modificaciones la microspora adopta una morfología en forma de estrella que en muchas ocasiones sirve como marcador de la inducción de la embriogénesis (Shariatpanahi et al., 2006; Seguí-Simarro y Nuez, 2008). Las células que desvían su desarrollo hacia la ruta embriogénica para formar MDEs se dividen de forma similar a los embriones cigóticos (ZE), permitiendo desarrollar plantas DHs a partir de ellos (Figura 1.2).

Sin embargo, la embriogénesis de microsporas también presenta algunas limitaciones, lo que hace que no siempre sea una opción viable para producir plantas DHs. Entre estas limitaciones se encuentra la aparición de embriones con malformaciones, sobre todo en el meristemo apical, lo que dificulta el crecimiento de la planta resultante (Kim et al., 2008). En cereales además, aparecen regenerantes albinos debido a la ausencia de cloroplastos por una anomalía en el desarrollo de los plastidios (Torp y Andersen, 2009) causada por un fuerte componente genético y por los componentes del cultivo (Dunwell, 2010). Pero la limitación más importante de esta metodología, que también es aplicable al cultivo de anteras, es el elevado número de especies recalcitrantes que existe en la actualidad. A excepción de las especies consideradas modelo, la eficiencia de obtención de DHs mediante esta técnica es aún muy baja (Touraev et al., 2001; Palmer et al., 2005). La familia *Solanaceae* incluye especies hortícolas de alto interés agronómico como pimiento, tabaco, patata, berenjena y tomate; y de estas únicamente tabaco y patata pueden considerarse no recalcitrantes.

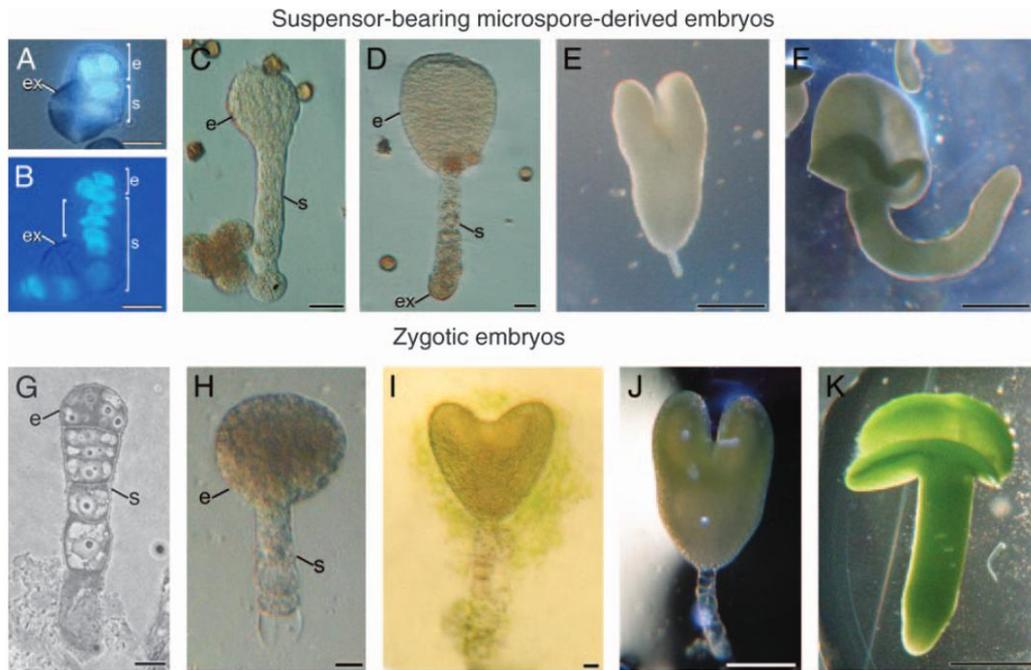


Figura 1.2. Evolución de embriogénesis de microspora (A-F) y de embriogénesis cigótica (G-K). (A, B) Embriones jóvenes emergiendo de la cubierta de exina. (C) Microspora en su estado globular temprano. (D) Transición del estado globular al estado en forma de corazón. (E) Fase de torpedo. (F) Embrión cotiledonar. (G) Sección de un embrión cigótico en su estado de 16 células. Es remarkable el parecido en forma con la fase globular temprana en microspora (C). (H) Embrión cigótico globular. (I) Embrión cigótico en forma de corazón (J) Embrión cigótico torpedo. (K) Embrión cigótico cotiledonar (Seguí-Simarro y Nuez, 2008).

1.5. Androgénesis en berenjena

Se han observado resultados positivos de androgénesis de berenjena en algunos genotipos mediante cultivo de anteras (Raina y Iyer, 1973; Misra et al., 1983). El protocolo de obtención de DHs a partir de anteras ha sido aprobado por diferentes laboratorios y empresas privadas, y a día de hoy ya se han obtenido líneas puras DHs e híbridos somáticos (Rotino et al., 2005; Salas et al., 2011; Rivas-Sendra et al., 2017). A pesar de su amplia aceptación, esta metodología presenta ciertas limitaciones. A los inconvenientes ya comentados del cultivo de anteras se suma la presencia de una pared celular gruesa en las anteras de berenjena, que hace más complicada la entrada de componentes del medio como hormonas de crecimiento, disminuyendo su efecto sobre las microsporas inducibles (Salas et al., 2012). Por estos motivos, el cultivo de microsporas aisladas resulta tan interesante. En especies como la colza, el tabaco o la cebada esta metodología está optimizada y es posible obtener cientos de embriones a partir de las microsporas obtenidas de una sola antera (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012). Sin embargo, resulta sorprendente que a pesar de las ventajas de esta técnica, se han realizado pocos estudios analizando este protocolo en berenjena; y todos ellos apuntan a que la inducción

de microsporas de berenjena hacia una ruta embriogénica termina produciendo callos, nunca MDEs (Miyoshi 1996; Bal et al., 2009).

Estos callos pueden regenerarse en plantas DH mediante un proceso conocido como organogénesis. Corral-Martínez y Seguí-Simarro (2012) evaluaron el proceso completo de producción de una planta DH a partir de microsporas aisladas de berenjena. En el momento de la inoculación, el cultivo líquido consistía principalmente en microsporas vacuoladas y polen bicelular joven (Figura 1.3a). Las placas se mantuvieron durante tres días sometidas a estrés por ayuno y temperatura de 35 °C. Cinco días después se podían ver indicaciones de inducción en microsporas con forma de estrella (Figura 1.3b, flecha), aunque algunas otras no mostraron ningún cambio notable (Figura 1.3b'), por lo que seguramente estarían muertas. Tras el periodo de estrés, las microsporas se recultivaron en un medio con sacarosa y reguladores del crecimiento, donde ya era posible observar células con seis divisiones (Figura 1.3c). Aproximadamente 20 días después del cultivo se observaban estructuras con forma similar al embrión globular (Figura 1.3d), pero a partir de este punto los embriones no fueron capaces de transformarse en embriones corazón y comenzaron a desdiferenciarse en estructuras conocidas como callos (Figura 1.3e). Los callos que tras un mes de cultivo tenían un tamaño de al menos 1 mm de diámetro se transfirieron a un cultivo de medio sólido, donde después de dos semanas aumentaron su tamaño y comenzaron a ser visibles a simple vista. Dos meses después de su cultivo en medio sólido comenzaron a observarse los primeros brotes (Figura 1.3f). Estos brotes dieron lugar a plántulas (Figura 1.3g) y finalmente, tras aclimatarlas, se convirtieron en plantas totalmente funcionales (Figura 1.3h). De media se obtuvieron unas cinco plantas por cada 100 callos producidos. Estas cifras implican unas 3,75 plantas por yema utilizada para aislar microsporas. En términos generales, desde el cultivo de las microsporas hasta la obtención de regenerantes maduros que produjesen flores pasaron 8 meses.

La tasa de producción de plantas DHs mediante regeneración de callos por organogénesis es similar a la que se obtendría mediante embriogénesis de microsporas, Sin embargo, el tiempo empleado en regenerar plantas a partir de callos es mucho mayor que el que se emplea en obtener directamente embriones DHs. Además, la organogénesis consume más recursos e incrementa la posibilidad de promover la variación gametoclinal (Forster et al., 2007). Por este motivo la investigación para mejorar el rendimiento de la embriogénesis de microsporas está muy demandada, aunque la técnica sigue falta de desarrollo y optimización en muchas especies.

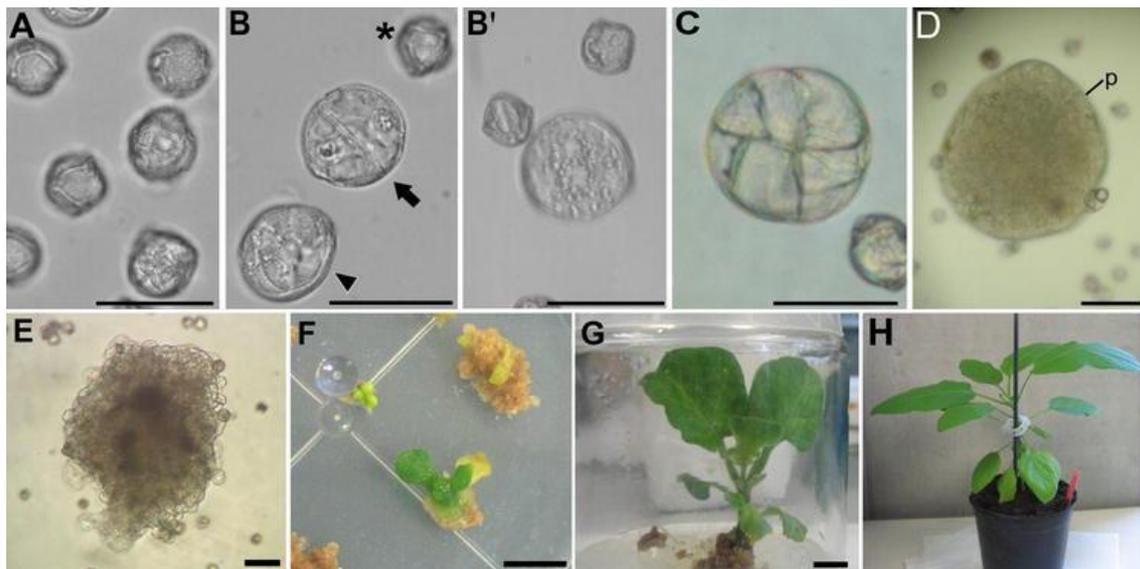


Figura 1.3. Desarrollo androgénico de las microsporas de berenjena. **(a)** Microsporas frescas aisladas. **(b)** Microsporas inducidas justo antes y después de la primera división embriónica (flechas), junto a algunas otras muertas (asterisco). **(b')** Microsporas no inducidas que entran en la vía de desarrollo similar a la gametofítica. Es notable la presencia de abundantes gránulos de almidón. **(c)** Microspora con seis divisiones. **(d)** Embrión globular con protoderma. **(e)** Estructura de callo microscópico **(f)** Callos macroscópicos con brotes organogénicos. **(g)** Plántula proveniente de un callo. **(h)** Planta DH aclimatada. Barras: **a-e** 50 μ m, **f, g**: 1cm (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012).

1.6. Factores que influyen en el rendimiento de la embriogénesis de microsporas

En los primeros ensayos de androgénesis se solía emplear tratamientos hormonales, fundamentalmente auxinas, citoquininas y etileno, enriquecidos con complementos nutricionales como leche de coco, patata o extracto de levadura (Raghavan, 1986). Hoy en día se tiende a evitar las hormonas y simplificar los medios, puesto que se ha visto que las hormonas no son esenciales para inducir la androgénesis en la mayoría de especies, y de hecho muchas veces son responsables de la formación de callos (Olmedilla, 2010). Una excepción corresponde a algunos cereales, como la cebada, el triticale y el trigo, en los que numerosos estudios han demostrado el papel de hormonas como el ácido fenilacético, el ácido naftalenacético, el ácido indol acético, el ácido abscísico y la kinetina como potenciadores de la embriogénesis (Otani y Shimada 1994; Davies, 2003 ; Pauk et al., 2003).

La fuente de carbono más común en los cultivos son los carbohidratos, y en particular la sacarosa, aunque la concentración óptima varía en función del tipo de cultivo, de forma que concentraciones por encima de la óptima pueden provocar efectos indeseados. Por ejemplo, se ha observado que con cultivos de anteras de arroz, cuando el medio se trataba con una concentración del 3-4% de sacarosa, hasta un 65% de los callos se transformaban

en plántulas verdes, mientras que con una concentración del 5-6% se formaban como máximo un 22% de plántulas verdes, y la frecuencia de plantas albinas aumentaba significativamente (Shahnewaz y Bari, 2004). Otro carbohidrato muy empleado es la maltosa; en cultivos de cereales, tales como arroz, triticale, cebada, centeno y trigo, la concentración óptima oscila entre 60 a 90 g/l, (Otani y Shimada, 1994; Karsai y Bedo, 1997; Bishnoi et al., 2000; Kasha et al., 2003). Se ha demostrado, además, que los carbohidratos juegan un papel adicional como reguladores de la presión osmótica, y por tanto del intercambio de nutrientes entre el medio intra y extracelular (Asif, 2013).

Otros compuestos importantes en el cultivo de microsporas son: antibióticos como la cefotaxima, usados para evitar la contaminación del cultivo (Lantos et al., 2006); antioxidantes como el glutatión, que promueven la embriogénesis (Asif et al., 2013); sales minerales como nitrógeno, fósforo y calcio, necesarios para el desarrollo de la plántula (Olmedilla, 2010); sustancias como hierro, $ZnSO_4$ y $CuSO_4$, que inducen la embriogénesis y aumentan la proporción de plántulas verdes vs albinas en la cebada (Echavarri et al., 2008); cobre y $AgNO_3$, con un efecto positivo en la inducción de la embriogénesis (Jacquard et al., 2009).

Al margen de los nutrientes, la presión osmótica del medio de cultivo es uno de los parámetros más importantes para la inducción de la androgénesis y para favorecer la transformación de los embriones en plantas verdes (Asif, 2013). La alteración del medio osmótico se realiza usualmente con polietilenglicol y manitol en diferentes concentraciones (Asif, 2013). Se ha demostrado que una alta osmolalidad reduce la aparición de las plantas albinas (Cistué et al., 1994, Jacquard et al., 2006) y que la presión osmótica es un factor determinante para estimular la embriogénesis en plantas recalcitrantes (Cabrera-Ponce et al., 2015) ya que aunque no lleguen a formar embriones cotiledonares, sí producen mayor número de callos que los cultivos que no han sido sometidos a estrés osmótico (Ghane y Nikam, 2014).

Al igual que sucede con otros parámetros del cultivo, hay un valor de osmolalidad óptimo por encima o por debajo del cual disminuye la eficacia del tratamiento. Al tratar microsporas de trigo y triticale en un rango de osmolalidad de 300 a 500 $mOsm \cdot kg^{-1}$ usando manitol se observó que el máximo número de plantas verdes se obtenía con un valor de 350 $mOsm \cdot kg^{-1}$, con una fuerte disminución de la respuesta de las microsporas a una mayor osmolalidad (Asif et al., 2014). También se ha podido estimular la embriogénesis al combinar sustancias que regulan la presión osmótica con algún agente

físico. Se han obtenido resultados significativos en el trigo al combinar distintas concentraciones de manitol a 4°C (Ayed et al., 2010) y en algunas especies de leguminosas al combinar la presión osmótica provocada por distintas sales minerales y biomoléculas con descargas eléctricas (Ochatt et al., 2009).

Es evidente que la presión osmótica es un factor de interés en el estudio del rendimiento de la embriogénesis, pero lo único que se ha demostrado hasta el momento es que este tipo de estrés incrementa la producción tanto de callos como de embriones, y no se ha llegado a conseguir que plantas recalcitrantes completen su ciclo embriogénico. Los estudios actuales se centran en modificar la osmolalidad del medio de cultivo y observar qué repercusión tienen estos cambios en la productividad del tejido cultivado. Pocos de ellos trabajan con microsporas y, por lo que sabemos, ninguno ha estudiado qué cambios osmóticos sufre la célula internamente durante su desarrollo ni en el paso de embrión a callo. Por este motivo resultaría interesante investigar qué le ocurre exactamente a la microspora durante su cultivo para poder hacernos una idea de, si el estrés osmótico es positivo, en qué estadio deberíamos aplicar el estrés, en qué medida, con qué intensidad, e ir probando diferentes condiciones osmóticas para intentar producir embriones en berenjena.

OBJETIVO

Este trabajo pretende estudiar qué cambios osmóticos sufre la microspora de berenjena a lo largo de su tiempo de cultivo, desde que se cultiva hasta que desarrolla callos, además de los cambios que sufre el medio, para evaluar si este es hipertónico, isotónico o hipotónico respecto a la microspora en cada fase de desarrollo.

Esta información serviría para entender mejor el desarrollo de la microspora durante su inducción embriogénica desde un punto de vista osmótico, y para poder desarrollar futuros estudios en los que se evalúe el rendimiento de la embriogénesis si fuera posible, o de la organogénesis en su defecto, en medios con una presión osmótica concreta.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Berenjena DH36

La berenjena (*Solanum melongena L.*) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. En 2012 se situaba en el sexto puesto en cuanto a producción de cultivos

vegetales, y el octavo puesto en cuanto a área cultivada. En 2012, se cultivaron 1.853.023 Ha de berenjena y se produjeron 48.424.295 t en todo el mundo (FAOSTAT).

El material utilizado son microsporas de la línea DH36 de berenjena (Figura 3.1). Esta se obtuvo a partir de Bandera, una variedad híbrida de berenjena ya estudiada y con una respuesta androgénica elevada (Corral-Martínez y Seguí-Simarro 2012 ; Salas et al. 2011). DH36 es una línea pura que muestra segregación tanto en rasgos vegetativos relacionados con la hoja, la flor y el fruto, como en rasgos reproductivos tales como el rendimiento de producción de semillas y de germinación. En términos morfológicos y habilidad reproductiva presenta similitudes con respecto a Bandera, pero produce cuatro veces más callos que el parental híbrido. Por ello se considera una línea potencialmente útil para realizar estudios genéticos y mapeo de distintos genes, sirviendo DH36 como modelo para facilitar estudios de androgénesis y embriogénesis. (Rivas-Sendra et al. 2017).



Figura 3.1. Variabilidad morfológica de la población de DHs. **(a-c)** Flores con diferente color de pétalos (blanco, rosa y lila). **(d)** Los frutos de Bandera muestran un fenotipo homogéneo, como se esperaba. **(e y f)** Frutos de DH36 con un fondo blanco y rayas oscuras. **(g y h)** Frutos de DH36 con fondo oscuro y rayas blancas. **(i y j)** Frutos de DH36 con color uniforme (Rivas-Sendra et al. 2017).

3.2. Instrumental

El medidor de osmolalidad es un micro osmómetro (Figura 3.2, izquierda) capaz de determinar los $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ que hay en una muestra de 20 μl . Para homogeneizar las muestras de polen se usaron tanto unos pistones, como un homogeneizador (Figura 3.2, derecha). El homogeneizador se utilizó junto a unas microesferas de vidrio de 400 μm de diámetro (Figura 3.2, centro) libres de DNAsas y RNAsas, empleadas como elemento disruptivo.



Figura 3.2. Micro osmómetro (izquierda), microesferas de vidrio (centro) y homogeneizador/agitador (derecha).

Con este instrumental se pretende medir la osmolalidad que presentan tanto las microsporas cultivadas *in vitro* como el medio en el que se encuentran desde el momento de su cultivo a día 0 hasta que produce callos a día 35 para observar cómo se adaptan las microsporas a su medio durante el periodo de inducción y el tratamiento post-inductivo.

Debido a que el volumen de muestra necesario para poder medir osmolalidad en el micro osmómetro es de 20 μl y la cantidad de microsporas que se pueden conseguir por cultivo es limitada y variable, se decidió diluir el volumen de microsporas obtenido e interpolar los valores para saber la osmolalidad real de la muestra y utilizar menos cantidad de placas de cultivo por medición.

Para ello, primeramente se realizaron pruebas control para comprobar que el micro osmómetro fuese capaz de medir valores diluidos correctamente, que la interpolación fuese fiable y que el estudio fuese reproducible.

3.3. Mediciones control de osmolalidad de hoja

Se obtuvieron 5 hojas diferentes de la variedad DH36 de berenjena. De cada una de ellas se cortó un segmento de unos 0,5-0,6 g. Se introdujeron en cinco eppendorfs diferentes y se congelaron con nitrógeno líquido. A continuación se homogeneizaron las muestras con pistones hasta obtener un extracto medianamente líquido. Se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad (14680 rpm) y se extrajo el sobrenadante. Se hicieron diluciones 1/2, 1/3 y 1/4 y se midió la osmolalidad de las 5 muestras tanto sin diluir como en cada una de las diluciones.

3.4. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo estándar

El medio de cultivo de berenjena incluye (para 150 ml):

- 0,15585 g de vitaminas NLN
- 0,0579 g de sales NLN
- 3 g de sacarosa
- 0,15 ml de NAA
- 0,15 ml de BA

Se obtuvo una alícuota del medio y se midieron 20 µl de muestra tres veces.

3.5. Mediciones control de osmolalidad de microsporas frescas

En primer lugar se recogieron muestras de yemas de berenjena de la variedad DH36 (aproximadamente unas 60-80 yemas). A continuación, se extrajeron las microsporas siguiendo el siguiente protocolo:

- Abrir las yemas para extraer las anteras y escoger sólo aquellas que midan entre 5,2 y 5,9 mm de longitud. Esta selección es importante ya que cuando la longitud de las anteras se encuentra entre ese intervalo es cuando más posibilidades hay de que las microsporas estén en su estado vacuolado.
- Colocar las anteras en un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de agua destilada.
- Con el émbolo de una jeringa, aplastar bien las anteras dentro del vaso.
- Filtrar la suspensión con un filtro de 41 µm y a continuación filtrar el contenido obtenido con un filtro de 11 µm.
- Lavar el filtro de 11 µm en un vaso de precipitados con agua destilada y pasar el líquido obtenido a uno o dos tubos Falcon de 15 ml.

- Centrifugar a 800 rpm, 5 min a 4°C, desechar el sobrenadante y resuspender en agua destilada (3 veces).
- Desechar el sobrenadante por última vez y resuspender el pellet en el poco agua destilada que quede dentro del Falcon.
- Pasar el contenido del Falcon a un tubo eppendorf de 1,5 ml y centrifugar a máxima velocidad durante 5 min.
- Eliminar el máximo sobrenadante posible con una pipeta y congelar el pellet en nitrógeno líquido.
- Homogeneizar el pellet con un pistón todo lo que se pueda.
- Volver a centrifugar a máxima potencia durante 5 min.
- Recuperar el sobrenadante con una pipeta de 5 o 10 µl para poder saber qué volumen se ha obtenido tras la centrifugación y pasar 20 µl de sobrenadante a un eppendorf de 2 ml. El resto de sobrenadante se distribuirá en diferentes tubos eppendorf de 2 ml según el volumen que quede disponible y las diluciones que se vayan a realizar. Se utilizan tubos de 2 ml porque la pipeta necesaria para medir osmolalidad en el osmómetro únicamente cabe hasta el tope de este tubo.
- Medir el contenido de cada tubo en el osmómetro.

Este protocolo se siguió sin esterilizar las microsporas ni trabajar en cabina de flujo ya que los valores obtenidos no se iban a utilizar posteriormente, sino que eran únicamente para comprobar si las diluciones realizadas para volúmenes tan pequeños como 5 µl seguían siendo fiables e interpolables.

3.6. Cultivo de microsporas

Para el cultivo de microsporas se procedió a trabajar en cabina de flujo y en condiciones de esterilidad. Los pasos a seguir para extraer las microsporas son iguales que en el apartado anterior, difiriendo en los pasos que corresponden al plaqueo de las microsporas:

- Coger unas 80 yemas y abrirlas para extraer las anteras y escoger sólo aquellas que midan entre 5,2 y 5,9 mm de longitud.
- Esterilizar las anteras en la cabina de flujo introduciéndolas en un colador de té y sumergiéndolas durante 30 segundos en etanol, 5 minutos en lejía, y posteriormente lavarlas 3 veces con agua estéril durante 2 minutos cada vez.
- Colocar las anteras en un vaso de precipitados de 50 ml con 5 ml de agua destilada.
- Con el émbolo de una jeringa, aplastar bien las anteras dentro del vaso.

- Filtrar la suspensión con un filtro de 41 μm y a continuación filtrar el contenido obtenido con un filtro de 11 μm .
- Lavar el filtro de 11 μm en un vaso de precipitados con agua destilada y pasar el líquido obtenido a un tubo Falcon de 15 ml.
- Centrifugar a 800 rpm, 5 min a 4°C, desechar el sobrenadante y resuspender en agua destilada (3 veces).
- Resuspender el pellet una última vez en agua destilada y calcular cuántos ml debemos cultivar para obtener placas con una densidad de microsporas de 50 millones de microspora/placa. Para que el cálculo sea lo más fiable posible se recomienda no resuspender el pellet obtenido en más de 5 ml.
- El cálculo se realiza midiendo con una cámara Nebauer cuántas microsporas tenemos en nuestro tubo Falcon. Para ello se pipetea 10 μl de muestra resuspendida en cada una de las partes de la cámara Nebauer y se cuentan las microsporas que hay en las 5 casillas diagonales de la cámara (en caso de que hubiesen muy pocas microsporas, para hacer el cálculo más preciso, se pueden contar las microsporas que hay en todas las casillas de la cuadrícula y el dato no se multiplicaría por 5 en la fórmula que se muestra a continuación). Este conteo se realiza dos veces, una en cada parte de la cámara y se calcula la media de ambas. Con este dato se calculan los ml cultivables:

$$ml \text{ cultivables} = \frac{\text{media} * 5 * ml \text{ resuspendidos}}{50}$$

Estos son los ml que debemos resuspender. Teniendo en cuenta que lo haremos en placas de 3 ml, se dividen los ml cultivables entre 3 y se obtiene el número de placas que utilizaremos. Si se quisiera plaquear en placas de 1 ml por requerimientos del experimento, se usarían tantas como ml obtenidos.

- Se resuspende el contenido del tubo Falcon en los ml de agua destilada estéril necesarios para obtener los ml cultivables y se procede a plaquear.
- Se guardan las placas a 35°C durante 3 días.

Durante estos tres días las microsporas sufren estrés térmico y por ayuno, ya que en su medio de cultivo únicamente se ha introducido agua destilada estéril. De esta forma se induce su embriogénesis. Al cabo de tres días se recogió el contenido de las placas en tubos Falcon de 50 ml, se centrifugó a 800 rpm durante 5 min a 4°C, se tiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en los ml correspondientes de medio de cultivo de

berenjena. Se plaqueó el contenido en placas de 3 ml y se guardaron en el fitotrón en oscuridad. Estos pasos se conocen como recultivo.

3.7. Medición de osmolalidad de las microsporas cultivadas y de su medio a distintos tiempos de cultivo

Este fue el apartado más complejo y que más se debió modificar conforme se iban obteniendo resultados, ya que no existe ningún protocolo puesto a punto para medir la osmolalidad del interior de una célula, por lo que se propusieron varios protocolos.

3.7.1. Rotura de la pared celular de las microsporas con pistones

El protocolo base era el siguiente:

- Coger, al menos, 5 placas de un mismo cultivo a día 0 (el mismo día que se realizó el cultivo), a día 3 cuando las microsporas aún estaban en agua, a día 3 unas cuatro horas después de haber realizado el recultivo, a día 7, a día 14, a día 21, a día 28 y a día 35. Con 5 placas debería haber material suficiente para obtener un pellet con el que se obtuviesen 5 µl de sobrenadante, pero se podrían necesitar más o menos placas según el estadio en el que se encontrasen las microsporas. Como norma general se utilizaron 5 placas para las mediciones a día 0, 3 (agua y medio) y 7. A partir del día 14, que ya deberían empezar a verse embriones, unas 2 o 3 placas podrían ser suficientes; y las mediciones a día 21, 28 y 35, donde los callos empezarían a formarse, o a ser incluso visibles a simple vista se podrían utilizar únicamente 1 o 2 placas. En total, para obtener de un sólo cultivo todas las mediciones necesarias (diluidas a 1/5), haría falta conseguir un mínimo de 75 ml de cultivo que se plaquearían en 25 placas de 3 ml.
- El contenido de las 5 placas se transfiere a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifuga a 800 rpm, 5 minutos a 4 °C.
- 20 µl del sobrenadante se utilizan para medir la osmolalidad del medio.
- Una vez se ha medido el medio de cultivo, se descarta el sobrenadante y se transfiere el pellet que queda en el tubo Falcon a un tubo eppendorf de 1,5 ml. A partir de aquí los pasos son como los que se describen en el punto 3.5 para medir osmolalidad de microsporas.
- Se centrifuga el eppendorf con el pellet a máxima velocidad, se elimina el máximo de sobrenadante y se congela el pellet en nitrógeno líquido.

- Se homogeniza el pellet congelado con un pistón y se vuelve a centrifugar a máxima velocidad.
- Se extraen 5 µl de sobrenadante y se diluyen con 20 µl de agua para poder medir la dilución en el micro osmómetro.

3.7.2. Rotura de la pared celular de las microsporas con microesferas de vidrio

Después de probar la homogenización con los pistones, se procedió a realizarlo con unas microesferas de vidrio de 400 µm de diámetro y un homogeneizador. Estas microesferas se introdujeron en el eppendorf que tenía el pellet de microsporas congeladas, y el eppendorf se introdujo en el homogeneizador a diferentes condiciones de homogeneización, variando el tiempo de actuación desde 1 minuto hasta 5 minutos, siempre a la máxima potencia, y añadiendo más o menos volumen de bolitas.

También se decidió observar las microsporas al microscopio antes y después de la homogeneización para ver si había algún cambio morfológico que indicase evidencias de rotura.

3.7.3. Rotura de la pared celular de las microsporas combinando el uso de microesferas y un tampón de extracción.

Como las técnicas disruptivas empleadas hasta el momento se llevaban a cabo en ausencia de tampón, finalmente se decidió realizar una prueba con un tampón de extracción de proteínas utilizado previamente en nuestro laboratorio para extraer hormonas de microsporas de forma exitosa.

El tampón de extracción utilizado llevaba en su composición:

- 100mM Tris HCl pH 8
- 10% SDS
- 5% (vol.) β-mercaptoetanol

Para su utilización hay que diluirlo 5 veces en agua estéril y, en caso de utilizarlo para extraer proteínas, PMSF 1mM como inhibidor de proteasas. En este caso no fue necesario.

En primer lugar se midió la osmolalidad del tampón de extracción pipeteando 20 µl del mismo en el micro osmómetro. A continuación se incluyeron 50 µl en el eppendorf con el pellet de microsporas congelado y un volumen de microesferas similar al volumen de

microsporas. Se introdujo el eppendorf en el homogeneizador y se trató durante 5 minutos a la máxima potencia. Después se centrifugó el eppendorf y se extrajeron 20 µl de sobrenadante para medir su osmolalidad. Fue necesario diluir 10 µl de esta muestra con 40 µl de agua para minimizar el contenido de SDS de la muestra pipeteada y evitar la aparición de burbujas.

Se desarrollaron protocolos paralelos debido a los resultados obtenidos y descritos en el apartado 4.4 de Resultados y Discusión. Los pasos que incluyen la toma de muestras, centrifugación y medida de la osmolalidad del medio fueron los mismos en todos los casos, pero las técnicas de disrupción se fueron modificando.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Mediciones control de osmolalidad de hoja

Este primer ensayo se realizó para comprobar si el micro osmómetro era capaz de medir valores de osmolalidad de muestras diluidas que fuesen proporcionales al valor de la muestra sin diluir. Se escogieron hojas como tejido control por el hecho de considerarse material ilimitado y poder obtener tantos µl como fuesen necesarios sin dificultad. Se utilizó una hoja diferente para cada réplica y se obtuvieron aproximadamente unos 60-70 µl de extracto puro de cada una de las hojas.

Los resultados obtenidos tras medir la osmolalidad del extracto puro de hoja y sus diluciones se muestran en la Tabla 4.1. La representación gráfica de cada una de las réplicas se muestra en la Figura 4.1. Esta gráfica relaciona los valores de osmolalidad de cada réplica con su dilución correspondiente, mostrando una tendencia lineal en cada una de las réplicas. La gráfica que relaciona la media de los valores de osmolalidad de las cinco réplicas con las diluciones realizadas aparece en la figura 4.2. Los valores de R^2 de las rectas de cada una de las réplicas y de la media de todas ellas se muestra en la Tabla 4.2.

Tabla 4.1. Valores de osmolalidad en extracto de hoja ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$) y sus diluciones.

Dilución	Réplicas					Media
	1	2	3	4	5	
1/4	93	95	87	95	113	96,6
1/3	122	124	122	127	152	129,4
1/2	182	195	176	195	228	195,2
1	350	359	343	371	423	369,2

Tabla 4.2. Valores de error cuadrático de cada una de las réplicas de hoja y de su media.

Réplica	R ²
1	0,99982
2	0,99754
3	0,99913
4	0,99909
5	0,99845
Media	0,99928

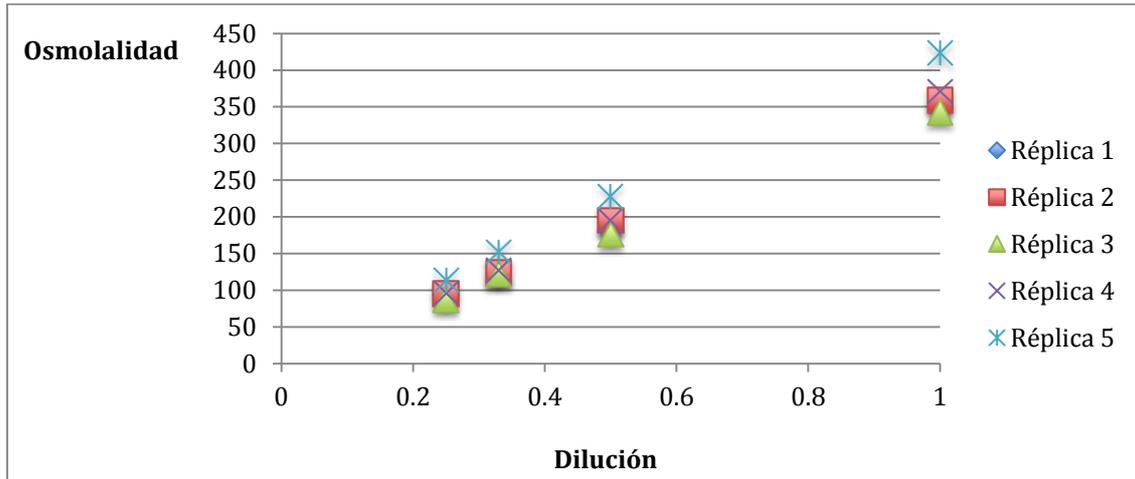


Figura 4.1. Representación de los valores de osmolalidad del extracto de hoja frente a su dilución.

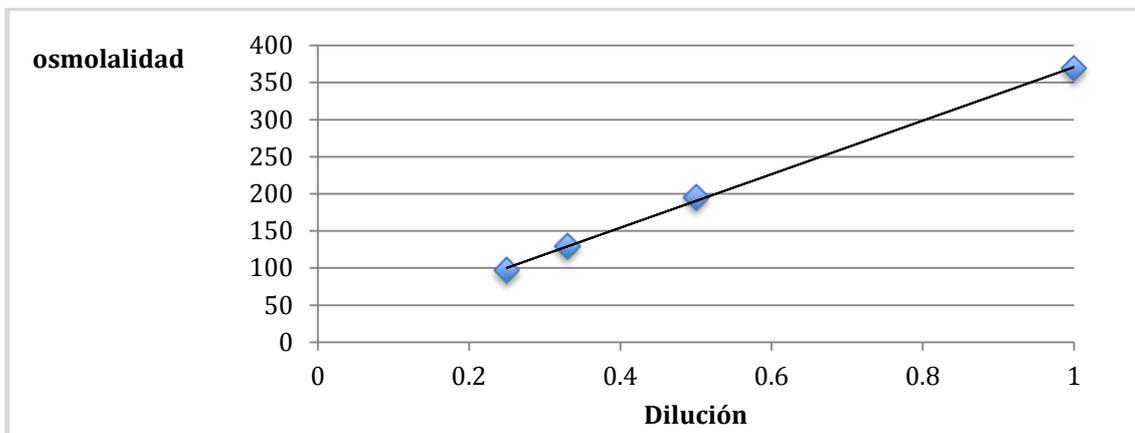


Figura 4.2. Representación gráfica de la media de los valores de osmolalidad del extracto de hoja frente a su dilución.

Mediante estas gráficas se quería comprobar si los valores de osmolalidad obtenidos al diluir el extracto puro de hoja eran proporcionales entre sí, y al observar valores de error cuadrático tan cercanos a 1 se podría concluir que sí lo eran. De esta forma sabemos que, al menos en hoja, sí sería posible diluir el extracto obtenido en agua y multiplicar su valor de osmolalidad por la dilución realizada para conocer la osmolalidad del extracto puro.

4.2. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo estándar

Se realizaron mediciones de osmolalidad del medio de cultivo de berenjena antes de utilizarse en ningún cultivo para saber de qué valores se partía antes de comenzar las mediciones del punto 3.7, y así comprobar si entonces a día 3, 4 horas más tarde de realizar el recultivo, la osmolalidad del medio difería de la determinada en este punto. La Tabla 4.3 muestra estos valores.

Tabla 4.3. Valores de osmolalidad del medio de berenjena.

MEDIO BERENJENA	
Réplica	mOsm·kg ⁻¹
1	73
2	71
3	71
MEDIA	71,667

4.3. Mediciones control de osmolalidad de microsporas frescas

Además del control realizado con las hojas de berenjena, se realizó un segundo control para asegurarnos de que las mediciones de osmolalidad de muestras diluidas son fiables también en microspora. De esta forma, podríamos estar seguros no sólo de que los valores de osmolalidad de las muestras diluidas son fiables, sino que además podríamos comprobar si los valores obtenidos en diferentes muestras y diferentes días son reproducibles, ya que cada réplica se midió en días distintos.

En cada una de las extracciones que se realizaron de microsporas se midió, en primer lugar, 20 µl de extracto puro (sin diluir), y con el volumen restante se fueron realizando diluciones 1/2, 1/3, 1/4, y 1/5 según lo que quedase disponible en cada ensayo. Las medidas que se obtuvieron se muestran en la Tabla 4.4. Se realizaron un total de 9 réplicas con un mínimo de 5 valores diferentes de cada dilución, y midiendo en todos los casos la muestra sin diluir. Las representaciones gráficas de las osmolalidades de cada una de las réplicas respecto a sus correspondientes diluciones se muestran en la Figura 4.3. La representación gráfica de la media de las osmolalidades de las réplicas respecto a sus diluciones se muestra en la Figura 4.4. Y los valores de error cuadrático de cada una de las rectas en la Tabla 4.5.

Tabla 4.4. Valores de osmolalidad de microsporas frescas (sin diluir y diluidas).

Réplicas	DILUCIÓN				
	1	0,5	0,33	0,25	0,2
1	88	38	28	-	-
2	97	-	33	-	16
3	59	27	17	-	11
4	52	24	17	-	-
5	57	-	-	11	7
6	51	-	16	12	8
7	68	-	-	15	11
8	47	24	14	10	9
9	73	36	-	15	11

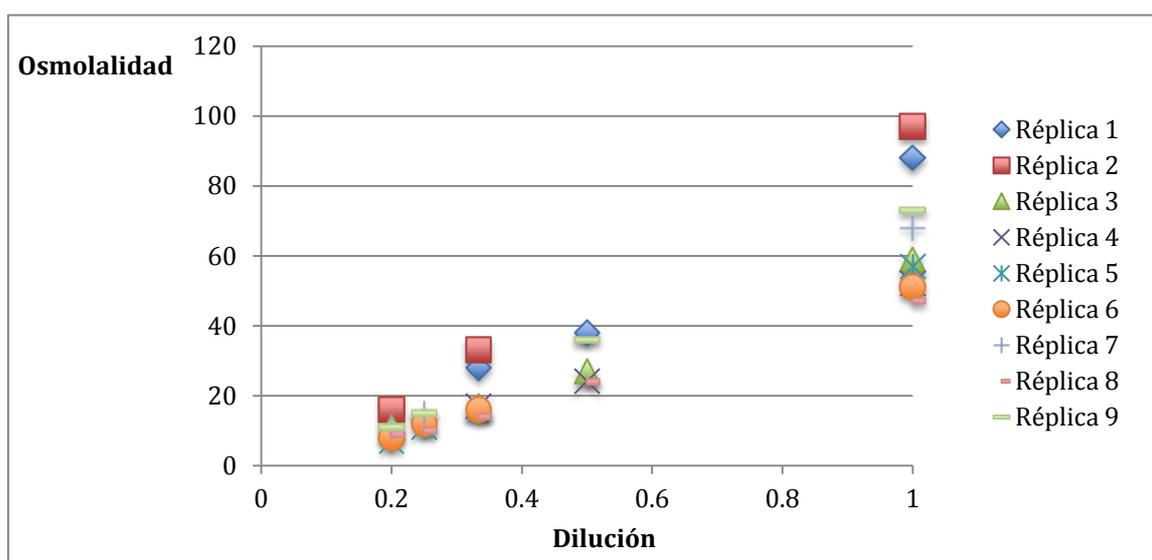


Figura 4.3. Valores de osmolalidad de microsporas frescas frente a sus diluciones.

Tabla 4.5. Valores de R² de cada una de las réplicas y de su media.

Réplica	R ²
1	0,99256
2	0,99805
3	0,99735
4	0,99725
5	0,99974
6	0,99917
7	0,99995
8	0,99708
9	0,99909
Media	0,99777

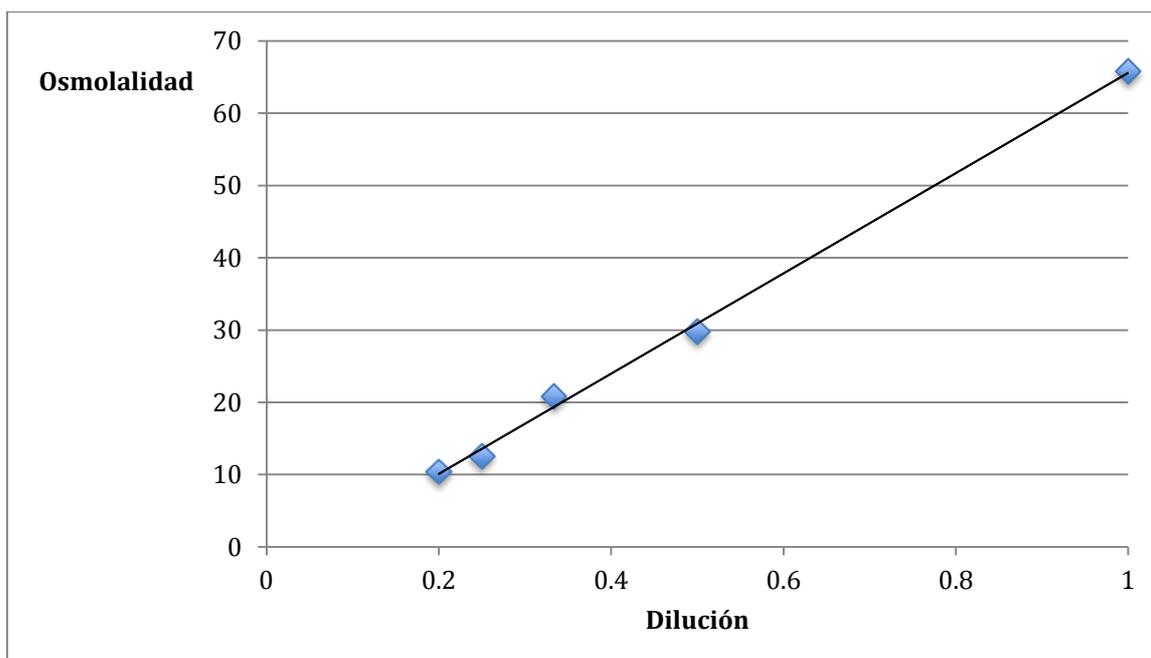


Figura 4.4. Representación de la media de las osmolalidades de las nueve réplicas frente a sus diluciones.

Nuevamente, el error cuadrático tanto de cada una de las rectas de las réplicas como de la media de todas ellas es muy cercano a 1, pudiendo concluir que los valores de osmolalidad obtenidos al diluir muestras son proporcionales a los valores sin diluir. Con esta información decidimos comenzar a hacer cultivos y utilizar, en las mediciones de osmolalidad de contenido intracelular, 5 μ l de extracto de microspora y 20 μ l de agua destilada (dilución 1/5). De esta forma, podríamos aproximar el valor de osmolalidad del interior de las microsporas de cada estadio multiplicando por 5 el valor obtenido al medir la osmolalidad de la dilución realizada. En vista a que la media de las réplicas (que se realizaron en días distintos) también muestra valores de osmolalidad proporcionales entre sí, se concluyó que se podían utilizar cultivos realizados en diferentes días para completar los datos de osmolalidad del apartado 4.4 a diferentes tiempos si con un único cultivo no se conseguía cubrir todas las mediciones.

4.4. Mediciones de osmolalidad de las microsporas cultivadas y de su medio a distintos tiempos de cultivo

4.4.1. Rotura de la pared celular de las microsporas con pistones

Inicialmente, se pensó que lo más eficiente sería empezar realizando cultivos que se utilizarían para medir las osmolalidades de los estadios más tardíos (día 14, 21, 28, 35), ya que son los que más tiempo requieren para obtener sus datos, y seguidamente se harían cultivos para mediciones más inmediatas (días 0, 3 en agua y 3 en medio, y 7), y así obtener todos los resultados de forma más o menos simultánea.

Los problemas surgieron cuando empezamos a medir la osmolalidad del medio y del interior de las microsporas en los estadios tempranos. Estos resultados aparecen en la Tabla 4.6. Los valores de osmolalidad del medio de cultivo están medidos en $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ y sin diluir, mientras que los valores de osmolalidad del interior de la microspora son los de las muestras diluidas 5 veces. La Tabla 4.7 muestra una aproximación de los valores de osmolalidad del supuesto contenido intracelular sin diluir, y se ha obtenido multiplicando por 5 los valores de osmolalidad de microspora de la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Mediciones de osmolalidad ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$) del medio de cultivo sin diluir y de las microsporas a días 0, 3 y 7 diluidas cinco veces (3 A es la medición a día 3 en agua y 3 M la medición a día 3 en medio).

DÍA	RÉPLICAS					
	1		2		3	
	MEDIO	MICROSPORA	MEDIO	MICROSPORA	MEDIO	MICROSPORA
0	0	0	0	2	1	3
3 A	0	1	1	0	0	0
3 M	75	18	83	20	77	21
7	129	29	128	24	130	25

Tabla 4.7. Mediciones de osmolalidad ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$) del medio de cultivo sin diluir y aproximación de los valores de osmolalidad del interior de las microsporas sin diluir (3 A es la medición a día 3 en agua y 3 M la medición a día 3 en medio).

DÍA	RÉPLICAS					
	1		2		3	
	MEDIO	MICROSPORA	MEDIO	MICROSPORA	MEDIO	MICROSPORA
0	0	0	0	10	1	3
3 A	0	5	1	0	0	0
3 M	75	90	83	100	77	105
7	129	145	128	120	130	125

Resultó sospechoso que las mediciones de osmolalidad del interior celular de las microsporas a días 0 y 3 antes del recultivo fuesen igual a 0. Ese valor era de esperar en la medición de osmolalidad del medio, ya que a esos tiempos las microsporas estaban cultivadas en agua, pero no se esperaba que el valor del interior de las microsporas fuese también 0. Al realizar las mediciones 4 horas después del recultivo y observar que la medición de osmolalidad del contenido intracelular se disparaba hasta alcanzar valores incluso mayores que su medio, se sometió a estudio el protocolo de extracción del contenido de las microsporas.

Nuestra hipótesis se basaba en que realmente no se estaban rompiendo las microsporas al homogeneizarlas con el pistón, y que el sobrenadante que se obtenía después de centrifugar era el propio medio que quedaba residual entre las microsporas del pellet. Esta hipótesis no surgió previamente en los pasos control debido a que al realizar las

mediciones de osmolalidad de microsporas frescas extraídas en agua destilada sí se obtenían valores significativos incluso al realizar diluciones, lo que nos hizo suponer que se estaba midiendo contenido intracelular.

Tras analizar los resultados obtenidos en este último paso se propuso la idea de que los valores obtenidos en el control se debían al hecho de haber homogeneizado las microsporas sin esterilizar, y que quizás lo que se estaba midiendo eran restos de fluidos de las anteras.

A pesar de que muy probablemente las mediciones control realizadas en microsporas frescas no se correspondiesen al contenido intracelular, siguen sirviendo para comprobar que el micro osmómetro es capaz de medir diluciones de forma precisa y que es posible interpolar las medidas de las muestras diluidas para saber el valor aproximado de la osmolalidad de las muestras sin diluir.

Se procedió, además, a observar al microscopio muestras de microsporas tanto antes como después de la homogeneización para comprobar si había evidencias de rotura tras utilizar los pistones y las imágenes obtenidas no mostraban ninguna diferencia (Figura 4.5). A pesar de ello, se concluyó que la manera más fiable de saber si se estaba rompiendo o no la pared celular de las microsporas era midiendo la osmolalidad de las mismas a día 0 y ver si se obtenían valores mayores que cero (la osmolalidad del agua destilada). Esta idea surgió pensando que quizás aunque las microsporas estuviesen rotas no sería posible ver estas roturas y que podían extraer su contenido celular mediante poros o fisuras no detectables por el microscopio. Por este motivo en los siguientes protocolos se procedió a probar las técnicas de homogenización en muestras de microsporas cultivadas en agua (a día 0, a día 3 antes del recultivo, o en cualquier otro estadio en el que antes de congelar la muestra ésta se hubiese lavado con agua).

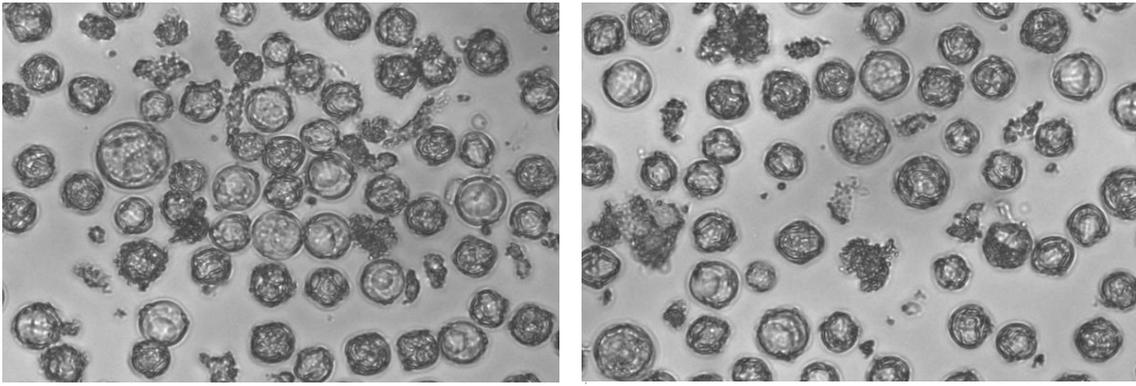


Figura 4.5. Microsporas antes (izquierda) y después (derecha) de la supuesta homogeneización. La foto está tomada a día 0. En la imagen de la izquierda se pueden apreciar varias microsporas claramente vacuoladas, lo que indica que se encontraban en el estadio adecuado para la inducción.

4.4.2. Rotura de la pared celular de las microsporas con microesferas de vidrio

Se hicieron nuevas rondas de cultivo para realizar las mediciones tempranas y encontrar un protocolo que permitiese medir la osmolalidad del interior celular. En todos los casos se dejaba una placa testigo, la cual no se utilizaba para medir osmolalidades, sino para comprobar si las microsporas estaban respondiendo adecuadamente a la inducción y saber si, en caso de conseguir los datos de osmolalidad deseados, estos eran correspondientes a microsporas inducidas.

Buscando soluciones para poder crear un protocolo que permita extraer contenido celular y medir su osmolalidad prácticamente intacta, decidimos utilizar un homogeneizador mecánico e introducir microesferas de vidrio en el eppendorf con la muestra para facilitar la homogeneización. Se probaron en diferentes muestras, con diferentes cantidades de microesferas, a diferentes tiempos (de 1 a 10 minutos) y a la máxima frecuencia (30 Hz). Después de centrifugar el pellet supuestamente homogeneizado y medir 5 μ l de sobrenadante con 20 μ l de agua destilada la osmolalidad medida por el micro osmómetro seguía siendo 0.

4.4.3. Rotura de la pared celular de las microsporas combinando el uso de microesferas y un tampón de extracción.

En este trabajo se intentó evitar a toda costa el uso de tampones de extracción para romper las microsporas y extraer su contenido celular, ya que la adición de compuestos podría alterar el valor obtenido de osmolalidad y los resultados que obtendríamos estarían sesgados por este hecho y no únicamente por el estrés recibido en la inducción y la entrada en la vía embriogénica. A pesar de ello, puesto que no estaba siendo posible homogeneizar las microsporas sin incluir ninguna sustancia externa, se añadió a modo de

prueba un tampón de extracción que había sido previamente utilizado en nuestro laboratorio para extraer proteínas de microsporas de forma exitosa. La diferencia es que en aquel experimento, después de utilizar el tampón se realizó una electroforesis para obtener las proteínas extraídas, y en este caso se quería medir la osmolalidad de todo el extracto.

En este paso nos encontramos con el inconveniente añadido de que el tampón contiene detergente SDS en su composición, por lo que al intentar pipetear los 20 μl de muestra aparecían muchísimas burbujas, lo que dificulta la medición de la osmolalidad (para medir adecuadamente osmolalidad en el micro osmómetro es necesario que no haya burbujas en las muestras). Se solventó diluyendo 10 μl de muestra con tampón con 40 μl de agua, para que de esta forma la concentración de detergente fuese mínima y no apareciesen burbujas.

Este protocolo volvió a dar resultados inesperados. La medición de osmolalidad que se realizó del tampón de extracción antes de introducirlo en el eppendorf dio un valor de 155 $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$ y después de introducir el tampón en la muestra de microsporas, incluir las microesferas, centrifugar y extraer el sobrenadante, la medición de osmolalidad diluida 5 veces dio un valor de 31 $\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$, que si lo interpolamos al valor sin diluir (multiplicar por 5) se obtiene justamente la osmolalidad del tampón. Resultó sorprendente que incluso con el uso del tampón la osmolalidad medida tras intentar romper las microsporas siguiese sin diferir de la osmolalidad del medio. Para poder explicarlo se propusieron varias hipótesis:

En primer lugar, existe la posibilidad de que el volumen de contenido intracelular fuese tan pequeño en comparación con el volumen de tampón utilizado que el micro osmómetro no percibiese ese cambio de osmolalidad. Al tratarse de un paso de prueba no se fue muy cauteloso con el volumen de tampón utilizado y quizás ajustando mejor las cantidades y conociendo el supuesto volumen de contenido intracelular se podrían ajustar mejor las condiciones y llegar a medir osmolalidad de microsporas.

Y en segundo lugar, es posible que se debiese a que las condiciones previas a la disrupción no fuesen del todo óptimas, ya que aunque inicialmente el pellet estaba congelado, al introducir las microesferas, colocarlo en el homogeneizador, esperar los 5 minutos de agitación etc. el pellet se descongelaba rápidamente y quizás eso afectaba a la eficiencia del protocolo dificultando la correcta homogeneización de las microsporas.

4.5. Medición de la osmolalidad del medio de cultivo

A pesar de no poder medir la osmolalidad interna de las microsporas se pensó que quizás se podrían aprovechar las medidas de osmolalidad del medio de cultivo que se habían estado realizando, pero nuevamente volvieron a surgir inconvenientes. En este caso se trataba de que los cultivos que estuvimos realizando para obtener las mediciones del medio e intentar romper la pared de las microsporas no respondían a la inducción por estrés. Por ese motivo, se dejaron de medir las osmolalidades de los estadios tardíos, ya que lo que realmente nos interesaba era conocer los cambios osmóticos que sufre la microspora durante su desarrollo embrionario y de formación de callo. Aún así, la Tabla 4.8 recoge las medidas de osmolalidad del medio de cultivo hasta el día 14 (último estadio del que se obtuvieron resultados de medio) para hacernos una idea de cómo se comporta el medio de cultivo de microsporas de berenjena cuando estas no consiguen inducirse, para compararlas en un futuro con mediciones de cultivos que sí se hayan inducido.

Tabla 4.8. Mediciones de osmolalidad del medio de cultivo de berenjena que no han llegado a inducirse ($\text{mOsm}\cdot\text{kg}^{-1}$), a días 0, 3, 7 y 14. (3A indica las mediciones que se hicieron a día 3 en agua y 3M a día 3 en medio de cultivo de berenjena).

DÍA	MEDIO		
0	0	0	1
3A	0	1	0
3M	75	83	77
7	129	128	130
14	124	127	128

Es destacable cómo a día 3 después del recultivo la medida de osmolalidad del medio coincide con las medidas de osmolalidad del punto 4.2 en las que se midió el medio de berenjena antes de incluirlo en ningún cultivo. Sin embargo, a día 7 se observa un salto de osmolalidad que resulta curioso, ya que las microsporas no están desarrollándose hacia una ruta embriogénica y muy probablemente estén muertas. Esto podría deberse a que al morir empiezan a liberar su contenido intracelular al medio. A partir del día 7 parece que la osmolalidad del medio empieza a estabilizarse, siendo muy similar a la del día 14, lo que puede indicar que a día 14 todo el contenido intracelular se había disuelto.

4.6. Propuestas para el futuro

Para poder lograr el objetivo de este trabajo sería imprescindible encontrar una forma viable de romper la pared celular de las microsporas sin alterar demasiado su osmolalidad interna. Chakraborty et al. (2009) prepararon extractos de polen utilizando un tampón

salino y agitando la muestra durante 16 horas continuas a 4°C. Omar et al. (2015) evaluaron el efecto antiproliferativo y antioxidante del polen de las abejas y prepararon sus extractos crudos de polen usando etanol, 10 minutos de vórtex y sonicación durante 1 hora a 41°C antes de guardar la muestra durante toda la noche a 4°C. Fíla et al. (2012) decidieron extraer proteínas del interior del polen usando ácido tricloroacético y homogeneizando el polen con un mortero.

De momento todas las metodologías empleadas para homogeneizar polen utilizan tampones o compuestos que faciliten la extracción de contenido intracelular, por lo que parece complicado encontrar una metodología capaz de romper la pared celular de las microsporas sin incluir agentes externos. Se podría empezar empleando técnicas disruptivas como la centrifugación, agitadores, o sonicación durante varias horas, ya que en nuestras pruebas tan sólo estuvimos agitando las muestras con las microesferas unos pocos minutos. También se podría probar la efectividad del uso del mortero en muestras tan pequeñas como las microsporas. Quizás no fuese una técnica imposible de lograr si se consigue una cantidad de pellet de microsporas mucho mayor de lo que se ha conseguido hasta ahora en nuestros experimentos, utilizando más cantidad de yemas. Otra posibilidad sería probar cualquiera de estas técnicas con algún tampón adecuado, midiendo previamente la osmolalidad del tampón, y comprobando que las medidas que se obtienen después de homogeneizar las muestras son mayores que la osmolalidad del tampón. Tal vez verdaderamente no sea posible romper la pared celular de las microsporas sin utilizar tampones de extracción, pero quizás el error que haya que asumir al añadirlo a la muestra no impida conseguir resultados que nos permitan hacernos una idea de cómo cambia la osmolalidad de las microsporas cuando entran en fase embriogénica.

CONCLUSIONES

La primera conclusión importante de este trabajo es la precisión comprobada del micro osmómetro utilizado. Este era capaz de medir una osmolalidad del agua destilada igual a 0, como cabe esperar, y de medir osmolalidades de concentraciones diluidas proporcionales a la osmolalidad de la concentración sin diluir.

En segundo lugar, se ha intentado poner a punto un protocolo para medir la osmolalidad interna de las microsporas, algo que hasta donde nosotros sabemos no se había hecho nunca antes, y aunque no ha sido posible terminar el experimento porque no se ha conseguido romper la pared celular de las microsporas, se ha abierto paso a futuras

investigaciones. Se ha comprobado qué metodologías no serían adecuadas para este fin y cómo el medidor de osmolalidad permite comprobar con bastante seguridad si se ha extraído o no contenido intracelular significativo, ya que determina prácticamente las mismas osmolalidades del medio en el que se encuentran las microsporas (agua, medio de cultivo, tampón) y de las microsporas no homogeneizadas.

Por último, se puede concluir el gran potencial que tendría esta rama de estudio. Si se consiguiese crear un protocolo exitoso y puesto a punto para medir la osmolalidad interna de las microsporas de cualquier especie se podría ver en qué difieren unas de otras e intentar asemejar sus condiciones de cultivo a las de las especies modelo. Se abriría un nuevo camino en la investigación de la embriogénesis de microsporas, comprobando si existe alguna relación entre la osmolalidad interna de las microsporas de especies recalcitrantes y no recalcitrantes, o si existen unos valores determinados de osmolalidad que promuevan la entrada a la ruta embriogénica o a la formación completa de MDEs. Y aunque en este trabajo no se haya podido conseguir ese protocolo, tampoco parece algo tan lejano o ficticio, y en mi opinión, merece la pena que se llegue a desarrollar en futuros estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- Asif, M. (2013). *Progress and opportunities of doubled haploid production* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.
- Asif, M., Eudes, F., Goyal, A., Amundsen, E., Randhawa, H., & Spaner, D. (2013). Organelle antioxidants improve microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(5), 489-497.
- Asif, M., Eudes, F., Randhawa, H., Amundsen, E., & Spaner, D. (2014). Induction medium osmolality improves microspore embryogenesis in wheat and triticale. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1), 121-126.
- Ayed, O. S., De Buyser, J., Picard, E., Trifa, Y., & Amara, H. S. (2010). Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. Durum Desf.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2(2), 030-038.
- Bal, U., Ellialtioglu, S., & Abak, K. (2009). Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured in vitro. *Scientia Agricola*, 66(4), 535-539.
- Bishnoi, U., Jain, R. K., Rohilla, J. S., Chowdhury, V. K., Gupta, K. R., & Chowdhury, J. B. (2000). Anther culture of recalcitrant indica × Basmati rice hybrids. *Euphytica*, 114(2), 93-101.
- Cabrera-Ponce, J. L., López, L., León-Ramírez, C. G., Jofre-Garfias, A. E., & Verver-y-Vargas, A. (2015). Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*, 252(2), 559-570.
- Chakraborty, P., Mandal, J., Sarkar, E., Chowdhury, I., & Gupta-Bhattacharya, S. (2009). Clinico-immunochemical studies on airborne Areca catechu L. pollen, a probable risk factor in emergency asthma hospitalization from Eastern India. *International archives of allergy and immunology*, 149(4), 305-314.
- Cistué, L., Ramos, A., Castillo, A. M., & Romagosa, I. (1994). Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol. *Plant cell reports*, 13(12), 709-712.
- Corral-Martínez, P., & Seguí-Simarro, J. M. (2012). Efficient production of callus-derived doubled haploids through isolated microspore culture in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Euphytica*, 187(1), 47-61.
- Cubero, J. I., & Salmerón, J. I. C. (2013). *Introducción a la mejora genética vegetal*. Mundi-Prensa Libros.
- Darwin, C. (1876). *The effects of cross and self fertilisation in the vegetable kingdom*. J. Murray.
- Davies, P. A. (2003). Barley isolated microspore culture (IMC) method. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 49-52). Springer Netherlands.
- Davies, P. A., & Sidhu, P. K. (2017). Oat Doubled Haploids Following Maize Pollination. *Oat: Methods and Protocols*, 23-30.
- Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377-424.
- Duvick, D. N. (1959). The use of cytoplasmic male-sterility in hybrid seed production. *Economic Botany*, 13(3), 167-195.

- Echavarri, B., Soriano, M., Cistué, L., Vallés, M. P., & Castillo, A. M. (2008). Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(3), 295-301.
- FAOSTAT <http://faostat.fao.org> .
- Fíla, J., Matros, A., Radau, S., Zahedi, R. P., Čapková, V., Mock, H. P., & Honys, D. (2012). Revealing phosphoproteins playing role in tobacco pollen activated in vitro. *Proteomics*, 12(21), 3229-3250.
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in plant science*, 12(8), 368-375.
- Germanà, M. A., & Chiancone, B. (2001). Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66(1), 59-66.
- Ghane, S. G., & Nikam, T. D. (2014). Influence of osmotic stress, physicochemical factors and nitrogen supplements on embryogenesis and plantlet formation in *Guizotia abyssinica* Cass.(Niger). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(3), 263-272.
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 497.
- Hosp, J., de Maraschin, S. F., Touraev, A., & Boutilier, K. (2007). Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158(3), 275-285.
- Jacquard, C., Asakaviciute, R., Hamalian, A. M., Sangwan, R. S., Devaux, P., & Clement, C. (2006). Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant cell reports*, 25(5), 375-381.
- Jacquard, C., Nolin, F., Hécart, C., Grauda, D., Rashal, I., Dhondt-Cordelier, S., Sangwan, R. S., Devaux, P., Mazeyrat-Gourbeyre, F. & Clément, C. (2009). Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant cell reports*, 28(9), 1329-1339.
- Jensen, C. J. (1983). Producing haploid plants by chromosome elimination. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, 55-79.
- Johannsen, W. (1903). Heredity in populations and pure lines. *Classic Papers in Genetics*, 20-26.
- Karsai, I., & Bedó, Z. (1997). Effect of carbohydrate content on the embryoid and plant production in triticale anther culture. *Cereal Research Communications*, 25(2), 109-116.
- Kasha, K. J., Simion, E., Miner, M., Letarte, J., & Hu, T. C. (2003). Haploid wheat isolated microspore culture protocol. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 77-81). Springer Netherlands.
- Keller, E. J., & Korzun, L. (1996). 13. Ovary and ovule culture for haploid production. *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 1: Fundamental Aspects and Methods*, 23, 217.
- Kim, M., Jang, I. C., Kim, J. A., Park, E. J., Yoon, M., & Lee, Y. (2008). Embryogenesis and plant regeneration of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 27(3), 425-434.
- Kölreuter, J. G. (1764). *Vorläufige Nachricht von einigen das Geschlecht der Pflanzen betreffenden Versuchen und Beobachtungen: Zweyte Fortsetzung* (Vol. 3). Gleditsch.
- Lacadena, J. R. (1970). Genética vegetal. *Fundamentos de su aplicación* (capítulo VIII). Agesa. Madrid, 429 pp.
- Lantos, C., Páricsi, S., Zofajova, A., Weyen, J., & Pauk, J. (2006). Isolated microspore culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) with Hungarian cultivars. *Acta Biologica Szegediensis*, 50(1-2), 31-35.

- Lippman, Z. B., & Zamir, D. (2007). Heterosis: revisiting the magic. *Trends in genetics*, 23(2), 60-66.
- Liu, Z., Wang, Y., Ren, J., Mei, M., Frei, U. K., Trampe, B., & Lubberstedt, T. (2016). Maize Doubled Haploids. *Plant Breeding Reviews*, 40, 148.
- Malik, M. R., Wang, F., Dirpaul, J. M., Zhou, N., Polowick, P. L., Ferrie, A. M., & Krochko, J. E. (2007). Transcript profiling and identification of molecular markers for early microspore embryogenesis in *Brassica napus*. *Plant Physiology*, 144(1), 134-154.
- Maluszynski, M. (Ed.). (2003). *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Springer Science & Business Media.
- Maraschin, S. D. F., De Priester, W., Spaink, H. P., & Wang, M. (2005). Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1711-1726.
- Misra, N. R., Varghese, T. M., Maherchandani, N., & Jain, R. K. (1983). Studies on induction and differentiation of androgenic callus of *Solanum melongena* L. In *Plant Cell Culture in Crop Improvement* (pp. 465-468). Springer US.
- Miyoshi, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15(6), 391-395.
- Ochatt, S., Pech, C., Grewal, R., Conreux, C., Lulsdorf, M., & Jacas, L. (2009). Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae). *Journal of plant physiology*, 166(12), 1314-1328.
- Oiyama, I., & Kobayashi, S. (1993). Haploids obtained from diploid x triploid crosses of citrus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 62(1), 89-93.
- Ollitrault, P., Allent, V., & Luro, F. (1996). Production of haploid plants and embryogenic calli of clementine (*Citrus reticulum* Blanco) after *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen.
- Olmedilla, A. (2010). Microspore embryogenesis. In *Plant developmental biology-biotechnological perspectives* (pp. 27-44). Springer Berlin Heidelberg.
- Omar, W. A. W., Azhar, N. A., Fadzilah, N. H., & Kamal, N. N. S. N. M. (2015). Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 265-269.
- Otani, M., & Shimada, T. (1994). Pollen embryo formation and plant regeneration from cultured anthers of tetraploid wheat. *Journal of Genetics and Breeding*, 48(1):103-106.
- Palmer, C. D., Keller, W. A., & Kasha, K. (Eds.). (2005). *Haploids in crop improvement II* (Vol. 56). Springer Science & Business Media.
- Pauk, J., Mihaly, R., Monostori, T., & Puolimatka, M. (2003). Protocol of triticale (x *Triticosecale* Wittmack) microspore culture. In *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 129-134). Springer Netherlands.
- Raghavan, V. (1986). *Embryogenesis in angiosperms: a developmental and experimental study*. Developmental and cell biology, vol 17. Cambridge University Press, Melbourne.
- Raina, S. K., & Iyer, R. D. (1973). Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. *Z Pflanzenzucht*.
- Rivas-Sendra, A., Campos-Vega, M., Calabuig-Serna, A., & Seguí-Simarro, J. M. (2017). Development and characterization of an eggplant (*Solanum melongena*) doubled haploid population and a doubled haploid line with high androgenic response. *Euphytica*, 4(213), 1-14.

- Rotino, G. L., Sihachakr, D., Rizza, F., Valè, G., Tacconi, M. G., Alberti, P., Mennella, G., Sabatini, E., Toppino, L., D'Alessandro, A. & Acciarri, N. (2005). Current status in production and utilization of dihaploids from somatic hybrids between eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relatives. *Acta physiologiae plantarum*, 27(4), 723-733.
- Salas, P., Prohens, J., & Seguí-Simarro, J. M. (2011). Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*, 182(2), 261-274.
- Salas, P., Rivas-Sendra, A., Prohens, J., & Seguí-Simarro, J. M. (2012). Influence of the stage for anther excision and heterostyly in embryogenesis induction from eggplant anther cultures. *Euphytica*, 184(2), 235-250.
- Seguí-Simarro, J. M. (2016). Androgenesis in solanaceae. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, 209-244.
- Seguí-Simarro, J. M., & Nuez, F. (2008). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia plantarum*, 134(1), 1-12.
- Sestili, S., & Ficcadenti, N. (1996). 15. Irradiated pollen for haploid production. *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 1: Fundamental Aspects and Methods*, 23, 263.
- Shahnewaz, S., & Bari, M. A. (2004). Effect of concentration of sucrose on the frequency of callus induction and plant regeneration in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Tissue Cult*, 14(1), 37-43.
- Shariatpanahi, M. E., Bal, U., Heberle-Bors, E., & Touraev, A. (2006). Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 127(4), 519-534.
- Shull, G. H. (1914). Duplicate genes for capsule-form in *Bursa bursa-pastoris*. *Molecular and General Genetics MGG*, 12(1), 97-149.
- Torp, A. M., & Andersen, S. B. (2009). Albinism in microspore culture. In *Advances in haploid production in higher plants* (pp. 155-160). Springer Netherlands.
- Touraev, A., Pfosser, M., & Heberle-Bors, E. (2001). The microspore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35, 53-109.
- Vega, V. P. (2015). *Aspectos básicos y aplicados de la inducción de embriogénesis en microsporas de pimiento y colza* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Wan, Y., Petolino, J. F., & Widholm, J. M. (1989). Efficient production of doubled haploid plants through colchicine treatment of anther-derived maize callus. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 77(6), 889-892.
- Wright, H. (1980). Commercial hybrid seed production. *Hybridization of Crop Plants*, (hybridizationof), 161-176.
- Zhou, W. J., Tang, G. X., & Hagberg, P. (2002). Efficient production of doubled haploid plants by immediate colchicine treatment of isolated microspores in winter *Brassica napus*. *Plant Growth Regulation*, 37(2), 185-192.