

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Grado en Biotecnología



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto de Conservación y Mejora
de la Agrodiversidad Valenciana

Cultivo de anteras y microsporas aisladas con
extractos purificados de endospermo líquido de
Cocos nucifera

Curso académico: **2019-2020**

Autora: **Laura Tur Giménez**

Tutor: **José María Seguí Simarro**

Directora experimental: **Mireia Albiñana Palacios**

Valencia, septiembre 2020

Cultivo de anteras y microsporas aisladas con extractos purificados de endospermo líquido de *Cocos nucifera*.

RESUMEN

La embriogénesis de microsporas consiste en desviar *in vitro* la ruta normal de desarrollo gametofítico de las microsporas para formar un embrión a partir del cual se obtendrán plantas haploides o dobles haploides tras la duplicación de su genoma. Existen dos técnicas de cultivo *in vitro* para la inducción de la embriogénesis de microsporas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas. Este proceso tiene un gran interés práctico, pues es una forma rápida y barata de obtener líneas puras homocigotas, esenciales para la producción de semilla híbrida. Por ello, se pretende estudiar este fenómeno en berenjena y pimiento, especies de gran interés agronómico. En el cultivo de anteras, tanto de pimiento como de berenjena, es común que los embriones derivados de microsporas tengan un desarrollo anómalo, lo cual reduce el rendimiento en la obtención de dobles haploides por esta vía. Por otro lado, en el cultivo de microsporas de berenjena, se pueden conseguir dobles haploides, pero únicamente es posible mediante organogénesis. Conforme avanza el desarrollo de los embriones inicialmente derivados de las microsporas, estos se transforman en embriones deformes y finalmente en callos. Este proceso no es tan eficiente como el derivado de la ruta embriogénica, por lo que resultaría muy interesante descubrir en qué condiciones sería posible inducir la embriogénesis de microsporas en berenjena. En este sentido, diversos estudios en otras especies y tipos celulares han demostrado que la adición de un extracto purificado de endospermo líquido de coco (*Cocos nucifera*) puede aportar, debido a su compleja mezcla de sustancias, incluyendo reguladores del crecimiento, el entorno químico necesario para que los embriones se desarrollen con normalidad. Planteamos un trabajo en el que se evalúe el efecto de la adición de cantidades controladas de dichos extractos al cultivo de anteras y microsporas aisladas de berenjena y al cultivo de anteras de pimiento en términos de número de embriones obtenidos y la calidad de estos.

PALABRAS CLAVE: doble haploide, androgénesis, embriogénesis de microsporas, agua de coco, pimiento, berenjena

SUMMARY

Microspore embryogenesis consists of *in vitro* changing the normal pathway of gametophytic development of pollen to form an embryo from which haploid or doubled haploid plants will be obtained after duplication of their genome. There are two *in vitro* culture techniques for inducing microspore embryogenesis: anther culture and isolated microspore culture. This process has practical interest: it is a fast and cheap way to obtain homozygous pure lines, essential for the production of hybrid seed. Therefore, our goal is to study this phenomenon in eggplant and pepper, species of agronomic interest. On the one hand, in anther culture it is common to observe that microspore-derived embryos have abnormal development, which reduces the final yield of this technique. On the other hand, in eggplant isolated microspore culture, doubled haploids can be obtained, but it is only possible by organogenesis. The embryos initially derived from the microspores are abnormal and finally transform into calli, from which doubled haploid plants can be obtained through organogenesis. This process is not as efficient as direct embryogenesis, so it would be very interesting to discover under what conditions it would be possible to promote the entire embryogenic development in eggplant. In this sense, various studies in other species and cell types have shown that the addition of a purified extract of liquid coconut (*Cocos nucifera*) endosperm can provide, due to its complex mixture of substances, including growth regulators, the necessary chemical environment to allow for normal embryo development. We propose a study to evaluate the effect, in terms of the number of embryos obtained and its quality, of adding controlled amounts of these extracts to the anther culture and isolated microspore culture media.

KEY WORDS: doubled haploid, androgenesis, microspore embryogenesis, coconut water, pepper, eggplant

AUTORA: Laura Tur Giménez

TUTOR: José María Seguí Simarro

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Mireia Albiñana Palacios

Valencia, septiembre 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a José María la oportunidad que me ha dado de formar parte de su grupo de investigación. También agradecer al equipo el recibimiento, el trato inmejorable y los buenos ratos que hemos pasado. A Marina, por cuidar de mis embriones durante los meses de confinamiento. Pero, en especial a Mireia, has sido más que mi directora experimental. Has estado ahí siempre que te he necesitado, aún cuando no tenías el porqué. Te deseo todo lo bueno que te pueda pasar, tanto personal como profesionalmente.

Belén, Ángela, Violeta, Alba y María sois lo mejor que me ha dado la biotecnología, gracias por hacer de las tardes en la biblioteca algo más ameno y por nuestras quedadas extracurriculares, son muchos los recuerdos bonitos que me llevo. Esta etapa sin vosotras no hubiera sido lo mismo.

Y, por último, pero no menos importante, a mis padres. Gran parte de lo que soy es gracias a vosotros. Gracias por la educación y valores que me habéis dado, por el apoyo en cada una de mis decisiones. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MEJORA GÉNÉTICA VEGETAL.....	1
1.2. IMPORTANCIA Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS PURAS	2
1.2.1. MÉTODO CONVENCIONAL.....	2
1.2.2. OBTENCIÓN DE HAPLOIDES Y DOBLES HAPLOIDES.....	3
1.3. ANDROGÉNESIS.....	3
1.3.1. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS	5
1.3.1.1. CULTIVO DE ANTERAS	6
1.3.1.2. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS.....	7
1.3.1.3. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS	7
1.4. ESPECIES RECALCITRANTES A LA ANDROGÉNESIS.....	9
1.4.1. PIMIENTO	9
1.4.1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	9
1.4.1.2. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS EN PIMIENTO	10
1.4.2. BERENJENA.....	11
1.4.2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	11
1.4.2.2. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS EN BERENJENA	11
1.5. AGUA DE COCO EN CULTIVO <i>IN VITRO</i>	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. PLANTAS DONANTES Y CONDICIONES DE CULTIVO	16
3.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE ANTERAS	16
3.2.1. MEDIO DE CULTIVO DE INDUCCIÓN (MEDIO C) Y REGENERACIÓN (MEDIO R).....	16
3.2.2. MEDIO DE CULTIVO DE ENRAIZADO Y MEDIO DE CRECIMIENTO PARA PLANTAS YA ENRAIZADAS.....	18
3.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS	19
3.4. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO	20
3.4.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE PIMIENTO EN EL ESTADIO ADECUADO	20
3.4.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS YEMAS DE PIMIENTO	21
3.4.3. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO	21
3.5. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA	22
3.5.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE BERENJENA EN EL ESTADIO ADECUADO.....	22
3.5.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS YEMAS DE BERENJENA	23
3.5.3. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA.....	23

3.6. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA	24
3.6.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE BERENJENA EN EL ESTADIO ADECUADO	24
3.6.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS ANTERAS DE BERENJENA	24
3.6.3. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA	24
3.7. ANÁLISIS DE PLOIDÍA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO	26
4.1.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO.....	26
4.1.2. CALIDAD DE LOS EMBRIONES Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO A PLANTA	29
4.1.3. ANÁLISIS DE PLOIDÍA DE LAS PLANTAS OBTENIDAS	30
4.2. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA.....	32
4.2.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO.....	32
4.2.2. CALIDAD DE LOS EMBRIONES Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO A PLANTA	33
4.3. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA	35
4.3.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO.....	35
4.3.2. EMBRIOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE LAS MICROSPORAS INDUCIDAS	37
5. CONCLUSIÓN	38
6. BIBLIOGRAFÍA.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medio de inducción (medio C) para el cultivo de anteras de pimiento.	16
Tabla 2. Medio de regeneración (medio R) para el cultivo de anteras de pimiento.	17
Tabla 3. Medio de inducción (medio C) para el cultivo de anteras de berenjena.	17
Tabla 4. Medio de regeneración (medio R) para el cultivo de anteras de berenjena....	17
Tabla 5. Composición del medio basal de inducción (preparado C) y del medio basal de regeneración (preparado R).	18
Tabla 6. Medio de enraizado.	18
Tabla 7. Composición del medio basal MS.	19
Tabla 8. Medio de recultivo de microsporas aisladas de berenjena.	19
Tabla 9. Composición del medio basal NLN.	20
Tabla 10. Número de anteras cultivadas, número de anteras que respondieron y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de anteras de pimiento.	26
Tabla 11. Número de anteras cultivadas, número de anteras que respondieron y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de anteras de berenjena. ...	32
Tabla 12. Viabilidad de las microsporas a día 0 y 3 y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de microsporas aisladas de berenjena.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Rutas androgénicas.....	4
Figura 2. Embriogénesis de microsporas por reprogramación del desarrollo gametofítico a nivel de microspora vacuolada o polen bicelular joven hacia la androgénesis.....	6
Figura 3. Efecto de la adición de agua de coco sobre la proliferación celular de explantes de zanahoria.....	13
Figura 4. Preparación del medio de recultivo para microsporas de berenjena.....	20
Figura 5. Recolección de las yemas de pimiento en el estadio adecuado.	21
Figura 6. Recolección de las yemas de berenjena en el estadio adecuado.	23
Figura 7. Procedimiento de extracción de las anteras de berenjena.....	24
Figura 8. Embriones/plántulas de pimiento obtenidas a partir del tratamiento con hormonas y agua de coco al 5% y al 10%.....	29
Figura 9. Plantas aclimatadas de pimiento aproximadamente 3 meses tras la aparición de los embriones.	30
Figura 10. Análisis de ploidía mediante citometría de flujo de las plantas de pimiento obtenidas a partir del cultivo de anteras.	31
Figura 11. Embriones en antera obtenidos a partir del cultivo de anteras de pimiento.	31
Figura 12. Embriones en antera obtenidos a partir del cultivo de anteras de berenjena en medio con agua de coco al 5% y hormonas.	34
Figura 13. Evolución de los embriones con un desarrollo apical-basal normal obtenidos a partir del cultivo de anteras de berenjena.	34
Figura 14. Embriones con anomalías morfológicas derivados del cultivo de anteras de berenjena.....	35

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Evolución de la temperatura promedio, máxima y mínima semanal desde abril hasta julio.	28
Gráfica 2. Evolución de la temperatura promedio, máxima y mínima diaria durante el mes de julio.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MEJORA GÉNÉTICA VEGETAL

La agricultura tiene sus inicios en el Neolítico, cuando los seres humanos optaron por el sedentarismo como estilo de vida. Con ello, surgió la necesidad de explotar los recursos locales, empezando así la domesticación de las especies silvestres. En esta etapa primitiva de la agricultura se empezó a hacer selección de forma inconsciente, lo cual dio lugar a las primeras variedades con reproducción controlada por el humano, pero todavía próximas a las especies silvestres.

En el periodo greco-romano de la Edad Antigua hay evidencias de una selección intuitiva basada en aspectos como el cuajado del fruto y la arquitectura de la planta, entre otros. Esta selección tuvo lugar en civilizaciones con ambientes diferentes y se originaron las variedades locales adaptadas a estos entornos, las cuales actualmente se usan como fuente de variabilidad genética.

Debido al descubrimiento de la reproducción sexual en plantas a finales del siglo XVII, surgió la denominada agricultura científica impulsada por la necesidad de aumentar la producción para poder abastecer a ciudades industriales crecientes. Este tipo de mejora está limitado a realizar cruces entre especies sexualmente compatibles. En este contexto, empezaron a originarse las primeras casas comerciales de semillas, lo que implica una divergencia definitiva de las funciones del agricultor, quedando desvinculada la función de mejorador.

En el siglo XX, el redescubrimiento de las leyes de la herencia de Mendel, junto con el avance del conocimiento en distintas ramas científicas, impulsa el desarrollo de una mejora genética más eficaz. Aparecen técnicas como la manipulación cromosómica y la mutagénesis.

Las técnicas anteriormente descritas engloban lo que se conoce como mejora tradicional. Dicha mejora requiere de varias generaciones para conseguir la transferencia de una determinada característica desde el parental donante a la variedad receptora y está limitada por la compatibilidad sexual entre parentales, excepto la mutagénesis, pues constituye una fuente de nuevos genes, aunque de forma empírica y aleatoria. Es a mitad del siglo XX cuando se desarrollaron técnicas basadas en ingeniería genética que permiten superar la barrera de incompatibilidad sexual entre especies, e incluso entre reinos.

El término biotecnología hace referencia a toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. En los últimos tiempos, este término se tiende a asociar a la tecnología que hace uso del ADN recombinante, es decir, se emplea como sinónimo de ingeniería genética. Sin embargo, entendiendo la biotecnología en su sentido más amplio, muchas de las técnicas y procesos empleados por la llamada mejora genética tradicional son biotecnológicos y, de igual forma, la tecnología de los dobles haploides, empleada en el presente trabajo para la obtención de líneas puras, explota el sentido más amplio del término.

1.2. IMPORTANCIA Y OBTENCIÓN DE LÍNEAS PURAS

El desarrollo de híbridos es común en muchos tipos de cultivo en todo el mundo y tiene gran relevancia en la mejora genética vegetal. Para producir semillas híbridas, se cruzan dos líneas parentales homocigóticas lo más diferentes genéticamente posible entre sí. Los parentales son elegidos con el objetivo de que garanticen la máxima producción y homogeneidad fenotípica (Cubero, 2013).

La semilla híbrida tiene un elevado valor comercial, ya que los híbridos ofrecen muchos beneficios al agricultor. Entre estos cabe destacar la homogeneidad en todas las fases del cultivo, ya que los híbridos resultantes del cruce de líneas puras son idénticos entre sí y se comportan de igual modo. Además, debido al efecto de la heterosis, los descendientes heterocigóticos resultantes son mucho más productivos que ambos progenitores, por lo que producen rendimientos más elevados. La heterosis es el aumento en la expresión de ciertos caracteres que surge tras el cruzamiento entre especies, variedades o líneas puras y que ocurre como resultado de la heterocigosis (Cubero, 2013).

Tras mencionar las principales ventajas que supone la compra de semilla híbrida para el agricultor, es importante explicar dónde radica el negocio para el productor de semilla híbrida. El agricultor no dispone de los medios necesarios para mantener las características del híbrido a lo largo de las generaciones. Siempre podrá guardar semilla de una cosecha para sembrar la siguiente, pero al ser híbrida la primera generación (F_1), su descendencia (segunda generación o F_2) segrega y resulta en una población altamente heterogénea, lo cual no es deseable para el agricultor. Esta capacidad de reproducir la semilla híbrida la tiene la casa comercial, pues dispone de los parentales cuyo cruce da lugar a la misma población de híbridos F_1 . Es por ello por lo que el agricultor suele optar por comprar dicha semilla cada año, pues le asegura una homogeneidad en todos los caracteres para él interesantes, que redundan en un incremento en producción y beneficios que compensan el gasto anual en semilla (Cubero, 2013).

1.2.1. MÉTODO CONVENCIONAL

Los híbridos se obtienen mediante el cruce de líneas puras, seleccionadas con el propósito de que garanticen la máxima producción y homogeneidad fenotípica. Las líneas puras son una población de individuos genéticamente idénticos y homocigotos para todos los caracteres. El método convencional de obtención de estas líneas puras consiste en varias generaciones de autofecundación y selección de aquellos individuos con características deseables. Para conseguir un nivel de homocigosis suficiente en las plantas parentales se requieren de 7-9 ciclos, lo cual supone un esfuerzo técnico y económico importante. Una vez se han desarrollado las líneas puras, es importante identificar aquellos parentales cuyo cruce dé lugar a los mejores híbridos en términos de rendimiento y explotación de la heterosis. Para ello, se testa la capacidad que tienen los distintos genotipos para combinarse entre sí y con otros genotipos mediante las conocidas pruebas de aptitud combinatoria. Hay dos tipos de aptitud a evaluar: aptitud combinatoria general y aptitud combinatoria específica. La aptitud combinatoria general es el comportamiento promedio de una línea en sus combinaciones híbridas, mientras que la aptitud combinatoria específica mide la expresión favorable o no de ciertas combinaciones híbridas específicas con respecto al comportamiento promedio de sus progenitores. Evaluadas de esta forma, se seleccionan las líneas puras progenitoras y se obtendrá la semilla híbrida para ser comercializada (Cubero, 2013).

1.2.2. OBTENCIÓN DE HAPLOIDES Y DOBLES HAPLOIDES

Las plantas haploides son aquellas que tienen la mitad de la dotación genética de la especie en concreto. Aunque en plantas cultivadas hay muchas excepciones, la mayoría de las especies son diploides, tienen dos cromosomas homólogos. En este caso, los individuos haploides derivados de estas presentan una sola copia de cada una de las parejas de cromosomas homólogos o, lo que es lo mismo, presentan una dotación gamética, pues en la meiosis, durante la formación de los gametos, se produce la recombinación entre los cromosomas homólogos y la reducción de la dotación cromosómica a la mitad. Por lo tanto, los individuos haploides tienen un origen gametofítico. En lugar de producirse la fusión de los gametos para dar lugar a un cigoto diploide, se desarrolla un individuo haploide a partir del gametofito femenino a través de un proceso denominado ginogénesis o a partir del gametofito masculino mediante un proceso denominado androgénesis.

Los individuos haploides son interesantes, por ejemplo, para el estudio de mutaciones recesivas que quedan enmascaradas en heterocigosis (Szarejko y Forster, 2007). Sin embargo, estos individuos presentan desventajas con respecto a los individuos diploides, son más susceptibles al ambiente y a ataques de patógenos (tienen menor capacidad de adaptación por solo disponer de una copia de cada gen), presentan un tamaño vegetativo menor y son estériles (Seguí-Simarro, 2010). Por esta razón, para su uso en la obtención de híbridos es necesario obtener individuos diploides estables genéticamente. Estos individuos diploides que derivan de la duplicación cromosómica de plantas haploides se denominan dobles haploides. Además de la obtención de líneas puras para la producción de híbridos, los dobles haploides tienen otras utilidades. Entre ellas, la detección de marcadores ligados a un determinado carácter a partir de poblaciones segregantes derivadas de híbridos. Estos marcadores serán posteriormente útiles en selección asistida por marcadores. Los dobles haploides presentan la ventaja de poder ser replicados y testados en distintos ambientes, lo cual es interesante en ensayos cuya precisión depende de un fenotipado robusto. Otra de las aplicaciones es la transformación a nivel de microspora y la posterior regeneración de dobles haploides transgénicos homocigotos para el transgén (revisado en Forster et al., 2007).

La duplicación cromosómica mencionada se puede producir de forma espontánea por las condiciones estresantes que supone el cultivo *in vitro*, que implican una tasa de división mayor, y por la tendencia a la estabilidad génica que tienen las células haploides. Por otro lado, hay otras alternativas para aumentar el rendimiento en la obtención de dobles haploides cuando esta duplicación cromosómica espontánea es poco frecuente: el tratamiento con agentes antimitóticos como puede ser la colchicina. Esta puede actuar bloqueando la mitosis durante el ensamblaje del huso mitótico en la anafase o durante la citocinesis impidiendo la formación del fragmoplasto, lo cual produce defectos en la formación de la pared y promueve la fusión nuclear (revisado en Seguí-Simarro y Nuez, 2008a).

1.3. ANDROGÉNESIS

La androgénesis consiste en un conjunto de vías que dan lugar a un individuo haploide el cual contiene la información genética del parental masculino. Las 3 vías androgénicas que se conocen son: la inactivación del genoma femenino en un cigoto unicelular (ruta 1), la embriogénesis de microsporas (ruta 2) y la callogénesis derivada de meiocitos (ruta 3), como podemos observar en la figura 1.

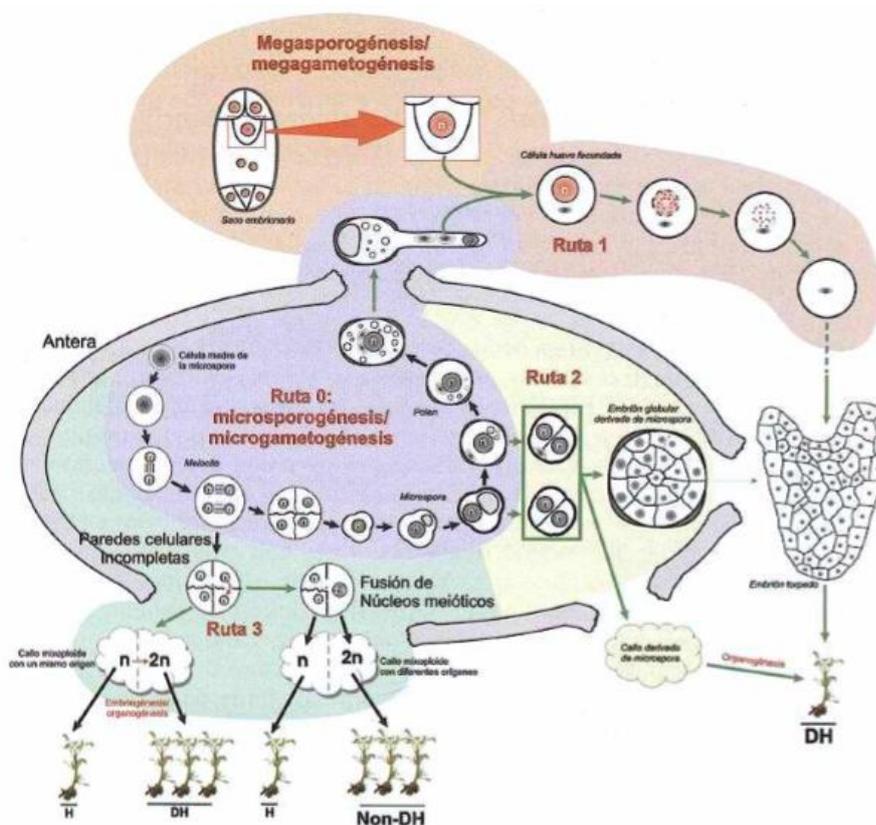


Figura 1. Rutas androgénicas. Ruta 0: Desarrollo gametofítico normal del polen. Ruta 1: Fecundación de la célula huevo y posterior inactivación del genoma haploide femenino. Ruta 2: Desvío de la ruta 0 hacia la embriogénesis o calogénesis a partir de microsporas y posterior organogénesis. Ruta 3: Reprogramación de la microsporogénesis/microgametogénesis hacia la formación de callos derivados de meiocitos y posterior organogénesis. Imagen de Seguí-Simarro, 2010.

La ruta 1 de inactivación del genoma femenino tras la fecundación se ha descrito en muy pocas especies, entre las cuales destaca el maíz, y la frecuencia con la que ocurre en la naturaleza es muy baja. Es por esto por lo que no se ha estudiado más sobre este mecanismo androgénico natural para su utilización como herramienta para la obtención de haploides y dobles haploides (Seguí-Simarro, 2010).

En cuanto a la ruta 3, consiste en inducir la proliferación de los meiocitos bajo determinadas condiciones *in vitro* para dar lugar a un callo antes de convertirse en tétradas de microsporas. Se pueden obtener dos productos mediante esta vía androgénica: si todas las células del callo provienen de la misma célula meiótica haploide, por organogénesis o embriogénesis se obtienen plantas haploides y dobles haploides, pero si se produce la fusión de dos células meióticas que han sufrido procesos de recombinación distintos se generan individuos diploides no deseables. Esta vía alternativa se ha estudiado sobretodo en tomate, ya que es una especie extremadamente recalcitrante a la embriogénesis derivada de microsporas. Debido a la baja frecuencia de obtención de dobles haploides, además del inconveniente anteriormente mencionado, se han centrado los esfuerzos en el estudio de la ruta 2, la más comúnmente empleada para la obtención de líneas puras (Seguí-Simarro, 2010).

1.3.1. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS

La embriogénesis de microsporas consiste en desviar *in vitro* la ruta normal de desarrollo gametofítico del polen para formar un embrión a partir del cual se obtendrán plantas haploides o dobles haploides. Esta ruta experimental fue descubierta en 1964 por Guha y Maheshwari, cuando demostraron que se podían regenerar plantas haploides mediante el cultivo de anteras de *Datura innoxia*.

En la ruta gametofítica, la primera división mitótica es asimétrica y resulta en la formación de una célula generativa metabólicamente inactiva que se encuentra en el citoplasma de una célula vegetativa metabólicamente activa durante la etapa temprana de la maduración del polen, la cual exhibe características de célula diferenciada. Ambos núcleos se encuentran en un estado no replicativo, la célula vegetativa se sale del ciclo celular (fase G0) y la célula generativa se encuentra bloqueada en fase G2 con la cromatina condensada tras la replicación. El núcleo generativo se divide para producir las espermátidas, mientras que la célula vegetativa acumula productos de reserva como almidón.

Teniendo en cuenta la clasificación descrita por Sunderland y Evans (1980) y la posterior agrupación definida por Raghavan (1997), hay 4 tipos de rutas principales de reprogramación gametofítica (revisado en Aionesei et al., 2005):

- La ruta A se caracteriza por la inducción tras la primera división asimétrica del núcleo de la microspora, a nivel de polen bicelular joven. Las estructuras multicelulares por proliferación se forman a partir de la célula vegetativa y la célula generativa degenera. Esta vía de reprogramación fue primero descrita en cultivo de anteras de *Nicotiana tabacum* (tabaco), pero también se ha observado en especies como *Brassica napus* (colza), *Triticum aestivum* (trigo), *Datura innoxia*, entre otras.
- La ruta B consiste en la inducción a nivel de microspora unicelular vacuolada. Se produce una división simétrica del núcleo de la microspora que da lugar a la estructura multicelular. Se ha descrito en colza y tabaco.
- La ruta C hace referencia a la fusión nuclear entre dos células derivadas de la célula vegetativa o entre el núcleo de la célula vegetativa y generativa, lo cual implica duplicación cromosómica espontánea. La fusión nuclear ocurre cuando en la primera división mitótica no se produce la citoquinesis y los dos núcleos entran sincrónicamente en división formando una placa metafásica y huso mitótico común. Este evento se ha descrito en cultivo de anteras de *Datura innoxia*.
- La ruta E fue descrita en el cultivo de anteras de *Hyoscyamus niger* e implica la formación del embrión a partir de la célula generativa, mientras que la célula vegetativa no se divide o sufre unas pocas rondas de división. En *Hordeum vulgare* (cebada) se ha demostrado que tanto divisiones simétricas como asimétricas dan lugar a estructuras multicelulares. Sin embargo, solo aquellas estructuras multicelulares heterogéneas generadas a partir de divisiones asimétricas resultan en la formación de estructuras de tipo embrión (Maraschin et al., 2005).

Estas rutas varían en función de la especie, el estadio de desarrollo del polen en el que se produce la inducción y también está influenciado por el tratamiento inductivo empleado.

Tras la inducción androgénica a nivel de microspora vacuolada - caracterizada por la presencia de una gran vacuola que desplaza el núcleo - o polen bicelular joven, las microsporas tienen distintos destinos (revisado en Seguí-Simarro y Nuez, 2008b). Muchas microsporas mueren

directamente tras el tratamiento estresante inductivo, mientras que otras adoptan estructuras tipo polen antes de morir (Figura 2, ruta “Muerte”). Algunas microsporas responden al tratamiento y se desvían de la ruta gametofítica. Estas microsporas pueden desencadenar la formación de callos multicelulares haploides (Figura 2, ruta “Callogénesis”), a partir de los cuales se obtienen haploides o dobles haploides por organogénesis, o estructuras tipo embrión directamente por embriogénesis (Figura 2, ruta “Embriogénesis de microsporas”). Estas microsporas inducidas aparecen incrementadas en tamaño con el núcleo en una posición central. Además, se produce un reordenamiento de los filamentos de actina y microtúbulos, lo cual conlleva una división simétrica del núcleo y, en estadios tempranos tras la inducción, los núcleos presentan características de células no diferenciadas (Testillano et al., 2000).

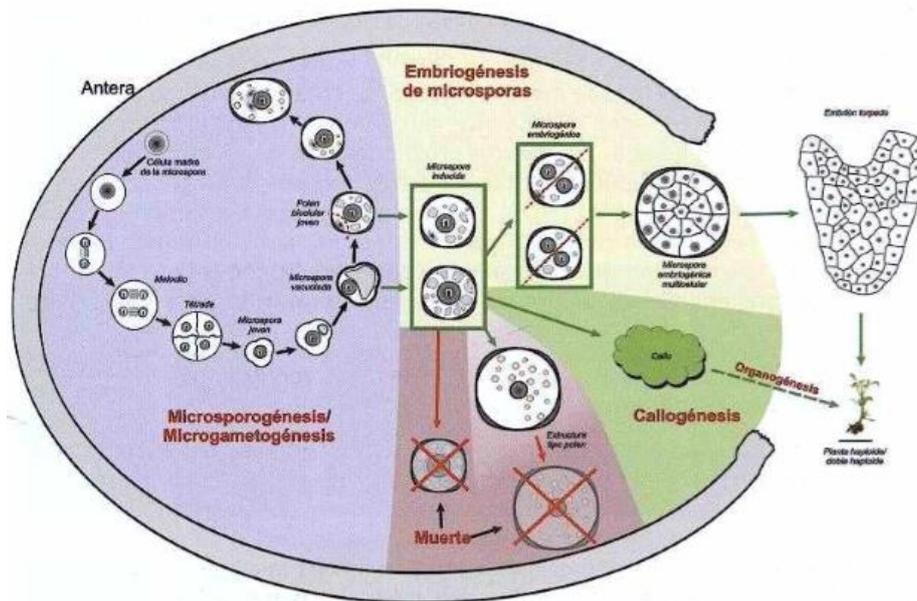


Figura 2. Embriogénesis de microsporas por reprogramación del desarrollo gametofítico a nivel de microspora vacuolada o polen bicelular joven hacia la androgénesis. La ruta “Microsporogénesis/Microgametogénesis” se corresponde con el desarrollo normal del polen. Tras la inducción, el núcleo adopta una posición central, se produce fragmentación vacuolar y el plano de división es simétrico (líneas discontinuas a nivel de microspora embriogénica). En la ruta “Embriogénesis de microsporas” se forma una microspora embriogénica multicelular, la cual seguirá las etapas del desarrollo embrionario hasta dar lugar a una planta haploide o doble haploide. Una ruta alternativa a la embriogénesis de microsporas es la “Callogénesis” en la cual se forman callos a partir de la microspora y por organogénesis se obtiene una planta haploide o doble haploide. Puede que la inducción en algunas microsporas no sea eficaz dando lugar a estructuras tipo polen o que se produzca la muerte de estas reflejado en la ruta “Muerte”. Imagen de Seguí-Simarro, 2010.

Existen dos técnicas de cultivo *in vitro* para la inducción de la embriogénesis de microsporas: el cultivo de anteras y el cultivo de microsporas aisladas.

1.3.1.1. CULTIVO DE ANTERAS

El cultivo de anteras es técnicamente más sencillo que el cultivo de microsporas aisladas. Este consiste en obtener las yemas florales que contengan las microsporas en el estadio adecuado para la inducción, extraer de estas las anteras y cultivarlas en el medio de inducción junto con las condiciones específicas para cada especie. A medida que los tejidos de la antera empiezan a degenerar y necrosarse, se produce la inducción de las microsporas que empiezan a proliferar hasta emerger en forma de embriones.

Entre las ventajas de esta metodología cabe destacar el efecto protector ejercido por parte de la antera en las primeras fases, que ayuda a mantener la viabilidad de las microsporas y a la proliferación de estas. Sin embargo, esta técnica presenta importantes limitaciones como es la posible regeneración de plantas a partir del tejido de la antera, lo cual da lugar a individuos con la misma constitución génica diploide del parental del que proceden. Esto hace que sea necesario analizar si las plantas regeneradas $2n$ son dobles haploides. Para ello, se necesita disponer de un conjunto de marcadores moleculares repartidos a lo largo del genoma de la variedad, de forma que la homocigosis para cada uno de estos marcadores es un indicador de que no se trata de un regenerante somático del tejido de la antera, sino de dobles haploides que han sufrido duplicación espontánea del genoma. Otra desventaja es el tiempo que tardan en difundir los componentes del medio a través del tejido de la antera hasta llegar al saco polínico y tener efecto sobre las microsporas. Además, la eficiencia de esta técnica en algunas especies es muy baja, obteniéndose unos pocos embriones por cada antera que ha respondido a las condiciones de inducción (Seguí-Simarro, 2010).

1.3.1.2. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS

Debido a la baja eficiencia que ofrece la técnica basada en el cultivo de anteras y otras limitaciones anteriormente explicadas, surge el cultivo de microsporas aisladas. Este abordaje es metodológicamente más tedioso, pero no presenta el principal inconveniente que supone la regeneración de plantas a partir del tejido de la antera. Además, las microsporas están directamente expuestas a los componentes del medio de cultivo, los cuales no han de difundir pasivamente a través de la antera hasta el saco polínico. Por lo tanto, el efecto de los componentes del medio de cultivo será más rápido y el acceso a los nutrientes por parte de las microsporas no se verá limitado. En el apartado anterior se planteaba el papel protector de la antera como una ventaja del cultivo de anteras, pero la presencia del tapetum puede influir de forma negativa sobre el control de las condiciones de cultivo (Seguí-Simarro, 2010).

El hecho de que sea un protocolo más exigente técnicamente hace que la aplicación de protocolos basados en el cultivo de anteras sea predominante en la mayoría de las especies, a pesar de que la eficiencia en número de embriones a partir de las microsporas de una antera es muy superior, una vez el protocolo está puesto a punto para la especie en concreto. De unos pocos embriones que podemos obtener mediante el cultivo de anteras, se puede pasar a cientos de embriones por antera mediante el cultivo de microsporas aisladas.

1.3.1.3. FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS

Entre los factores que influyen sobre la desviación del programa gametofítico hacia la embriogénesis tenemos aspectos relacionados con la planta donante, con las condiciones de aislamiento e inducción de las microsporas y las condiciones de cultivo.

Condiciones de la planta donante

La planta donante y las condiciones en las que se encuentra influyen sobre la embriogénesis de microsporas. Hay especies que tienen una alta respuesta androgénica como es el caso de la

especie modelo *Brassica napus*, sobre la cual se realizan los estudios de investigación básica para comprender los cambios de expresión y metabólicos que determinan la reprogramación de las microsporas hacia la formación de un embrión. Otras especies que debido a su respuesta androgénica se pueden considerar especies modelo son: tabaco, cebada y trigo. En el lado opuesto, hay especies con muy baja respuesta androgénica, para las cuales es costoso obtener protocolos eficientes de obtención de dobles haploides. Son las denominadas especies recalcitrantes a la androgénesis.

Dentro de cada especie, también hay diferencias en la respuesta androgénica entre distintos cultivares. Esta diferencia entre distintos genotipos y la heredabilidad de la competencia androgénica sugiere un control genético de este carácter y la posibilidad de seleccionar individuos que tengan mayor disposición androgénica (Zhang y Takahata, 2001).

A parte de la influencia del genotipo de la planta donante también influye la edad de la planta y las condiciones de crecimiento de la planta: si crece en invernadero o cámara, la temperatura, la estación del año, el fotoperiodo, etc. (Seguí-Simarro, 2010).

Estadio adecuado de la microspora y condiciones de inducción

Para que la inducción de la androgénesis sea exitosa se deben recolectar yemas florales que contengan microsporas en el estadio adecuado. La etapa del desarrollo más sensible a la inducción se sitúa en torno a la primera mitosis del polen, entre microspora vacuolada y polen bicelular joven, es decir, entre el final de la microsporogénesis y el inicio de la microgametogénesis. Esta capacidad de reprogramarse hacia la embriogénesis se debe al estado todavía no diferenciado y, por lo tanto, reversible de estos estadios del desarrollo del polen (Seguí-Simarro, 2010).

La inducción requiere de la aplicación de tratamientos estresantes, los cuales se pueden aplicar a nivel de la yema floral, las anteras o las microsporas ya aisladas. Entre los agentes estresantes más ampliamente utilizados encontramos tratamientos de frío, choque térmico, ayuno y estrés osmótico producido por compuestos no metabolizables como el manitol.

Por ejemplo, en cebada se emplea tanto el pretratamiento a nivel de yema floral con frío como el ayuno basado en manitol, de forma individual o combinada. De igual modo, en colza hay dos protocolos descritos, el más común se basa en aplicar calor sobre las microsporas aisladas, mientras que la segunda opción consiste en el empleo de colchicina, lo cual se traduce en un proceso que induce simultáneamente la embriogénesis y la duplicación cromosómica necesaria para la obtención de dobles haploides. En tabaco el procedimiento más empleado combina el estrés causado por el ayuno con el calor sobre la suspensión de microsporas (revisado en Shariatpanahi et al., 2006).

Condiciones de cultivo

Una vez inducida la reprogramación de la microspora, esta debe encontrar unas condiciones de cultivo que favorezcan el desarrollo y crecimiento del embrión hacia plántula. Entre los agentes que influyen en el cultivo *in vitro* encontramos el tipo de fuente de carbono (sacarosa, glucosa, maltosa), la presencia de micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y reguladores del crecimiento (fitohormonas) en concentraciones adecuadas, además de las condiciones de

temperatura y luz (intensidad y fotoperiodo). También influyen la densidad de anteras o microsporas y el posible acondicionamiento con tejidos o extractos (ovarios, anteras o tejidos somáticos) procedentes de la misma o distinta especie. Este acondicionamiento puede ser previo o simultáneo (Seguí-Simarro, 2010).

1.4. ESPECIES RECALCITRANTES A LA ANDROGÉNESIS

Los beneficios que supone el sustituir el método convencional de obtención de líneas puras por la tecnología de dobles haploides discutidos anteriormente hacen que sea de gran interés desarrollar protocolos eficientes en especies de interés agronómico. Este es el caso, por ejemplo, de los cultivos hortícolas que forman parte de la familia Solanaceae. Esta familia está constituida por aproximadamente 3000 especies que pertenecen a 100 géneros diferentes. *Datura innoxia*, especie en la que se reportó por primera vez la embriogénesis de microsporas (Guha y Maheshwari, 1964), forma parte de esta familia. También es miembro de esta familia *Nicotiana tabacum*, especie considerada sistema modelo para el estudio de la androgénesis, ya que se disponen de protocolos eficientes de obtención de dobles haploides mediante cultivo de anteras y microsporas aisladas (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011). Sin embargo, las especies con las que se trabajó en este estudio, *Solanum melongena* (berenjena) y *Capsicum annuum* (pimiento), son consideradas especies recalcitrantes a la androgénesis. A pesar de pertenecer a la misma familia, estas especies son aparentemente distantes en cuanto a su disposición a la androgénesis. A continuación, se describen estas especies y se revisan los distintos protocolos descritos en la literatura, así como las distintas aproximaciones realizadas para mejorar la eficiencia del proceso.

1.4.1. PIMIENTO

El pimiento es una especie que pertenece al género *Capsicum* L. Este género está constituido por 27 especies, entre las cuales sólo cinco han sido domesticadas: *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* y *C. pubescens*.

Es una especie herbácea perenne, aunque se suele cultivar como anual, de porte arbustivo alcanza una altura de aproximadamente un metro. El sistema radicular es voluminoso y profundo. Las hojas son pecioladas, pubescentes y con márgenes enteros. Las flores pueden ser solitarias o formar grupos de escaso número. El cáliz es persistente, acampanado y entero, con costillas redondeadas terminadas en un diente romo. La corola tiene los pétalos anclados en su base, de color blanco y denticulados. Las anteras son generalmente purpúreas. El fruto es una baya hueca con tabiques incompletos donde se alojan las semillas de color amarillento. Es una especie alógama parcial, tiene capacidad de autofecundarse.

1.4.1.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA

El género *Capsicum* es uno de los que tiene mayor variabilidad dentro de las especies hortícolas. Los frutos de este género pueden ser picantes o dulces, así como toda la gama de sabores intermedios. También existe mucha variedad en el color y el tamaño del fruto entre especies. En cuanto a su uso en alimentación, algunos de ellos se emplean como vegetales

frescos y otros se secan para su uso como especias. El pimiento tiene relevancia gastronómica sobre todo en las Américas, donde radica su origen como alimento, y Europa. La producción de pimiento a nivel mundial se ha visto incrementada en 30 millones de toneladas desde que se recopilaron los primeros datos de FAOSTAT en 1961 hasta la actualidad (FAO, 2020).

El mayor productor con diferencia es Asia, donde el área cultivada superó el millón de hectáreas y produjo casi 25 millones de toneladas en 2018 (FAO, 2020). La producción en Europa y América es muy similar, aproximadamente 5 millones de toneladas en las Américas y más de 3 millones de toneladas en Europa en 2018 (FAO, 2020). Sin embargo, la suma de la producción de ambas supone sólo un tercio de la producción en Asia. Por otro lado, España produjo casi un 40% de la producción a nivel europeo en 2018. En cuanto a la exportación, en el año 2017 se cultivaron 20,498 ha, se recolectaron más de 1 millón de toneladas, de las cuales se exportó más del 56%.

1.4.1.2. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS EN PIMIENTO

El primer protocolo eficiente para la embriogénesis de microsporas en pimiento fue descrito por Dumas de Vaulx et al. (1981). Este consiste en someter a las anteras de pimiento a un estrés térmico (35°C) para inducir la reprogramación hacia el desarrollo esporofítico de la microspora. Se emplean dos medios y condiciones de cultivo diferentes para promover la inducción y el desarrollo embrionario. Este procedimiento se ha convertido en el método de elección y se han descrito muchas adaptaciones para mejorar la eficiencia en distintos genotipos. Posteriormente, se describió el efecto positivo de la adición de carbón activo al medio, el cual absorbe los compuestos tóxicos liberados por el mismo tejido de la antera. Otro protocolo descrito basado en el cultivo de anteras consiste en un medio formado por 2 fases: una fase líquida sobre una semisólida a base de agar con carbón activado (Dolcet-Sanjuan et al. 1997). Este método, que surgió por la falta de respuesta en algunos genotipos empleando el método anterior, incluye el uso de cámaras con atmósfera de CO₂, lo cual dificulta que se pueda adoptar como rutina en un laboratorio (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011).

Sin embargo, estos protocolos basados en el cultivo de anteras presentan las desventajas descritas en el apartado 1.3.1.1. Por esta razón, se abordó la obtención de un protocolo eficiente a partir del cultivo de microsporas aisladas. Supena et al. (2006) describieron un método que consistía en el empleo de un medio bifásico. En este, las anteras se depositan en el medio líquido en el cual flotan. Alcanzada la dehiscencia, las anteras liberan las microsporas, las cuales quedan en la interfase entre ambos medios (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011). Parra-Vega et al. (2013) probaron este método en 4 genotipos de pimiento dulce. Para dos de los genotipos, entre los cuales se encuentra el genotipo con el que se trabajó en este experimento, no se observaron diferencias significativas en el rendimiento embriogénico con respecto al protocolo estándar. En cambio, los otros dos mostraron un incremento relevante. Por lo tanto, es interesante probar este método en el genotipo con el que se trabaja, pues puede ser beneficioso en términos de rendimiento.

Otra posibilidad es el cultivo de microsporas aisladas en medio líquido. En 2008, se describió un protocolo basado en un tratamiento inductivo a 32°C en ayuno y el posterior cultivo en presencia de sacarosa, pero la calidad de los embriones obtenidos era baja, ya que presentan anomalías morfológicas (Kim et al., 2008). Un año después, se planteó el empleo de maltosa durante la fase de inducción y el cocultivo de los embriones derivados de microsporas

con ovarios de trigo (Gémes et al., 2009). Mediante este método se obtuvieron estructuras multicelulares las cuales avanzaron hasta convertirse en embriones. Sin embargo, muchos de estos presentaban anomalías morfológicas y otros dieron lugar a callo. Con todo, será necesario seguir investigando para conocer mejor los requerimientos para un correcto desarrollo embrionario *in vitro* (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011).

1.4.2. BERENJENA

La berenjena es una especie que pertenece al género *Solanum* L. dentro de la familia Solanaceae. El género *Solanum* L. está constituido por 1300 especies aproximadamente e incluye especies importantes a nivel económico en agricultura como la patata (*S. tuberosum* L.) y el tomate (*S. lycopersicum* L.).

La berenjena es una planta herbácea y perenne, aunque se siembra como anual. Es mayormente de porte arbustivo de hasta dos metros de alto. Las hojas son pecioladas, con superficie vellosa y bordes irregularmente ondulados y lobulados. Su sistema radicular es extenso y moderadamente profundo. Las flores de la planta de berenjena son hermafroditas. Se presentan solitarias o en grupos de dos a cinco, tienen pétalos que varían en color de blanco hasta violeta oscuro y un cáliz que puede ser espinoso. El fruto es una baya de colores variados en función de la variedad, siendo el más común el morado, con semillas amarillas.

1.4.2.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA

La berenjena es la tercera solanácea más cultivada después de la patata y el tomate (FAO, 2020). Esta es especialmente popular en la gastronomía del sudeste asiático y el Mediterráneo. La producción de berenjena ha experimentado un incremento constante desde que se recopilaron los primeros datos en 1961 hasta la actualidad. Este aumento es de aproximadamente 47 millones de toneladas en todo el mundo (FAO, 2020).

El principal productor es China seguido de India. En 2018, se cultivaron 804,618 ha de berenjena en China y 736,000 ha en India, frente a las 33,511 ha cultivadas en toda Europa. Sin embargo, Europa presenta mayor producción por hectárea cultivada que India, es decir, Europa supera a India en términos de rendimiento (hg/ha) (FAO, 2020). Por otro lado, a nivel europeo los principales productores de berenjena son Italia y España. Ambos países suman más del 50% de la producción europea (FAO, 2020). En cuanto al comercio de berenjena, España es el principal exportador a nivel mundial. En 2017 se cultivaron 3,580 ha y se obtuvo una producción de 225,912 toneladas, de las cuales más del 60% se exportaron (FAO, 2020).

1.4.2.2. EMBRIOGÉNESIS DE MICROSPORAS EN BERENJENA

Al igual que en pimiento, el primer protocolo de obtención de haploides y dobles haploides a partir del cultivo de anteras en berenjena fue descrito por Dumas de Vault y Chambonnet (1982). Este método es esencialmente igual que el protocolo descrito para pimiento y constituye también el método estándar más empleado para la producción de dobles haploides.

Miyoshi (1996) desarrolló un protocolo basado en el cultivo de microsporas aisladas. El tratamiento inductivo que resultó exitoso consistía en un tratamiento térmico combinado con

condiciones de ayuno: cultivo de las microsporas aisladas en medio sin sacarosa a 35°C durante 3 días. Una vez transcurrido este tiempo, se recultivaron en medio NLN conteniendo una concentración de sacarosa del 2% y fitohormonas, ácido naftalenacético (NAA) 0.5 mg/L y benciladenina (BA) 0.5 mg/L. Ambas etapas en oscuridad. Este método, sin embargo, no desencadenó embriogénesis directa, sino formación de callos a partir de los cuales se regeneraron plantas por organogénesis. Para ello, los callos se transfirieron a medio MS con zeatina 4 mg/L y ácido indolacético (IAA) 0.2 mg/L. El paso limitante de este método fue la regeneración por organogénesis, se obtuvieron 20-65 callos/anteras y la eficiencia de regeneración por callo transferido fue de 0.1-2%. Con el objetivo de obtener un protocolo que permitiera la embriogénesis directa en berenjena, se probó una versión del método empleado en cebada (Bal et al., 2009). Este combinaba un tratamiento térmico a 33°C con la presencia de manitol en el medio. Se observaron divisiones simétricas y se obtuvieron estructuras multicelulares, pero no se reportó regeneración de plantas a partir de estas estructuras, ni por callogénesis ni por embriogénesis directa. Otros estudios basados en el protocolo descrito por Miyoshi (1996) se han llevado a cabo para tratar de optimizarlo.

Corral-Martínez et al. (2008) reprodujeron el experimento llevado a cabo por Miyoshi y observaron estructuras tipo embrión globular en estadios tempranos de la proliferación de las microsporas. No obstante, estos embriones no eran capaces de efectuar la transición de simetría radial a bilateral y se transformaban en última instancia en estructuras tipo callo. Corral-Martínez y Seguí-Simarro (2012) trataron de optimizar la eficiencia de regeneración por organogénesis probando distintos medios. En este estudio se concluyó que la combinación de dos tipos de medios de regeneración era necesaria para mejorar la eficiencia inicial: medio M4, el cual se diferencia en la concentración de los componentes y el agente gelificante empleado con respecto al utilizado por Miyoshi (1966), y medio V3 con sacarosa al 3%, 0.1 mg/L IAA y 0.2 mg/L BA (M5). El medio M4 para promover el crecimiento de los callos y la aparición de brotes y el medio M5 para favorecer la aparición de raíz en aquellos callos que no enraizaron en medio M4. En este mismo artículo se reportó el efecto positivo obtenido al suplementar el medio NLN con 1% sacarosa y 1% polietilenglicol, agente osmótico no metabolizable, sobre la inducción y proliferación de callos. Este mismo grupo continuó la investigación en esta línea y se vio que una reducción de las concentraciones de NAA y BA a 0.1 mg/L era beneficioso en cuanto a número y tamaño de los callos (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Además, se ensayó la adición de proteínas de arabinogalactano al medio. Estas prevenían parcialmente la conversión de los embriones globulares en callo, ya que se observaron embriones en estadios embriogénicos más avanzados. Estos embriones, sin embargo, presentaban un meristemo apical defectuoso o ausente (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Por lo tanto, se demostró que las proteínas de arabinogalactano en cierta medida son capaces de promover la embriogénesis directa a partir de microsporas de berenjena, aunque se debe de seguir trabajando en ello para obtener un protocolo eficiente de obtención de dobles haploides por esta vía. Por último, se abordó de nuevo la optimización del protocolo de regeneración mediante organogénesis (Rivas-Sendra et al., 2015). Los resultados obtenidos en este artículo difieren de la conclusión a la cual se llegó en estudios anteriores en el mismo laboratorio. Estos apuntaron al medio de regeneración descrito por Miyoshi (1996) como el más adecuado para obtener la tasa más alta de callos organogénicos productores de brotes. Sin embargo, para obtener una eficiencia mejorada se propuso el subcultivo de los callos en este medio de forma continuada y el posterior subcultivo también continuado de los brotes en medio basal MS para que desarrollaran raíz y continuaran creciendo.

1.5. AGUA DE COCO EN CULTIVO *IN VITRO*

El fruto de *Cocos nucifera* se clasifica botánicamente como una drupa, un fruto simple de mesocarpo carnoso que rodea un endocarpo leñoso. El pericarpio del coco está constituido por 3 capas: el exocarpo, formado por una cascara gruesa; el mesocarpo fibroso y el endocarpo, capa vellosa a la cual se adhiere la pulpa o endospermo. En este endospermo se encuentra el embrión embebido y situado debajo del poro flexible que forma parte de los tres ojos de la cáscara, los cuales representan los carpelos del ovario, y la cavidad interna del fruto queda rellena de endospermo líquido denominado comúnmente agua de coco (Niral y Jerard, 2018). Entre los componentes del agua de coco, cabe destacar la presencia de fitohormonas: auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico. Las auxinas se ha demostrado que tienen un papel importante en el desarrollo y crecimiento, así como la diferenciación de células en los meristemas y órganos inmaduros. Por su lado, las citoquininas tienen capacidad de inducir la proliferación celular, y en combinación con auxinas están implicadas en procesos de morfogénesis. Las giberelinas ejercen su efecto sobre la germinación, la elongación de células epidérmicas y la expansión de la hoja (Yong et al., 2009).

El agua de coco ha sido ampliamente utilizada en cultivo *in vitro* debido a su composición y al efecto que tiene las fitohormonas que forman parte de esta sobre los tejidos vegetales. Van Overbeek et al. (1941) reportaron el efecto positivo del agua de coco sobre la germinación de embriones inmaduros extraídos de óvulos de *Datura*. Los embriones inmaduros cultivados en medio basal desarrollaron raíz e hipocotilo, pero no cotiledones. Sin embargo, los embriones cultivados en medio basal suplementado con agua de coco crecieron y desarrollaron correctamente en última instancia hipocotilo y cotiledones. Es decir, se demostró que el agua de coco es fuente de aquellos factores de crecimiento requeridos por los embriones en estadios tempranos del desarrollo. Tras reportarse el empleo de agua de coco en el cultivo de embriones inmaduros, Caplin y Steward (1948) estudiaron el efecto del agua de coco sobre explantes de raíz en zanahoria. En este experimento, se cultivaron los explantes en un medio basal con distintas concentraciones de IAA (Figura 3 A, B, C y D) y se comparó con el cultivo en estos mismos medios a los cuales se les añadió agua de coco al 15% (Figura 3 E, F, G y H). Como podemos observar en la figura 3, la adición del agua de coco al medio de cultivo indujo la proliferación celular a partir de células radiculares diferenciadas.

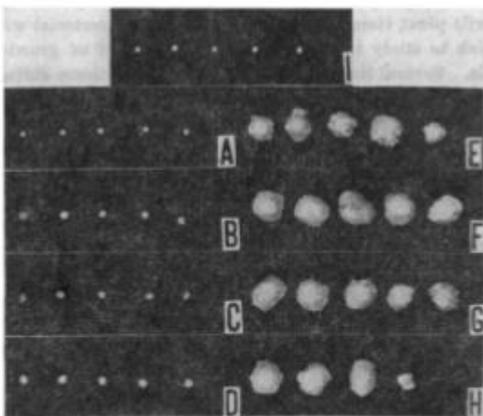


Figura 3. Efecto de la adición de agua de coco sobre la proliferación celular de explantes de zanahoria. I: Explantes de raíz cultivados durante 21 días en medio basal sin ácido indolacético (IAA) y sin agua de coco. A, B, C y D: Explantes de raíz cultivados durante 21 días en medio basal con IAA 10, 1, 0.1, y 0.01 mg/L, respectivamente. E, F, G y H: Explantes de raíz cultivados durante 21 días en medio basal con IAA 10, 1, 0.1, y 0.01 mg/L, respectivamente y agua de coco al 15%. Imagen de Caplin y Steward, 1948.

La embriogénesis de microsporas fue descrita por primera vez por Guha y Maheshwari (1964), como ya hemos mencionado en apartados anteriores. En este mismo artículo, los autores probaron el cultivo de anteras en distintos medios. En el medio basal suplementado con caseína hidrolizada, agua de coco, zumo de uva y zumo de ciruela aparentemente no se

observaron cambios hasta las 6-7 semanas tras el cultivo, cuando emergieron estructuras tipo embrión de la antera. Estas estructuras tipo embrión siguieron un desarrollo basal-apical normal, excepto por el hecho de que muchos de ellas eran policotiledóneas. Además, lo que resulta interesante de este experimento es que la mejor respuesta se produjo en las anteras cultivadas en medio con agua de coco.

En el cultivo de anteras, tanto de pimiento como de berenjena, es común que los embriones derivados de microsporas tengan un desarrollo anómalo con cotiledones atrofiados o ausentes debido a la carencia de un meristemo apical funcional. Esto dificulta la germinación de los embriones y reduce el rendimiento en la obtención de dobles haploides por esta vía (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011). Por otro lado, en el cultivo de microsporas de berenjena la alteración de la ontogenia normal ocurre antes. Conforme avanza el desarrollo de los embriones inicialmente derivados de las microsporas, estos se transforman en embriones deformes y finalmente en callos (Corral-Martínez et al., 2008). Este proceso no es tan eficiente como el derivado de la ruta embriogénica debido al bajo rendimiento de regeneración mediante organogénesis a partir de las estructuras tipo callo, por lo que resultaría muy interesante descubrir en qué condiciones sería posible inducir la embriogénesis de microsporas en berenjena. Los experimentos con sistemas modelo para el cultivo de microsporas han revelado una serie de factores involucrados directa o indirectamente en el desarrollo de embriones derivados de microsporas. Muchos de ellos tienen en común su importante papel en la embriogénesis cigótica, donde su síntesis o regulación están mediadas por el endospermo u otros tejidos de óvulos o semillas (revisado en Seguí-Simarro et al., 2011). Por lo tanto, en los sistemas embriogénicos *in vitro* desprovistos de cualquier tejido materno, estos factores, ausentes o mal regulados, pueden estar detrás de algunas de las desviaciones observadas. A pesar de todo lo expuesto anteriormente y hasta donde llega nuestro conocimiento, no se ha profundizado en el estudio de la aplicación de agua de coco en el medio de cultivo de anteras o microsporas aisladas en berenjena o pimiento, ni en su efecto en la embriogénesis derivada de microsporas en estas especies.

2. OBJETIVOS

La finalidad del presente trabajo es estudiar el efecto del agua de coco sobre la embriogénesis de microsporas en pimiento y berenjena, especies recalcitrantes a la androgénesis de gran interés agronómico. Para ello, planteamos la adición de distintas concentraciones de agua de coco al medio de cultivo estándar con hormonas tras la etapa de inducción androgénica y a un medio de cultivo sin hormonas en esta misma etapa. Los objetivos que perseguimos son los siguientes:

- Evaluar el efecto de los distintos tratamientos en el cultivo de anteras, tanto de pimiento como de berenjena, sobre el número de embriones obtenidos y la calidad de estos, es decir, sobre la formación de un meristemo apical funcional, el correcto desarrollo apical-basal hasta dar lugar a plántula y la ausencia de anomalías morfológicas.
- Estudiar cómo influyen los distintos tratamientos sobre el rendimiento androgénico en el cultivo de microsporas aisladas de berenjena, así como sobre su capacidad de aportar el ambiente necesario para promover la embriogénesis directa derivada de las microsporas. Con esto se pretende evitar el desvío hacia la formación de callos, ya que la regeneración mediante organogénesis constituye un paso limitante en esta ruta.
- Analizar la ploidía de las plantas obtenidas mediante el cultivo de anteras y microsporas aisladas para los distintos tratamientos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PLANTAS DONANTES Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las dos especies empleadas fueron *Capsicum annuum* genotipo Herminio, híbrido comercial de Syngenta, y *Solanum melongena* genotipo DH36, doble haploide de alta respuesta androgénica desarrollado en el laboratorio de Biología Celular del COMAV (Rivas-Sendra et al., 2017).

Las semillas, tanto de pimiento como de berenjena, se sembraron en semilleros y se incubaron a 22°C, con una humedad del 60% y ciclos de 16h de luz y 8h de oscuridad. Transcurridos 2 meses, las plantas se trasplantaron a tiestos de 30 cm en invernadero, los cuales llevan fibra de coco. Se empleó el sistema de fertirrigación para el aporte de agua y fertilizantes. Las condiciones de temperatura del invernadero fueron 25±3°C en verano y 20±3°C en invierno con un fotoperiodo variable dependiente de la época del año.

3.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE ANTERAS

3.2.1. MEDIO DE CULTIVO DE INDUCCIÓN (MEDIO C) Y REGENERACIÓN (MEDIO R)

Los componentes del medio de inducción (medio C) para el cultivo de anteras de pimiento que se emplearon y sus concentraciones fueron las del protocolo estándar utilizado en el laboratorio y se detallan en la siguiente tabla:

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Preparado C	4.24 g/L
Sacarosa	3 %
Bacto agar	0.8 %
Kinetina	0.01mg/L
2,4-D	0.01 mg/L
Vitamina B12	0.03 mg/L
Cefotaxima	100 mg/L

Tabla 1. Medio de inducción (medio C) para el cultivo de anteras de pimiento.

Se pesaron en la báscula las cantidades adecuadas de sacarosa, preparado C y bacto-agar. A continuación, se añadió el volumen de agua destilada necesario a la sacarosa y al preparado C, se agitaron bien y se ajustó el pH a 5.9 para que los elementos minerales se encontraran solubles y pudieran ser asimilados. Para ello, se empleó un pHmetro, el cual debe calibrarse previamente para su uso. Finalmente, se añadió el bacto-agar, se preparó para esterilizar en un autoclave Matachana Miniclave 21E y se vertió el medio en placas de 35x10 mm. Los componentes termolábiles, las hormonas y el antibiótico, previamente esterilizados mediante filtros con un poro de 0.22 µm, se añadieron en cabina de flujo laminar después de esterilizar el medio con el resto de componentes.

Es en el medio de regeneración (medio R) donde se probó el efecto del agua de coco. Para ello, se realizaron 7 tratamientos distintos: medio R con agua de coco a distintas concentraciones (CW 20, 10 y 5 %) con hormonas (+h), medio R con agua de coco a distintas concentraciones (CW 20, 10 y 5%) sin hormonas (-h) y el control, el cual consistió en el medio de regeneración empleado habitualmente en el laboratorio.

	CONTROL	CW+h	CW-h
		20%	20%
CW	-	10%	10%
		5%	5%
Preparado R	4.24 g/L	4.24 g/L	4.24 g/L
Sacarosa	3 %	3 %	3 %
Bacto agar	0.8 %	0.8 %	0.8 %
Kinetina	0.1 mg/L	0.1 mg/L	-
Cefotaxima	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L

Tabla 2. Medio de regeneración (medio R) para el cultivo de anteras de pimiento.

Se siguieron los pasos descritos anteriormente para la preparación del medio de inducción. El agua de coco empleada es de la casa comercial Sigma, preparada y esterilizada específicamente para el cultivo *in vitro* de células vegetales. Según la casa comercial, ésta se obtiene a partir de cocos seleccionados, es procesada para eliminar las proteínas y esterilizada mediante filtración. El agua de coco se añadió junto con la kinetina y la cefotaxima después de esterilizar el medio.

Los componentes y concentraciones del medio C para el cultivo de anteras de berenjena fueron las del protocolo estándar utilizado en el laboratorio y se detallan en la siguiente tabla:

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Preparado C	4.55 g/L
Sacarosa	12 %
Bacto agar	0.8 %
Kinetina	5 mg/L
2,4-D	5 mg/L
Vitamina B12	0.2 mg/L

Tabla 3. Medio de inducción (medio C) para el cultivo de anteras de berenjena.

Como en el caso del medio R para el cultivo de anteras de pimiento, se prepararon los 7 tratamientos con los componentes y concentraciones detallados en la tabla 4, de la misma forma descrita para pimiento.

	CONTROL	CW+h	CW-h
		20%	20%
CW	-	10%	10%
		5%	5%
Preparado R	4.55 g/L	4.55 g/L	4.55 g/L
Sacarosa	3 %	3 %	3 %
Bacto agar	0.8 %	0.8 %	0.8 %
Kinetina	0.1 mg/L	0.1 mg/L	-

Tabla 4. Medio de regeneración (medio R) para el cultivo de anteras de berenjena.

El medio base empleado en el medio de inducción (preparado C) y en el medio de regeneración (preparado R) fueron comunes para el cultivo de anteras de pimiento y berenjena. Estos preparados fueron desarrollados por Dumas de Vaulx et al. (1981) y su composición se detalla en la tabla 5.

	mg/L	PREPARADO C	PREPARADO R
Macroelementos	KNO ₃	2150	2150
	NH ₄ NO ₃	1238	1238
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	412	412
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	313	313
	KH ₂ PO ₄	142	142
	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	50	50
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	38	38
	(NH ₄) ₂ SO ₄	34	34
Microelementos	KCl	7	7
	MnSO ₄ ·H ₂ O	22.13	20.13
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3.625	3.225
	H ₃ BO ₃	3.15	1.55
	KI	0.695	0.33
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.188	0.138
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.016	0.011
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.016	0.011
Vitaminas y aminoácidos	Mio-inositol	50.3	50.3
	Piridoxina (HCl)	5.5	5.5
	Ácido nicotínico	0.7	0.7
	Tiamina (HCl)	0.6	0.6
	Pantotenato de calcio	0.5	0.5
	Biotina	0.005	0.005
	Glicina	0.1	0.1
Hierro quelado	Na ₂ EDTA	18.65	18.65
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9	13.9

Tabla 5. Composición del medio basal de inducción (preparado C) y del medio basal de regeneración (preparado R).

3.2.2. MEDIO DE CULTIVO DE ENRAIZADO Y MEDIO DE CRECIMIENTO PARA PLANTAS YA ENRAIZADAS

El medio de cultivo de enraizado y el medio de crecimiento para plantas ya enraizadas fue común para pimiento y berenjena. En la tabla 6 se muestra los componentes que constituyen el medio de enraizado.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Preparado MS+vitaminas	4.24 g/L
Sacarosa	3 %
Bacto agar	0.8 %
IAA	1 mg/L
GA3	1 mg/L

Tabla 6. Medio de enraizado.

El medio de crecimiento para plantas únicamente se diferenciaba del medio de enraizado en que no contenía hormonas y en que se vertió en botes de mayor tamaño que permitían el crecimiento de la planta.

El medio base empleado en el medio de enraizado y en el medio de crecimiento para plantas ya enraizadas consistió en el medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962) cuya composición se detalla en la tabla 7.

	MEDIO MS	mg/L
Macronutrientes	CaCl ₂	332.02
	KH ₂ PO ₄	170.00
	KNO ₃	1900.00
	MgSO ₄	180.54
	NH ₄ NO ₃	1650.00
Micronutrientes	CoCl ₂ ·H ₂ O	0.025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
	FeNaEDTA	36.70
	H ₃ BO ₃	6.20
	KI	0.83
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	
Vitaminas	Mio-inositol	50.3
	Piridoxina (HCl)	5.5
	Ácido nicotínico	0.7
	Tiamina (HCl)	0.6
	Pantotenato de calcio	0.5
	Biotina	0.005
	Glicina	0.1

Tabla 7. Composición del medio basal MS.

3.3. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS

En el presente trabajo, se empleó una versión modificada del protocolo estándar (Miyoshi, 1996; Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014). Los componentes y las concentraciones del medio de recultivo se detallan en la siguiente tabla:

	CONTROL	CW+h	CW-h
		20%	20%
CW	-	10%	10%
		5%	5%
Vitaminas NLN	2.078 g/L	2.078 g/L	2.078 g/L
Sales NLN	0.772 g/L	0.772 g/L	0.772 g/L
Sacarosa	4 %	4 %	4%
NAA	0.02 mg/L	0.02 mg/L	-
BA	0.02 mg/L	0.02 mg/L	-

Tabla 8. Medio de recultivo de microsporas aisladas de berenjena.

Se pesaron en la báscula las cantidades adecuadas de sacarosa, sales y vitaminas NLN. A continuación, se añadió el volumen de agua destilada necesaria para cada concentración de agua de coco, se agitaron bien y se ajustó el pH a 5.9 con ayuda del pHmetro.

En cabina de flujo laminar, se esterilizó el medio de cultivo por filtración con poro de 0.22 µm (Figura 4A) y se añadió el agua de coco para obtener los tratamientos a 5, 10 y 20%, con hormonas y sin hormonas (Figura 4B). A los tratamientos con hormonas se les añadió NAA y BA a 0.02 mg/L.

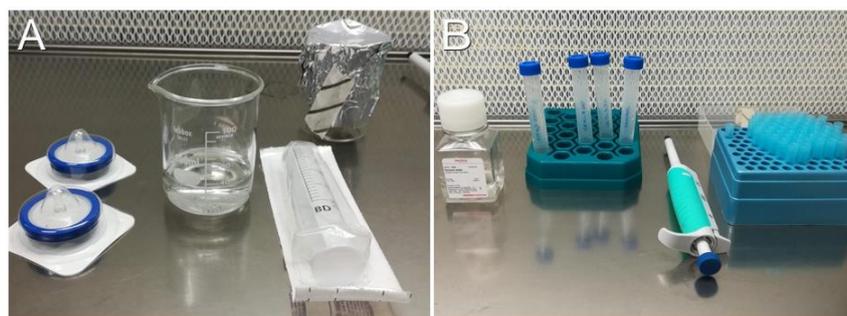


Figura 4. Preparación del medio de cultivo para microsporas de berenjena. A: Esterilización del medio empleando un filtro de 0.22 μm y una jeringa para hacer pasar la solución a través del filtro. **B:** Adición del volumen requerido de agua de coco para obtener los tratamientos al 5, 10 y 20% con y sin hormonas.

En la siguiente tabla se detalla la composición del medio basal NLN:

	MEDIO NLN	mg/L
Macroelementos	KH_2PO_4	125.00
	KNO_3	125.00
	MgSO_4	61.00
Microelementos	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	FeNaEDTA	36.70
	H_3BO_3	10.00
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	18.95
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.00
Vitaminas	D(+)-Biotina	0.05
	Ácido fólico	0.50
	L-Glutamina	800.00
	Glutati3n (reducido)	30.00
	Glicina	2.00
	Myo-Inositol	100.00
	Ácido nicotínico	5.00
	Piridoxina HCl	0.50
	L-Serina	100.00
Tiamina HCl	0.50	

Tabla 9. Composición del medio basal NLN.

3.4. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO

3.4.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE PIMIENTO EN EL ESTADIO ADECUADO

En primer lugar, es necesario obtener las yemas en el estadio adecuado para poder llevar a cabo el cultivo de anteras. Las yemas de pimiento que contienen el mayor porcentaje de microsporas en el estadio adecuado para inducir la embriogénesis, microspora vacuolada y polen bicelular joven, son aquellas en las que la longitud de sépalos no supera el 80% de la longitud total de la yema (Parra-Vega et al., 2012). En la figura 5B, señalada con una flecha se muestra el tamaño de yema que se recolectó.

En cada una de las réplicas experimentales, se realizaron 7 tratamientos diferentes, y por cada tratamiento 3 réplicas. En cada placa de medio de cultivo se colocaron 2 yemas, por lo tanto, se necesitaban exactamente 42 yemas, pero durante el cultivo en ocasiones se descartan algunas yemas por distintas razones y por esto se recolectaron 50-60 yemas.

Las yemas recolectadas se colocaron en un tubo Falcon de 50 mL (Figura 5C). Después de recoger la cantidad necesaria, se introdujeron en una nevera portátil con hielo para mantenerlas en frío en su transporte desde el invernadero al laboratorio donde se colocaron en un recipiente con hielo.



Figura 5. Recolección de las yemas de pimiento en el estadio adecuado. A: Plantas donantes de pimiento, genotipo Herminio. **B:** Yema que contiene microsporas en el estadio adecuado para la inducción de la androgénesis (flecha). Los sépalos representan el aproximadamente el 80% de la longitud total de la yema. **C:** Yemas recolectadas en tubo Falcon de 50 mL.

3.4.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS YEMAS DE PIMIENTO

Todas las soluciones empleadas en la desinfección superficial de las yemas se encontraban a temperatura de refrigeración para que el choque térmico posterior fuera eficaz y para evitar la degradación del material. En cabina de flujo laminar, las yemas que se encontraban en hielo se desinfectaron. Para ello, se llenó el tubo Falcon con etanol al 70% durante 30 segundos y, transcurrido este tiempo, se reemplazó por hipoclorito sódico a 4 g/L con unas gotas de Tween-20 durante 5 minutos. Finalmente, se llevaron a cabo 3 lavados de 4 minutos cada uno con agua esterilizada. Las yemas se depositaron en papel estéril para eliminar el exceso de agua que pudiera quedar.

3.4.3. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO

Para el cultivo de anteras de pimiento se empleó el protocolo descrito por Dumas de Vaulx et al. (1981). Tras depositar las yemas sobre el papel de filtro estéril se procedió a extraer las anteras que se encontraban en el interior de las yemas, rodeadas por dos capas concéntricas: los pétalos y los sépalos. Con ayuda de un bisturí esterilizado se realizó un corte en la parte

basal de la yema y, posteriormente, uno longitudinal y superficial para cortar el cáliz y la corola. A continuación, se extrajeron las anteras con ayuda de 2 pinzas esterilizadas. Se eliminó la mayor cantidad de filamento posible sin dañarlas y se depositaron sobre la placa con medio C cuya composición se muestra en la tabla 1 del apartado 3.2.1. Aquellas anteras que presentaban pigmentación antocianina se descartaron, pues estaban en un estadio de desarrollo más avanzado no adecuado para la inducción de la androgénesis. Se depositaron 2 yemas por placa de forma que la cara cóncava de las anteras quedaba en contacto con el medio de cultivo y se repitió el proceso hasta obtener un total de 21 placas necesarias para cubrir los diferentes tratamientos y sus respectivas réplicas. Por último, se envolvieron con papel de aluminio y se introdujeron en una estufa a 35°C, aportando las condiciones de oscuridad y de temperatura necesarias para la inducción.

Transcurridos 8 días, las anteras se extrajeron de la estufa, se retiró el papel de aluminio y se incubaron en cámara de cultivo *in vitro* o fitotrón a 25°C con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad durante 4 días. Tras estos 4 días, transcurridos 12 días tras el cultivo, las anteras se transfirieron a los diferentes tratamientos de medio R cuya composición detallada se encuentra en la tabla 2 del apartado 3.2.1. en condiciones de esterilidad y se incubaron en las mismas condiciones (25°C 12/12 horas de luz/oscuridad). Aproximadamente a día 60, 45 días tras el paso a medio R, las anteras se pasaron a medio R fresco, pues los componentes que forman el medio se agotan con el tiempo y es necesario traspasar las anteras a medio recién preparado.

Durante este tiempo los embriones en estadios ya avanzados o plántulas que aparecieron en las anteras se pasaron a medio MS+h donde los embriones siguieron un desarrollo bipolar dando lugar a plántulas, o donde las plántulas ya formadas continuaron su desarrollo y crecimiento. Los embriones empezaron a aparecer aproximadamente un mes y medio tras el cultivo. Aquellas plántulas que presentaban un patrón de desarrollo normal se transfirieron a bote con medio MS-h para su desarrollo y crecimiento.

3.5. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA

3.5.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE BERENJENA EN EL ESTADIO ADECUADO

Se procedió de igual forma que para la recolección de yemas de pimiento, pero en el caso de las yemas de berenjena, fue necesario recurrir al criterio de longitud de la antera. Esto es debido a la heterogeneidad en la longitud de sépalos y la falta de correlación con el desarrollo floral. Para el cultivo de microsporas de DH36, el intervalo en el cual las microsporas se encuentran en el estadio de microspora vacuolada y polen bicelular joven es 5.2-5.9 mm. Sin embargo, en el cultivo de anteras se ha demostrado que la berenjena tiene una pared más gruesa que otras especies y, por lo tanto, cuando las hormonas presentes en el medio alcanzan el lóculo, las microsporas han avanzado en el proceso de desarrollo del polen y ya no se encuentran en el estadio adecuado para la inducción (Salas et al., 2012). Es por esto por lo que se aplicó un intervalo de longitud de 4.5-5.9 mm, permitiendo la selección de anteras de menor tamaño con microsporas en estadios más tempranos. Como primera aproximación, se recolectaron yemas totalmente cerradas con los pétalos cubiertos por los sépalos (Figura 6B), ya que estas contienen microsporas uninucleares tardías (vacuoladas) y polen bicelular joven.



Figura 6. Recolección de las yemas de berenjena en el estadio adecuado. A: Plantas donantes de berenjena, genotipo DH36. **B:** Tamaño de antera que se debe recolectar como primera aproximación.

3.5.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS YEMAS DE BERENJENA

La desinfección de las yemas de berenjena se llevó a cabo del mismo modo que la desinfección de las yemas de pimiento. En cabina de flujo laminar, se añadieron cada una de las soluciones de desinfección: etanol 70%, hipoclorito sódico 4g/L y agua. El etanol se dejó actuar durante 30 segundos, el hipoclorito sódico 5 minutos y el agua 4 minutos. Se llevaron a cabo 3 lavados con agua en total durante el tiempo especificado cada uno. Finalmente, tras retirar las distintas soluciones de desinfección, las yemas se depositaron sobre papel de filtro estéril para eliminar el resto de agua.

3.5.3. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA

Para el cultivo de anteras de berenjena se siguió el protocolo descrito por Dumas de Vaulx y Chambonnet (1982). En primer lugar, se procedió a extraer las anteras que se encontraban en el interior de las yemas. Para ello, se realizó un corte en la parte basal de la yema con ayuda de un bisturí (Figura 7A). Seguidamente, se hizo un corte superficial longitudinal para poder retirar el cáliz y la corola (Figura 7B). Entonces, fue posible extraer las anteras con ayuda de 2 pinzas esterilizadas (Figura 7C) y eliminar con cuidado la mayor cantidad de filamento posible. En este caso, a diferencia del cultivo de anteras en pimiento, una vez abierta cada una de las yemas, se retiró una de las anteras y se midió con un papel milimetrado para comprobar si estaba dentro del intervalo de longitud que contiene las microsporas en el estadio adecuado para la inducción de la androgénesis: 4.5-5.9 mm (Figura 7D). A partir de este momento, la forma de proceder fue la misma que la descrita para el cultivo de anteras de pimiento. La composición del medio C empleado fue la que se muestra en la tabla 3 del apartado 3.2.1. y la composición del medio R en la tabla 4 del mismo apartado.

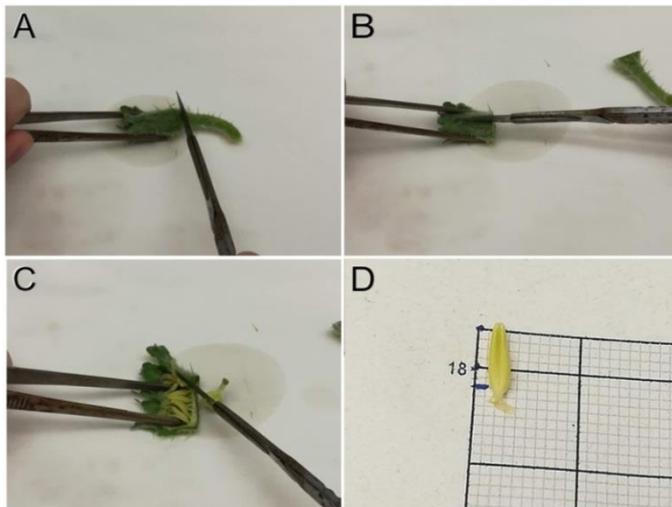


Figura 7. Procedimiento de extracción de las anteras de berenjena. A: Corte transversal en la parte basal de la yema. **B:** Corte longitudinal superficial para atravesar las dos capas concéntricas constituidas por los pétalos y sépalos. **C:** Extracción de las anteras con ayuda de las pinzas. **D:** Medida de la longitud de la antera.

3.6. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA

3.6.1. RECOLECCIÓN DE YEMAS DE BERENJENA EN EL ESTADIO ADECUADO

Se recolectaron aquellas yemas en las que la corola era más corta que el cáliz como primera aproximación. Sin embargo, al igual que para el cultivo de anteras, fue necesario recurrir al parámetro de longitud de antera para seleccionar aquellas que midieran 5.2-5.9 mm, pues son las que contienen microsporas vacuoladas más susceptibles de inducción. En el cultivo de microsporas aisladas no fue necesario aumentar el rango de longitud, pues en este caso los componentes del medio no han de difundir a través del tejido de la antera. Las anteras seleccionadas se depositaron en un filtro de té para proceder a su desinfección.

3.6.2. DESINFECCIÓN SUPERFICIAL DE LAS ANTERAS DE BERENJENA

La desinfección de las anteras de berenjena previamente extraídas y seleccionadas por su longitud se realizó en cabina de flujo laminar. En primer lugar, las anteras contenidas en filtros de té se sumergieron en una solución de etanol al 70% durante 30 segundos. A continuación, se transfirieron a una solución 4g/L de hipoclorito sódico con 2 gotas de Tween-20. Transcurridos 5 minutos, se introdujeron sucesivamente en 3 recipientes conteniendo agua esterilizada durante 2 minutos cada uno.

3.6.3. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA

El protocolo de obtención de dobles haploides a partir del cultivo de microsporas en berenjena empleado en este trabajo fue descrito por primera vez por Miyoshi (1996) y posteriormente optimizado por el grupo de Biología Celular del COMAV (Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2012; Corral-Martínez y Seguí-Simarro, 2014; Rivas-Sendra et al., 2015).

En primer lugar, se introdujo un embolo de jeringa, el cual previamente se encontraba almacenado en una solución de etanol al 70%, en agua estéril para eliminar los restos de esta

solución. Este émbolo se depositó sobre papel de filtro estéril, así como el filtro de té conteniendo las anteras. Las anteras se pasaron a un vaso de precipitados y se añadió agua destilada estéril. A continuación, se procedió a extraer las microsporas presionando con el émbolo las anteras hasta obtener una suspensión. Esta se pasó por un filtro de 41 μm recolectando todo el volumen en tubos de 15 mL. Las microsporas pasan a través del filtro quedándose retenidos los restos de antera de mayor tamaño que el diámetro del poro. Se centrifugó la suspensión a 800 rpm durante 4 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió con 10 mL de agua destilada en un único tubo y se pasó la suspensión por un filtro de 11 μm . En este caso, las microsporas son más grandes que el poro y quedan retenidas. Se repitió este paso de centrifugación y lavado sin filtrar 2 veces más. Durante este proceso es importante mantener en hielo las anteras y la suspensión de microsporas una vez extraídas.

Seguidamente, se determinó la concentración de microsporas mediante una cámara Neubauer tras resuspender el precipitado de la última centrifugación en 3 o 5 mL, en función del tamaño del precipitado. El volumen que cabe en cada cámara es 0.0001, la concentración final de microsporas a la que se pretendía llegar era de 200,000 microsporas/mL, el volumen inicial era de 3 o 5 mL y se realizó el conteo dos veces para obtener la media. De forma que el volumen final se calculó con la siguiente fórmula:

$$V_{final} = \frac{\text{media número de microsporas} \cdot V_{inicial}}{200,000 \cdot 0.0001}$$

Se añadió el volumen de agua destilada calculado para alcanzar la densidad deseada y se repartió en placas de 1 mL. Las placas se depositaron en la estufa a 35°C envueltas en albal.

Finalmente, 1 mL adicional se empleó para ver la viabilidad de las microsporas mediante tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) a razón de 4 $\mu\text{L/mL}$. El FDA es un sustrato que penetra en las células y es hidrolizado en un producto fluorescente por las esterasas de las células vivas, midiendo tanto la actividad enzimática como la integridad de la membrana celular, la cual se requiere para retener este producto fluorescente. Para que el porcentaje de viabilidad fuera representativo se contó como mínimo 3 campos y 150 microsporas.

Transcurridos 3 días del cultivo, se volvió a medir la viabilidad y se procedió a realizar el cambio a medio de recultivo cuya composición se especifica en la tabla 8 del apartado 3.3. Se repartieron las placas de 1 mL entre los 7 tratamientos: agua de coco al 5, 10 y 20% con hormonas, agua de coco al 5, 10, 20% sin hormonas y el control, que consiste en el medio de cultivo estándar empleado en el laboratorio, de forma que de cada tratamiento hubiera como mínimo 3 réplicas. Las placas se almacenaron a 25°C en oscuridad.

3.7. ANÁLISIS DE PLOIDÍA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el análisis de ploidía de las plantas obtenidas se utilizaron hojas jóvenes y sanas procedentes de las plantas donantes a partir de las cuales se obtuvieron las anteras y se utilizaron como estándares de contenido de DNA 2C. A continuación, las hojas se machacaron con una cuchilla, se procesaron con el tampón de lisis para la extracción y se llevó a cabo la tinción nuclear fluorescente con CyStain UV Ploidy Staining Solution (Sysmex) basada en DAPI. La extracción nuclear se filtró a través de filtros 30 μm CellTricks y se analizó mediante el citómetro de flujo Partec PA-I.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CULTIVO DE ANTERAS DE PIMIENTO

4.1.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO

Las tres réplicas de pimiento se llevaron a cabo a lo largo del mes de julio (días 10, 18 y 24). De las tres réplicas realizadas sólo se obtuvo respuesta en el cultivo del 24 de julio de 2019. Dado que la respuesta androgénica fue muy baja, se probó a aumentar el número de réplicas hasta 6. En estos nuevos cultivos no se observaron embriones a pesar de proceder de una segunda ronda de plantas donantes jóvenes, cuya disposición a la inducción androgénica es mayor (Kristiansen y Andersen, 1993). Aunque según un estudio (Ercan et al., 2006), las yemas tomadas de plantas viejas, si se recolectan aquellas que contienen microsporas en la etapa óptima de desarrollo susceptible de inducción, tienden a dar el mismo rendimiento embriogénico que las jóvenes. Los autores de este estudio concluyeron que es importante tener en cuenta que la recolección de yemas en el estadio adecuado guiada por el tamaño de yema puede inducir a error, pues el tamaño de yema que contiene microsporas en el estadio susceptible de inducción depende de la edad, del genotipo y de la posición en la planta. Como podemos observar en la tabla 10, los tratamientos en los cuales se obtuvieron embriones presentaban una concentración de agua de coco del 5 y del 10%, ambos con hormonas. El tratamiento con agua de coco al 5% dio lugar a 8 embriones, todos ellos obtenidos de la misma antera. Esto se traduce en un rendimiento de 5 embriones por cada 100 anteras. Por otro lado, para el tratamiento con agua de coco al 10% se obtuvo 1 embrión (0.61 embriones/100 anteras). Esto se calculó considerando las 6 réplicas y descartando el conteo de aquellas anteras que se dañaron o contaminaron antes de responder.

Tratamiento	Nº anteras cultivadas	Nº anteras androgénicas	Rendimiento androgénico (embriones/100 anteras)
CW+h 20%	162	0	0
CW+h 10%	164	1	0.61
CW+h 5%	160	1	5
CW-h 20%	161	0	0
CW-h 10%	153	0	0
CW-h 5%	141	0	0
Control	151	0	0

Tabla 10. Número de anteras cultivadas, número de anteras que respondieron y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de anteras de pimiento. El rendimiento androgénico se expresa en número de embriones obtenidos por cada 100 anteras.

Para poder llegar a una conclusión sobre cuál fue la causa de esta baja respuesta, es conveniente que consideremos los resultados obtenidos en estudios previos, también basados en el protocolo descrito por Dumas de Vault et al. (1981), en los cuales se registraron rendimientos embriogénicos de en torno a 20 embriones/100 anteras para el genotipo Herminio (Parra-Vega et al., 2013). Así pues, si comparamos con la nula respuesta embriogénica obtenida en los controles, se infiere que esta no pudo ser debida a un protocolo no eficiente, sino a unas condiciones de cultivo de las plantas donantes no óptimas o a la presencia de antibiótico en el medio de cultivo, única diferencia en composición con respecto al estudio de Parra-Vega et al. (2013).

Influencia del uso de antibióticos sobre el rendimiento en la embriogénesis de microsporas

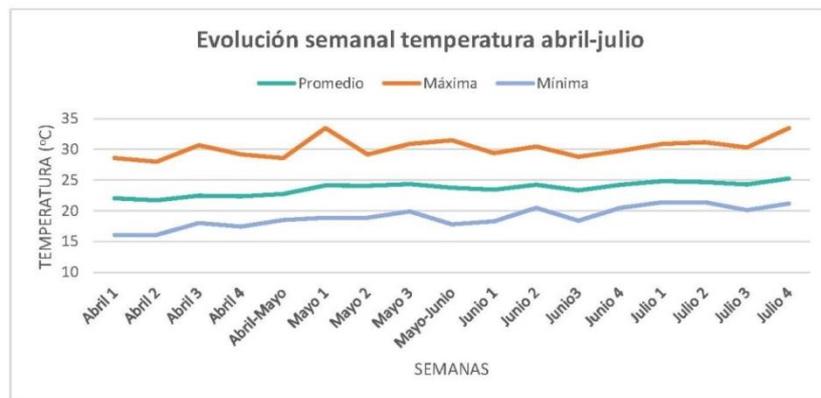
Una característica propia de pimiento es que a medida que la planta avanza en edad acumula bacterias en los espacios intercelulares de sus tejidos. Por lo tanto, cuando las bacterias endógenas encuentran las condiciones adecuadas en el medio de cultivo empiezan a proliferar. La elevada tasa de contaminación endógena de pimiento hizo que fuera necesario suplementar el medio con una concentración de 100 mg/L de cefotaxima, tanto el medio C como el medio R. La cefotaxima es un antibiótico bacteriostático del tipo cefalosporinas de amplio espectro que ha permitido reducir en gran medida la tasa de contaminación debida a este problema intrínseco de pimiento. Sin embargo, a veces el antibiótico no cubre todo el espectro de bacterias endógenas y se produce contaminación, como pasó en uno de los cultivos. Por otro lado, se sabe que, en el cultivo de microsporas de colza, el empleo de cefotaxima puede inhibir la embriogénesis de microsporas, siendo esta inhibición mayor cuando aumenta la concentración y la exposición (Ahmadi et al., 2014). Además, la presencia de este antibiótico aumenta el porcentaje de embriones derivados de microsporas anormales, muchos de ellos incapaces de regenerar dando lugar a la formación de callos y también influye sobre su desarrollo normal para dar lugar a plántula (Ahmadi et al., 2014). Por lo tanto, sería interesante buscar otro tipo de tratamiento para reducir la contaminación endógena propia de pimiento que no afecte al rendimiento en la obtención de embriones a partir de microsporas y a su correcto desarrollo para dar lugar a plántula.

Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas donantes sobre el rendimiento en la embriogénesis de microsporas

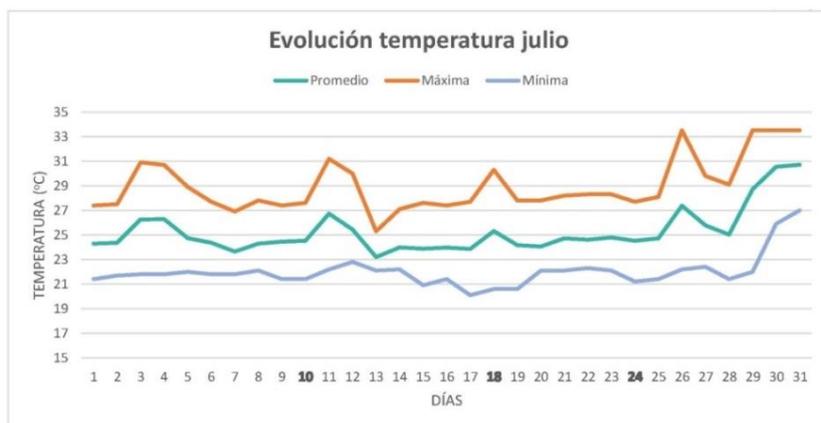
Para saber en qué condiciones se encontraban las plantas donantes en el invernadero se recurrió al registro de temperaturas del módulo en el que se cultivaron las plantas en el año 2019. En este registro se almacenó cada 10 minutos la temperatura, de forma que disponíamos de la evolución de la temperatura a lo largo del día para los distintos días de cada mes. En la gráfica 1 se representan las temperaturas semanales registradas desde el mes de abril, cuando se trasplantaron en etapa aún juvenil, hasta el mes de julio, cuando se llevó a cabo la recolección de las yemas para el cultivo de anteras. Se observa como la temperatura promedio semanal aumenta progresivamente en este periodo de tiempo, así como la temperatura máxima y mínima semanal, como cabe esperar. Sin embargo, es necesario resaltar las temperaturas máximas semanales. En la tercera semana del mes de abril ya se alcanzan temperaturas superiores a 30°C, temperatura muy superior a la temperatura a la que se encontraba el invernadero teóricamente: 25±3°C en verano. El invernadero posee sistemas que permiten mantener la temperatura dentro estos rangos: malla de sombreo, aireación a través de apertura de ventanas y sistema de cooling. Sin embargo, las temperaturas registradas nos llevan a pesar de que no se hizo un control adecuado de la temperatura debido a la avería de algunos de estos sistemas.

En un experimento realizado por Kristiansen y Andersen (1993), se probó la influencia de la temperatura, el fotoperiodo y la edad sobre el potencial androgénico en pimiento y se concluyó que los factores que influían sobre el rendimiento embriogénico eran la temperatura a la que crecían las plantas donantes y la edad, mientras que el fotoperiodo no tuvo efecto. Según este estudio, la temperatura óptima que favorece la aparición de embriones a partir del cultivo de anteras es de entorno a los 26°C. Como se observa en la gráfica 2, los días 3, 4, 11,

12, 18, 26, 29, 30 y 31 de julio se registraron máximos de temperatura por encima de los 30°C. Además, estos periodos en los que fallaron los sistemas de control de temperatura del invernadero estaban repartidos bastante equitativamente a lo largo del mes, lo que hizo que fuera muy poco probable que una nueva yema, desde que apareció hasta que fue recolectada, no se viera sometida a estas altas temperaturas. En el caso del cultivo del 24 de julio, el hecho de haber obtenido respuesta puede explicarse si tenemos en cuenta que se obtuvieron embriones únicamente a partir de dos anteras, obteniendo 8 embriones a partir de una de ellas. De forma que se pudieron haber combinado dos factores favorables, la posición de las anteras en la planta, así como la posición de la planta en el invernadero, y el no haberse visto sometidas a temperaturas extremadamente elevadas desde que aparecieron hasta que fueron recolectadas.



Gráfica 1. Evolución de la temperatura promedio, máxima y mínima semanal desde abril hasta julio.



Gráfica 2. Evolución de la temperatura promedio, máxima y mínima diaria durante el mes de julio. Los días en los que se recolectaron yemas para llevar a cabo los cultivos se muestran resaltados en negrita.

Los cultivos posteriores se realizaron a partir de nuevas plantas donantes. Estas plantas se llevaron a otro módulo de los invernaderos el 23 de septiembre, casi 3 meses después de la siembra. Se tardó 1 mes más hasta que las plantas desarrollaron suficientes yemas y pudimos llevar a cabo los cultivos. De estos tres nuevos cultivos, solamente disponíamos de datos de temperatura del que se llevó a cabo el 31 de octubre, pues el segundo cultivo se descartó por contaminación endógena de las anteras y el último se hizo el 9 de enero de 2020, nuevo año del cual no había registro de temperaturas.

4.1.2. CALIDAD DE LOS EMBRIONES Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO A PLANTA

De los 8 embriones obtenidos para el tratamiento con agua de coco al 5% y hormonas, 3 embriones se necrosaron y murieron tras pasarlos a medio MS+h, mientras que 5 de ellos se pasaron a medio MS+h siendo ya plántulas. Entre estas, la plántula derivada del embrión G3.1 presentaba un meristemo apical anómalo y nunca llegó a desarrollar cotiledones (Figura 8A). En cambio, la plántula G3.3 que parecía tener un desarrollo normal (Figura 8B), al pasarla a bote con medio MS-h murió. Otras 2 de ellas presentaban un desarrollo apical anormal con callosidades en cada yema axilar y nudo, así como en el meristemo apical y caulinar (Figura 8C). Sólo llegó a planta sana el embrión G3.8. Como se observa en la figura 9A, la planta presentaba un desarrollo apical-basal normal, incluso aparecieron yemas florales *in vitro*. Esta presentaba un número de hojas suficiente que permitió retirar una para el análisis posterior de ploidía. En cuanto al tratamiento con agua de coco al 10% obtuvimos un único embrión, el cual avanzó hasta plántula, como podemos observar en la figura 8D, y se transfirió a bote MS-h donde dio lugar a una planta con desarrollo completamente normal (Figura 9B).



Figura 8. Embriones/plántulas de pimiento obtenidas a partir del tratamiento con hormonas y agua de coco al 5% (A, B, C) y al 10% (D). A: Plántula G3.1 con desarrollo del meristemo apical anormal a día 5, 14 y 40 tras la aparición de los embriones. B: Plántula G3.3 con desarrollo normal a día 5, 14 y 40 tras la aparición de los embriones. C: Plántula G3.5 con desarrollo apical y basal anormal a día 5, 14 y 40 tras la aparición de los embriones. D: Plántula F3.1 con desarrollo apical-basal correcto a día 5, 11 y 14.

Como no se obtuvo respuesta en los controles, no podemos comparar la calidad de los embriones y su desarrollo hasta plántula para determinar el efecto del agua de coco sobre este aspecto. Aun así, en el tratamiento CW+h 5% el número de embriones que abortaron es del 37'5%. Entre aquellos que avanzaron hasta plántula, el 80% presentaban anomalías en el desarrollo apical. Estos embriones derivados de las microsporas presentaban cotiledones

atrofiados o incluso ausentes, de forma que se vio dificultada su expansión lateral. Entre las anomalías más frecuentes tenemos la carencia de un meristemo apical funcional, lo cual dificulta la germinación de embriones derivados de microsporas (revisado en Seguí-Simarro *et al.*, 2011). Por lo tanto, es importante el estudio de los factores que influyen en la embriogénesis cigótica, en la cual éstos son sintetizados o regulados por el endospermo o los tejidos del óvulo o de la semilla, para aplicar estos conocimientos en la mejora del desarrollo de los embriones derivados de microsporas *in vitro*. El hecho de que el agua de coco sea el endospermo líquido de *Cocos nucifera* nos hace pensar que podría aportar alguno de estos factores que apoyan el correcto desarrollo embrionario, pues es su función natural. Sin embargo, debido a las condiciones en las que se encontraban las plantas donantes o el empleo de antibióticos en el medio, como hemos comentado anteriormente, el efecto del agua de coco queda enmascarado y, por lo tanto, sería conveniente abordar en primer término la optimización de las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, así como tratar de evitar la contaminación endógena mediante una alternativa que no inhiba la embriogénesis.



Figura 9. Plantas aclimatadas de pimiento aproximadamente 3 meses tras la aparición de los embriones. A: Planta PG3.8 procedente del tratamiento con agua de coco al 5% con hormonas. Esta presenta un desarrollo apical-basal normal e incluso ha desarrollado yemas florales (flecha). **B:** Planta PF3.1 procedente del tratamiento con agua de coco al 10% con hormonas.

4.1.3. ANÁLISIS DE PLOIDÍA DE LAS PLANTAS OBTENIDAS

Para llevar a cabo el análisis de ploidía de las dos plantas obtenidas con el tratamiento con agua de coco al 5 y 10% y hormonas, se utilizó un citómetro de flujo modelo Partec Ploidy Analyzer I. En este tipo de análisis, el eje x hace referencia al contenido en DNA y el eje y al número de núcleos detectados. La posición de los picos de los histogramas generados es relativa, por lo tanto, ésta debe ser ajustada previamente basándose en una muestra control de referencia de ploidía conocida. Como referencia de contenido de DNA 2C se tomó una hoja de las plantas donantes diploides y se ajustó el histograma de forma que el valor 100 del eje de abscisas ($x=100$) se correspondiera con el contenido 2C para facilitar la interpretación de los resultados. En cada histograma tenemos un pico con distribución normal identificado con un rectángulo que se corresponde con las células del material vegetal en fase G0/G1 que será: diploide en el control ($x=100$), haploide en la muestra si el pico se encuentra en una posición desplazada a la izquierda en $x=50$ con respecto al control, diploide si se encuentra en la misma posición que el control ($x=100$), triploide si el pico se encuentra desplazado hacia la derecha en $x=150$ con respecto al control y así sucesivamente y, por otro lado, un pico de menor altura que se corresponde con unas pocas células que están en fase G2 del ciclo celular con el doble de DNA.

Como podemos observar en la figura 10, ambas plantas presentaban un contenido en DNA 2C al igual que la planta donante.

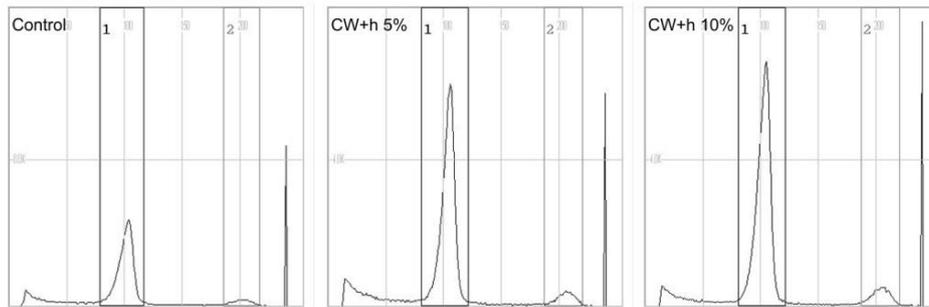


Figura 10. Análisis de ploidía mediante citometría de flujo de las plantas de pimiento obtenidas a partir del cultivo de anteras. En cada histograma el pico marcado con un rectángulo se corresponde con las células del material vegetal que se encuentran en fase G0/G1. El histograma control pertenece al material vegetal procedente de las plantas donantes $2n$, el cual se emplea como referencia para conocer la ploidía de las plantas regenerantes. Las plantas obtenidas a partir del tratamiento con agua de coco al 5% y hormonas (CW+h5%) y con agua de coco al 10% y hormonas (CW+h10%) presentan un contenido en DNA igual al control, por lo tanto, son diploides.

Embriogénesis directa y origen gametofítico

Como se observa en la figura 11, la embriogénesis mediante el protocolo descrito por Dumas de Vault et al. (1981) fue directa. Según un estudio realizado por Parra-Vega et al. (2013), la formación de embriones es más frecuente que la formación de callo en el genotipo Herminio. Se demostró mediante análisis de ploidía y mediante marcadores moleculares que todas las plántulas obtenidas a partir de callo por organogénesis derivaban del tejido de la antera. Es decir, no se daba la posibilidad de producción de embriones vía callogénesis a partir de la microspora. Por el contrario, los embriones obtenidos vía directa eran haploides, y aquellos diploides resultaron ser dobles haploides tras el análisis de marcadores moleculares (Parra-Vega et al., 2013). Por lo tanto, el haber utilizado un protocolo que induce la embriogénesis directa sin formación de callo da cierta seguridad a la hora de concluir que los regenerantes obtenidos con un contenido de DNA 2C eran dobles haploides, es decir, 100% homocigotos.

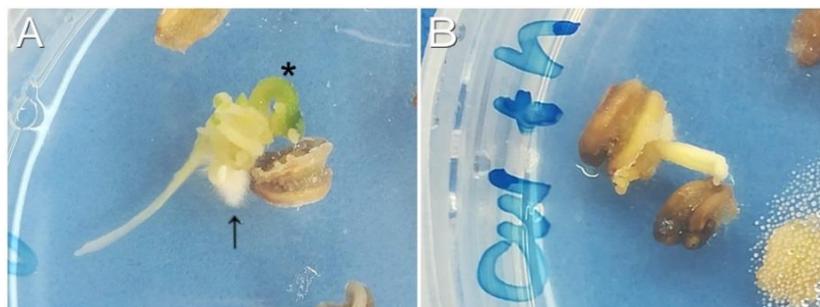


Figura 11. Embriones en antera obtenidos a partir del cultivo de anteras de pimiento. **A:** Masa de embriones obtenida a partir de una única antera en el tratamiento con agua de coco al 5% con hormonas. Uno de ellos se encuentra en un estadio más avanzado del desarrollo embriogénico (señalado con un asterisco). Se aprecian los pelos radiculares que se observan frecuentemente antes de la aparición del embrión (flecha). **B:** Embrión obtenido a partir del tratamiento con agua de coco al 10% con hormonas. El lateral de la antera se rompió por la presión ejercida por el embrión en crecimiento.

4.2. CULTIVO DE ANTERAS DE BERENJENA

4.2.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO

Las tres réplicas de cultivo de anteras de berenjena se llevaron a cabo a lo largo del mes de febrero (días 5, 12 y 26). Como podemos observar en la tabla 11, el mayor rendimiento se obtuvo en las anteras cultivadas en medio con agua de coco al 5% y hormonas, siendo este 3.64 embriones/100 anteras cultivadas, seguido del rendimiento obtenido en el medio con agua de coco al 10% y en el medio con agua de coco al 20%, ambos con hormonas. El medio con agua de coco a una concentración del 10% sin hormonas ofreció un rendimiento de 1.91 embriones/100 anteras. Es decir, en un medio sin hormonas, el agua de coco tuvo la capacidad de inducir la formación de embriones a partir de las microsporas inducidas. Por su parte, en los controles no se obtuvo respuesta a pesar de utilizar el protocolo estándar, con el cual se han obtenido rendimientos de 237.5 embriones/ 100 anteras en el genotipo DH36 (Rivas-Sendra et al., 2017). Es importante tener en cuenta que debido a la declaración del Estado de Alarma del 14 de marzo del 2020 no se pudo refrescar el medio a los 45 días tras el paso de las anteras a medio R. Esto pudo influenciar notablemente en el rendimiento obtenido, pues en berenjena la experiencia apunta a que la mayor aparición de embriones se da tras refrescar el medio R. Sin embargo, aun teniendo en cuenta la imposibilidad de refrescar el medio, la eficiencia sigue siendo baja si se compara con las respuestas obtenidas en otros genotipos comerciales híbridos como es el caso de Ecavi con un rendimiento de 61 embriones/100 anteras (Salas et al. 2011), Cristal con 53 embriones/100 anteras (Salas et al. 2012) o Bandera con 146 embriones/100 anteras, genotipo a partir del cual se desarrolló esta línea doble haploide de alta respuesta. Con todo esto, la nula respuesta obtenida en los controles fue indicador de que las condiciones en las que se realizaron los cultivos fueron inadecuadas y, por lo tanto, las eficiencias obtenidas en los otros medios pueden estar sesgadas por estas condiciones no óptimas.

Tratamiento	Nº anteras cultivadas	Nº anteras androgénicas	Rendimiento androgénico (embriones/100 anteras)
CW+h 20%	107	1	0.935
CW+h 10%	117	2	1.709
CW+h 5%	110	3	3.636
CW-h 20%	97	0	0
CW-h 10%	105	2	1.905
CW-h 5%	106	0	0
Control	112	0	0

Tabla 11. Número de anteras cultivadas, número de anteras que respondieron y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de anteras de berenjena. El rendimiento androgénico se expresa en número de embriones obtenidos por cada 100 anteras.

Influencia de las condiciones de cultivo de las plantas donantes sobre el rendimiento en la embriogénesis de microsporas

En este caso, el protocolo empleado no difiere en composición ni concentración con respecto al empleado en el trabajo realizado por Rivas-Sendra et al. (2017). Por lo tanto, se refuerza nuestra hipótesis sobre las condiciones no ideales en las que se encuentran las plantas donantes. No se disponía de los datos de temperatura del invernadero del periodo en el que se traspasaron las plantas de berenjena donantes y se hicieron los cultivos. A pesar de ello, los registros de temperatura en los meses en los que crecieron las plantas de pimiento

constituyen una evidencia de que los sistemas de regulación de la temperatura del invernadero fallaban (apartado 4.1.1.). Esto pudo producir fluctuaciones de la temperatura, la cual se desvió de los límites entre los cuales se mantiene teóricamente: $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ en invierno. En berenjena no hay estudios en los que se evalúe el efecto de la temperatura a la que se encuentran las plantas donantes sobre la respuesta embriogénica y, por lo tanto, no se conoce la temperatura óptima de cultivo. No obstante, existen estudios en otras especies (Lo y Pauls, 1992; Kristiansen y Andersen, 1993; Ercan et al., 2006) que demuestran la importancia de conocer la temperatura óptima de cultivo de las plantas donantes, en primer término, para llevar un control riguroso de estas condiciones una vez conocidas, pues influyen significativamente sobre el rendimiento androgénico. Por este motivo, sería interesante estudiar este factor en este genotipo en concreto, pues tiene características interesantes para la investigación básica y aplicada de la embriogénesis de microsporas en berenjena. Por ejemplo, debido al alto rendimiento androgénico que ofrece, se puede utilizar para facilitar el estudio del control genético de la competencia androgénica. Esta línea de alta respuesta podría usarse también para transferir su competencia androgénica a genotipos recalcitrantes de interés agronómico mediante cruces (Rivas-Sendra et al., 2017). De igual forma, cuando se estudien las condiciones que proporcionan los rendimientos propios del genotipo DH36, éste será ideal para repetir el experimento llevado a cabo en el presente trabajo y así poder concluir qué efecto tiene el agua de coco sobre la embriogénesis derivada de microsporas.

4.2.2. CALIDAD DE LOS EMBRIONES Y SU CAPACIDAD DE DESARROLLO A PLANTA

Como podemos observar en la figura 12, la formación de callo a partir del tejido de la antera es frecuente en berenjena, independientemente del genotipo (Salas et al., 2011). Este callo es una posible fuente de obtención de regenerantes por organogénesis o embriogénesis somática, lo cual constituye un inconveniente para esta vía de obtención de líneas puras. Sin embargo, en un estudio realizado en varios genotipos de berenjena se demostró que no es posible la formación de brotes ni embriones a partir de estos callos con reducida friabilidad (Salas et al., 2011). Además, en este mismo estudio, se analizó la ploidía de los embriones obtenidos mediante el cultivo de anteras en el genotipo híbrido Bandera. De estos embriones un 17'9% eran haploides, confirmando su origen gametofítico, un 46'4% eran diploides y el resto presentaban ploidías superiores o eran mixoploides. Para el genotipo Bandera y Ecavi se analizó una muestra representativa de individuos diploides elegidos al azar mediante marcadores moleculares y resultaron ser todos homocigotos para el conjunto de microsatélites empleados (Salas et al., 2011). Esto demuestra una coexistencia independiente de callos somáticos con embriones derivados de microsporas.

Por otro lado, la figura 12 muestra la aparición de embriones señalados con flechas en dos anteras pertenecientes a réplicas distintas cultivadas en medio con agua de coco al 5% con hormonas. Los embriones aparecían en la superficie de la antera mediante embriogénesis directa, como es el caso de los dos embriones obtenidos a partir de una única antera de la figura 12A, o tras unas pocas rondas de división previas a la formación de los embriones, como podemos observar en el embrión de la figura 12B, de forma que presentaba un pequeño callo en la parte basal. Sin embargo, el aspecto de este callo es diferente a aquellos derivados del tejido de la antera. Estos últimos aparecían en la parte anterior y/o posterior de la antera y eran más compactos, mientras que los callos embriogénicos eran friables y aparecían en los laterales de la antera. Esto sugiere que procedían del lóculo de la antera donde las microsporas inducidas empezaron a proliferar.

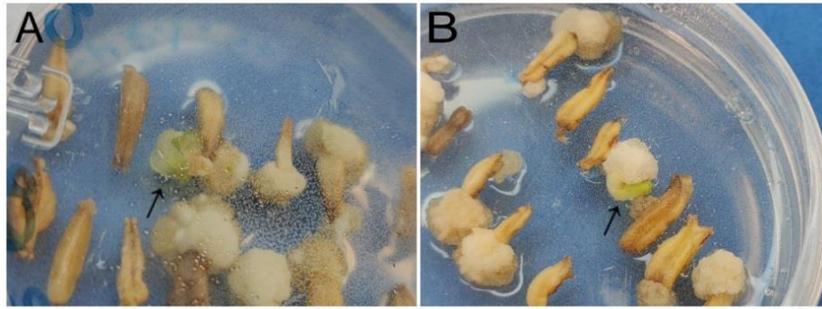


Figura 12. Embriones en antera obtenidos a partir del cultivo de anteras de berenjena en medio con agua de coco al 5% y hormonas. A: Embriones obtenidos a partir de una única antera mediante embriogénesis directa (flecha). **B:** Embrión formado tras una etapa previa de callo (flecha).

La figura 13 muestra aquellos embriones que dieron lugar a plántula con un desarrollo normal. En la figura 13A, se muestra la evolución del embrión G2.0 obtenido a partir del tratamiento con agua de coco al 5% con hormonas. Como podemos observar este presentaba formación de callo en la parte basal, pero esto no afectó al correcto desarrollo de la raíz y la parte apical. Lo mismo ocurrió con el embrión E3.1 procedente del tratamiento con agua de coco al 20% y hormonas (Figura 13C). Por otro lado, en la figura 13B se muestra un ejemplo en el cual se obtuvo un brote a partir de callo derivado de tejido del embrión por organogénesis. En este caso, como se observa en la primera imagen, al extraer el embrión de la antera este se fracturó, una parte se necrosó y la otra empezó a desarrollar callo. A partir de este callo surgió un brote que derivó en una plántula con un desarrollo apical y radicular normal.



Figura 13. Evolución de los embriones con un desarrollo apical-basal normal obtenidos a partir del cultivo de anteras de berenjena. A: Embrión G2.0 obtenido a partir del tratamiento con agua de coco al 5% y hormonas. **B:** Embrión F2.1 derivado del tratamiento con agua de coco al 10% y hormonas. **C:** Embrión E3.1 procedente del tratamiento con agua de coco al 20% y hormonas.

En la figura 14 se muestran aquellos embriones que presentaban anomalías en el desarrollo. Todos ellos tenían en común la ausencia de un meristemo apical funcional, de forma que fueron incapaces de desarrollar cotiledones, como es el caso del embrión G2.1 (Figura 14D), el cual abortó y acabó necrosándose, o presentaban cotiledones atrofiados

(Figura 14 A, B, C). El embrión C2.1 (Figura 14A) derivó en callo y a partir de este aparecieron dos brotes por organogénesis.

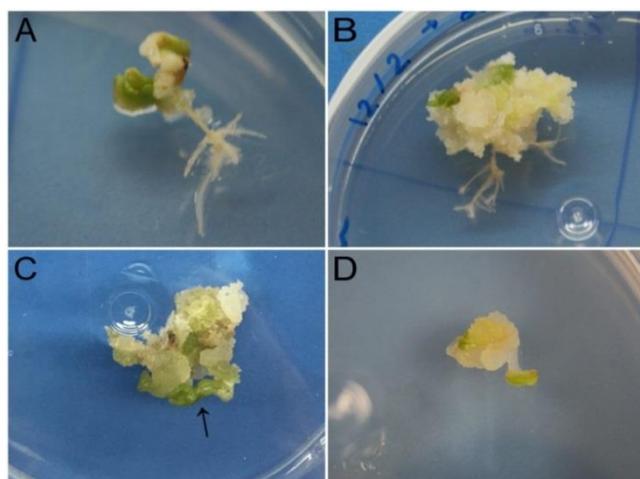


Figura 14. Embriones con anomalías morfológicas derivados del cultivo de anteras de berenjena. A: Embrión C2.1 con cotiledones malformados obtenido a partir del tratamiento con agua de coco al 10% sin hormonas. **B:** Embrión C2.2 obtenido a partir del tratamiento con agua de coco al 10% sin hormonas. **C:** Embrión G1.1 con cotiledones atrofiados (flecha) derivado del tratamiento con agua de coco al 5% con hormonas. **D:** Embrión G2.1 caracterizado por la ausencia de cotiledones originado a partir del tratamiento con agua de coco al 5% con hormonas.

Los brotes obtenidos por organogénesis a partir de callo derivado de embriones fracturados o con desarrollo apical anómalo derivan de tejido embrionario, por lo tanto, serán haploides o dobles haploides en función de si el embrión sufrió duplicación cromosómica espontánea durante el desarrollo embrionario.

Es importante tener en cuenta que, a partir de la declaración del Estado de Alarma, el seguimiento de los cultivos fue realizado por compañeros bajo estrictas normas de asistencia al laboratorio, siendo esta asistencia limitada. Por lo tanto, no se pudo tener un control adecuado de los cambios de medio, lo cual puede haber afectado a la capacidad de algunos de ellos para continuar su desarrollo embrionario. También es importante tener en cuenta que este análisis de los resultados se ha realizado a través de fotografías, lo cual dificulta una interpretación de los resultados de calidad. De todos modos, las bajas eficiencias obtenidas y la nula respuesta de los controles no habrían permitido determinar el efecto de las distintas concentraciones de agua de coco sobre la calidad de los embriones. Así pues, una vez se establezcan las condiciones adecuadas de cultivo de las plantas donantes y los controles proporcionen los rendimientos propios del genotipo DH36, sería conveniente repetir este experimento.

4.3. CULTIVO DE MICROSPORAS AISLADAS DE BERENJENA

4.3.1. RENDIMIENTO EMBRIOGÉNICO

Esta parte experimental también se vio influenciada por el decreto del Estado de Alarma. Debido a esta circunstancia, sólo se pudo llevar a cabo un cultivo de microspora de las 3 réplicas experimentales planteadas inicialmente en el trabajo. A partir de este cultivo, llevado a cabo el 3 de marzo de 2020, se obtuvieron 5 réplicas por cada uno de los tratamientos. El 23 de marzo ya se detectó respuesta, pero hasta el 17 de abril no se llevó a cabo el conteo. En el protocolo estándar aquellos callos que superan 1 mm de tamaño se transfieren a medio MS para obtener regenerantes a partir del callo (Miyoshi, 1966; Corral-Martínez et al., 2008; Rivas-Sendra et al., 2015). Sin embargo, debido a la imposibilidad de ir al laboratorio, se cambió el criterio de conteo. Se contabilizaron los callos que eran visibles al ojo humano a partir de una fotografía y sólo aquellos que la calidad de dicha imagen permitía identificar inequívocamente como callos. Se descartaron las placas contaminadas. En trabajos anteriores, se registraron

rendimientos promedio de 267.36 callos/mL para el genotipo DH36, frente a 65.08 callos/mL obtenidos para el genotipo Bandera, a partir del cual se obtuvo esta línea doble haploide de alta respuesta (Rivas-Sendra et al., 2017). Sin embargo, en este estudio se obtuvo un rendimiento en el control de 0.6 callos/mL, drásticamente inferior al registrado en el estudio anterior. Hay que tener en cuenta que la viabilidad de partida de las microsporas, tras ser aisladas durante el cultivo, fue baja (Tabla 12). Por lo tanto, tras el tratamiento inductivo estresante las microsporas androgénicas que sobrevivieron fueron menos que si hubiéramos partido de una viabilidad superior. Esta baja viabilidad a día 0 pudo deberse a periodos largos en los cuales la suspensión no se mantuvo en hielo durante el cultivo, por ejemplo, durante la extracción de las microsporas. Sin embargo, la diferencia en términos de rendimiento con respecto a estudios anteriores sigue siendo muy pronunciada, aun teniendo en cuenta esta baja viabilidad de partida. En el presente trabajo se empleó una versión modificada del protocolo: se redujeron las concentraciones de hormonas y se duplicó la concentración de sacarosa, sales y vitaminas NLN. No obstante, estas diferencias en el protocolo no explican la baja respuesta obtenida, ya que en cultivos prueba realizados con el protocolo original dieron como resultado una respuesta androgénica nula. Por lo tanto, todo apunta a las condiciones no óptimas de las plantas donantes en el invernadero discutido para el cultivo de anteras de berenjena.

Influencia del agua de coco sobre el rendimiento embriogénico

A diferencia del protocolo empleado en especies modelo como cebada, colza o tabaco, en el cual la adición de hormonas al medio no es requerida para una correcta inducción de la embriogénesis derivada de microsporas (revisado en Shariatpanahi et al., 2006), en el método descrito para el cultivo de microsporas de berenjena es necesario suplementar el medio con hormonas. Como podemos observar en la tabla 12, el agua de coco en medio de cultivo sin hormonas fue capaz de promover la proliferación de las microsporas inducidas dando lugar a callos. Además, el rendimiento resultó ser directamente proporcional a la concentración de agua de coco, se obtuvo el mayor rendimiento con agua de coco al 20%. El rendimiento obtenido con agua de coco al 10% sin hormonas fue equivalente al control (0.6 callos/ml). Por lo tanto, el endospermo líquido de coco parece aportar el ambiente adecuado para inducir la proliferación de las microsporas inducidas, con un rendimiento equivalente al obtenido mediante el medio de cultivo estándar basado en hormonas, o mayor empleando concentraciones de agua de coco superiores a 10%. Sería interesante estudiar el efecto de incrementar la concentración de agua de coco para llegar a conocer aquella concentración óptima en un medio no suplementado con hormonas.

El medio de cultivo estándar con hormonas suplementado con agua de coco al 5% y 10% ofreció los mayores rendimientos, significativamente superiores a los obtenidos mediante el protocolo estándar. Esto denota un efecto sinérgico resultante de combinar en el medio las hormonas empleadas en el protocolo estándar y el agua de coco. Sería interesante profundizar en este sentido para estudiar que concentraciones de hormonas y agua de coco producen una respuesta óptima. Pues, como podemos observar en la tabla 12, este efecto sinérgico depende de las proporciones en las que se encuentren los distintos componentes, siendo la respuesta nula con una concentración de agua de coco del 20%. Esta nula respuesta pudo deberse a un efecto inhibitorio derivado de combinar algún componente del agua de coco con las concentraciones de NAA y BA empleadas. También cabe la posibilidad de que esta nula respuesta se debiera a la traspiración de las placas, lo cual ocurre frecuentemente en el cultivo

en medio líquido. Como consecuencia, se evapora el medio de cultivo y las microsporas no son capaces de proliferar.

A pesar de obtener resultados prometedores, estos no están apoyados por un análisis estadístico por la falta de réplicas experimentales, ya que lo comentado es respecto a un único cultivo. Por lo tanto, estas diferencias en rendimiento observadas para los distintos tratamientos podrían deberse al azar de lo biológico y deberían realizar más cultivos para ver si esas proporciones se mantienen. Con todo, no podemos llegar a una conclusión, pero sí se han reforzado las evidencias que apoyan la teoría inicialmente planteada y la necesidad de seguir con esta línea de investigación.

Viabilidad día 0	Viabilidad día 3	Tratamiento	Rendimiento androgénico (callos/ml)
14.1%	3.9%	CW+h 20%	0
		CW+h 10%	3
		CW+h 5%	2
		CW-h 20%	1
		CW-h 10%	0.6
		CW-h 5%	0.2
		Control	0.6

Tabla 12. Viabilidad de las microsporas a día 0 y 3 y rendimiento androgénico obtenido para las distintas concentraciones de agua de coco (CW) con hormonas (+h) y sin hormonas (-h) en el cultivo de microsporas aisladas de berenjena. El rendimiento androgénico se expresa en callos obtenidos por cada mililitro de medio de cultivo.

4.3.2. EMBRIOGÉNESIS DIRECTA A PARTIR DE LAS MICROSPORAS INDUCIDAS

En el protocolo estándar, el desvío de embriogénesis directa a callogénesis se produce en estadios tempranos, a nivel de embrión globular (Corral-Martínez y Seguí-Simarro). Uno de los objetivos de este trabajo era estudiar el efecto del endospermo líquido de coco sobre los embriones en estadios tempranos y su capacidad de continuar el desarrollo embrionario. En el cultivo de microsporas aisladas es crítico refrescar el medio para así asegurar una concentración adecuada de los distintos componentes, mantener el equilibrio de micronutrientes y el pH. Sin embargo, no fue posible hacer los cambios de medio necesarios debido a la imposibilidad de ir al laboratorio durante el Estado de Alarma. Por lo tanto, probablemente en un determinado momento los componentes que constituyen el agua de coco se agotaron o permanecieron presentes en concentraciones no suficientes, de forma que los embriones acabaron perdiendo su identidad dando lugar a estructuras celulares desorganizadas. Por ello, no se pudo determinar el efecto del agua de coco sobre su capacidad de impulsar el desarrollo embrionario en el cultivo *in vitro* de microsporas androgénicas.

5. CONCLUSIÓN

Una vez analizados y discutidos los resultados se exponen las siguientes conclusiones:

- Es necesario estudiar las condiciones óptimas de cultivo de las plantas donantes que proporcionan las mayores eficiencias androgénicas. En berenjena, no hay estudios previos en los que se evalúe este factor. Así pues, se plantea esta línea de investigación como requisito para continuar trabajando con este genotipo de alta respuesta. Por otro lado, en pimiento hay estudios previos en los cuales se ha establecido la temperatura óptima de cultivo de las plantas donantes, pero no en el genotipo Herminio. Por lo tanto, debido a la gran influencia del genotipo en la embriogénesis de microsporas, sería interesante estudiar este aspecto en el genotipo con el que se trabaja.
- Una vez optimizadas las condiciones de las plantas donantes que proporcionan el rendimiento propio de estos genotipos, sería interesante repetir este experimento con agua de coco para determinar su efecto sobre el rendimiento, la calidad de los embriones y su capacidad de desarrollo a planta, pues las condiciones de cultivo inadecuadas de las plantas donantes pueden haber sesgado las proporciones obtenidas en el rendimiento y la nula respuesta obtenida en los controles no permite comparar los distintos tratamientos en términos de calidad de los embriones.
- En berenjena, se ha obtenido respuesta tanto en el cultivo de anteras como de microsporas en medio con agua de coco sin hormonas, esto nos permite concluir que el agua de coco proporciona el ambiente hormonal y nutricional necesario para que las microsporas inducidas empiecen a proliferar y formar embriones en el cultivo de anteras o callos en el cultivo de microsporas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AHMADI, B.; SHARIATPANAH, M.; OJAGHKANDI, M.A.; HEYDARI, A.A. (2014). Improved microspore embryogenesis induction and plantlet regeneration using putrescine, cefotaxime and vancomycin in *Brassica napus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 497–505.
- AIONESEI, T.; TOURAEV, A.; HEBERLE-BORS, E. (2005). Pathways to Microspore Embryogenesis. En C. Don, W. Keller y K. Kasha, *Haploids in Crop Improvement II* (págs. 11-34). Berlin: Springer.
- 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: 535-539.
- CAPLIN, S.M.; STEWARD, F. (1948). Effect of Coconut Milk on the Growth of Explants From Carrot Root. *Science*, 108: 655-657.
- 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: 47–61.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2014). Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins. *Euphytica*, 195: 369–382.
- CORRAL-MARTÍNEZ, P.; NUEZ, F.; SEGUÍ-SIMARRO, J. (2008). Recent advances in eggplant microspore culture for production of androgenic doubled haploids. En J. Prohens y M. L. Badenes, *Modern Variety Breeding for Present and Future Needs* (págs. 104-108). Valencia: Editorial de la Universitat Politècnica de València.
- CUBERO, J. I. (2013). *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Madrid: Mundi-Prensa.
- DOLCET-SANJUAN, R.; CLAVERIA, E.; HUERTA, A. (1997). Androgenesis in *Capsicum annum* L - Effects of carbohydrate and carbon dioxide enrichment. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122: 468-475.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D.; POCHARD, E. (1981). Culture in vitro d'anthères de piment (*Capsicum annum* L.) : amélioration des taux d'obtention de plantes chez différents génotypes par des traitements à + 35 °C. *Agronomie*, 1: 859-864.
- DUMAS DE VAULX, R.; CHAMBONNET, D. (1982). Culture in vitro d'anthères d'aubergine (*Solanum melongena* L.): stimulation de la production de plantes au moyen de traitements à 35°C associés à de faibles teneurs en substances de croissance. *Agronomie*, 2: 983-988.
- ERCAN, N.; SENSOY, F.; SENSOY, A. (2006). Influence of growing season and donor plant age on anther culture response of some pepper cultivars (*Capsicum annum* L.). *Scientia Horticulturae*, 110: 16-20.
- FAOSTAT (2020). <http://faostat.fao.org>
- FORSTER, B.; HEBERLE-BORS, E.; KASHA, K.; TOURAEV, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12: 368-375.
- GÉMES, A.; KRISTÓF, Z.; VÁGI, P.; LANTOS, C.; PAUK, J. (2009). In vitro anther and isolated microspore culture as tools in sweet and spice pepper breeding. *Acta Horticulturae*, 829: 61-64.
- GUHA, S.; MAHESHWARI, S. (1964). In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204: 497.

- 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: 425-434.
- KRISTIANSEN, K.; ANDERSEN, S. (1993). Effects of donor plant, temperature, photoperiod and age on anther culture response of *Capsicum annuum* L. *Euphytica*, 67: 105-109.
- LO, K.; PAULS, K. (1992). Plant-Growth Environment Effects on Rapeseed Microspore Development and Culture - a Flow Cytometric Study. *Plant Physiology*, 99: 468-472.
- MARASCHIN, S.D.; GAUSSAND, G.; PULIDO, A.; OLMEDILLA, A.; LAMERS, G.E.; KORTHOUT, H.; . . . WANG, M. (2005). Programmed cell death during the transition from multicellular structures to globular embryos in barley androgenesis. *Planta*, 221: 459-470.
- MIYOSHI, K. (1996). Callus induction and plantlet formation through culture of isolated microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.). *Plant Cell Reports*, 15: 391-395.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 437-497.
- NIRAL, V.; JERARD, B. (2018). Botany, Origin and Genetic Resources of Coconut. En K. Nampoothiri, V. Krishnakumar, P. Thampan y M. Achuthan Nair, *The Coconut Palm (Cocos nucifera L.) - Research and Development Perspectives* (págs. 57-111). Singapore: Springer.
- PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2012). Morphological markers to correlate bud and anther development with microsporogenesis and microgametogenesis in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 627-633.
- PARRA-VEGA, V.; RENAÚ-MORATA, B.; SIFRES, A.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2013). Stress treatments and in vitro culture conditions influence microspore embryogenesis and growth of callus from anther walls of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112: 353-360.
- 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*, 213: 89.
- RIVAS-SENDRA, A.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; CAMACHO-FERNÁNDEZ, C.; SEGUÍ SIMARRO, J.M. (2015). Improved regeneration of eggplant doubled haploids from microspore-derived calli through organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122: 759-765.
- SALAS, P., PROHENS, J.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2011). Evaluation of androgenic competence through anther culture in common eggplant and related species. *Euphytica*, 182: 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: 235-250.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M. (2010). *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*. València: Universitat Politècnica de València.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; NUEZ, F. (2008b). How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; NUEZ, F. (2008a). Pathways to doubled haploidy: chromosome doubling during androgenesis. *Cytogenetics and Genome Research*, 120: 358-369.
- SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; CORRAL-MARTÍNEZ, P.; PARRA-VEGA, V.; GONZÁLEZ-GARCÍA, B. (2011). Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops. *Plant Cell Reports*, 30: 765-778.

- 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*, 127:519–534.
- SUNDERLAND, N.; EVANS, L. (1980). Multicellular pollen formation in cultured barley anthers.II. The A-pathway, B-pathway and C-pathway. *Journal of Experimental Botany*, 31: 501-514.
- SUPENA, E.; MUSWITA, W.; SUHARSONO, S.; CUSTERS, J. (2006). Evaluation of crucial factors for implementing shed-microspore culture of Indonesian hot pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 107: 226-232.
- SZAREJKO, I.; FORSTER, B. (2007). Doubled haploidy and induced mutation. *Euphytica*, 158: 359-370.
- TESTILLANO, P.S.; CORONADO, M.J.; SEGUÍ-SIMARRO, J.M.; DOMENECH, J.; GONZÁLEZ-MELENDI, P.; RASKA, I.; RISUEÑO, M.C. (2000). Defined Nuclear Changes Accompany the Reprogramming of the Microspore to Embryogenesis. *Journal of Structural Biology*, 129: 223–232.
- VAN OVERBEEK, J.; CONKLIN, M.; BLAKESLEE, A. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94: 350-351.
- YONG, J.W.; GE, L.; NG, Y.F.; TAN, S.N. (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules*, 14: 5144-5164.
- ZHANG, F.; TAKAHATA, Y. (2001). Inheritance of microspore embryogenic ability in Brassica crops. *Theor Appl Genet*, 103, 254–25.