

~~L.P. 83/7~~
t 4/8

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 19/01/00
ENTRADA NUM. 135

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL

INDUCCIÓN A LA ANDROGENESIS EN ESPECIES
RECALCITRANTES: "*Pisum sativum* L. y *Arabidopsis thaliana* L."

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613375453
Nº Copia 15468641

TESIS DOCTORAL DE
LAMIAE AZBAID

UNIVERSIDAD DE GRANADA
21 DIC. 1999
COMISION DE DOCTORADO

Vº Bº
LA DIRECTORA DE LA TESIS

Fdo: Dra. A. OLMEDILLA ARNAL

Vº Bº
LA TUTORA DE LA TESIS

Fdo: Dra. C. LLUCH PLÁ

GRANADA, 1999

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS.
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN. BIOLOGÍA DEL POLEN.
GRANADA.

A MIS PADRES

A KHALID

Agradecimientos:

En la realización de esta tesis han contribuido numerosas personas; quiero agradecer especialmente:

En primer lugar, a mi directora de tesis la Dra. Adela Olmedilla Arnal por todos los conocimientos que me ha permitido ir adquiriendo y por ser un buen ejemplo de entrega con esfuerzo y dedicación absoluta en todo trabajo que realiza.

A la Dra. María Isabel Rodríguez-García por sus consejos, por el apoyo que me ha dado, y por permitirme disponer de todos los medios necesarios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Carmen Lluch Plá por ser ella la que me ayudó a iniciar mi camino en el mundo de la investigación. Gracias por ser mi tutora.

Al Dr. Manuel Gómez por ayudarme a crecer mis plantas dándome sus valiosos consejos y ofreciéndome las instalaciones necesarias para ello.

Al Dr. Juan de Dios Alché por todo su apoyo y por no dudar en aclarar cualquiera de mis dudas.

A Fransisco Javier Bonet por todo el esfuerzo dedicado a darle vueltas a la nueva hipótesis del origen de la androgénesis, y por su amistad.

A las demás personas que forman y que han formado el grupo de Biología del Polen de la Estación Experimental del Zaidín: Concepción Martínez por la ayuda de todo tipo que me ha ofrecido, por sus valiosos consejos y por su amistad. A la Dra. María del Carmen Fernández. A Matilde Garrido Ortiz que me hizo descubrir que el microtomo no era un enigma indescifrable. A la cara siempre divertida de Amada Pulido por su cariño y por ser muy buena amiga. A Antonio Jesús Castro por su ayuda y su amabilidad. A Mohamed Mrani-Alaoui por su valiosa amistad, sin olvidar al nuevo compañero Mounim Khalifa.

A todo el equipo de biblioteca y de informática por toda la ayuda que me ofreció especialmente Manuel Martínez y Pedro A. de Castillo Sánchez.

A mi padre por ser mi mejor amigo y por enseñarme la lección de que la vida no se gana fácilmente. A mi madre por su cariño y por enseñarme que la personalidad fuerte de una mujer se adquiere realizándose profesionalmente ante todo.

A Khalid por su cariño y comprensión, sobre todo en los momentos menos agradables de la realización de esta tesis.

A mis hermanos Mohamed, Najlae, Hanae y Mohamed Lahmidi.

A mis amigos que me animaron y de los que de alguna forma aprendí: Loubna Kerkeb (gracias por tu compañía incomparable), Leila, Badea, Sanae Elabbas, Carine Moussef, Meriem, Concha, Bernardo, Esther y Natalia.

A todos vosotros/as y a las innumerables personas que están especialmente presentes en mi mente aunque no ha sido posible nombrarlas, os estoy inmensamente agradecida.

Esta memoria de tesis doctoral ha sido realizada en el laboratorio de Biología del Polen de la Estación Experimental del Zaidín gracias a la concesión de una beca de la Asociación Española de Cooperación Internacional.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.Desarrollo <i>in vivo</i> del polen.....	3
2.Androgénesis.....	7
3.Las rutas androgénicas.....	13
4.Factores que influyen en la androgénesis.....	15
4.1.Genotipo de la planta donadora.....	15
4.2.Condiciones fisiológicas y edad de la planta donadora.....	16
4.3.Estadio de desarrollo del polen.....	17
4.4.Tratamientos de inducción en anteras.....	18
4.4.1.Choque térmico.....	18
4.4.1.1.Choque frío.....	18
4.4.1.2.Choque de calor.....	19
4.4.2.Otros pretratamientos.....	20
4.5.Condiciones de cultivo de las anteras.....	20
4.5.1.Temperatura y luz.....	20
4.5.2.Condiciones atmosféricas.....	21
4.5.3.Medio de cultivo.....	21
4.5.4.Otros factores.....	22
4.6.Condiciones de cultivo de polen aislado.....	23
4.6.1.Medio de cultivo.....	23
4.6.2.Temperatura de cultivo.....	24
4.6.3.Pretratamientos.....	24
5.Plantas utilizadas.....	25
6.Hipótesis sobre el origen de la androgénesis.....	26
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Materiales.....	32
2. Cultivo de las plantas.....	32
2.1. Guisante.....	32
2.2. Arabidopsis.....	33
3. Determinación de las fases de desarrollo del polen.....	33
3.1.Tinción con DAPI.....	33
4. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica.....	34
4.1. Fijación.....	34
4.2. Deshidratación e inclusión.....	36
4.2.1. Mezclas deshidratantes.....	36
4.2.2. Deshidratación y preinclusión.....	36
4.2.3. Polimerización e inclusión.....	36
5. Estudio de secciones al microscopio óptico.....	37
5.1. Obtención de secciones semifinas.....	37
5.2. Tinción con azul de toluidina.....	37
6. Estudio de secciones al microscopio electrónico.....	38
6.1. Tallado.....	38
6.2. Obtención de secciones ultrafinas.....	38
6.2.1. Recubrimiento de rejillas con formvar.....	38
6.3. Acetato de uranilo.....	39
6.4. Citrato de plomo.....	39
6.5. Tinción de polisacáridos (Thiery).....	40
7. Hibridación <i>in situ</i>	40
7.1. Síntesis sonda.....	40
7.1.1. Transformación de células competentes.....	40
7.1.1.2. Preparado de células competentes.....	41

7.1.1.3. Transformación.....	42
7.1.2. Preparación del ADN plasmídico molde.....	42
7.1.2.1. Método de la lisis alcalina.....	42
7.1.2.2. Digestión de ADN.....	44
7.1.2.3. Electroforesis en geles de agarosa.....	45
7.1.2.4. Síntesis de la sonda ARN.....	45
7.2. Hibridación.....	45
7.2.1. Lavados.....	46
7.2.2. Detección inmunocitoquímica de la sonda	47
8. Cultivo <i>in vitro</i> de anteras.....	47
8.1. Medio de cultivo (DBM1)	50
8.2. Estudio bajo la lupa estereoscópica.....	52
9. Cultivo <i>in vitro</i> de polen aislado.....	52
9.1. Tratamientos inductores.....	52
9.2. Medios de cultivo.....	55
9.2.1. Medio B5.....	55
9.2.2. Medio NLN.....	55
9.2.3. Medio AT3.....	56
9.3. Método de cultivo.....	58
RESULTADOS.....	59
1. Relación tamaño del botón floral estadio de desarrollo.....	60
2. Caracterización de las fases clave del desarrollo para la inducción de androgénesis.....	63
3. Almidón en las distintas fases de desarrollo.....	68
4. Localización de ARN ribosómico mediante hibridación <i>in situ</i>	69
5. Cultivo <i>in vitro</i> de anteras.....	70
6. Cultivo <i>in vitro</i> de polen aislado.....	77
DISCUSION.....	128
1. Relación tamaño botón floral/estadio de desarrollo.....	129
2. Cambios sufridos por el grano de polen durante su desarrollo.....	130
3. Cultivo de anteras.....	136
4. Cultivo <i>in vitro</i> de de polen aislado.....	141
5. Origen de la androgénesis. Una hipótesis.....	145
CONCLUSIONES.....	155
BIBLIOGRAFÍA.....	159

ABREVIATURAS:

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ARN: ácido riconucleico.

BSA: suero de albúmina bovina.

Col 4: Columbia 4

Col 0: Columbia 0.

DAPI: 4'6- diamidino-2-fenilindol.

DTT: ditiotreitól.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

L. erecta: Landsberg *erecta*.

IPTG: isopropil- β -D-triogalactopiranosido.

pt: primordia timming.

r.p.m.: revoluciones por minuto.

SDS: duodecil sulfato sódico.

Ur-Pb: uranilo-plomo.

UV: ultravioleta.

WS: Wassilewskija.

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3indolil- β -D-galactopiranosido.

INTRODUCCIÓN

1. Desarrollo *in vivo* del polen

Las angiospermas son plantas que se reproducen sexualmente mediante alternancia de dos generaciones: la esporofítica, diploide e independiente, y la gametofítica, haploide, de vida más corta y dependiente de la primera. Esta alternancia de generaciones es un aspecto característico del ciclo de la vida de las plantas.

El esporofito diploide da lugar tras la meiosis a las esporas que germinan para dar un nuevo organismo haploide o gametofito. Este gametofito haploide genera gametos que se fecundan para originar de nuevo el esporofito diploide.

El gametofito masculino o grano de polen se desarrolla en un órgano floral muy especializado que es la antera mientras que el femenino o saco embrionario lo hace dentro del ovario situado en la base del pistilo. Los gametofitos masculino y femenino de las angiospermas son pues estructuras microscópicas que se desarrollan dentro del esporofito y dependen de él para su nutrición y desarrollo. En plantas primitivas el gametofito es multicelular e independiente del esporofito pero ha evolucionado hasta que, en las angiospermas, queda reducido a una estructura de dos o tres células que dependen del esporofito durante casi toda su vida.

El polen permanece en la antera hasta su dehiscencia que es cuando pasa a ser un organismo libre llegando al estigma del pistilo donde se produce la germinación y crecimiento del tubo polínico a través del cual los dos núcleos espermáticos llegan al saco embrionario fecundando uno de ellos a la oosfera formando el cigoto y el otro al núcleo secundario para dar lugar al endospermo.

El polen es un sistema relativamente sencillo de estudiar, es más accesible y abundante que el óvulo por lo que es más fácil de manipular y ello ha movido el interés de numerosos investigadores dedicados tanto a estudios de desarrollo como de manipulación genética.

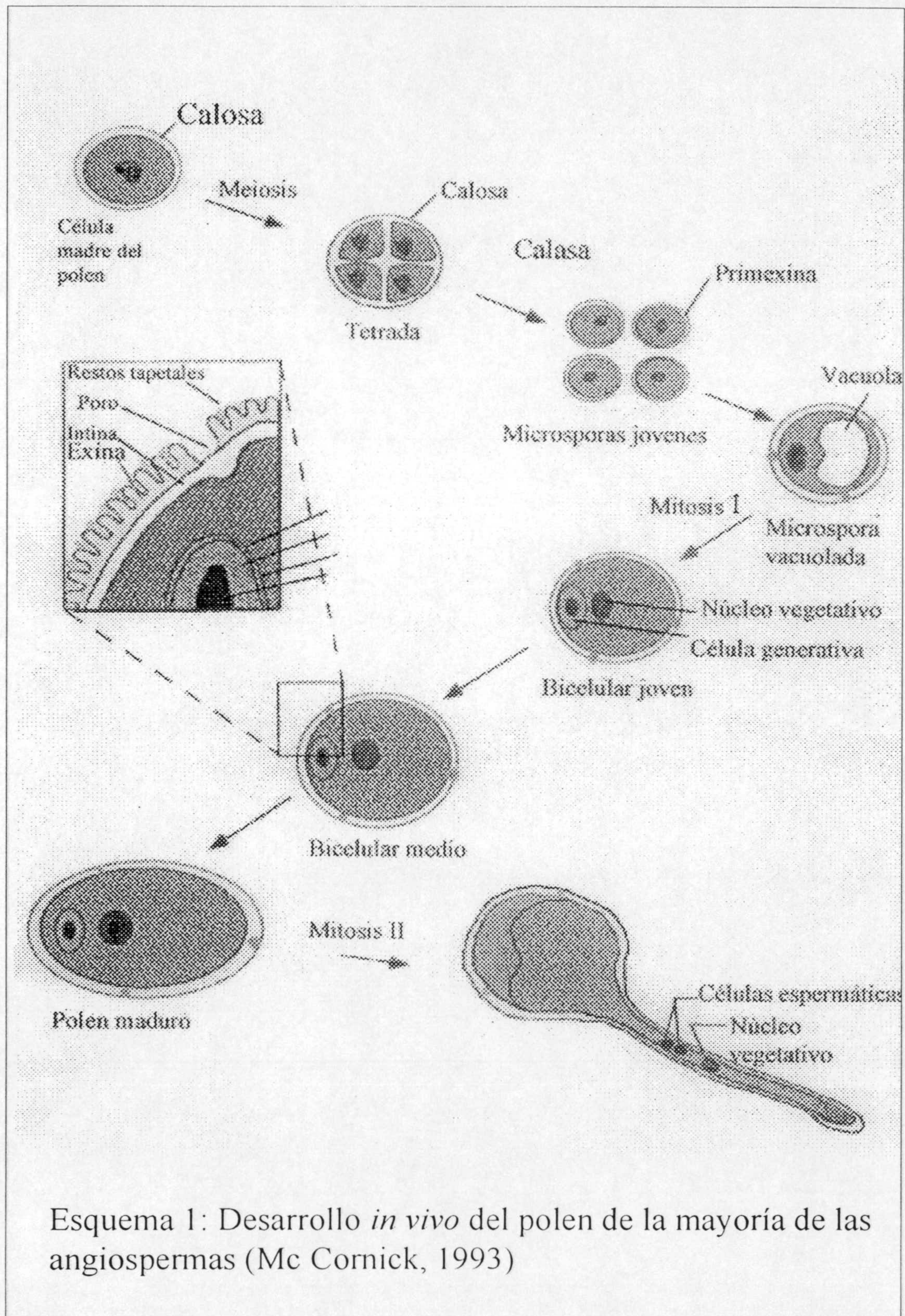
La antera, donde se desarrolla el gametofito masculino haploide o grano de polen, contiene generalmente cuatro sacos polínicos o microesporangios. Existe una gran invaginación que divide a la antera en dos lóbulos o tecas unidos por una zona de tejido conectivo. En cada una de las tecas se encuentran dos sacos polínicos. La pared de los sacos polínicos esta formada por una capa externa de células: la epidermis o exotecio, el endotecio, una o varias capas intermedias y el tapetum. Este último se forma por medio de la diferenciación gradual de la pared de la antera. Suele estar formado por una sola capa de células cuando hay más de una capa celular en el tapetum las capas adicionales

que se desarrollan suelen derivar de divisiones ocurridas en algunas células del tejido esporógeno. Las células del tapetum son de tamaño variable y con un citoplasma denso rico en orgánulos señal de su alta actividad metabólica. El tapetum sirve como fuente de nutrientes para las células madre del polen y para las microsporas en desarrollo, las cuales van a transformarse al madurar en gametofitos masculinos (granos de polen). Se ha visto que todos los metabolitos necesarios para el polen deben pasar a través del tapetum, o ser metabolizados por él (Echlin, 1971).

Se distinguen tradicionalmente dos tipos de tapetum: el glandular o secretor y el ameboide o periplasmoidal. El tapetum glandular es característico de distintas especies entre las que se encuentra el *Pisum sativum* L. (Biddle, 1979) y la *Arabidopsis thaliana* L. es Owen y Makaroff, 1995) sus células permanecen asociadas con la pared de la antera hasta que se desintegran. En este caso los nutrientes pasan a los lóculos vía exocitosis y se transportan por la membrana plasmática (Pacini y Juniper, 1979).

El tapetum ameboide, por el contrario, se caracteriza porque sufre una pronta dispersión y los protoplastos de sus células penetran entre los microsporocitos donde se funden formando un periplasmodio que los rodea (Pacini y Juniper, 1979, Pacini, 1990).

El desarrollo del polen tiene lugar en la antera y puede dividirse en dos grandes procesos: microsporogénesis y microgametogénesis (Heslop-Harrison, Touraev et al., 1997) (Esquema 1). La microsporogénesis empieza con la meiosis y termina con la formación de la microspora vacuolada haploide. Las células madres del polen se producen por mitosis del tejido esporógeno. Las células esporogénas se diferencian en microsporocitos los cuales, finalmente, se separan y se vuelven esféricos, quedando suspendidos en el fluido locular de la antera. Una vez formados, cada uno de ellos sufre una división meiótica y termina constituyéndose una tetraada formada por cuatro microsporas haploides unidas por una pared de calosa porque, poco antes de la división meiótica, las paredes primarias de las células madres del polen son remplazadas por gruesas capas de calosa (Heslop-Harrison, 1964; 1966; Dunbar, 1973). Una posible función de la calosa es la de molde donde se deposita la primexina (Waterkeyn y Bienfait, 1971). La primexina es el precursor temporal de la exina (pared externa del grano de polen). Mientras las microsporas están aún encerradas en la pared de calosa, cada una empieza a formar la capa externa de su pared. Los granos de polen de cada tetraada se separan unos de otros tras la degradación de la calosa por la acción de la β ,1,2-glucanasa o calasa, enzima que parece proceder del tapetum (Frankel et al., 1969; Izhar y Frankel, 1971) quedando finalmente libres en el interior del saco polínico. Las



Esquema 1: Desarrollo *in vivo* del polen de la mayoría de las angiospermas (Mc Cornick, 1993)

microsporas jóvenes tienen el núcleo en una posición central y es en esta fase de desarrollo donde empieza a formarse la intina o capa más interna de la pared del grano de polen (Heslop-Harrison, 1976). Estas microsporas sufren una larga interfase postmeiótica a lo largo de la cual su tamaño aumenta considerablemente (Dickinson y Sheldon, 1984; Van Lammeren et al., 1985). Conforme avanza la profase se produce una gran vacuola citoplásmica que empuja al núcleo a un polo de la microspora y que produce el aumento del tamaño de la de la misma. Por ejemplo en el caso de *Lilium* este aumento puede ser de 20 veces el tamaño original (Willems y Reznickova, 1980). Las microsporas vacuoladas contienen menos ribosomas que recién libradas mientras que los otros orgánulos siguen más o menos igual que antes (Pacini y Juniper, 1984). Conforme van madurando las microsporas, el tamaño del núcleo aumenta, el citoplasma se hace más denso y rico en orgánulos y la vacuola se reabsorbe. Durante la microgametogénesis, la microspora unicelular se divide mediante una división asimétrica (Knox, 1984; Touraev et al., 1997) dando lugar al polen bicelular joven formado por las células vegetativa y generativa. La célula vegetativa ocupa la mayor parte del polen y presenta un núcleo con la cromatina poco condensada, mientras que la célula generativa recibe tan sólo una pequeña parte del citoplasma, se encuentra dentro de la célula vegetativa y su pared es una continuación de la intina. El núcleo generativo posee una cromatina muy condensada señal de poca actividad. El grano de polen va madurando gradualmente pasando por un estadio intermedio el llamado polen bicelular medio donde la célula generativa se separa de la pared del grano de polen quedando rodeada por el citoplasma de la vegetativa (Brighigna et al., 1981; Nakamura y Miki-Hirosige, 1985). Por último, en el polen maduro el núcleo de la célula vegetativa se observa muy lobulado y la célula generativa presenta una forma lenticular con su núcleo de cromatina muy condensada rodeado por una cantidad de citoplasma muy pequeña. El polen maduro puede ser bicelular o tricelular según si la célula generativa completa su división durante la formación del tubo polínico o se divide para dar lugar a células espermáticas antes de la formación del tubo polínico. La mayor parte de los granos de polen son bicelulares pero existen algunas familias como las *Cruciferae* (*Brassicaceae*) que son tricelulares.

2. Androgénesis

Como en otros organismos eucarióticos en plantas la embriogénesis comienza con la formación del cigoto a partir de la fusión de los gametos. Sin embargo, en plantas, la embriogénesis se puede desarrollar a partir de células distintas del cigoto. El origen de estos embriones asexuales puede ser a partir de embriones obtenidos por apomixis que se forman de los óvulos no fecundados o incluso de alguna célula del tejido materno circundante, embriones androgénicos derivados del polen o embriones somáticos originados de células somáticas cultivadas *in vitro*.

Aunque el polen de angiospermas está programado para diferenciarse en gametos se ha observado que algunos granos pueden dividirse, en ciertas condiciones de inducción y cultivo *in vitro*, siguiendo una ruta esporofítica que da lugar a la formación de embriones y plantas haploides (Raghavan, 1986). Este fenómeno recibe el nombre de androgénesis, embriogénesis haploide o embriogénesis del polen.

Las plantas haploides son de gran utilidad para estudios genéticos y para la mejora vegetal (Borojevic, 1990).

Con las plantas haploides se pueden obtener en una sola generación homocigotos diploides por duplicación de los cromosomas de estas plantas mientras que con los métodos convencionales se requieren 6 o 7 generaciones. Las plantas haploides reducen por lo tanto el tiempo y el esfuerzo necesarios para la mejora vegetal.

Además, los caracteres recesivos se expresan directamente en estas plantas ya que no hay genes dominantes que impidan o enmascaren su expresión. Esto tiene un gran interés para la investigación y detección de mutantes.

Por último, los genotipos de los gametos pueden expresarse en su totalidad en las plantas haploides lo que permite una mejor selección de los mismos a la vez que facilita su análisis genético.

En la naturaleza se han descrito algunos casos de androgénesis *in vivo* como el de distintos híbridos de *Solanum* (Ramanna y Hermsen, 1974) y en *Narcissus biflorus* (Koul y Karihaloo, 1977). En estos híbridos la formación de embrioides (embriones no cigóticos) se produce de manera espontánea en ausencia de tratamientos de estrés, hormonas etc. Pero, en general, la androgénesis debe inducirse en cultivo *in vitro* ya sea de anteras o microsporas aisladas después de distintos tratamientos con hormonas o tras la aplicación de distintos tratamientos de estrés.

Guha y Maheshwari en 1964 describieron por primera vez la inducción androgénica mediante cultivo *in vitro* de anteras. Estos investigadores cultivaban anteras de *Datura innoxia* (Solanaceae) para estudiar los factores que controlaban la meiosis y por casualidad obtuvieron embriones haploides que emergían de la antera después de 6 o 7 semanas del cultivo. Guha y Maheshwari realizaron el cultivo de anteras bajo condiciones asépticas partiendo de distintos estadios de desarrollo en un medio que contenía sales minerales, un hidrolizado de caseína ácido indol acético (IAA) y kinetina. Aunque pensaron que estas embriones podían tener como origen otros tejidos de la antera, en trabajos posteriores confirmaron que provenían del polen por su naturaleza haploide. Este estudio representó un hito en las investigaciones de cultivo de tejidos de plantas, lo que abrió el camino para la producción de plantas haploides que son muy útiles para experimentos de genética y de mejora vegetal.

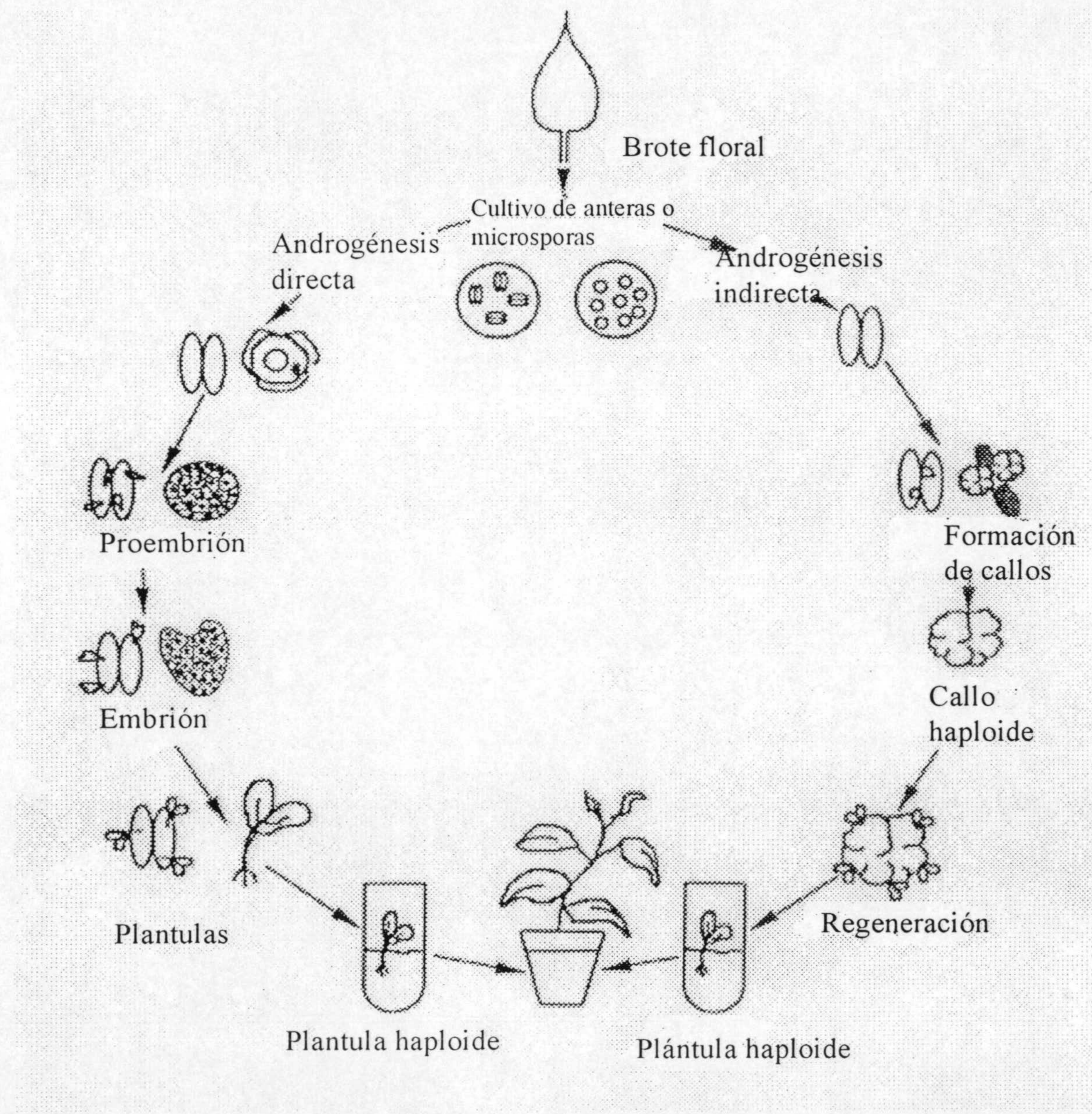
Sólo tres años después en 1967 Bourgin y Nitsch obtuvieron plantas haploides completas mediante el cultivo *in vitro* de anteras de *Nicotiana tabacum*. Este trabajo supuso un nuevo impulso para la aplicación de la androgénesis en la mejora vegetal puesto que se había conseguido la inducción en una planta de interés económico.

Con estos antecedentes, se intentó la inducción de androgénesis en numerosas especies vegetales utilizando distintos medios y condiciones de inducción y cultivo (Revisiones: Raghavan, 1986; Sopory y Munshi, 1996; Dunwell, 1996). Todos estos ensayos para obtener plantas haploides se hicieron y se hacen de una manera bastante empírica porque se desconoce el mecanismo que desvía el polen hacia la vía esporofítica.

La androgénesis inducida por cultivo *in vitro* de anteras puede ser directa o indirecta. En el caso de la androgénesis directa, el polen cultivado sufre distintas etapas de embriogénesis dando lugar directamente a un embrión y luego a una planta haploide (Reinert y Bajaj, 1977; Sopory y Munshi, 1996) (Esquema 2).

En la androgénesis indirecta el polen se divide primero para dar lugar a un callo que rompe la pared de la antera y por organogénesis o embriogénesis somática da lugar a una planta haploide (Esquema 2).

Así como el trabajo de Guha y Maheshwari fue el primer ejemplo de androgénesis directa, Wycki y Oono, en 1968, obtuvieron embriones haploides por primera vez mediante la androgénesis indirecta. Cultivando anteras de arroz en un medio suplementado con hormonas (ácido indolacético (IAA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina) obtuvieron callos de naturaleza haploide cuyo origen era el grano de polen. Transfiriendo estos callos a un medio que contenía IAA y kinetina se



Esquema 2: Representación esquemática del cultivo *in vitro* de anteras o microsporas y formación de plantas haploides vía androgénesis directa e indirecta (Reinert y Bajaj, 1977).

regeneraron por organogénesis las correspondientes plantas haploides. La androgénesis indirecta se ha inducido también en otras plantas como *Pisum* L. obteniendo callos a partir del cultivo *in vitro* de anteras de dicha planta en un medio suplementado con ácido α -naftalenacético (NAA) y leche de coco (Gupta, 1975). Gresshoff y Doy en 1972 obtuvieron callos haploides tras el cultivo *in vitro* de anteras de *Arabidopsis thaliana* L. en un medio con alta concentración de auxinas y baja concentración de kinetina.

En general, el número de especies en las que se puede inducir la androgénesis de manera indirecta es más elevado que el de las especies en las que se puede inducir de forma directa (Vasil, 1980; Maheshwari et al., 1982; Sangwan Norreel et al., 1986).

El número de granos de polen que dentro de una antera responden a la inducción androgénica tanto directa como indirecta es relativamente bajo. Dentro de una misma especie, a pesar de que se han probado diferentes métodos de inducción y cultivo, la proporción de granos que responden a la inducción es menor cuando se realiza a través de la androgénesis indirecta.

Ya en el año 1986, según la revisión realizada por Raghavan, la androgénesis (directa e indirecta) se había inducido en más de 170 especies repartidas entre 68 géneros y 28 familias de angiospermas. Conforme pasa el tiempo y usando nuevas técnicas de inducción como el cultivo *in vitro* de polen aislado, se ha conseguido extender la lista de las plantas androgénicas (Ouyang, 1986; de Buyser y Henri, 1986; Huang, 1986; Reynolds, 1990, 1993; Touraev et al., 1996; Barnabas et al., 1987; Pretova et al., 1993; Telmer, 1993; Zaho et al., 1996; Sopory y Munshi, 1996; Dunwell, 1996). Las *Solanaceae*, *Cruciferae* (*Brassicaceae*), *Gramineae* (*Poaceae*), *Ranunculaceae* y *Liliaceae* son las familias que incluyen un mayor número de especies androgénicas. Sin embargo existen plantas, incluso dentro de las familias antes mencionadas, en las que todavía no se ha conseguido inducir la androgénesis, a estas plantas se las denomina recalcitrantes. Entre las plantas recalcitrantes se encuentran prácticamente todas las leguminosas y algunas plantas como el *arabidopsis* que a pesar de pertenecer a una familia muy androgénica no ha respondido hasta la fecha a la inducción.

La inducción de androgénesis mediante cultivo de anteras depende de toda una serie de factores que se han ido depurando más o menos empíricamente y que se detallarán más adelante. Para dicha inducción hay que considerar unos pasos que son prácticamente generales a todas las especies. En primer lugar, es necesario aislar las flores de las plantas seleccionando aquellas que estén en el estadio adecuado para la inducción

androgénica. Para ello, es importante conocer el estadio de desarrollo del polen que contienen los botones florales y establecer una relación entre éste y el tamaño y/o aspecto de la flor pudiendo así, de forma automática, seleccionar las flores que interesan más. Esto requiere un conocimiento previo del desarrollo *in vivo* del polen. Una vez realizada la selección, es necesario esterilizar los botones florales mediante inmersión en etanol o hipoclorito sódico para evitar contaminaciones. Tras el lavado de los agentes esterilizantes, se extraen las anteras en condiciones estériles y se cultivan en medio sólido o líquido que suele contener auxinas (2,4-D, IAA o NAA) y citoquininas (kinetina) (Raghavan, 1986, Sopory y Munshi, 1996). Es importante no dañar las anteras al sacarlas de la flor pues entonces se producen mayoritariamente callos.

La androgénesis se puede inducir no sólo mediante cultivo *in vitro* de anteras sino también a partir del cultivo de polen aislado. Cultivando el polen aislado se consigue descartar la posible influencia del tejido esporofítico de la antera en la inducción de androgénesis lo que facilita el análisis y comprensión de los elementos que son realmente necesarios para la inducción. Con este cultivo se evita la producción de plantas con distintos niveles de ploidía que pueden proceder del tejido somático de la antera. La manipulación del material cultivado y el seguimiento del desarrollo androgénico desde las primeras divisiones es también más fácil cultivando polen aislado. Además como con el polen aislado no es necesario utilizar hormonas se evita el paso intermedio de la formación de callos. Por último, el porcentaje de inducción androgénica cultivando el polen aislado *in vitro* suele ser más alto que el obtenido con cultivo de anteras puesto que usando polen aislado se puede enriquecer el cultivo con los granos potencialmente androgénicos que en muchas especies presentan características particulares (Dunwell, 1996). En plantas como el tabaco o distintos cereales se ha observado que en el desarrollo normal del polen aparecen dos tipos distintos de granos (dimorfismo en el polen). Es decir, en una misma antera existen dos tipos de granos de polen con distinto tamaño, grado de vacuolación o afinidad por los colorantes. Como la inducción androgénica sólo se consigue en un determinado porcentaje de granos de la antera se ha estudiado la relación de estos hechos intentando reconocer los granos potencialmente embriogénicos. En tabaco, aislando y cultivando los llamados granos P o granos embriogénicos de los granos gametofíticos normales se consigue aumentar considerablemente la frecuencia de inducción (Heberle-Bors y Reinert 1980).

El primer trabajo realizado sobre cultivo *in vitro* de polen aislado se llevó a cabo por Kameya e Hinata en 1970. Estos investigadores cultivaron polen aislado de *Brassica oleracea* y del híbrido *B. alboglabra* x *B. oleracea* usando “el método de la gota pendiente” que consiste en situar una gota de medio de cultivo conteniendo granos de polen sobre un cubreobjetos que se invierte sobre la cavidad de un portaobjetos excavado y sellado con parafina. Más tarde se empleó otro método de cultivo de polen aislado: “el cultivo nodriza” que consiste en situar el polen sobre un disco de papel colocado sobre una antera que está siendo cultivada en un medio sólido, así se obtuvieron callos haploides a partir de polen aislado de *Lycopersicum esculentum* (Sharp et al., 1972). En la actualidad, el método más extendido es el cultivo directo del polen aislado en medio líquido (Nitsch y Norreel, 1973; Nitsch, 1974, 1975; Sangwan y Norreel, 1975; Sopory, 1977; Sopory y Munshi, 1996). Para el cultivo *in vitro* de polen aislado, se seleccionan los botones florales en el estadio adecuado, se esterilizan y lavan, se abren asépticamente y se presionan para que el polen salga. Dicho polen se resuspende en un medio líquido y se cultiva. Para la inducción en polen aislado no se requieren hormonas en el medio de cultivo pero sí un tratamiento de estrés previo al cultivo que desencadene la respuesta androgénica.

Hasta ahora, hemos hablado del cultivo *in vitro* de anteras y polen aislado para inducir la androgénesis, pero también se han usado con éxito otras variaciones de estas técnicas de las que citaremos:

1) Aislamiento del polen a partir de anteras precultivadas: Se cultivan las anteras *in vitro* en un medio sólido, luego se extrae el polen y se cultiva en medio líquido. A veces, el polen al aislarlo ya se ha dividido y tiene de dos a cuatro núcleos, entonces puede ser considerado como cultivo de embriones.

2) Cultivo de anteras flotando en medio líquido: Esta técnica fue desarrollada por primera vez por Wernicke y Kohlenbach (1976) y Sunderland y Roberts (1977). La antera tras el cultivo en medio líquido se abre espontáneamente, liberando al medio nutritivo los embriones y el polen multicelular. Por último, estos callos y embriones se transfieren al medio de regeneración. Esta técnica permite una mejor nutrición al polen en desarrollo y elimina el efecto de la competición inhibitoria entre los granos embriogénicos. Además los inhibidores o productos tóxicos que pueden resultar de la degeneración de la pared de la antera se difunden directamente al medio nutritivo líquido en lugar de permanecer alrededor de la antera como en el caso del cultivo en

medio sólido. Esta técnica se usó con éxito en varias especies (Tyagi et al., 1979; Xu et al., 1981; Chen y Chen, 1983).

3. Las rutas androgénicas

Independientemente de que la androgénesis se induzca mediante el cultivo de anteras o polen aislado, los patrones iniciales de división celular que sufre el polen varían según las especies y/o las condiciones de inducción (Sunderland, 1974). Estos patrones o modelos de división se han agrupado en las llamadas rutas androgénicas (Esquema 3):

Ruta A: descrita por primera vez por Sunderland y Wicks (1971) en *Nicotiana tabacum*. En esta ruta la célula vegetativa se divide sucesivamente dando lugar al embrión mientras que la generativa degenera. Dicha ruta se ha observado en más especies como por ejemplo *Capsicum annum*, *Datura innoxia* (Iyer y Raina, 1972) y *Brassica* spp (Pechan y Keller, 1988).

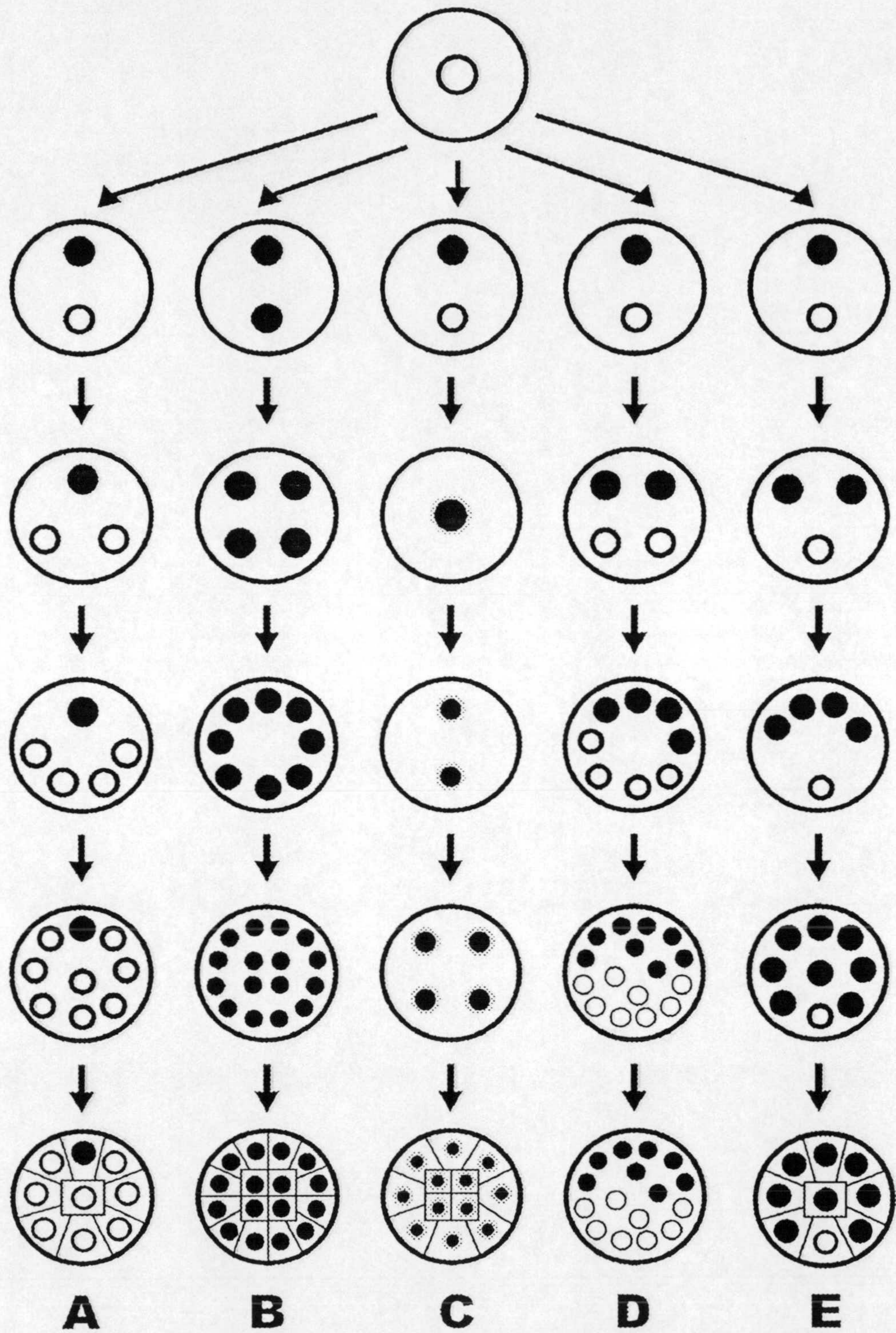
Ruta B: La primera división mitótica en esta ruta es simétrica dando lugar a dos núcleos idénticos, ambos se dividen sucesivamente hasta producir el embrión, se ha descrito en *Nicotiana* (Nitsch, 1972), *Brassica napus* (Zaki y Dickinson, 1991) y *Triticum aestivum* (Bonet y Olmedilla, 1999).

Ruta C: En este caso se produce la división asimétrica pero los núcleo vegetativo y generativo se funden y dando lugar a un embrión que evidentemente no es haploide. Esta ruta se ha descrito en *Hordeum vulgare* (Sunderlands y Evans, 1980).

Ruta D: Después de la división asimétrica tanto la célula vegetativa como la generativa se dividen y dan lugar a un embrión haploide. Dicha ruta se ha observado en *Hiyoscyamus niger* (Raghavan, 1978), *Nicotiana tabacum* (Anand et al., 1980) y algunos cereales (Bouharmont, 1977; Miao et al., 1978; Sun, 1978; Sunderland et al., 1979).

Ruta E: En este caso es la célula generativa la que se divide para dar un embrión mientras que la vegetativa degenera directamente o después de muy pocas divisiones. Descrita por primera vez en *Hiyoscyamus niger* (Raghavan, 1977) no se ha visto hasta la fecha en otras especies.

Se ha observado que la ruta androgénica seguida por los granos de polen varía no solamente de una especie a otra, sino a veces dentro de la misma antera (Wilson et al., 1978; Pretova et al., 1993; Sangwan y Sangwa-Norreel, 1996).



Esquema 3: Las distintas rutas androgénicas que puede seguir un grano de polen como respuesta a la inducción androgénica (Raghvan, 1986 modificado)

La razón por la cual el polen sigue una ruta determinada sigue siendo desconocida pero en la mayoría de los casos los embriones se forman a partir de la célula vegetativa o de los dos núcleos idénticos obtenidos por una división simétrica.

4. Factores que influyen en la androgénesis

El éxito de la inducción de la androgénesis depende de una serie de factores que pueden ser genéticos, fisiológicos, físicos, químicos, etc. y que son capaces de hacer que el polen se desvíe hacia la ruta androgénica (Raghavan, 1976; Meheshwari et al., 1980, 1982; Bajaj, 1983). Así que aunque en principio se pensó que la inducción de haploides mediante el cultivo *in vitro* de anteras o polen aislado era sólo posible en especies de unas pocas familias como las *Solanaceae*, *Cruciferae (Brassicaceae)* y *Gramineae (Poaceae)*, en la actualidad parece que, aunque en estas familias la inducción es más fácil, también es posible conseguirlo en otras conociendo los factores que influyen en este proceso. Una vez conocidos podrían manipularse y así conseguir mejores resultados.

Los factores más estudiados son:

4.1. Genotipo de la planta donadora

El genotipo de la planta donadora es uno de los factores más importantes a considerar. La respuesta a la androgénesis parece venir controlada por la dotación génica de la planta de donde proviene el polen. Así, en algunas especies, sólo algunos genotipos responden a la inducción androgénica. En especies muy cercanas genéticamente como *Brassica oleracea* y *Brassica campestris*, la respuesta cambia considerablemente según el genotipo de que se trate. En tabaco, que responde muy bien a la inducción, el porcentaje de granos que responden depende mucho de la variedad utilizada. Así los mejores resultados se obtienen con las variedades Petit Havana SRI (Chibi et al., 1993; Garrido et al., 1993) Samsun (Kyo y Ohkawa, 1991; Zarsky et al., 1992) y Wisconsin 38 (Martensson y Widell, 1993).

Según el grado de predisposición del genotipo a seguir la ruta androgénica, será necesario complicar más o menos las condiciones de cultivo o del choque previo para obtener una buena respuesta androgénica. En *Datura* y *Nicotiana*, que son plantas muy androgénicas cultivando las anteras incluso en medios muy simples, que contienen agua

destilada y sacarosa al 2%, se obtiene respuesta androgénica. Sin embargo, se ha comprobado que en especies recalcitrantes no se consiguen resultados por más que se compliquen los medios de cultivo o los pretratamientos de choque. Todo esto hace pensar que existe una predisposición genética del polen a seguir la ruta androgénica o no.

En algunos casos se ha sugerido que el genotipo puede influir a través de la producción por parte de la pared de la antera de sustancias que benefician (Pelletier y Llami 1973; Nitch y Norreel 1973, Nitch 1974a) o inhiben la inducción (Heberle-Bors y Reinert 1979).

Pero el genotipo parece influir no sólo en la capacidad androgénica de las distintas variedades y especies, sino también en la frecuencia de regeneración de plantas haploides a partir de estos embriones de polen (Zhou y Konzak, 1989; Quimio y Zapata, 1990; Duijs et al., 1992).

La naturaleza de los genes activados o desactivados por los factores que determinan las condiciones del cultivo es desconocida, pero se ha postulado que tanto los productos de los genes nucleares, citoplásmicos y/o la interacción de los mismos pueden afectar la producción de plantas haploides (Lazar et al. 1984; Ekiz y Konzak, 1991). Un ejemplo en el que se pone de manifiesto dicha influencia es la producción de plantas haploides albinas que aparecen frecuentemente en el cultivo de cereales tras la regeneración de embriones androgénicos. Se ha visto que la relación entre el número de embriones obtenidos y la proporción de las plantas verdes regeneradas después del cultivo *in vitro* de anteras de trigo depende mucho del genotipo de la planta donadora (Marsolais et al., 1984).

En el caso de los genotipos óptimos para la inducción se puede aumentar la frecuencia de producción de embriones modificando otros factores del cultivo que describiremos a continuación. Posiblemente en genotipos considerados recalcitrantes se podría obtener respuesta androgénica optimizando estos otros factores.

4.2. Condiciones fisiológicas y edad de la planta donadora

El éxito de la inducción de la androgénesis depende en gran medida de la calidad de la planta donadora. Una planta que no crece en condiciones óptimas tiende a ahorrar sus recursos y a formar un polen rico en sustancias de reserva: almidón, lípidos, etc., se ha

comprobado que este polen es poco adecuado para la inducción de androgénesis (Raghavan, 1986, Sangwan y Sangwan-Norreel, 1987).

Por ello, conviene en primer lugar, controlar las condiciones de crecimiento de la planta en la que se quiere inducir la androgénesis.

El polen de plantas no recalcitrantes que florecen pronto y producen muchas flores suele dar mejores resultados que el de las mismas plantas cuando tardan más en florecer o producen menos flores. La frecuencia de la androgénesis es también más alta en las anteras de las primeras flores (Maheshwari et al. 1980, 1982).

Las condiciones de luz y de temperatura aplicadas durante el crecimiento de la planta también influyen en la respuesta de la antera a la inducción androgénica (Dunwell y Sunderland, 1973; Picard y De Buyser, 1975).

Se ha descrito en muchas especies que la frecuencia de los granos de polen embriogénicos depende de las condiciones de crecimiento de la planta donadora incluyendo el cambio de estaciones, la edad de la planta, luz y temperatura a la que crece. Se ha propuesto que las condiciones fisiológicas de la planta pueden influir en los factores reguladores que proceden de la antera y que regulan de alguna manera la androgénesis (Dunwell, 1976).

Parece pues que la formación de las plantas a partir del polen esta predeterminada antes del cultivo y regulada por las condiciones de crecimiento de la planta donadora (Heberle-Bors y Reinert, 1981).

4.3. Estadio de desarrollo del polen

Como se ha demostrado en numerosos estudios, no sólo el genotipo, la edad o las condiciones ambientales de crecimiento de la planta donadora son factores críticos en la frecuencia de la androgénesis, sino que también existe otro factor importante para la inducción androgénica que es el estadio de desarrollo del polen del que se parte para el cultivo.

La respuesta del polen a la inducción androgénica tiene lugar sólo en un periodo limitado de su desarrollo que depende considerablemente de la especie cultivada. Generalmente, en la mayoría de las plantas los embriones haploides se obtienen partiendo del estadio de microspora vacuolada o del polen bicelular joven (justo antes o inmediatamente después de la mitosis) (Sangwan y Sangwan Norreel, 1987). Pero se han observado algunas excepciones, así, se ha inducido la androgénesis partiendo del

estadio de tetrada en arroz (Guha, 1973) y en tabaco (Nakata y Tanaka, 1968; Carlson, 1970).

Los mejores resultados para trigo se han obtenido cultivando anteras en el estadio de microspora joven o vacuolada (Ouyang et al., 1973; Pan y Kao, 1978; Wei, 1982; He y Ouyang, 1984; Mejza et al., 1993; Touraev et al., 1996) mientras que en tabaco parece mejor partir de polen bicelular joven (Heberle-Bors y Reinert, 1977). En *Brassica napus* que responde muy bien a la inducción androgénica y que generalmente se cultiva en el estadio de microspora vacuolada o polen bicelular joven (Pechan y Keller, 1988; Fan et al. 1988) se han obtenido buenos resultados de inducción incluso cuando se cultiva polen maduro (Binarova et al. 1997). Partiendo de polen maduro prácticamente no se han conseguido resultados en ninguna otra planta.

Los factores que han sido mencionados hasta ahora influyen en el cultivo tanto de anteras como de polen aislado. Pero a partir de ahora vamos a citar los factores específicos del cultivo de anteras y los del cultivo de polen aislado.

4.4. Tratamientos de inducción en anteras

Como se ha mencionado antes, crecer la planta donadora en condiciones fisiológicas adecuadas y seleccionar el estadio de desarrollo más idóneo para el cultivo contribuye en gran medida al éxito en la inducción androgénica. Pero se ha visto que además un tratamiento físico o químico antes del cultivo a toda la planta, al botón floral o a la antera suele tener un efecto positivo sobre la inducción. Los pretratamientos de choque pueden incluir el choque térmico (de frío o calor) o variaciones en las condiciones atmosféricas del cultivo.

4.4.1. Choque térmico

El choque térmico puede ser de frío o de calor.

4.4.1. 1. Choque frío

El choque frío consiste en someter a la planta entera, al botón floral o a la antera a un tratamiento a 4°C durante un tiempo que va de unas horas a unos cuantos días según la planta utilizada. Dicho choque fue aplicado por primera vez sobre botones florales de

Datura innoxia por Nitsch y Norreel en 1973, estos autores comprobaron que tras este pretratamiento la frecuencia de la androgénesis mejoraba.

El mecanismo por el cual el choque frío tiene un efecto beneficioso en la inducción androgénica es todavía desconocido aunque se han propuesto distintas hipótesis para explicarlo. El choque frío parece alterar la primera división mitótica del polen haciendo que esta división sea simétrica, es decir, que dé lugar a un polen bicelular con dos células iguales más propenso a producir embriones que el polen bicelular resultado de la división asimétrica normal (Nitsch y Norreel, 1973). Sin embargo, como se ha dicho, la androgénesis no siempre se inicia partiendo de microsporas vacuoladas existen especies como el tabaco donde el polen bicelular joven obtenido tras una división asimétrica responde mejor a la inducción. Además, aún partiendo de microsporas, no siempre se produce un aumento en el número de divisiones simétricas con el choque frío (Heberle-Bors y Duncan, 1976).

Otra hipótesis postula que el choque frío retrasa la dehiscencia de la antera lo que hace posible que sobrevivan más granos de polen que pueden responder a la inducción androgénica (Sunderlan y Roberts, 1979). Otros autores proponen que el choque frío produce una acumulación de microsporas inducibles en la antera (Duncan y Heberle-Bors, 1976; Wenzel et al. 1977). Se ha pensado también que el choque frío podría reprimir la diferenciación gametofítica (Rashid, 1983).

Por último, se ha propuesto que el choque frío actúa reduciendo la actividad metabólica dentro de la antera, lo que hace que se acumulen un gran porcentaje de granos de polen embriogénicos (Vasil y Nitsch, 1975).

En algunos casos como en *Brassica campestris* se ha descrito que el choque frío reduce el número de embriones haploides obtenidos del cultivo de anteras (Keller et al., 1983).

4.4.1. 2. Choque de calor

Para estudiar el efecto de la temperatura en la inducción androgénica Sopory y Maheshwari (1976) y Keller y Armstrong (1978, 1979, 1983) subieron la temperatura del cultivo *in vitro* de las anteras de *Datura innoxia* y *Brassica* spp y observaron que la respuesta androgénica de dichas anteras aumentó. Estos estudios y otros posteriores demostraron que el choque de calor aplicado a las anteras cultivadas favorece la inducción androgénica en distintas especies (Dunwell et al., 1983; Arnison et al., 1990; Duijs et al, 1992; Sopory y Munshi, 1996). Dunwell y col. en 1983 propusieron tres

posibles explicaciones del efecto del choque de calor. En primer lugar consideraron que este choque puede desorganizar el desarrollo normal de los tejidos somáticos de la antera estimulando así el proceso de inducción. Además, las altas temperaturas pueden sincronizar la población de microsporas lo que aumentaría el número total de microsporas en la fase del ciclo celular susceptible a la inducción. Por último, es posible que las altas temperaturas favorezcan la formación de embriones haploides en mayor medida que los no haploides procedentes de la antera.

Como el caso del choque frío, el choque térmico también puede afectar negativamente la androgénesis.

4.4.2. Otros pretratamientos

Como se ha dicho antes, además del choque frío, hay otros factores que influyen positivamente sobre la inducción androgénica en cultivo de anteras. La centrifugación de las microsporas y el choque de calor son ejemplos de estos pretratamientos (Wilson et al., 1978; Sangwan-Norreel, 1977; Keller y Armstrong, 1983; Keller et al., 1983).

Sometiendo las anteras a bajas presiones o a estrés hídrico se ha obtenido un mayor número de embriones de tabaco (Imamura y Harada, 1980) lo mismo ocurre irradiando las anteras con radiación gamma (Sun et al, 1978; Zapata et al., 1986).

4.5. Condiciones de cultivo de las anteras

El éxito en la inducción de la androgénesis en el cultivo de anteras depende también de las condiciones de cultivo.

4.5.1. Temperatura y luz

Las anteras se suelen cultivar a 25°C tras aplicarles los distintos choques térmicos que favorecen la inducción, no hay descritas muchas variaciones sobre la temperatura de cultivo.

En cuanto a la luz, las primeras fases de cultivo se realizan generalmente en oscuridad, lo que parece ser fundamental para la formación de embriones, mientras que la regeneración de las plantas sólo ocurre en presencia de luz. Parece por lo tanto que la luz no afecta la inducción de embriones pero sí influye en su regeneración.

En algunos casos se ha visto que la alternancia de luz y de oscuridad aumenta la frecuencia en los embriones obtenidos (Corduan, 1975; Sopory y Maheschwari, 1976; Sunderland, 1971). En otros casos, la inducción en luz permanente ha dado buenos resultados (Greshoff y Doy, 1974; Corduan y Spix, 1975).

El papel exacto de la luz sigue siendo desconocido y los estudios realizados sobre este factor son muy contradictorios.

4.5.2. Condiciones atmosféricas

Son pocos los estudios que se ocupan del efecto de los gases sobre la inducción androgénica. Se ha observado que altos niveles de oxígeno disuelto en el medio de cultivo favorecen la formación de callos (Kessel y Carr, 1972). Por el contrario un tratamiento anaerobio (100% nitrógeno o nitrógeno conteniendo menos del 5% de oxígeno) aumenta la producción de embriones (Imamura y Harada, 1980).

4.5.3. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo es determinante no sólo en la inducción de androgénesis sino también en el desarrollo de los embriones. Los medios de cultivo más utilizados derivan de los medios de Murashige y Skoog (1962), Gamborg y col. (1968) y Nitsch y Nitsch (1969) que contienen distintas mezcla de sales minerales (micro y macronutrientes), una fuente de carbono, Fe-EDTA, vitaminas y hormonas.

Uno de los componentes más importantes es la fuente de carbono que actúa además como regulador de la presión osmótica del medio de cultivo, la sacarosa es la más usada (Binding, 1972). La sacarosa se añade en distintas concentraciones que oscilan entre el 6 y el 12%. En general, se necesita una alta concentración de sacarosa para iniciar la formación de los embriones androgénicos mientras que para que estos embriones progresen se requieren concentraciones más bajas. Por ejemplo, para el cultivo *in vitro* de anteras de trigo se utiliza un 9% de sacarosa para inducir la androgénesis, mientras que para la regeneración de los embriones haploides este porcentaje se reduce al 2% (Henry y De Buyser, 1981).

Aunque lo más frecuente es usar sacarosa como fuente de carbono hay casos como en petunia en los que se usa maltosa (Raquin, 1983).

Las hormonas son otro componente muy utilizado en el cultivo de anteras. En el 80% de los casos de cultivo de anteras se usan hormonas (auxinas y citoquininas) (Sopory, 1972; Sopory y Maheshwari, 1976; Byscov, 1978; 1979; Sopory et al., 1978; Maheshwari et al., 1980, 1982 Rueda y Vázquez, 1985; Raghavan y Nagmani, 1989) el desarrollo de microsporas dentro de anteras cultivadas *in vitro* viene regulado por el tipo y concentración de las auxinas usadas (Ball et al., 1993), por ejemplo el IAA favorece la formación de embriones haploides mientras que el 2,4-D favorece la formación de callos (Armstrong et al., 1987).

En *Datura innoxia*, se ha visto que la ausencia de hormonas del medio de cultivo no impide la formación de embriones haploides al cultivar sus anteras *in vitro*, e incluso que al añadir hormonas se puede inhibir la inducción de la androgénesis (Nitsch, 1974). En algunos casos la presencia de hormonas es imprescindible la inducción de androgénesis en el cultivo *in vitro* de anteras, pero no es necesaria para el desarrollo posterior de los embriones (Maheshwari et al. 1980, 1982).

4.5.4. Otros factores

Además de las ventajas que presenta la presencia de los azúcares y factores reguladores en el medio de cultivo, algunos autores han mencionado el efecto beneficioso de añadir a dicho medio otras sustancias. Así, el carbón activo por ejemplo parece que adsorbe los inhibidores excretados por la antera, los presentes en el agar o los que se forman de la degradación de otros metabolitos presentes en el medio (Kohlenbach y Wernicke, 1978; Maheshwari et al, 1980). Es también probable que el nivel de las hormonas (endógenas y exógenas) sea regulado por la adsorción del carbón activo. Por lo tanto, aunque no se conoce su modo de acción, parece que el carbón activo aumenta la inducción androgénica.

Se ha estudiado también el efecto de los aminoácidos sobre la inducción androgénica y se ha visto que en el caso de cultivo *in vitro* de anteras de trigo, la presencia de aminoácidos en el medio de cultivo aumenta la frecuencia con la que se forman embriones. Por otro lado, parece que la presencia de maltosa inhibe el efecto de los aminoácidos (Trottier et al., 1993).

Como el cultivo de anteras se realiza en la mayoría de los casos en un medio sólido, habrá que tener en cuenta los componentes que se utilizan para solidificar el medio y

que son el agar o agarosa. En algunas ocasiones se ha descrito que el agar puede incluir componentes tóxicos para la embriogénesis o actuar afectando la disponibilidad de hormonas en el medio influyendo así sobre el tipo de desarrollo. Por estas razones hay autores que prefieren usar agarosa (Lyne et al., 1986) aunque el empleo de agar es el más extendido.

4.6. Condiciones de cultivo del polen aislado

Dentro de las condiciones de cultivo que pueden diferenciar el cultivo de polen aislado del cultivo de anteras debemos considerar: el medio de cultivo, las condiciones físicas en las que se incuban las microsporas y los pretratamientos de inducción que se aplican.

4.6.1 Medio de cultivo

Una de las diferencias entre el cultivo de anteras y el de polen aislado en *Brassica napus* es la concentración de sacarosa que se añade al medio. La concentración óptima necesaria para la inducción en cultivo de polen aislado es más alta que la que se requiere en cultivo de anteras (0.35M comparado con el 0.23M). Se ha postulado que tal vez el polen aislado es más sensible a los choques osmóticos y por eso necesita una concentración más elevada de sacarosa que las anteras (Lichter, 1982). Igual que para el cultivo de anteras existen diferencias en la composición de los medios de cultivo óptimos para obtener androgénesis en cultivo de polen aislado dependiendo de las especies. Algunos autores señalan mientras que en el caso de maíz la sacarosa es muy eficaz (Gaillard et al., 1991; Pescitelli, 1990) la maltosa ha dado mejores resultados en el caso de trigo (Tuveson y Ohlund, 1993) y cebada (Hoekstra et al., 1993). La sacarosa es la más usada en general y la mayoría de los estudios que se han realizado en *Brassica napus* utilizan el medio NLN (Lichter, 1982) que contiene sacarosa al 13% (0.44M) (Binarova et al., 1993; Custers et al., 1994).

En cuanto a las hormonas, aunque hay algunas referencias de trabajos en los que se usan hormonas para el cultivo *in vitro* de polen aislado lo más frecuente es que no se incluyan en el medio de inducción (Touraev et al., 1996).

4.6.2 Temperatura de cultivo

En *Brassica oleracea* se ha comprobado la importancia de la temperatura en la inducción de androgénesis en cultivo *in vitro* de polen aislado. Si se cultivan microsporas aisladas de esta planta a 32.5°C se obtiene una alta proporción de embriones haploides (desarrollo esporofítico) mientras que si estas microsporas se cultivan a 17.5°C lo que se obtiene es polen maduro (desarrollo gametofítico). A 25°C se obtienen mezclas de los primeros estadios de ambos modelos de desarrollo (Custers et al. 1994).

4.6.3 Pretratamientos

Igual que en el caso de cultivo de anteras en el de polen aislado se utilizan distintos tratamientos de estrés para inducir la androgénesis. Para el cultivo de polen aislado estos pretratamientos son si cabe más importantes puesto que prácticamente los tratamientos con hormonas no se utilizan para la inducción. Estos tratamientos de estrés aplicados en el estadio más adecuado del desarrollo de polen causan un bloqueo o un retraso en el desarrollo gametofítico normal favoreciendo el desarrollo esporofítico (Sangwan y Sangwan-Norreel, 1996; Jähne y Lörz, 1995; Touraev et al., 1996). Los pretratamientos aplicados dependen de la especie y pueden incluir el choque frío, choque de calor, ayuno, choque osmótico o agentes que afectan a la división celular (a los microtúbulos). El choque frío se usa con bastante frecuencia y se aplica a la planta entera, el botón floral o a la antera (Gaillard et al., 1991; Pescitelli et al., 1990; Jähne y Lörz, 1995). No hemos encontrado casos en los que se aplique directamente al polen aislado.

Por el contrario el choque de calor se aplica a las anteras o directamente al polen aislado (Duijs et al., 1992; Sato et al., 1989; Takahata y Keller, 1991; Pechan et al., 1991; Custers et al., 1994; Cordewener et al., 1996). Este pretratamiento es el más común para la inducción en *Brassica* y *Nicotiana* y al aplicarlo a microsporas induce una primera división mitótica simétrica (ruta B), pero si se aplica a polen bicelular joven, también puede llevarlo a seguir la ruta esporofítica. En este último caso el núcleo vegetativo que se encuentra en G₁ durante el desarrollo normal del polen, entra rápidamente en la fase S y continúa dividiéndose para dar lugar a un embrión (Hu y Kasha, 1999). Se ha demostrado que el choque de calor lleva a la producción de proteínas de "heat shock" y

se ha propuesto que estas proteínas están implicadas en el proceso de inducción androgénica (Cordewener et al., 1996).

Otro tipo de estrés que en los últimos años se ha usado mucho en cultivo de polen es el ayuno consiste en mantener las anteras en un medio pobre en azúcares que tiene manitol en lugar de sacarosa durante unos días para después cultivar el polen aislado en un medio nutritivo con sacarosa (Vicente et al., 1992; Zarsky et al., 1992; Heberle-Bors, 1989; Roberts-Oöehlschlager y Dunwell, 1990; Hoekstra et al., 1992; Ziauddin et al., 1992). Además, se están aplicando con éxito combinaciones de estos pretratamientos por ejemplo Touraev et al. (1996) muestran que la combinación choque de calor y ayuno da muy buenos resultados para la inducción androgénica en trigo y en tabaco.

La aplicación de sustancias químicas que afectan el ciclo celular también se utiliza como pretratamiento inductor de la androgénesis, en *Brassica napus* tratando con 25 mg/l de colchicina durante 12 horas antes de la primera división mitótica se consigue incrementar la proporción de granos de polen que sufren una división simétrica (Iqbal et al., 1994; Zaki y Dickinson, 1991). Este incremento parece estar directamente relacionado con el aumento de la frecuencia de granos de polen androgénicos. La división simétrica parece que bloquea la diferenciación de la célula generativa y activa el promotor Lat52 (promotor específico de la célula vegetativa) en las dos células resultantes de la división (Eady et al., 1995; Hu y Kasha, 1999). La colchicina se aplica a la temperatura de cultivo sin combinación con ningún choque térmico, sin embargo altera tanto los microtúbulos y ejes de división como la formación de la pared celular (Zhao et al, 1996; Hu y Kasha, 1999).

La ruta androgénica seguida por el polen cultivado puede variar dependiendo del pretratamiento aplicado, así por ejemplo en trigo, un pretratamiento con manitol induce una primera división mitótica simétrica (Ruta B) mientras que el choque frío induce más la división asimétrica (ruta A o D).

5. Plantas utilizadas

Como se ha dicho, a pesar del gran número especies vegetales en las que se ha conseguido inducir la androgénesis todavía existen muchas plantas en las que no se ha podido desviar al polen de la vía gametofítica normal a la esporofítica. Entre estas plantas están el *Pisum sativum* L. y la *Arabidopsis thaliana* L. (Fig.1).

El guisante es un ejemplo más de leguminosas en las que no se ha conseguido la inducción androgénica. La importancia agrícola de esta familia ha hecho que se intentara en distintas especies y con diferentes protocolos pero no se han obtenido resultados hasta la fecha. Se han obtenido embriones somáticos de guisante cultivando ápices de tallo y se ha comprobado que dependiendo del genotipo usado la capacidad embriogénica varía. (Bencheikh y Gallais, 1996 a y b). Además la regeneración de leguminosas obtenidas por métodos de cultivo *in vitro* ha resultado también muy compleja (Huyghe, 1990)

Igual que para guisante en *arabidopsis* no se ha conseguido hasta la fecha la inducción androgénica sin embargo el *arabidopsis* pertenece a una familia en la que existen muchos ejemplos de plantas que responden a la inducción androgénica e incluso algunas de ellas como la *Brassica napus* son un modelo de dicha inducción. En *arabidopsis* sería de gran utilidad poder encontrar las condiciones de inducción no por su importancia agrícola sino por su importancia en investigación, debido a la gran cantidad de estudios que se han hecho con esta planta que es considerada en genética vegetal como el equivalente a la *Drosophila melanogaster*. Se han obtenido embriones somáticos de *arabidopsis* a través de callos obtenidos de cultivo *in vitro* de partes de la semilla o de la raíz (Huang y Yeoman, 1984; Marton y Browse, 1991). Recientemente se han obtenido embriones somáticos de semillas germinadas de un mutante de *arabidopsis* que tienen muy desarrollado el meristemo apical del brote y que se postula que tienen inhibidos los elementos que controlan la división celular y/o la diferenciación (Mordhorst et al 1998).

6. Hipótesis sobre el origen de la androgénesis

La comprensión del proceso ontogénico de los organismos pluricelulares es uno de los grandes retos de la ciencia. La formación de una planta a partir de una única célula, continúa siendo, en gran medida, un gran misterio para el hombre. Probablemente pasarán algunos años hasta que se puedan comprender en su totalidad los aspectos celulares y moleculares que llevan desde el cigoto hasta el animal o planta adultos. Dentro de este contexto, la androgénesis es un fenómeno interesante cuyo estudio puede ayudar a la comprensión del proceso ontogénico.

Al cultivar una cierta cantidad de microsporas en un medio adecuado, lo normal es que la mayoría de las células muera o continúe su diferenciación hasta dar lugar al polen

maduro. Sin embargo, algunas células se desvían de la ruta ontogénica habitual para adquirir una capacidad morfogénica que concluye en la formación de un embrión haploide.

La mayoría de los estudios realizados sobre androgénesis se basan en la búsqueda de condiciones de cultivo adecuadas que permitan la androgénesis en la mayor cantidad de especies posibles. Estas experiencias están orientadas a la mejora genética vegetal, debido a las ventajas que muestran los individuos totalmente homocigotos obtenidos tras la androgénesis. Sin embargo son pocos los estudios que tratan de explicar el origen de la capacidad androgénica de ciertas microsporas. Actualmente se estudian los genes que se expresan durante la androgénesis, o se tratan de encontrar marcadores citológicos o moleculares de este proceso (Sangwan and Sangwan-Norreel, 1996; Cordewener et al. 1996). Sin embargo, podría ser interesante plantearse las siguientes preguntas: ¿por qué se produce la androgénesis?, ¿Qué es lo que “mueve” a ciertas microsporas a producir un embrión haploide?. ¿Por qué hay plantas con diferente capacidad androgénica?. En el apartado discusión trataremos de responder estas preguntas considerando la androgénesis como un proceso embriogénico que se inicia a partir del polen, que es una estructura altamente diferenciada dentro del reino vegetal.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El polen tiene la notable capacidad de dar lugar a la formación de embriones haploides a través de la androgénesis. La androgénesis o embriogénesis del polen se consigue cultivando *in vitro* anteras o polen aislado en determinadas condiciones. Si bien algunos de los factores que favorecen dicha inducción son conocidos no se sabe cuál es el origen de este proceso por lo que para inducirlo en una determinada especie hay que recurrir a métodos más o menos empíricos. Además, a pesar del gran número de especies en las que se han encontrado las condiciones para dicha inducción existen algunas familias en las que no se ha conseguido todavía (*Leguminosae*) y otras (*Brassicaceae*) que incluyen tanto plantas que responden muy bien a la androgénesis (*Brassica napus*) como otras en las que no se ha conseguido dicha inducción (*Arabidopsis thaliana* L.). Dada la importancia agrícola de las leguminosas hemos utilizado para este estudio el *Pisum sativum* L. como ejemplo de esta familia. La *Arabidopsis thaliana* L. la hemos seleccionado por su interés en estudios básicos.

El objeto final de esta tesis es conseguir una mejor comprensión del proceso androgénico que pueda servir para su aplicación general a las distintas especies vegetales.

Los objetivos perseguidos a lo largo de este trabajo fueron:

- 1) Puesta a punto de las condiciones de cultivo en cámara e invernadero de las plantas de *Arabidopsis* y guisante para obtener flores vigorosas para el uso de sus anteras y polen aislado en la inducción androgénica.
- 2) Desarrollo de un método para determinar de forma rápida el estadio de desarrollo del polen en los botones florales de las dos plantas de estudio.
- 3) Estudio de las características estructurales de los distintos estadios de desarrollo del polen para caracterizar las fases clave para la inducción de la androgénesis.
- 4) Estudio de la presencia de almidón como marcador de la capacidad androgénica del polen de las especies estudiadas.
- 5) Estudio de la distribución del ARN ribosómico en las distintas fases de desarrollo del polen de *Arabidopsis* y guisante para evaluar la actividad metabólica de estas fases así como para caracterizar estructuras nucleares.
- 6) Desarrollo y puesta a punto del cultivo *in vitro* de las anteras de *Arabidopsis* y guisante para la inducción de androgénesis directa en este polen.

- 7) Determinación de los ecotipos y variedades que responden mejor a la inducción androgénica en cultivo de anteras.
- 8) Desarrollo y puesta a punto del cultivo de microsporas aisladas de *Arabidopsis thaliana* L. y *Pisum sativum* L. para la inducción androgénica.
- 9) Determinación de los tratamientos de estrés más exitosos para inducir la androgénesis en cultivo *in vitro* de microsporas aisladas.
- 10) Desarrollo de una hipótesis del origen de la androgénesis a la vista de los resultados obtenidos y de los datos bibliográficos existentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Para la realización del presente trabajo se han utilizado:

Anteras de guisante (*Pisum sativum* L.) variedad Lincoln así como cuatro mutantes que tienen afectada la fertilidad del polen: RBF31-1, SGEF1, SGEF2 y SGE y

Anteras de cinco ecotipos de arabis (*Arabidopsis thaliana* L.): Wassilewskija (WS), Columbia (Col 4, Col 0), Landsberg *erecta*, C 24, así como el mutante pt (“primordia timing”) que da muy buen resultado en embriogénesis somática.

2. Cultivo de las plantas

2.1. Guisante

Para el cultivo de guisante, se dejaron las semillas en agua dos días, posteriormente se distribuyeron en bateas de polietileno con una capa de vermiculita húmeda donde se mantuvieron hasta que crecieron las plántulas hasta que alcanzaban unos 10 cm de longitud. Dichas plántulas se transfirieron después de quitarles los cotiledones a un cultivo hidropónico en invernadero a 25°C con un ciclo de 18h luz/6h oscuridad en presencia permanente de un sistema de aireación. La solución nutritiva se cambiaba en las macetas cada semana. Esta solución contenía una mezcla de macronutrientes y micronutrientes (Del Río, et al.,1985).

Macronutrientes:

Para 10 litros:

$P_0_4H_2K$	1.2233 g
$(NO_3)_2Ca.4H_2O$	9.5233 g
$SO_4 Mg.6H_2O$	2.6700 g
$(NO_3)_2Mg.6H_2O$	2.8933 g
NO_3K	5.3000 g
KOH (1N)	0.7000 ml

Micronutrientes:

Para 100ml:

H_3BO_3	0.2857 g
-----------	----------

Fe.EDTA	0.0800 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0.1538 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.0196 g

A cada litro de la solución de macronutrientes se le añadía 1 ml de la solución de micronutrientes.

Los botones florales aparecían aproximadamente tras un mes de cultivo.

2.2. Arabidopsis

Para el cultivo de arabidopsis se prepararon macetas con turba muy húmeda y con ayuda de unas pinzas finas se colocaron las semillas bien espaciadas. Para romper la dormancia las semillas se mantuvieron a 4°C durante cuatro días y luego se transfirieron a la cámara de cultivo que estaba iluminada con luz de calidad fluorescente e incandescente, a temperatura entre 20-25°C y con ciclo de 18h de luz/6h de oscuridad.

Las flores empezaban a aparecer aproximadamente tras un mes de cultivo.

3. Determinación de las fases de desarrollo del polen

Para determinar el estadio de desarrollo en el que se encontraban los granos de polen de los distintos botones florales se usó la tinción con DAPI (Vergne et al.,1987).

Se midió el botón floral, se determinó el estadio de desarrollo del polen que contenía y se estableció la relación entre el tamaño del botón floral y la fase de desarrollo del polen que contenía para poder determinar fácilmente qué botones florales se seleccionaban para el posterior cultivo *in vitro* de sus anteras o polen aislado.

3.1. Tinción con DAPI

En primer lugar se preparó una solución concentrada disolviendo el DAPI (4'6-Diamidino-2-fenilindol) en agua destilada a una concentración de 10µg/ml. Esta solución podía almacenarse a 4°C durante meses.

La tinción se realizó diluyendo 10 veces la solución concentrada para conseguir una concentración final de 1µg/ml. A esta solución se le añadió Tritón X-100 al 1%, que ayudaba al fluorocromo a penetrar en el grano de polen.

Las anteras recién extraídas o fijadas en Carnoy (etanol al 70%-ácido acético: 3/1) se sumergieron en la solución de tinción durante 20 minutos como tiempo mínimo, pudiendo dejarse hasta 24 horas a 4°C. Después, las anteras se colocaron sobre un portaobjetos y se aplastaron con unas gotas de DAPI. Esta tinción se podía aplicar también al polen aislado sin fijar o fijándolo previamente en Carnoy. En este caso se centrifugó el polen durante 5 min a 1000 r.p.m., se eliminó el medio que contuviera el polen o el fijador, se añadió la solución de DAPI y se dejó actuar como mínimo 20 min, pudiendo dejarse a 4°C hasta 24 horas .

La observación se realizó en el microscopio de fluorescencia bajo irradiación con luz ultravioleta ($\lambda=366\text{nm}$), el DNA unido al DAPI emite fluorescencia azul ($\lambda= 480\text{nm}$). Esta fluorescencia se mantiene sin desvanecerse durante bastante tiempo. Se tomaron fotografías en blanco y negro y en color con películas de 400 ASA en un microscopio óptico Zeiss Axioplan.

4. Procesamiento de muestras para microscopía óptica y electrónica

4.1. Fijación

Fijadores:

Como fijador primario se usó el Karnovsky (Karnovsky,1965) que es una mezcla de altas concentraciones de paraformaldehído y glutaraldehído. En este estudio se usó una mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 5% en tampón cacodilato 0.025M que se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 0.1g de paraformaldehído y se disolvieron en 1.25ml de agua destilada calentando la solución en baño María y añadiendo aproximadamente 50 μl de una solución de NaOH 1N para que se disolviera completamente. Se enfrió la solución en hielo y se le añadieron 0.63ml de cacodilato sódico 0.1M y 0.5ml de glutaraldehído al 25%; por último se enrasó con agua destilada hasta 2.5ml.

La solución stock de cacodilato sódico 0.1M se mantenía a 4°C y se preparaba a partir de polvo comercial, disolviendo 21.4g en un litro de agua destilada y ajustando el pH a 6.9. La solución 0.025M se preparaba a partir de la solución stock diluyendo 4 veces y ajustando nuevamente el pH.

La preparación del fijador así como la fijación se realizaba en campana para evitar los vapores tóxicos del mismo.

También se usaron otros fijadores primarios como la mezcla de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 1% en tampón PBS; el glutaraldehído al 3% en cacodilato 0.025M y la mezcla paraformaldehído al 3% y glutaraldehído al 0.25% en PBS.

Como fijador secundario, en el caso de fijación previa con Karnovsky, se usó el tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0.025M. El osmio se preparaba a partir de ampollas con 0.1 g de tetróxido de osmio cristalizado. Se calentaba previamente la ampolla de vidrio para que los cristales de osmio se licuaran y se concentraran en un punto de la ampolla. Se introducía en un frasco de vidrio grueso y oscuro, y se rompía dentro del frasco con un golpe de mazo. Inmediatamente, se añadían 5 ml de agua destilada, consiguiéndose una solución al 2% de tetróxido de osmio stock que se almacenaba a 4°C bien tapada para impedir la salida de vapores tóxicos de osmio.

El osmio se diluía en proporción 1:1 con tampón cacodilato 0.05M antes de usarse. Todas estas operaciones se realizaron bajo campana porque los vapores de osmio son muy tóxicos.

Fijación:

Las anteras se introdujeron en el fijador y se sometieron a vacío durante 30 segundos. De este modo se desgasificaba el tejido y se hacía más fácil la penetración del fijador.

La fijación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 horas porque la penetración del fijador es lenta por las capas exteriores de la antera y las gruesas paredes del grano de polen.

Una primera señal indicadora de que la fijación se estaba realizando adecuadamente era que las muestras permanecían sumergidas en el fijador, si flotaban era preciso ayudarlas a sumergirse empujándolas con pinzas o desgasificándolas nuevamente.

Tras la fijación, el tejido se lavó en el tampón por 3 veces durante quince minutos cada una.

En el caso de microsporas aisladas, se centrifugaron durante 2 minutos a 5000 r.p.m., luego se eliminó el sobrenadante y se preparó una solución de agarosa al 2% en tampón PBS que se disolvía en el horno microondas, se dejaba enfriar hasta que alcanzara unos 30°C para no dañar las células y se añadía a las microsporas que estaban en un tubo Eppendorf. Se cortaba el fondo del tubo con una cuchilla, se sacaba la agarosa con las microsporas y se fijaban en el fijador que podía ser cualquiera de los citados anteriormente.

4.2. Deshidratación e inclusión.

4.2.1. Mezclas deshidratantes:

Como agente deshidratante se utilizó el etanol diluido en agua al: 30%, 50%, 70%, 90% y etanol absoluto. El alcohol final tenía que ser de gran pureza para asegurar la completa deshidratación del tejido.

Las soluciones de deshidratación se conservaban en frascos bien tapados para que no se evaporara el etanol.

4.2.2. Deshidratación y preinclusión

Las muestras una vez fijadas se trataban con distintas mezclas como se detalla a continuación:

Etanol 30% durante 60 minutos.

Etanol 50% durante 60 minutos.

Etanol 70% toda la noche.

Etanol 90% durante 60 minutos.

Etanol 100% durante 60 minutos.

Etanol 100% durante 60 minutos.

Etanol 100% durante 60 minutos.

Etanol 100%:resina Unicryl (1:1) durante 2 horas a 4°C.

Etanol 100%:resina Unicryl (1:1) durante toda la noche a 4°C.

Resina durante toda la noche a 4°C.

4.2.3. Polimerización e inclusión

Las muestras que se iban a incluir se colocaron en cápsulas de gelatina que contenían una gota de resina, una vez bien orientadas las muestras se rellenaron las cápsulas con resina, se taparon cuidadosamente y se llevaron a polimerizar a una cámara a -20°C con luz ultravioleta donde se dejaron durante tres días.

Siempre que se usó resina se emplearon guantes y se trabajó en campana porque el Unicryl es muy alergénico.

Durante la inclusión se conservó la resina en hielo y una vez terminada se guardó a -20°C porque esta resina también polimeriza por la acción de la temperatura.

5. Estudio de secciones al microscopio óptico

5.1. Obtención de secciones semifinas

Se colocaron las muestras incluidas en resina en el soporte de las cápsulas del microtomo y con una cuchilla de afeitar se eliminó progresivamente la resina hasta llegar al tejido. A continuación se colocó la pieza portamuestras en el brazo del microtomo y se obtuvieron cortes de 1 o 2 μm con una cuchilla de vidrio. Se transfirieron los cortes obtenidos a un portaobjetos sobre una gota de agua y se colocaron en una placa calefactora para secar lentamente la gota mientras el corte se iba estirando y se iba adhiriendo al porta.

Los cortes semifinos así obtenidos se tiñeron con azul de toluidina.

5.2. Tinción con azul de toluidina

La solución de azul de toluidina se preparó como sigue:

Para 50ml:

Azul de metileno	0.25g
Azul de toluidina	0.25g
Borax	0.5g

Se disolvió el Borax en 30ml de agua bidestilada calentando en caso necesario. Después se añadió el azul de metileno y el de toluidina, se enrasó la solución a 50ml con agua bidestilada y se filtró.

Para teñir los cortes semifinos una vez adheridos al portaobjetos se colocó sobre ellos una gotita de colorante, se dejó actuar un minuto y se lavó el exceso de colorante con agua destilada. Para montar las preparaciones en definitivo una vez teñidas, lavadas y secas se colocó sobre ellas un cubreobjetos con una gotita de BIOMOUNT. Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Zeiss Axioplan y se fotografiaron en películas blanco y negro o de color de 100 ASA.

6. Estudio de secciones al microscopio electrónico

6.1 Tallado

Tras la observación del corte semifino al microscopio óptico y la comprobación de que se había llegado a las microsporas, se seleccionó la región donde estaban las células más interesantes para su observación al microscopio electrónico. Esta región se identificó en el frente del bloque del que se había obtenido el corte semifino con ayuda de la lupa del microtomo y se talló la pieza con una cuchilla de afeitar dejando como único frente para cortar la pequeña región de interés convertida en un trapecio de 1mm de lado aproximadamente.

6.2 Obtención de secciones ultrafinas

En el ultramicrotomo, se obtuvieron los cortes ultrafinos de entre 60 y 80 nm de espesor con una cuchilla de vidrio. Alrededor del filo de la cuchilla se montó una balsa que se llenó con agua bidestilada donde quedaban flotando los cortes a medida que se iban obteniendo. El color de interferencia que presentaban los cortes indicaba su espesor, siendo los más finos de color blanco-gris.

Las secciones ultrafinas, que se obtuvieron tras el corte y quedaron flotando en la balsa, se agruparon con ayuda de una pestaña adherida al borde de un palillo y se recogieron tocándolas con una rejilla de cobre, oro o níquel según su uso posterior. Se secó la gota que quedaba sobre la rejilla con un papel Whatman y se almacenó para su tinción posterior.

Las rejillas se cubrieron previamente con una película de formvar al 0.2% en cloroformo. Esta película facilitó la adherencia del corte a la rejilla y le dió estabilidad a los cortes en manejos posteriores.

6.2.1. Recubrimiento de rejillas con formvar

Se preparó una disolución de formvar al 2% en cloroformo y se vertía sobre un vasito con un orificio inferior de salida de líquidos controlado por una llave. Se sumergió en ella un portaobjetos perfectamente limpio, después de unos segundos se abría la llave

dejando salir la solución de formvar a gran velocidad y se dejaba secar la fina película que se quedaba adherida al portaobjetos. En un recipiente conteniendo unos 250 ml de agua bidestilada, se flotó la película de formvar hundiendo lentamente el portaobjetos de modo que se desprendiera la película y quedara sobre la superficie del agua. Sobre esta película se colocaron las rejillas y por último se recogieron con otro portaobjetos recubierto con una etiqueta adhesiva que se hundía sobre un extremo de la película de formvar quedando las rejillas entre el formvar y la etiqueta adherida al portaobjetos. Antes de utilizar las rejillas para recoger los cortes ultrafinos obtenidos en el ultramicrotomo se comprobó el espesor de la película y su grado de homogeneidad al microscopio electrónico.

6.3. Acetato de uranilo

Se usó para contrastar los cortes ultrafinos y se preparó al 5% en agua destilada. Antes de usarlo era imprescindible centrifugarlo a 12000 r.p.m durante 2 minutos. Se tomó una gotita de la parte superior, se depositó encima de un papel parafilm y se flotó la rejilla en esta solución manteniéndola sobre ella 20 min. Por último, la rejilla se lavaron con abundante agua bidestilada y se secaron con papel Whatman.

6.4. Citrato de plomo

Se utilizó para incrementar el contraste obtenido con el acetato de uranilo. La solución de contraste se preparó agitando durante 30 min 1.33g de nitrato de plomo y 1,67g de citrato trisódico con dos moléculas de H₂O en 30ml de agua bidestilada. Se agitó durante un minuto, se dejó reposar durante 30 min, se añadieron 8ml de NaOH 1N y se completaba a 50ml con agua bidestilada. Para la tinción, se diluyó la solución anterior con NaOH 0,01N en proporción 1:8. La tinción con citrato de plomo es delicada pues éste puede precipitar combinándose con el CO₂ del aire formando carbonato de plomo, por ello la tinción se realizó dentro de una placa Petri recubierta de parafilm en la que se colocó una gota del citrato de plomo rodeada con unas lentejas de sosa las cuales propiciaban una atmósfera que impedía que el plomo precipitara. Las rejillas se flotaron en el citrato de plomo durante dos minutos, se lavaron con agua bidestilada y se secaron con papel Whatman.

6.5. Tinción de polisacáridos (Thiery)

La técnica de Thiery (Thiery, 1967) se utiliza para contrastar polisacáridos en los cortes ultrafinos.

Para esta tinción se requiere que el material haya sido fijado previamente usando glutaraldehído al 3% en cacodilato 0.025M a 4°C durante 6 horas. Los cortes se recogieron en rejillas de níquel u oro recubiertas con formwar porque las rejillas de cobre reaccionan con los reactivos de la reacción produciendo precipitados indeseables. Las rejillas con los cortes ultrafinos se flotaron en ácido periódico al 1% en agua bidestilada durante 20 a 30 min. Después, se lavaron 3 veces con agua bidestilada, se flotaron en tiosemicarbácida al 1% en ácido acético al 10% durante 30 a 40 min y se lavaron rápidamente con ácido acético al 10%. Por último, las rejillas se lavaron de nuevo con agua bidestilada, se flotaron en proteínato de plata al 1% en agua bidestilada durante 30 min, en oscuridad y después de lavarlas con agua bidestilada se secaron con papel Whatman.

7. Hibridación *in situ*

7.1. Síntesis sonda

Como molde para la síntesis se usó el plásmido pBLUESCRIPT II KS +/-, en el que se había insertado un fragmento Eco RI de 1500 pb de la zona codificante del gen del ARN ribosómico 18S de *Arabidopsis thaliana* L (Olmedilla et al., 1993). Este plásmido de 2.5 kb, contiene dos promotores de transcripción: para la ARN pol T3 y T7; un gen de resistencia a ampicilina y la zona del “polylinker”, donde se insertó el fragmento del gen del 18S ARN, contenía el gen de la β -galactosidasa.

7.1.1 Transformación de células de *Escherichia coli*

Para poder disponer de una cantidad suficiente de ADN plasmídico y así poder realizar la síntesis de la sonda ribosómica, se transformaron bacterias *E. coli* (JM109) (Yanisch-Perron et al., 1985) con el plásmido pBluescript que contenían el fragmento del gen ribosómico 18S.

Reactivos necesarios:

Medio YT

8 g/l Bacto triptona

5 g/l Extracto de levadura

5g/l NaCl

Ajustar pH a 7.2.

Para las placas se añadieron 15 g/l de bacto agar, se esterilizó en autoclave, se dejó enfriar a unos 25°C, añadieron 100µg/ml de ampicilina y se vertió sobre placas Petri.

CaCl₂

Se preparó una disolución 50mM de CaCl₂ en un tampón 10mM Tris HCl pH 8 y otra 100mM en el mismo tampón.

X-gal (5-bromo-4-cloro-3indolil-β-D-galactopiranosido)

Solución al 2% de X-gal en dimetil formamida

IPTG (isopropil-β-D-triogalactopiranosido)

Solución 100mM en agua

7.1.1.2 Preparado de células competentes

Se preparó un cultivo de las bacterias JM109, un día antes de la transformación, añadiendo una colonia de estas bacterias (tomado de un stock que se tenía en placa Petri guardado a 4°C) a 2ml de medio YT y dejándolas crecer a 37°C en agitación continua.

Al día siguiente se tomaron 40 ml de medio YT en un erlenmeyer de 250ml y se le añadieron 0.4 ml de las bacterias crecidas previamente, tras lo cual se pusieron a crecer en las mismas condiciones. Se controló el crecimiento de las bacterias tomando pequeñas alícuotas hasta observar que la densidad óptica a 660 nm era de aproximadamente 0.4 (DO₆₆₀=0.4).

Entonces se centrifugó el cultivo a 12000g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió, agitando suavemente, 20 ml de CaCl₂ 50mM enfriado en hielo. Se incubaron las bacterias resuspendidas 20min en hielo y a continuación se centrifugaron 5 minutos a 4°C a12000g. Por último, se eliminó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron suavemente en 4ml de CaCl₂ 50mM frío.

7.1.1.3 Transformación

En un tubo eppendorf se mezclaron de 0.1 a 1 μg de ADN con 48 μl de la solución de la solución de CaCl_2 100mM y 100 μl de células competentes. Se incubó la mezcla en hielo 30 minutos agitando suavemente cada 10 minutos. A continuación se aplicó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos y se incubaron las bacterias a 37°C durante 1h tras añadirles 1ml de medio YT. Por último, distintas cantidades (25, 50, 100 μl) de estas bacterias, se cultivaron en placas petri con medio YT, ampicilina , X-gal e IPTG . Así se seleccionaron en placa Petri las bacterias que contenían el plásmido con el inserto por su resistencia a ampicilina y por su coloración blanca (no realizaban la reacción de la β -galactosidasa).

7.1.2 Preparación del ADN plasmídico molde

Para la síntesis de la sonda fue necesario aislar una cantidad suficiente de ADN plasmídico y linearizarlo digiriendo con las enzimas de restricción adecuadas para dejar actuar a la enzima ARN polimerasa T3 o T7 y así obtener la sonda antisense que se hibrida al ARN del polen o la sense que no se hibrida y que sirve de control negativo. Para el aislamiento del plásmido a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina (Maniatis et al., 1982).

7.1.2.1 Método de la lisis alcalina

Soluciones necesarias

GTE

Glucosa 50 mM

Tris-HCl 25 mM

EDTA- Na_2 10 mM

La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

Solución de lisis:

Lauril sulfato sódico (SDS) 1% (p/v)

NaOH 0.2 N

Esta solución se preparó a partir de soluciones concentradas al 10% (p/v) de SDS y de 2N de NaOH.

Tampón acetato sódico pH 4.8:

Acetato sódico 5 M 60 ml

Acido acético glacial 11.5 ml

H₂O hasta 100 ml

El pH se ajustó a 4.8 con ácido acético glacial. La solución se esterilizó en el autoclave y se conservó a 4°C.

TE:

Tris-HCl pH 8.0 10 mM

EDTA-Na₂ 1 mM

Esta solución se esterilizó en el autoclave y se almacenó a 4°C.

Se partió de un volumen de 1.5ml de cultivo. Las células se recogieron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, éstas se resuspendieron en 100µl de GTE, y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200µl de solución de lisis, se mezcló el tubo por inversión y se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. El lisado se neutralizó añadiendo 150µl de tampón acetato sódico 3M pH 4.8 y, tras mezclar el tubo por inversión, se incubó durante 5 minutos en un baño de hielo. Las proteínas, el ADN cromosómico y los restos celulares se eliminaron por centrifugación a 12000g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol frío, se incubó durante 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 12000g durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200µl de acetato sódico 0.3M pH 4,8. Finalmente se añadieron 2 volúmenes de etanol frío y la mezcla se incubó a -20°C durante 30 minutos. Para precipitar el ADN se centrifugó a 12000g durante 15 minutos. El precipitado se lavó con etanol 70% (v/v) y se centrifugó a 12000g durante 5 minutos. El sedimento de ADN se dejó secar a 37°C y se resuspendió en 50 µl de TE.

Para el aislamiento del ADN a mayor escala se usó el “Plasmid midi kit” de Qiagen Inc. (cat. 12145) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.1.2.2 Digestión de ADN

Para verificar el contenido de ADN del plásmido se realizaron digestiones con la enzima EcoR I comprobándose que efectivamente se separaban dos fragmentos: uno de 2.95kb correspondiente al plásmido pBLUE SCRIPT y otro de 1.5kb correspondiente al inserto. Para linearizar el plásmido se digirió con Pst I para obtener el ADN necesario para la síntesis del ARN antisense y con Xho I para el sense. Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas de tampón y concentración fijadas por el fabricante para cada enzima. Las reacciones contenían habitualmente 0.5-5 mg de ADN; 0.1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente suministrado por la casa comercial, diez veces concentrado; y 0.5-5 unidades del enzima de restricción, en volúmenes finales de 10-40 ml completados con H₂O o TE. Las digestiones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción durante 2 horas a 37°C. Tras la digestión se procedió a la electroforesis de los fragmentos para comprobar su tamaño.

7.1.2.3 Electroforesis en geles de agarosa

Reactivos utilizados:

Tampón de carga:

Glicerol.	30% (v/v)
Azul de bromofeno	10.3% (p/v)
Azul de xilencianol	0.3% (p/v)

Tampón TAE :

Tris-Base	4.84 g
Acido acético glacial	1.14 ml

EDTA-Na₂ 0.5M, pH 8.0 2 ml

H₂O hasta 1 l

Este tampón se preparó a partir de una solución 50 veces concentrada esterilizada en el autoclave.

La electroforesis se llevó a cabo según Sambrook *et al.* (1989), utilizando geles de agarosa al 1% (p/v) preparados en tampón TAE.

La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 5-10 V/cm. Para la visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio (10 µg/ml) durante 15 minutos y, después de lavar con agua, se expusieron a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó tomando como patrón los fragmentos del fago λ cortado con las enzimas *Hind* III, *Hind* III/*Eco*R I, *Bst* EII o el marcador de peso molecular VIII (Boehringer Mannheim, ref. 1336045).

7.1.2.4 Síntesis de la sonda ARN

Una vez linearizado el plásmido se procedió a la síntesis utilizando la siguiente mezcla:

1µl de ADN del plásmido linearizado que contiene el clon de interés (1µg)

4µl mezcla dig-UTP (Boehringer Mannheim)

4µl mezcla de nucleótidos (10mM ATP, 10mM GTP, 10mM CTP en H₂O)

4µl tampón de transcripción 5x

2µl 100mM DTT (ditiotreitól)

1µl de RNasin (inhibidor de ARNasas)

1µl enzima (T7 para sonda sense o T3 para sonda antisense)

H₂O hasta 20µl

La mezcla de transcripción se mantuvo durante 2hs a 40°C. Tras lo cual se procedió a la fenolización añadiendo un volumen igual de una mezcla fenol/cloroformo (v/v), una vez agitado el conjunto se centrifugó durante 2 minutos a 10000 rpm, se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ARN con dos volúmenes y medio de etanol absoluto a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 4°C durante 30 minutos a 10000 rpm, se lavó el precipitado con etanol al 70%, se secó y se redisolvió la sonda en 20 µl de TE.

7.2 Hibridación

Para la solución de hibridación se mezclaron para cada dos rejillas:

5µl de formamida desionizada

2µl de sulfato de dextrano 50%

1µl de 20xSSC (175.3g NaCl, 88.2g citrato sódico y H₂O hasta 1l)

2µl del ARN sintetizado como se indicó arriba

Se prepararon los cortes de bloques del material incluido en Unicryl en rejillas de Ni con formvar.

Para la hibridación se flotaron las rejillas durante un momento en una gota de agua, se sacudió el exceso de agua dando un golpe con el puño en la mesa con la rejilla sujeta con la pinza. Este paso se repitió siempre entre gota y gota para no diluir las soluciones de un paso a otro. Después se pasaron las rejillas a una gota con una solución de 1µg/ml de proteinasa K en tampón TE y se incubaron 1 hora en atmósfera húmeda, Este paso se realizó para digerir las proteínas que están unidas a los ARNs de los tejidos por la acción del fijador. Tras la digestión, se lavaron 3 veces las rejillas en gotas de TE durante 5 minutos y se procedió a la hibridación. La hibridación se realizó flotando las rejillas en gotas de solución de hibridación que previamente se había desnaturalizado calentándola a 80° durante 5 minutos y pasándola inmediatamente a hielo. Las rejillas se dejaban con la solución de hibridación toda la noche a 50°C en una cámara húmeda. La microgota de sonda (5µl) se colocaba sobre una tapita de tubo eppendorf dentro de una placa Petri en la que se ponía papel con un poco de TE y formamida 1/1 (v/v), después se cerraba la placa con parafilm y se metía en una caja de plástico dentro de la estufa.

7.2.1 Lavados

Para eliminar la sonda que no se había unido específicamente se lavó en:

4xSSC (obtenido diluyendo el 20xSSC) cuatro veces dos minutos en cada gota

2xSSC cuatro veces dos minutos en cada gota

1xSSC 2hs a 50°C en cámara húmeda en una gota grande (50µl)

SC (0.5ml PIPES 100mM, 0.1ml NaCl 5N, 5ul Tween 20, y 0.4ml H₂O)

7.2.2 Detección inmunocitoquímica de la sonda

Para detectar la sonda marcada con digoxigenina se incubaron las rejillas en 1% BSA (suero de albúmina bovina) en SC durante 15 minutos para bloquear las proteínas que pudieran reaccionar inespecíficamente contra el anticuerpo anti-digoxigenina. Después, se incubaron las rejillas durante una hora con el anticuerpo anti-digoxigenina unido a oro coloidal de 10 nm de diámetro, el anticuerpo se diluyó 1/25 en SC, tras lo cual se lavaron las rejillas en SC cuatro veces durante 2 minutos cada una. Por último se realizó un lavado en agua al chorro y se secaron con papel Whatman.

Para contrastar las rejillas se flotaron durante 20 minutos en una solución de acetato de uranilo al 5% .

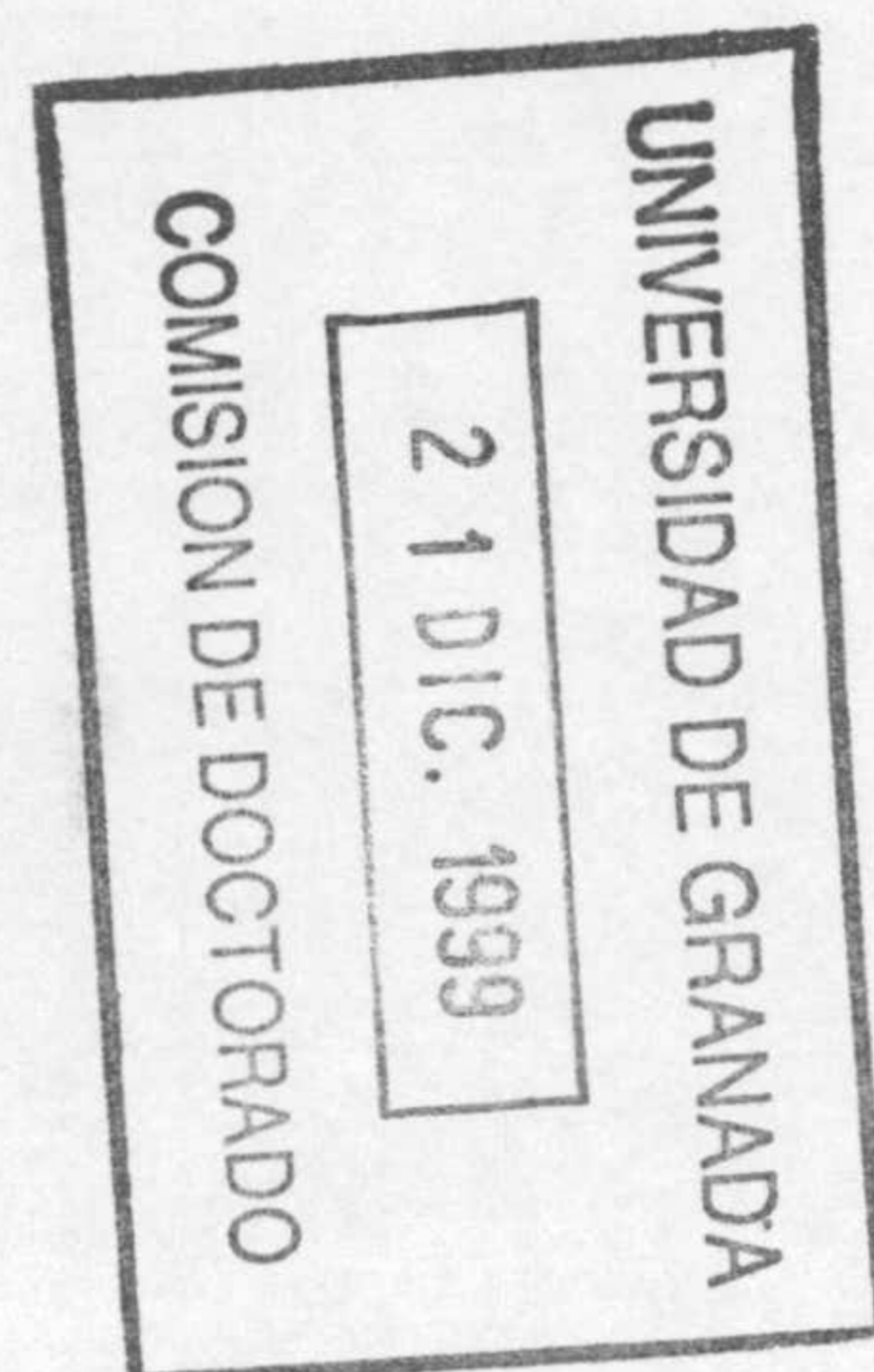
8. Cultivo *in vitro* de anteras

Para realizar el cultivo se seleccionaron los botones florales que correspondían a los estadios de desarrollo del polen deseados. Se sometieron o no a un choque frío a 4°C según método de inducción probado (ver distintos cultivos aplicados Tablas 1a y 1b) posteriormente se esterilizaron en etanol al 70% durante 3 minutos tras lo cual se lavaron con agua estéril dos veces. A continuación, se abrieron las flores con ayuda de unas pinzas finas, se sacaron las anteras y se colocaron en placas Petri conteniendo medio de cultivo. Esta operación debía realizarse con mucho cuidado para no dañar las anteras con las pinzas. En algunos casos se sometieron las anteras a un choque de luz de 24 horas antes de pasarlas a cultivar (Tablas 1a y 1b). El cultivo se realizó en oscuridad a 25°C durante 3 semanas.

Se usó como medio de cultivo el DBM1 propuesto por Greschoff y Doy (1972) que consiste en:

	1	2	3	4	5	6	7	8
Choque frío	Botones florales 24 h a 4°C	-	Botones florales 24 h a 4°C	Anteras 24 h a 4°C	Botones florales 24 h a 4°C	Botones florales 48 h a 4°C	Botones florales 24 h a 4°C	Botones florales 24 h a 4°C
Choque de luz	-	Anteras 24 h en luz	Anteras 24 h en luz	Anteras 24 h en luz	-	Anteras 24 h en luz	Anteras 24 h en luz	Anteras 24 h en luz
Medio de cultivo 25°C	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido	Sólido
[Auxinas] / [Citoquininas] mg.l ⁻¹	NAA/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1	NAA+2,4-D/ Kinetina 6+2/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1	2,4-D/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/1

Tabla 1a: Condiciones de cultivo de anteras en medio sólido.



	9	10	11	12
Choque frío	Botones florales 24 h a 4°C	Botones florales 24 h a 4°C	Botones florales 24 h a 4°C	-
Choque de luz	Anteras 24 h en luz	-	Anteras 24 h en luz	Anteras 24 h en luz
Medio de cultivo 25°C	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido
[Auxinas]/ [Citoquininas] mg.l ⁻¹	NAA/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1	2,4-D/ Kinetina 8/0.1	NAA/ Kinetina 8/0.1

Tabla 1b: Condiciones de cultivo de anteras en medio líquido.

8.1. Medio de cultivo (DBM1)

Macronutrientes (5x)

Para 100 ml:

NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	45mg
Na ₂ HPO ₄	15 mg
KCl	150mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	100mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	125mg
KNO ₃	500mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	75.0mg
KI	0.375mg

Quelato de hierro (200x)

Para 5 ml:

FeSO ₄ .7H ₂ O	0.0278 g
Na ₂ .EDTA	0.0372 g

Vitaminas (100x):

Para 10 ml:

Acido nicotínico	1 mg
Tiamina	10 mg
Piridoxina	1.0 mg
Mioinositol	100 mg
Glicina	4 mg

Micronutrientes: (1000x)

Para 100 ml:

MnSO ₄ .H ₂ O	1120 mg
H ₃ BO ₃	310 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	430 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	13 mg
CaSO ₄ .5H ₂ O	1.3 mg

CaCl₂.6H₂O 1.3 mg

Hormonas: se añadieron en distintas concentraciones y mezclas (ver Tablas 1a y 1b):

Para 1 litro:

NAA 8.0mg

Kinetina 0.1 mg

Una vez preparados los distintos componentes del medio, se mezclaron en las siguientes proporciones:

Para un litro:

Macronutrientes 200ml

Vitaminas 10ml

Micronutrientes 1ml

Quelato de hierro 5ml

Hormonas (según el cultivo)

Se ajustó el pH entre 5.8 y 6.4 con NaOH 1N, se añadieron 20mg/l de sacarosa y 8g/l de agar (en caso de cultivar en medio sólido) (Tablas 1a y 1b).

El medio se esterilizó en autoclave añadiendo cuando ya estaba casi frío las vitaminas y hormonas, se vertió en placas Petri estériles en la cabina de flujo laminar y se dejó solidificar. Las placas se podían conservar a 4°C durante semanas. Para los cultivos en medio líquido se procedió de la misma manera pero sin añadir agar.

Las anteras se colocaron en las placas con medio de cultivo, se sellaron dos veces con parafilm y se incubaron en la cámara a 25°C en oscuridad durante tres semanas.

Se realizaron doce tipos de cultivos diferentes con las anteras de guisante y arabidopsis (Tablas 1a y 1b). En los estadios de arabidopsis en los que los botones florales eran tan pequeños que era prácticamente imposible abrirlos sin deteriorar las anteras, se cultivó el botón entero. Cada cultivo se repitió un mínimo de dos veces empleando las distintas variedades y ecotipos de las dos plantas y partiendo de anteras con polen en distintos estadios de desarrollo.

8.2. Estudio bajo la lupa estereoscópica

Se estudió el aspecto de las anteras, antes y tras 21 días de cultivo, utilizando una lupa estereoscópica. Se agruparon las alteraciones más frecuentemente observadas y se contaron. Además se tomaron fotografías de estos cambios.

9. Cultivo *in vitro* de polen aislado

Tras estudiar los resultados del cultivo *in vitro* de anteras se cultivaron microsporas aisladas de las dos plantas (*Pisum sativum* L. y *Arabidopsis thaliana* L.) seleccionando aquellas variedades y ecotipos que habían dado lugar a divisiones andrógénicas. Así, se cultivaron microsporas aisladas de guisante variedad Lincoln y de los ecotipos de *Arabidopsis* Col 4 y C 24.

9.1. Tratamientos inductores

Para la inducción de la androgénesis se aplicaron distintos pretratamientos antes del cultivo del polen aislado (Tabla 2):

- 1) **Choque frío a botones florales:** Se sometieron los botones florales a un choque frío (5 días a 4°C) después de lo cual se extrajeron las microsporas y se cultivaron.
- 2) **Choque frío a los botones florales seguido de una combinación de choque de calor y ayuno aplicado a las anteras:** después del choque frío aplicado a los botones florales, se extrajeron las anteras sometiéndolas a un choque térmico (6 días a 33°C) en medio de ayuno (sustituyendo la sacarosa por manitol), por último se aislaban las microsporas y se cultivaban.
- 3) **Choque frío a los botones florales seguido de una combinación de choque de calor y ayuno aplicado a las microsporas aisladas:** después del choque frío aplicado a los botones florales se extrajeron las microsporas y se sometieron a una combinación de ayuno y choque de calor a 33°C pero sólo durante 24 horas porque las microsporas aisladas eran más sensibles a los tratamientos de choque que las anteras.
- 4) **Choque frío a los botones florales seguido de choque de calor a las microsporas aisladas:** después de aplicar el choque frío a los botones florales se extrajeron las anteras cultivándolas 24 horas a 32°C para que se adaptaran un poco al calor y por

último se les aplicó un choque de calor a 41°C durante una hora. Las anteras se mantuvieron siempre en medio rico con sacarosa.

5) **Choque de calor a microsporas aisladas:** Las microsporas aisladas se sometieron a un choque de calor a 32°C durante 8-12h en medio rico.

	1	2	3	4	5	6
Choque frío	Botones florales 5 días a 4°C	Botones florales 5 días a 4°C	Botones florales 5 días a 4°C	Botones florales 5 días a 4°C	-	-
Choque de calor	-	-	-	Anteras 24 h a 32°C +1h a 41°C	Polen aislado de 8 a 12h a 32°C	-
Choque de calor/ayuno	-	Anteras 6 días a 33°C en ayuno	Polen aislado 6 días a 33°C en ayuno	-	-	-
Choque químico	-	-	-	-	-	Anteras 25mg.l ⁻¹ colchicina 12h a 25°C

Tabla 2. Condiciones de cultivo del polen aislado

9.2. Medios de cultivo.

9.2.1 Medio de ayuno B5 (Touraev et al., 1996)

Macronutrientes:

KNO ₃	12.5 g
MgSO ₄	1.25 g
CaCl ₂	3.75 g
NH ₄ SO ₄	0.67 g
NaHP0 ₄	0.75 g

Se añadían 54.7mg de manitol y se enrasa con agua destilada hasta un litro. El medio se esteriliza por filtración.

9.2.2 Medio NLN (Lichter, 1982):

Macronutrientes (10x):

Para 1 litro:

KNO ₃	1.25 g
MgSO ₄	1.25 g
CaNO ₃	5 g
KH ₂ PO ₄	1.25 g

Micronutrientes (100x):

Para 1 litro:

CuSO ₄	0.0025 g
H ₃ BO ₃	0.6200 g
MnSO ₄	2.2300 g
Na ₂ MoO ₄	0.0250 g
ZnSO ₄	0.8600 g
CoCl ₂	0.0025 g

Vitaminas (100x):

Para 1 ml:

Biotina	0.005 g
Acido fólico	0.050 g

Glicina	0.20 g
Acido nicotínico	0.50 g
Piridoxina	0.05 g
Tiamina	0.05 g
Mioinositol	10 g

Para un litro de medio:

Macronutrientes	100ml
Micronutrientes	10ml
Vitaminas	10ml

Se añade además:

Glutación	0.03g
Glutamina	0.80g
Serina	0.10g
Sacarosa	130g

Se ajustó el pH a 6.0 con KOH y se esterilizó el medio por filtración.

9.2.3. Medio AT3

Otro medio nutritivo que se usó para el cultivo *in vitro* de polen aislado, es el AT3 (que es más concentrado que el NLN en micronutrientes y macronutrientes) (Touraev et al. 1996):

Macronutrientes 1 (10x):

Para un litro:

KNO ₃	14.15 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.830 g

Macronutrientes 2 (10x):

Para un litro:

(NH ₄) ₂ SO ₄	2.315 g
KH ₂ PO ₄	2.000 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.925 g

Vitaminas (100x)

Para 1 ml:

Mioinositol	5 g
Niacina	0.05 g
Piridoxina	0.05 g
Tiamina	0.5 g

Micronutrientes (100x):

Para un litro:

MnSO ₄ .H ₂ O	500 mg
H ₃ BO ₃	150 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	100 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12.5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.25 mg
CoCl ₂ .6H ₂ O	1.25 mg

Fe-Na EDTA:

Para 500 ml:

Na-EDTA	18.65 mg
FeSO ₄ .7H ₂ O	13.9 mg

Se añadieron 5 ml por 100ml del medio. Se esterilizó el medio por filtración.

Para un litro de medio:

Macronutrientes 1:	100ml
Macronutrientes 2:	100ml
Micronutrientes:	10ml
Vitaminas:	10ml
Quelato de hierro:	50ml
Sacarosa:	130g

Por último el medio se esterilizó por filtración.

8.3. Método de cultivo.

Tras los distintos pretratamientos se aisló el polen aplastando los botones florales o las anteras en medio B5 (utilizando alrededor de 20 botones florales por estadio de desarrollo) se filtró la solución para eliminar restos de anteras o de flores y enriquecer el medio en polen, se centrifugó a 1000 r.p.m durante 5 minutos, se eliminó el medio B5 y se añadió 1 ml del medio NLN o AT3. Se mezcló la solución y se vertió sobre una placa Petri estéril muy pequeña (35/10mm), se sellaron las placas dos veces con parafilm y se dejaron dos semanas en la cámara del cultivo a 25°C en oscuridad. El seguimiento de este cultivo se hizo en el microscopio invertido tomando pequeñas alícuotas (100 µl) y tiñéndolas con DAPI como se indicó más arriba.

RESULTADOS

1. Relación tamaño del botón floral estadio de desarrollo

El estadio de desarrollo en el que se encuentra el polen cuando se aplican los distintos tratamientos para inducir la androgénesis es un factor determinante del éxito en dicha inducción. Para facilitar la selección de los botones florales cuyas anteras o polen aislado van a ser cultivados, fue necesario establecer, en las dos plantas de este estudio (guisante y arabidopsis), la relación entre el tamaño del botón floral y el estadio de desarrollo del polen que contiene. Para establecer el estadio de desarrollo del polen se usó la tinción con DAPI en aplastado. El DAPI se une al DNA, permitiendo, así, determinar la posición del núcleo y el estado de condensación de la cromatina en los distintos estadios de desarrollo (Tablas 3 y 4).

Aplastando las anteras de las dos plantas tras la tinción con DAPI se observó que los granos de polen de guisante eran elípticos y unas 3 veces más grandes que los de arabidopsis que tenían una forma más redondeada (Figs.2 y 3).

Tanto en guisante como en arabidopsis en el estadio de célula madre del polen se observan grandes núcleos en el centro de la célula con la cromatina fuertemente condensada. Dichas células están muy conectadas entre sí y no es fácil dispersarlas a pesar del aplastamiento (Fig. 2a). En el estadio de tetrada se observan los núcleos de las cuatro células aunque no están en el mismo plano de enfoque. Los núcleos tienen la cromatina muy condensada, y la intensidad de fluorescencia que presentan es bastante similar en todos ellos (Fig. 2b). En el estadio de microspora recién liberada o microspora joven, el núcleo ocupa una posición central y la cromatina aparece más descondensada que en el estadio anterior (Figs. 2c y 3a). En el estadio de microspora vacuolada, el núcleo se observa en la periferia y una gran vacuola ocupa una gran parte del citoplasma (Fig. 2d y 3b). En el estadio de polen bicelular joven, después de la primera división mitótica, se observan dos núcleos: el vegetativo que ocupa una posición más central en la célula vegetativa, y que presenta una cromatina dispersa y el núcleo generativo que se encuentra en la periferia, y que presenta una mayor intensidad de fluorescencia (Figs. 2e y 3c). En el estadio de polen bicelular medio el núcleo vegetativo aparece en el centro de la célula vegetativa y el generativo se observa próximo al anterior y también en el centro del grano de polen (Fig. 2f). En el estadio de polen bicelular maduro el núcleo generativo presenta una intensa fluorescencia, signo de una gran condensación cromatínica, sigue ocupando una posición central al lado del

Para guisante:	
Tamaño del botón floral	Estadio de desarrollo del polen
2 a 3 mm	Célula madre del polen
± 4 mm	Tetrada
5 a 6 mm	Microspora recién liberada
± 7 mm	Microspora vacuolada
8mm	Polen bicelular joven
9 a 10 mm	Polen bicelular medio
≥ 10 mm	Polen bicelular maduro

Tabla. 3: Relación tamaño botón floral / Estadio de desarrollo del polen para guisante.

Para arabidopsis:	
Tamaño del botón floral	Estadio de desarrollo del polen
0.2 a 0.3 mm	Célula madre del polen
0.3 a 0.4 mm	Tetrada
0.4 a 0.6 mm	Microspora recién liberada
0.6 a 0.7 mm	Microspora vacuolada
0.7 a 0.9 mm	Polen bicelular joven
0,9 a 1,1 mm	Polen bicelular medio
≥ 1.1 mm	Polen maduro (tricelular)

Tabla 4: Relación tamaño botón floral / estadio de desarrollo del polen para arabidopsis.

núcleo vegetativo y presenta un aspecto alargado en forma de huso. El núcleo vegetativo es más redondeado, de mayor tamaño y su cromatina tiene una muy baja intensidad de fluorescencia (Figs. 2g y 3d).

En el caso de *arabidopsis*, se observa además el polen maduro tricelular (Fig. 3e) que resulta de una segunda división mitótica de la célula generativa antes de la formación del tubo polínico. En este estadio se ven el núcleo vegetativo y dos núcleos espermáticos más fluorescentes. En el polen de guisante esta división tiene lugar después de la formación del tubo polínico.

En las tablas 3 y 4 se relacionan, para guisante y *arabidopsis*, los tamaños de los botones florales y los estadios de desarrollo del polen que contienen.

Cuando las plantas por cualquier accidente, como el ataque de una enfermedad o plaga o una fluctuación drástica en la temperatura de cultivo, no crecen en condiciones óptimas, el tamaño de los botones florales, con polen en un determinado estadio de desarrollo, se reduce de 2 a 3 mm, en el caso de guisante, y 0.1 a 0.2 mm, en el caso de *arabidopsis*.

2. Caracterización de las fases clave del desarrollo para la inducción de la androgénesis

En paralelo al estudio que se realizó mediante la tinción con DAPI se estudió también la estructura y ultraestructura de los granos de polen mediante microscopía óptica y electrónica en secciones de anteras de guisante y *arabidopsis*.

Los cortes semifinos se estudiaron al microscopio óptico tras tinción con azul de toluidina y como marcadores de las distintas fases se estudiaron como referencia:

- La posición relativa del núcleo.
- Las vacuolas citoplásmicas: tamaño y disposición en el grano de polen.
- Las paredes celulares.

Los cortes ultrafinos se observaron al microscopio electrónico tras una tinción con uranilo-plomo y como marcadores de las distintas fases de desarrollo se consideraron:

- El núcleo: su posición relativa en el grano de polen, el grado de condensación de la cromatina y los cambios estructurales del nucleolo.
- El citoplasma: morfología y distribución de orgánulos del mismo en el grano de polen.
- Las paredes celulares.

En el **guisante** las **células madres del polen** al microscopio óptico son células poliédricas, con un gran núcleo en su centro que presenta una cromatina muy condensada y patentes nucleolos de estructura heterogénea (Fig. 4a). En los cortes semifinos de **tetradas** observamos de dos a tres células de tamaño y constituyentes celulares similares, unidas por una pared de calosa. En cada una de las microsporas de la tetrada se observa un núcleo en el centro de la célula que puede tener uno o dos nucleolos de estructura homogénea y aspecto compacto. En algunos casos dichos nucleolos presentan unas protuberancias. Alrededor de todos los núcleos, se observa un halo claro. Se pueden ver también en el citoplasma unos cuerpos de densidad semejante a la del nucleolo (Fig. 4b).

Al observar la tetrada al microscopio electrónico, se comprueba que en estadios tempranos, cuando rodeando a las microsporas en formación sólo se observa calosa y no hay signos de formación de primexina, el nucleoplasma presenta unas masas densas a los electrones de tamaño variable. El nucleolo o los nucleolos que se observan aparecen formados casi exclusivamente por componente fibrilar denso no siendo posible distinguir otros componentes nucleolares (componente granular, centros fibrilares o vacuolas). En tetradas más avanzadas se observa una cromatina muy condensada con nucleolos homogéneos algunos con cuerpos nucleares próximos o adosados a ellos. También el nucleoplasma muestra unos grupos de gánulos densos (Figs 4d y 4e). Rodeando al núcleo se distinguen varias capas de vesículas que corresponden al halo claro observado al microscopio óptico. (Figs 4c y 4d). El citoplasma es muy rico en ribosomas (Figs. 4c y 4d). Se ven también plastidios y otros orgánulos poco diferenciados junto con masas granulares de aspecto semejante al nucleolo que podrían corresponder a los cuerpos densos que se observan al microscopio óptico (Figs. 4c, 4d y 4f). En cuanto a la pared, conforme se observan tetradas más avanzadas, la primexina se hace más patente (Figs. 4c y 4d).

Durante el estadio de **microspora** el núcleo presenta al microscopio óptico una cromatina menos condensada que en el estadio anterior, el nucleolo sigue siendo bastante homogéneo y en el citoplasma, que es menos denso, desaparece el halo claro que rodeaba al núcleo y van surgiendo vacuolas que se van agrandando y unificando a medida que se avanza en este estadio de desarrollo (Fig. 5a). Al microscopio electrónico en la microspora joven o recién liberada en el citoplasma se observan todavía las vesículas que se veían en tetrada, la cromatina aparece condensada y el nucleolo ya no es tan homogéneo como en la tetrada. En la microspora vacuolada ya no se observan

prácticamente vesículas rodeando al núcleo y el nucleolo muestra grandes áreas claras que corresponden a vacuolas nucleolares de reactivación. La cromatina se va descondensando gradualmente y se observan cuerpos más o menos próximos al nucleolo que parecen corresponder a "coiled bodies" (Figs. 5c y 5d). El citoplasma es bastante laxo, las mitocondrias son pequeñas y los plastidos más diferenciados que en la tetraedra pero no se observan indicios de almidón en su interior. Las vacuolas citoplásmicas preresentan numerosos restos membranosos en su interior, ocupan una gran extensión del grano de polen y provocan un aumento del tamaño de la microspora (Fig. 5e). La exina está prácticamente formada presentando un tectum continuo y la intina también está más desarrollada que en la tetraedra (Figs. 5b, 5d y 5e).

Después de la división mitótica de la microspora vacuolada se forma el polen **bicelular joven**. En estos granos se observa, al microscopio óptico, una gran vacuola semejante a la de la microspora vacuolada, en uno de los polos del grano de polen. En el otro extremo se distingue un núcleo grande, correspondiente a la célula vegetativa, con la cromatina muy descondensada y el nucleolo muy denso. Este núcleo viene acompañado por una pequeña célula, la célula generativa, pegada a la pared en la que prácticamente no se distingue el citoplasma y que muestra un gran núcleo con la cromatina muy condensada y un nucleolo prominente y homogéneo (Fig. 6a). Al microscopio electrónico, se confirma que la pared de la célula generativa está conectada con la intina (Fig. 6b). El alto grado de condensación que presenta la cromatina en la célula generativa se hace bien patente comparado con el de la cromatina del núcleo vegetativo (Figs. 6b y 6c). Los nucleolos de las dos células son bien patentes y están formados por componente fibrilar denso y granular entremezclados (Figs 6a y 6b). En el citoplasma de la célula vegetativa se observan un gran número de ribosomas, retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y algunos lípidos. No se ven indicios de almidón en los plastidios (Figs. 6b, 6c y 6d). La pared está cada vez más completa mostrando el tectum de la exina grueso y continuo (Figs. 6b y 6c).

En el estadio de **polen bicelular medio**, al microscopio óptico, observamos que la célula generativa se despega de la intina mostrándose más hacia el centro del polen, quedando totalmente rodeada por su propia pared y presentando una morfología más o menos redondeada (Fig. 7a). El núcleo generativo sigue teniendo una cromatina bastante condensada que contrasta con la del núcleo vegetativo que es muy laxa. Los nucleolos son raramente visibles en la célula generativa mientras que en el núcleo vegetativo se mantienen de gran tamaño. En este estadio, podemos observar que

desaparecen las vacuolas y vesículas citoplásmicas que observábamos en el citoplasma del bicelular joven. Además, aquí se hace patente la presencia de almidón en los plastidios del citoplasma (Fig. 7a). Al microscopio electrónico se confirma la presencia del almidón y que la célula generativa está despegada de la intina (Fig. 7b y 7c). El citoplasma vegetativo es cada vez más rico en orgánulos, se observa mucho retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias y ribosomas. El citoplasma de la célula generativa aunque reducido a una estrecha banda alrededor del núcleo presenta también orgánulos bien diferenciados pero en mucha menor cantidad.

En el estadio de **polen maduro** al microscopio óptico se observa el núcleo vegetativo muy lobulado en el centro del grano de polen y la célula generativa en forma de huso muy próxima a él (Fig. 8a). El citoplasma vegetativo es muy rico en orgánulos su observación al microscopio electrónico demuestra la presencia de almidón dentro de los plastidos que se han diferenciado en amiloplastos (Figs 8b y 8c). Los núcleos de ambas células muestran muy claramente la gran diferencia en el grado de condensación de la cromatina que presentan. Es muy difícil encontrar nucleolos en este estadio porque su tamaño se reduce notablemente llegando prácticamente a desaparecer en el núcleo generativo (Fig. 8b).

En **arabidopsis** al microscopio óptico la **célula madre del polen** se caracteriza por un núcleo grande en el centro de la célula con la cromatina condensada y un nucleolo muy densamente teñido. En el citoplasma se ven unos cuerpos densos (Fig. 9a).

La **tetrada** al microscopio óptico se caracteriza por un gran núcleo en el centro de la célula con la cromatina bastante condensada. En el citoplasma se observan algunas vacuolas pero no aparece el halo claro que observamos alrededor del núcleo en guisante. En algunos casos son visibles las cuatro microsporas de la tetrada, en otros sólo se ven dos o tres pero siempre unidas por una pared de calosa (Fig. 9b). La observación de la tetrada al microscopio electrónico muestra un citoplasma muy rico en ribosomas, los orgánulos como plastidos, mitocondrias y dictiosomas no aparecen muy diferenciados. Las membranas internas de los plastidos se distinguen todavía y no hay rastros de almidón. En tetradas avanzadas se observa dentro de la calosa el inicio de la formación de una pared producida por la microsporas, la primexina, que evolucionará para formar la exina a lo largo del desarrollo del polen (Figs 9c y d).

Las microsporas recién liberadas de la pared de calosa o **microsporas jóvenes**, observadas al microscopio óptico, presentan un núcleo en el centro, algunas pequeñas

vacuolas y unos cuerpos densos en el citoplasma (Fig. 10a). Al microscopio electrónico se ve el núcleo con la cromatina descondensada. En el citoplasma los plastidos son cada vez más diferenciados. Se observan también muchos ribosomas y retículo endoplásmico rugoso (Fig 10b).

En el estadio de **microspora vacuolada**, al microscopio óptico, se ve una gran vacuola citoplásmica que resulta de la integración de las pequeñas vacuolas que observamos en el estadio anterior. Dicha vacuola hace que el núcleo se sitúe en la periferia y conduce a un aumento de tamaño en el polen (Fig. 10c). Al microscopio electrónico, el núcleo presenta una cromatina muy descondensada, el nucleolo está formado por componente granular entremezclado con el fibrilar. En el citoplasma los plastidos son más diferenciados y aparecen unas áreas claras en su interior que podrían ser los primeros signos de almidón. El retículo endoplásmico es también patente. Dentro de la vacuola del citoplasma se observan unas estructuras dispersas (Fig. 10d).

Observando el **polen bicelular joven** al microscopio óptico se distingue un núcleo grande con la cromatina poco condensada en el centro del grano de polen y un núcleo generativo en la periferia (Fig. 11a). Al microscopio electrónico se observa que la célula generativa está rodeada por una pared que es continuación de la intina (Fig. 11b). El citoplasma de la célula vegetativa muy rico en ribosomas con algunas vesículas, gran cantidad de orgánulos bien diferenciados: amiloplastos, mitocondrias, dictiosomas y gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso. En la célula generativa el citoplasma también es muy rico en ribosomas. El núcleo de la vegetativa tiene la cromatina muy descondensada y el nucleolo presenta los componentes fibrilar denso y granular entremezclados. En cuanto a la pared, la exina está prácticamente completa y la intina también está formada (Fig. 11c).

En el **polen bicelular medio**, al microscopio óptico se observa que la célula generativa se ha despegado de la intina y ocupa una posición central en el citoplasma de la célula vegetativa. El núcleo de la célula vegetativa es redondeado y junto a él aparece la célula generativa con un perfil más irregular (Fig. 12a). La observación al microscopio electrónico muestra la presencia amiloplastos y pequeñas vacuolas en el citoplasma de la vegetativa que aparecen frecuentemente rodeando la célula generativa. El citoplasma tanto de la célula vegetativa como de la generativa es muy rico en ribosomas. En el núcleo generativo se hacen patentes numerosos gránulos inter y pericromatínicos, la cromatina no presenta un alto contraste, el nucleolo es homogéneo y en ocasiones presenta una protuberancia o algún cuerpo nuclear próximo (Fig 12b).

El polen maduro al microscopio electrónico muestra la cromatina de la célula vegetativa muy descondensada. El citoplasma de la misma presenta numerosos orgánulos bien diferenciados y es rico en almidón. La pared del polen está completamente formada en este estadio de desarrollo (Fig. 12c y 12 d).

Aunque existen numerosas similitudes en el desarrollo del polen de las dos plantas estudiadas la principal diferencia además del tamaño del polen es el tipo de pared que se forma en el polen de las dos especies. La pared de guisante tiene el tectum continuo mientras que la de *arabidopsis* es discontinua y más alta. En el citoplasma, otra diferencia es la distribución de las vesículas en los diferentes estadios de desarrollo, en la tetra de guisante aparecen alrededor del núcleo numerosas vesículas que no están presentes en la tetra de *arabidopsis* (Figs. 4 y 9). Algo semejante ocurre con las vesículas que rodean a la célula generativa en el polen bicelular de *arabidopsis* y no están presentes en guisante (Figs 11, 12, 7 y 8). En cuanto a la formación de amiloplastos en *arabidopsis* se observan en estadios más tempranos mientras que en guisante no se ponen de manifiesto hasta el estadio de polen bicelular medio. Por último mencionar que la segunda división mitótica tiene lugar en *arabidopsis* antes de la formación del tunbo polínico (polen tricelular) mientras que no ocurre así en guisante (polen bicelular) (Figs. 2 y 3).

3. Almidón en las distintas fases de desarrollo

Se ha propuesto (Sangwan y Sangwan-Norreel, 1987) que los plastidios pueden ser usados como marcadores de plantas androgénicas, en los estadios de tetra de microspora y polen bicelular joven, en especies androgénicas no es posible encontrar amiloplastos mientras que en especies recalcitrantes se distingue ya almidón en los plastidios de estos estadios. En este sentido, para tratar de determinar en qué estadios era posible detectar amiloplastos, además del estudio al microscopio óptico y electrónico, se aplicó la tinción de Thiery (Thiery, 1967) en cortes ultrafinos que es específica de polisacáridos. Se ha comprobado que tanto para guisante como para *arabidopsis* (Figs. 13a, 13b, 13c y 13d), no se ha podido distinguir la presencia de precipitado de plata en los plastidios en el estadio de tetra de microspora joven ni vacuolada. Las áreas claras que observábamos en microspora vacuolada en *arabidopsis* no se cubren de precipitado. En tetra de microspora el único precipitado visible es la fina capa que se forma en la incipiente pared de la tetra avanzada y en la intina de microspora. (Figs. 13a y 13b),

tampoco se ven indicios polisacáridicos en los plastidios del polen bicelular joven en guisante pero sí en *arabidopsis*. En polen bicelular medio y maduro el precipitado se hace bien evidente sobre los amiloplastos y en la pared del polen (Figs. 13c y 13d).

4. Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ*

Para tener una estimación relativa de la cantidad de ARN ribosómico presente en los distintos estadios de desarrollo y su distribución en los distintos componentes celulares se realizó la hibridación *in situ* al microscopio electrónico utilizando como sonda un ARN, sintetizado a partir de un clon de *Arabidopsis thaliana* que cubría la zona del 18S marcado con digoxigenina. La localización de la hibridación se realizó con anticuerpos antidigoxigenina unidos a partículas de oro coloidal de 15nm de diámetro.

En guisante en el estadio de tetrada se observó una marca muy abundante en las zonas ricas en ribosomas del citoplasma quedando libres de marcado las numerosas vesículas que rodean al núcleo. El nucleoplasma aparece escasamente marcado, en su interior se distinguen uno o dos nucleolos con muchos granos de oro y algunos cuerpos que a veces presentan señal de hibridación. En los nucleolos que tienen adosados cuerpos nucleares estas zonas no muestran señal de hibridación (Figs 14a, 14b y 14c).

En microspora el marcado es mucho más escaso en el citoplasma no presentando señal de hibridación ni mitocondrias ni plastidios; en el nucleoplasma se detectan apenas algunos granos de oro mientras que los nucleolos aparecen fuertemente marcados. La pared está libre de marca (Figs 15a y 15b).

En el polen bicelular tanto el citoplasma de la célula generativa como el de la vegetativa aparecen fuertemente marcados aunque de nuevo aparecen libres de marca las paredes, mitocondrias, plastidios y dictiosomas (Figs. 16a, 16b y 16c)

En *arabidopsis* en tetrada se observa una gran cantidad de señal en el citoplasma apareciendo libres de marcado las mitocondrias, plastidios y vesículas. Conforme avanza la tetrada se observa una ligera disminución de la señal de hibridación (Figs. 17a y 17b). En el núcleo se observa que el nucleolo está cubierto de granos de oro, el nucleoplasma presenta un escaso marcado y lo mismo ocurre con los cuerpos nucleares. La pared de calosa no presenta señal de hibridación independientemente de lo avanzada que sea la tetrada, cuando ya se observa la primexina ésta tampoco presenta señal de hibridación (Fig. 17b).

En microspora se observa un descenso en la señal de hibridación en el citoplasma comparado con la señal observada en las tetradas más tempranas. El nucleolo está cubierto de señal de hibridación y en la vacuola se ven unas estructuras con partículas de oro (Fig 18a). La pared no presenta marca (Fig. 18b).

En el polen bicelular se observa una abundante señal de hibridación tanto en el citoplasma de la célula vegetativa como en el de la generativa, las mitocondrias y amiloplastos no presentan señal de hibridación lo mismo que la pared que rodea a la célula generativa. En el núcleo el nucleolo se observa cubierto de señal de hibridación (Fig 18c).

5. Cultivo *in vitro* de anteras

Para evaluar los resultados del cultivo *in vitro* de anteras se realizó, en primer lugar, el seguimiento de las mismas mediante la observación, bajo la lupa estereoscópica, de las transformaciones obtenidas con la variedad Lincoln de guisante tras los 12 distintos cultivos (Tablas 1a y 1b, en el capítulo de Materiales y métodos). Las alteraciones que se detectaban eran: a) la formación de una protuberancia o callo en una de las tecas, b) la formación de un callo en el filamento, c) el aumento de su volumen, d) el oscurecimiento de una de las tecas hasta quedar marrón mientras que la otra quedaba del color original o e) el oscurecimiento de las dos tecas quedando la antera marrón (Fig. 19)

En paralelo se estudió mediante tinción con DAPI el polen que contenían dichas anteras para intentar establecer una relación entre las variaciones externas de la antera y lo que ocurría con el polen en su interior. Se pretendía encontrar un marcador de las anteras en las que se estaban produciendo divisiones androgénicas o, como mínimo, encontrar un signo externo de que en un determinado tipo de antera se habían muerto los granos o no estaban sufriendo ningún cambio. En cada experimento los resultados se recogieron en tablas como la Tabla 5 (Tablas 5a y 5b). No se observó ninguna relación entre estos dos parámetros en guisante puesto que se encontraron polinucleados en anteras que a veces estaban marrones o no tenían alteraciones en el color y en anteras con el mismo aspecto externo que las citadas no había granos de polen que hubieran sufrido divisiones. Así, en la variedad Lincoln de guisante se encontraron polinucleados en anteras marrones mientras que en *arabidopsis* los polinucleados se observaron en anteras con una teca marrón y otra amarilla y los del ecotipo C24 aparecieron en anteras cuyo tamaño había

	Tetrada	Microspora joven	Microspora vacuolada	Polen bicelular joven	Polen medio	Polen maduro
Cultivo 1	10 Anteras cultivadas Callo en teca: 4 Mayor tamaño: 6	40 Anteras cultivadas Callo en teca: 2 Callo en filamento: 7 Mayor tamaño: 9 T. amarilla/marron: 4 Anteras marrones: 13 Ningún cambio: 5	15 Anteras cultivadas Callo en filamento: 10 Mayor tamaño: 9 Ningún cambio: 5	20 Anteras cultivadas Callo en teca: 2 Callo en filamento: 5 Ningún cambio: 13	28 Anteras cultivadas Callo en teca: 4 Anteras marrones: 16 Ningún cambio: 8	36 Anteras cultivadas Callo en filamento: 30 Ningún cambio: 6
Cultivo 2	19 Anteras cultivadas Callo en filamento: 13 Mayor tamaño: 4 Ningún cambio: 2	34 Anteras cultivadas Callo en filamento: 6 Mayor tamaño: 7 T. amarilla/marron: 7 Anteras marrones: 3 Ningún cambio: 11	31 Anteras cultivadas Callo en filamento: 7 Mayor tamaño: 6 T. amarilla/marron: 4 Anteras marrones: 9 Ningún cambio: 5	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	16 Anteras cultivadas Ningún cambio: 16	32 Anteras cultivadas Ningún cambio: 32
Cultivo 3	34 Anteras cultivadas Callo en teca: 1 Callo en filamento: 9 Mayor tamaño: 6 T. amarilla/marron: 3 Anteras marrones: 6 Ningún cambio: 9	30 Anteras cultivadas Callo en filamento: 9 Mayor tamaño: 3 T. amarilla/marron: 3 Anteras marrones: 12 Ningún cambio: 3	25 Anteras cultivadas Callo en filamento: 3 Mayor tamaño: 6 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 9 Ningún cambio: 5	30 Anteras cultivadas Ningún cambio: 30	25 Anteras cultivadas Ningún cambio: 25	13 Anteras cultivadas Ningún cambio: 13
Cultivo 4	24 Anteras cultivadas Callo en teca: 3 Callo en filamento: 7 Mayor tamaño: 5 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 7	27 Anteras cultivadas Anteras marrones: 21 Ningún cambio: 6	23 Anteras cultivadas Callo en filamento: 7 Anteras marrones: 16	17 Anteras cultivadas Ningún cambio: 17	22 Anteras cultivadas Ningún cambio: 22	24 Anteras cultivadas Ningún cambio: 24
Cultivo 5	35 Anteras cultivadas Callo en filamento: 17 Mayor tamaño: 18	26 Anteras cultivadas Callo en teca: 8 Callo en filamento: 12 Ningún cambio: 6	27 Anteras cultivadas Callo en teca: 16 Callo en filamento: 5 Mayor tamaño: 2 Ningún cambio: 4	16 Anteras cultivadas Callo en filamento: 5 Ningún cambio: 11	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	15 Anteras cultivadas Ningún cambio: 15
Cultivo 6	20 Anteras cultivadas Callo en filamento: 6 Mayor tamaño: 4 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 5 Ningún cambio: 3	23 Anteras cultivadas Callo en filamento: 6 Mayor tamaño: 2 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 8 Ningún cambio: 5	30 Anteras cultivadas Callo en filamento: 5 Mayor tamaño: 8 T. amarilla/marron: 3 Anteras marrones: 10 Ningún cambio: 4	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	16 Anteras cultivadas Ningún cambio: 16	23 Anteras cultivadas Ningún cambio: 23
Cultivo 7	10 Anteras cultivadas Ningún cambio: 10	20 Anteras cultivadas Callo en teca: 10 Anteras marrones: 8 Ningún cambio: 2	25 Anteras cultivadas Callo en teca: 19 Ningún cambio: 6	23 Anteras cultivadas Ningún cambio: 23	25 Anteras cultivadas Ningún cambio: 25	21 Anteras cultivadas Ningún cambio: 21
Cultivo 8	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	21 Anteras cultivadas Callo en filamento: 12 Mayor tamaño: 6 Anteras marrones: 6	31 Anteras cultivadas Callo en filamento: 6 Mayor tamaño: 9 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 11 Ningún cambio: 3	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	16 Anteras cultivadas Ningún cambio: 16	27 Anteras cultivadas Ningún cambio: 27

Tabla 5a: Cambios de aspecto sufridos por la antera de guisante al cultivarla en medio sólido.

	Tetrada	Microspora joven	Microspora vacuolada	Polen bicelular joven	Polen medio	Polen maduro
Cultivo 9	26 Anteras cultivadas Ningún cambio: 26	20 Anteras cultivadas Callo en teca: 11 Callo en filamento: 9	30 Anteras cultivadas Callo en teca: 14 Callo en filamento: 12 Ningún cambio: 4	23 Anteras cultivadas Callo en teca: 11 Callo en filamento: 9 Ningún cambio: 3	18 Anteras cultivadas Ningún cambio: 18	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20
Cultivo 10	23 Anteras cultivadas Ningún cambio: 23	21 Anteras cultivadas Callo en filamento: 3 Mayor tamaño: 6 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 9 Ningún cambio: 1	27 Anteras cultivadas Callo en filamento: 4 Mayor tamaño: 8 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 10 Ningún cambio: 3	30 Anteras cultivadas Callo en filamento: 11 Mayor tamaño: 13 Anteras marrones: 4 Ningún cambio: 2	15 Anteras cultivadas Ningún cambio: 15	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20
Cultivo 11	26 Anteras cultivadas Ningún cambio: 26	26 Anteras cultivadas Callo en teca: 9 Callo en filamento: 5 Anteras marrones: 6 Ningún cambio: 6	35 Anteras cultivadas Callo en teca: 21 Callo en filamento: 8 Ningún cambio: 6	20 Anteras cultivadas Callo en teca: 10 Callo en filamento: 7 Ningún cambio: 3	17 Anteras cultivadas Ningún cambio: 17	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20
Cultivo 12	30 Anteras cultivadas Ningún cambio: 30	21 Anteras cultivadas Callo en teca: 1 Callo en filamento: 8 Mayor tamaño: 3 Ningún cambio: 4	27 Anteras cultivadas Callo en filamento: 4 Mayor tamaño: 7 T. amarilla/marron: 2 Anteras marrones: 10 Ningún cambio: 4	30 Anteras cultivadas Callo en filamento: 16 Mayor tamaño: 7 Anteras marrones: 5 Ningún cambio: 2	20 Anteras cultivadas Ningún cambio: 20	25 Anteras cultivadas Ningún cambio: 25

Tabla 5b. Los cambios de aspecto sufridos por la antera de guisante tras su cultivo en medio líquido.

aumentado considerablemente. Por ello se realizó el seguimiento de los cultivos con las otras variedades de guisante y con arabidopsis sólo mediante el estudio con DAPI.

Para confirmar que en arabidopsis tampoco se cumplía esta relación se seleccionaron dos tipos de cultivos utilizando el ecotipo Col 4, uno en el que se obtenían granos polinucleados (cultivo 3) y otro en el que no se observaban (cultivo 9), y se siguieron las variaciones con la lupa estereoscópica (Tabla 6). En estos casos tampoco se pudo establecer ninguna relación.

Otros aspectos que consideramos también, a la vista de estas tablas, fueron la posible relación entre: a) la alteración externa producida en la antera y el estadio de desarrollo del polen del que se partía o b) la alteración externa observada y el tipo de cultivo aplicado. Considerando las Tablas 5a y 5b que eran semejantes a las obtenidas en otras repeticiones se observa que en guisante cuando se parte de polen bicelular y se cultivan las anteras en medio sólido lo más frecuente es que no se detecten variaciones externas (cultivos 1 a 8, Tabla 5a), si se cultivan en medio líquido ocurre prácticamente lo mismo salvo para el polen bicelular joven que sí sufre variaciones (cultivos 9 a 12, Tabla 5b). En el estadio de tetrađa no se producen variaciones externas de la antera cuando los cultivos se realizan en medio líquido (cultivos 9 a 12, Tabla 5b) y en cultivo en medio sólido cuando se aplicaban variaciones drásticas en hormonas, la sustitución de NAA por 2,4-D o el aumento de la concentración de kinetina (cultivos 7 y 8, Tabla 5a).

Cuando se parte de cultivo de microsporas es cuando más cambios externos en la antera se observan, la formación de callos predomina en tratamientos con 2,4D (cultivos 5 y 7, en medio sólido, y cultivo 11, en medio líquido, Tabla 5a). En medio líquido, se forman también preferentemente callos cuando se aplican combinados los choques de frío y luz (cultivo 9, Tabla 5b).

En cuanto a arabidopsis tras el cultivo de microsporas predomina la formación de callos en unas condiciones en las que en guisante predominaban, para este estadio, los cambios de color aunque también se formaban callos (cultivo 3, Tabla 6). Para el cultivo en medio líquido de anteras con polen en el estadio de microspora joven predominaba el cambio de color y para vacuolada la aparición de callos en el filamento (cultivo 9, Tabla 6).

En cuanto al análisis del cultivo, observamos que, independientemente del estadio de partida, los cultivos que preferentemente inducen callos son el 5, 7, 9 y 11 en guisante,

	Tetrada	Microspora joven	Microspora vacuolada	Polen bicelular joven	Polen medio	Polen maduro
Cultivo 3	12 Anteras cultivadas Callo en filamento: 8 Ningún cambio: 4	15 Anteras cultivadas Callo en filamento: 11 Ningún cambio: 4	21 Anteras cultivadas Callo en filamento: 15 Anteras marrones: 4 Ningún cambio: 2	30 Anteras cultivadas Callo en teca: 6 Callo en filamento: 18 Anteras marrones: 6	16 Anteras cultivadas Callo en teca: 8 Callo en filamento: 4 T. amarilla/marron: 4	20 Anteras cultivadas Callo en teca: 4 Callo en filamento: 8 Anteras marrones: 8
Cultivo 9	16 Anteras cultivadas Callo en filamento: 11 Ningún cambio: 5	24 Anteras cultivadas Anteras marrones: 18 Ningún cambio: 6	28 Anteras cultivadas Callo en filamento: 20 Ningún cambio: 8	31 Anteras cultivadas Callo en teca: 16 Mayor tamaño: 12 Ningún cambio: 3	18 Anteras cultivadas Ningún cambio: 18	21 Anteras cultivadas Ningún cambio: 21

Tabla 6. Los cambios sufridos por la antera del ecotipo Col 4 de arabidopsis tras su cultivo en medio sólido y líquido.

es decir tres cultivos en los que se añade 2,4-D y el que se hace en medio líquido con las dos combinando choque frío a los botones y de luz a las anteras (Tablas 5a y 5b).

En *arabidopsis* en los dos casos recogidos predominaban los callos (cultivos 3 y 9, Tabla 6).

Después de los estudios con DAPI observamos que después de aplicar los distintos tratamientos de cultivo a los distintos genotipos se producían granos de polen polinucleados solamente en la variedad Lincoln de guisante y en los ecotipos col 4 y C24 de *arabidopsis*.

Los pretratamientos más eficaces para las dos plantas han sido la combinación del choque frío a los botones florales y el choque de luz a las anteras (Tabla 7).

En cuanto al medio de cultivo, los mejores resultados se han obtenido tanto para *arabidopsis* como para guisante con los que contetenían una combinación de NAA/kinetnina $8\text{mg.l}^{-1} / 0.1\text{mg.l}^{-1}$ (Tabla 7).

Hemos estudiado también el factor: pretratamiento de choque. Así, sometimos los botones florales a un choque frío a 4°C durante 24 horas. A veces hemos combinado el choque frío con un choque de luz sometiendo las anteras ya cultivadas a un choque de luz de 24 horas.

Los polinucleados de guisante encontrados tenían núcleos con distinta intensidad de fluorescencia observándose uno con fluorescencia más intensa en uno de los extremos del grano mientras que los otros, de menor intensidad, se distinguían más en el centro del grano de polen (Fig. 20a). En cambio, los polinucleados de *arabidopsis*, presentaban núcleos con una intensidad de fluorescencia parecida (Fig. 20b).

Los polinucleados de guisante sese obtuvieron cuando se cultivaban anteras de la variedad Lincoln en fase de tetrada o microspora joven aplicando el cultivo 3 (botones florales a 4°C durante 24 horas, anteras choque luminoso durante 24 horas, medio con NAA y la kinetina $8\text{mg.l}^{-1} / 0.1\text{mg.l}^{-1}$) donde se obtenían preferentemente cambios de color (antera marrón). En las otras variedades de guisante, los granos se mostraban como vacíos, la mayoría de los núcleos no presentaban apenas fluorescencia, mientras que en otros granos los núcleos no presentaban variación del estadio de partida. En el mutante SGE se observaron granos con dos núcleos con la misma intensidad de fluorescencia (Figs. 20b y 20c).

Guisante:

- Variedad: Lincoln y mutante SGE.
- Estadio de partida: Tetrada o microspora joven.
- Choque antes de siembra: Botones florales a 4°C durante 24 horas.
- Choque después de la siembra: Choque de luz para anteras durante 24 horas.
- Auxina / Citoquinina: 8/0.1 mg.l⁻¹

Arabidopsis:

- Ecotipos: Col 4 y C 24.
- Estadio de partida: Microspora vacuolada.
- Choque antes de la siembra: Botones florales a 4°C durante 24 horas.
- Choque después de la siembra: Choque de luz para anteras durante 24 horas.
- Auxinas / Citoquininas: 8/0.1 mg.l⁻¹

Tabla 7: Condiciones de obtención de polinucleados al cultivar anteras de guisante y arabidopsis en medio sólido.

6. Cultivo *in vitro* de polen aislado

Para realizar el cultivo de polen aislado se partió de las variedades y ecotipos que habían producido ya algún indicio de divisiones distintas de las gametofíticas. No probándose, en principio, los genotipos que no habían respondido en el cultivo de anteras. Además, dado que para obtener una cantidad razonable de polen había que tomar anteras de más de alrededor de 10 a 15 flores a veces se encontraban mezclas de pólenes en estadios próximos por lo que se consideraba polen de dos grupos: tetradra/microspora joven, microspora vacuolada/ polen bicelular. Por eso se cultivaron la variedad Lincoln de guisante y los ecotipos Col 4 y C 24 de arabidopsis utilizando siempre medio líquido y variando los pretratamientos aplicados al botón floral, a la antera o a las microsporas una vez aisladas (Tabla 2).

Los resultados fueron analizados tomando 100 μ l de polen aislado inmediatamente después de los distintos pretratamientos y estudiándolos tras la tinción con DAPI.

Los pretratamientos de choque aplicados antes del cultivo de polen aislado aparecen detallados en el capítulo materiales y métodos (Tabla 2).

Para guisante, al someter los botones florales a un choque frío a 4°C durante 5 días (pretratamiento 1, Tabla 2), partiendo de los estadios de tetradra y microspora joven (Fig 21 a) hemos observado, al teñir los granos con DAPI, granos con la cromatina más descondensada (Figs. 21b y 21c) divisiones simétricas con núcleos con un alto grado de condensación cromatínica (Figs. 21d y 21e) y polinucleados con los núcleos con una intensidad de fluorescencia semejante (Fig 21f). Partiendo de los estadios microspora vacuolada y polen bicelular Fig. 22a), hemos observado unas divisiones anómalas con puentes cromosómicos (Fig. 22b) y dos polos de división (Fig 22c). Además, hemos observado divisiones simétricas (Fig 22 d) y unos polinucleados que presentaban una intensidad de fluorescencia parecida (Figs. 22e y 22f) (Tabla 8).

Cuando se combina el choque frío con el de calor y ayuno (pretratamiento 2, Tabla 2) (botones florales a 4°C durante 5 días, anteras a 33°C en medio de ayuno durante 6 días) y se parte de tetradra y microspora joven observamos unos polinucleados que presentaban una intensidad de fluorescencia semejante (Figs. 23a, 23b, 23c, 23d 23e y 23f). Con el mismo pretratamiento pero partiendo de microspora vacuolada y polen bicelular se observan también polinucleados con los núcleos con intensidad de fluorescencia muy parecida (Figs. 24a, 24b y 24c) (Tabla 8).

Guisante:

- Variedad: Lincoln.
- Pretratamiento: 1.
- Estadio de partida: Tetrada y microspora joven; microspora vacuolada y polen bicelular.
- Choque antes del cultivo: Botones florales 5 días a 4°C.
- Choque después del cultivo: ninguno.
- Medio de cultivo: AT3 con 13% de sacarosa.

- Variedad: Lincoln.
- Pretratamiento: 2.
- Estadio de partida: Tetrada y microspora joven; microspora vacuolada y polen bicelular.
- Choque antes del cultivo: Botones florales 5 días a 4°C.
- Choque después del cultivo: Anteras a 33°C durante 6 días en medio B5 de ayuno.
- Medio de cultivo: AT3 con 13% de sacarosa.

Tabla 8: Condiciones de obtención de polinucleados en cultivo de polen aislado en la variedad Lincoln.

Aplicando los otros pretratamientos (Tabla 2) a los dos grupos de flores de guisante o se perdía la fluorescencia o se observaban granos con núcleos semejantes a los observados en el control.

Con arabidopsis, ecotipos Col 4 y C24, no se observaron cambios que indicaran la presencia de divisiones androgénicas, en la mayoría de los casos los granos estaban vacíos o los núcleos fluorescían como antes de cultivarlos. Debido a estos resultados negativos se probó también con el mutante pt de arabidopsis resultando también los resultados infructuosos.

Fig. 1: Fotos de guisante (*Pisum sativum* L.) y arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L.).

1a: Guisante variedad Lincoln.

1b: Arabidopsis mutante pt.



Fig. 1

Fig. 2: Tinción con DAPI para ADN en aplastados. Granos de polen de guisante en distintas fases de desarrollo observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente.

Fig. 2a: Células madres del polen dentro de la antera (Barra = 100 μ m). Los núcleos presentan una cromatina bastante condensada.

Fig. 2b: Tetradas (Barra = 10 μ m). Los núcleos presentan la cromatina muy condensada.

Fig. 2c: Microspora joven (Barra = 10 μ m). El núcleo ocupa una posición central y la cromatina está más descondensada que en el estadio anterior.

Fig. 2d: Microspora vacuolada (Barra = 10 μ m). El núcleo se observa en la periferia y la vacuola ocupa una gran parte del citoplasma.

Fig. 2e: Polen bicelular joven (Barra = 10 μ m). Se observan dos núcleos, uno vegetativo (NV) que ocupa una posición más o menos central en la célula vegetativa y que presenta una cromatina dispersa, y el núcleo generativo (NG) que está en la periferia y cuya cromatina fluoresce más.

Fig. 2f: Polen bicelular medio (Barra = 10 μ m). El núcleo vegetativo (NV) está en el centro de la célula vegetativa y el generativo (NG) está más próximo del vegetativo. Nótese la diferencia de fluorescencia entre la cromatina de los dos núcleos.

Fig. 2g: Polen bicelular maduro (Barra = 10 μ m). El núcleo generativo (NG) presenta una fluorescencia intensa y aparece con aspecto de huso. El núcleo vegetativo (NV) es más redondeado, de mayor tamaño y su cromatina fluoresce menos.

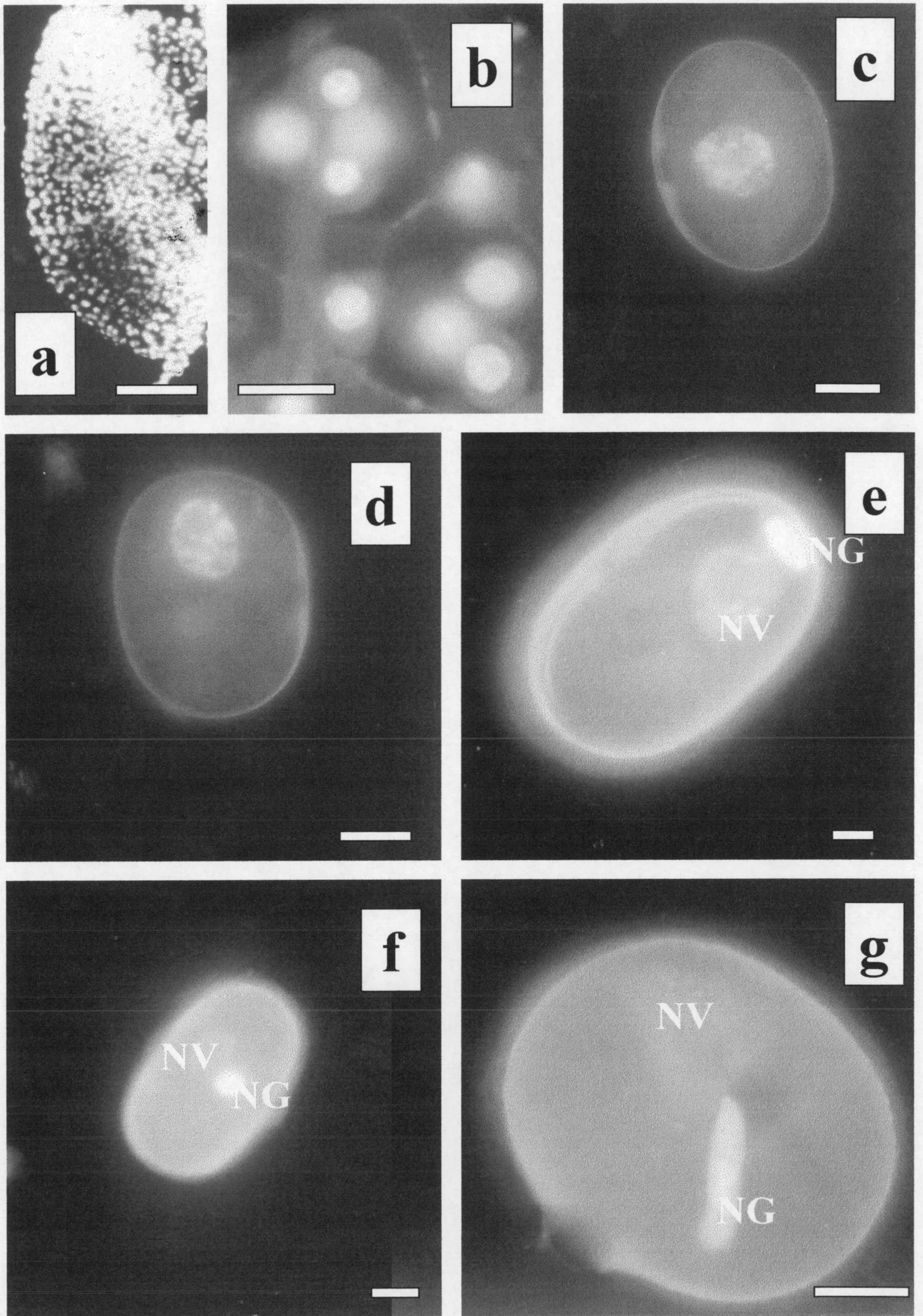


Fig. 2

Fig. 3: Tinción con DAPI para ADN en aplastados. Granos de polen de arabis en distintas fases de desarrollo observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente (Barra = 10µm).

Fig. 3a: Microspora joven. El núcleo ocupa una posición central.

Fig. 3b: Microspora vacuolada. El núcleo se observa en la periferia y la vacuola ocupa una gran parte del citoplasma.

Fig. 3c: Polen bicelular joven. Se observan dos núcleos, uno vegetativo (NV) que ocupa una posición más o menos central en la célula vegetativa y que presenta una cromatina dispersa, y el núcleo generativo (NG) que está en una periferia y cuya cromatina fluoresce más.

Fig. 3d: Polen bicelular medio. El núcleo vegetativo (NV) está en el centro de la célula vegetativa y el núcleo generativo (NG) está cerca del vegetativo. Observamos la diferencia de fluorescencia entre la cromatina de los dos núcleos.

Fig. 3e: Polen tricelular. El núcleo generativo (NG) del polen bicelular medio ya se ha dividido dando lugar a dos núcleos espermáticos (NE) que presentan una fluorescencia intensa. El núcleo vegetativo (NV) es de mayor tamaño y su cromatina fluoresce menos que la de los dos núcleos espermáticos.

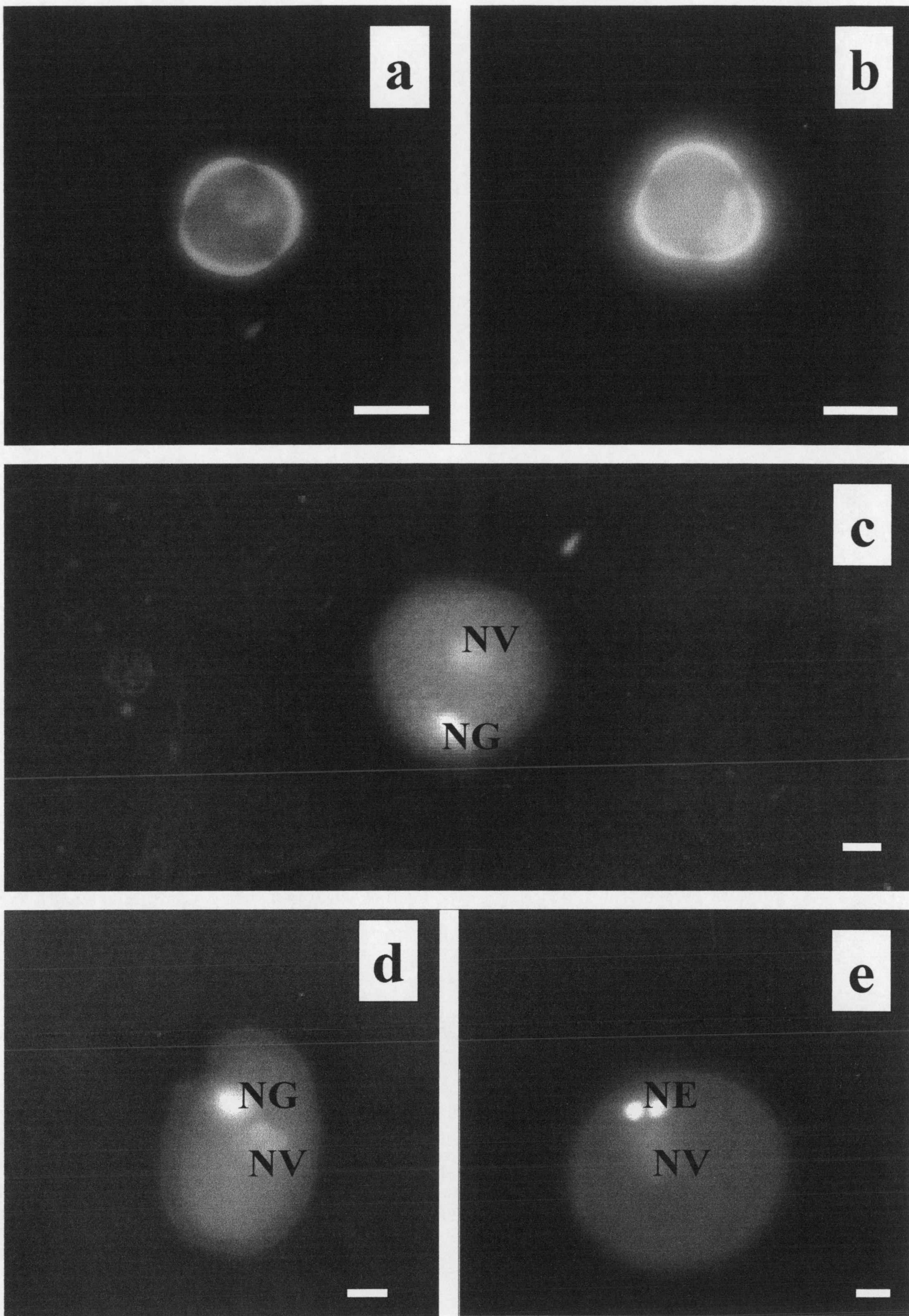


Fig. 3

Fig. 4: Células madres del polen y tetradas de guisante (Barras = 1µm).

Figs. 4a y 4b: Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico.

Fig. 4a: Células madres del polen que son poliédricas con un gran núcleo (N) en su centro que presenta una cromatina muy condensada y patentes nucleolos de estructura heterogénea.

Fig. 4b: Tetradas con dos o tres células de tamaño y constituyentes celulares similares, unidas por una pared de calosa (Ca). En cada microspora de la tetrada se observa un núcleo en el centro que puede tener uno o dos nucleolos (Nu). Alrededor de todos los núcleos se observa un halo claro (estrella negra). Algunos nucleolos presentan una protuberancia (estrella blanca). Se pueden ver también en el citoplasma unos cuerpos (flecha negra) de densidad semejante a la del nucleolo.

Figs. 4c, 4d, 4e y 4f: Cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb.

Fig. 4c: En estadios tempranos de tetrada de guisante, se observa la calosa (Ca) rodeando a las microsporas en formación. El nucleoplasma presenta unas masas densas a los electrones (flecha negra) y los nucleolos (Nu) aparecen formados casi exclusivamente por componente fibrilar denso.

Fig. 4d: Se observa una tetrada de guisante más avanzada que en 4c. El núcleo se presenta con una cromatina (Cr) muy condensada. Las protuberancias que se veían en el nucleolo al microscopio óptico se ven también al microscopio electrónico (estrella blanca). El núcleo se muestra rodeado de varias capas de vesículas (V). En cuanto a la pared se distingue la primexina se va (PE).

Fig. 4e: El núcleo se observa con la cromatina (Cr) condensada y gránulos de la región intercromatínica (flecha). Vesículas (V) en el citoplasma alrededor del núcleo.

Fig. 4f: Se observa un detalle del citoplasma (Cit), se ven los plastidios (P) poco diferenciados igual que los otros orgánulos citoplásmicos. Se ven también cuerpos en el citoplasma de aspecto semejante al nucleolo que podrían corresponder a los cuerpos densos observados al microscopio óptico (flechas blancas).

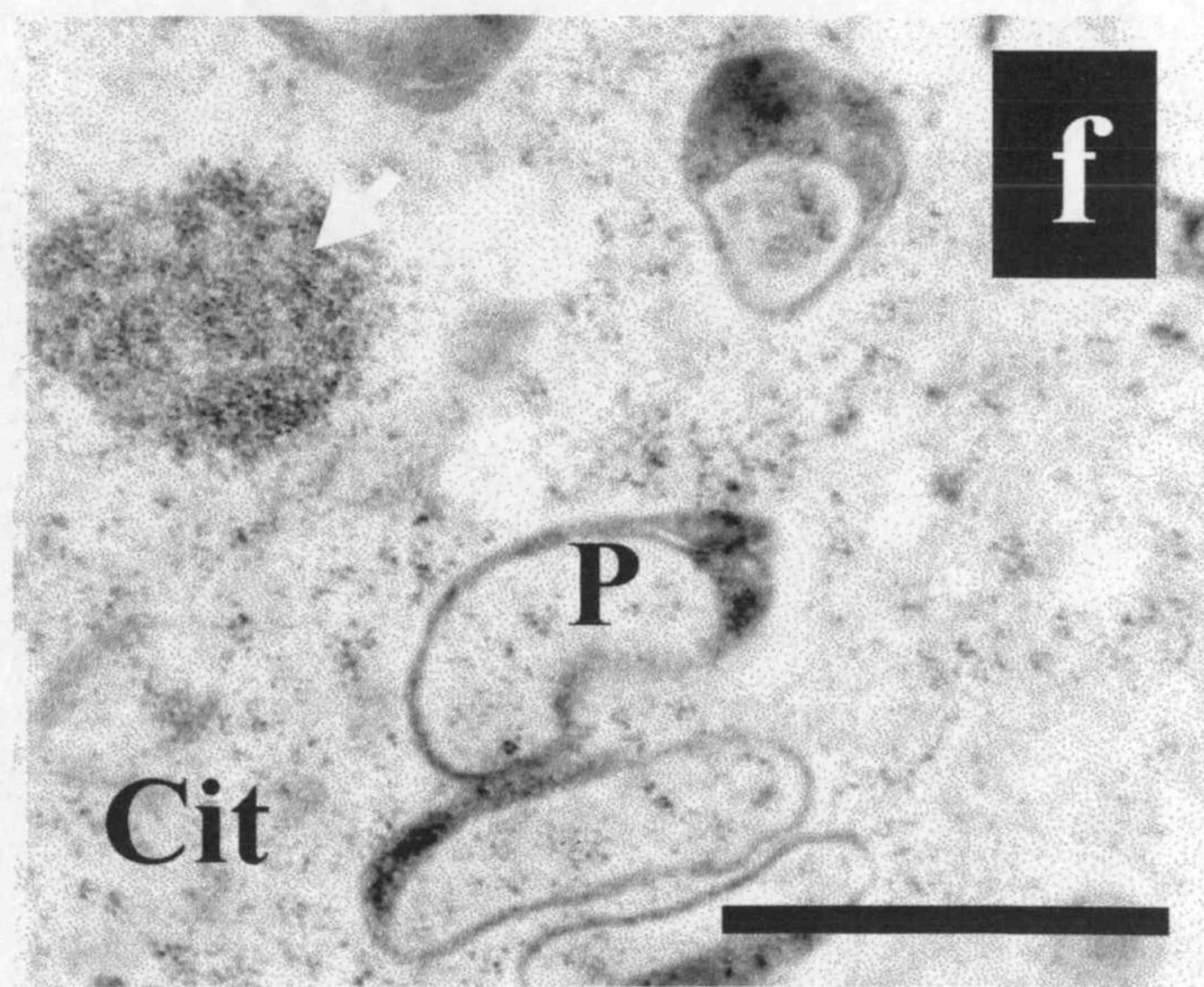
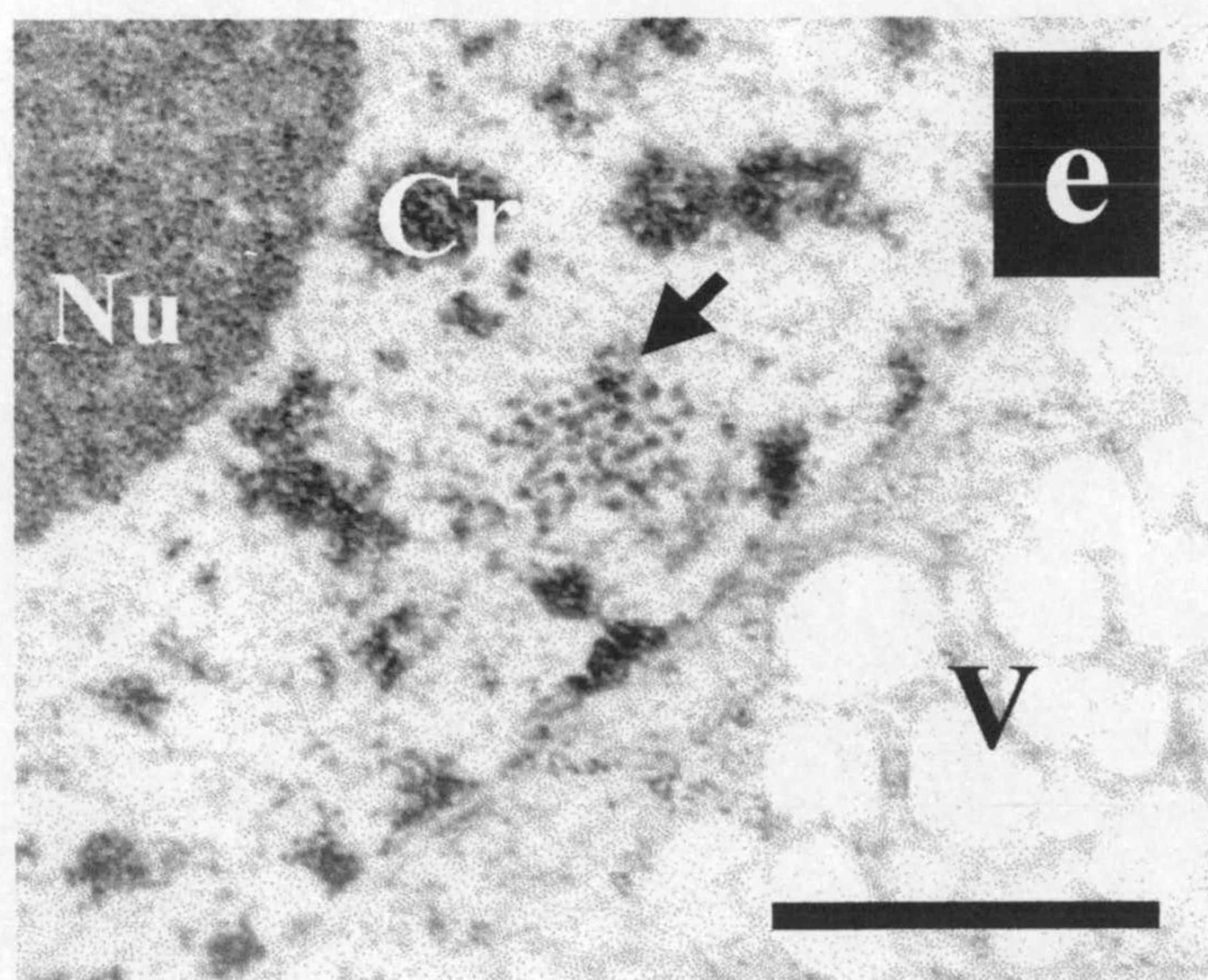
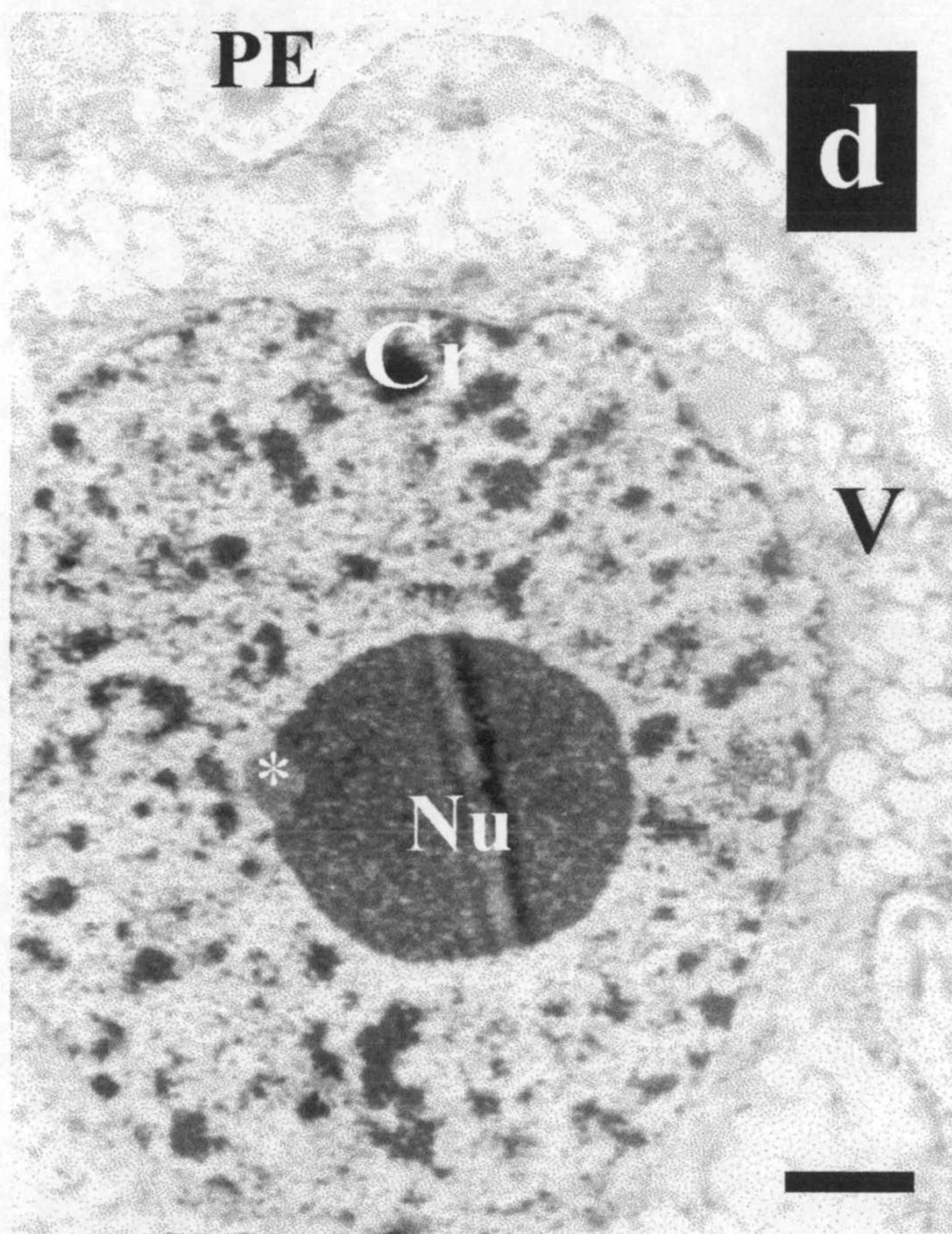
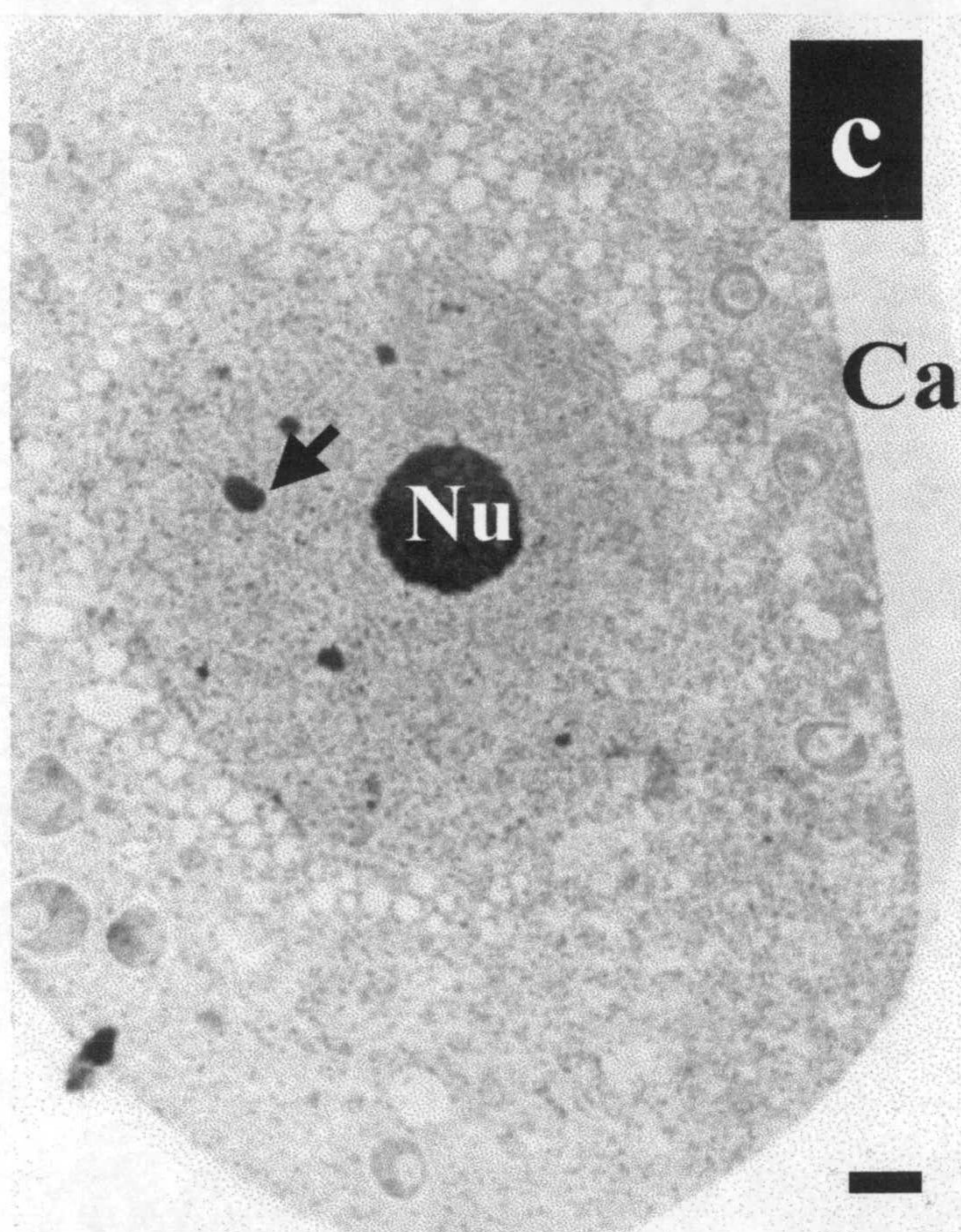
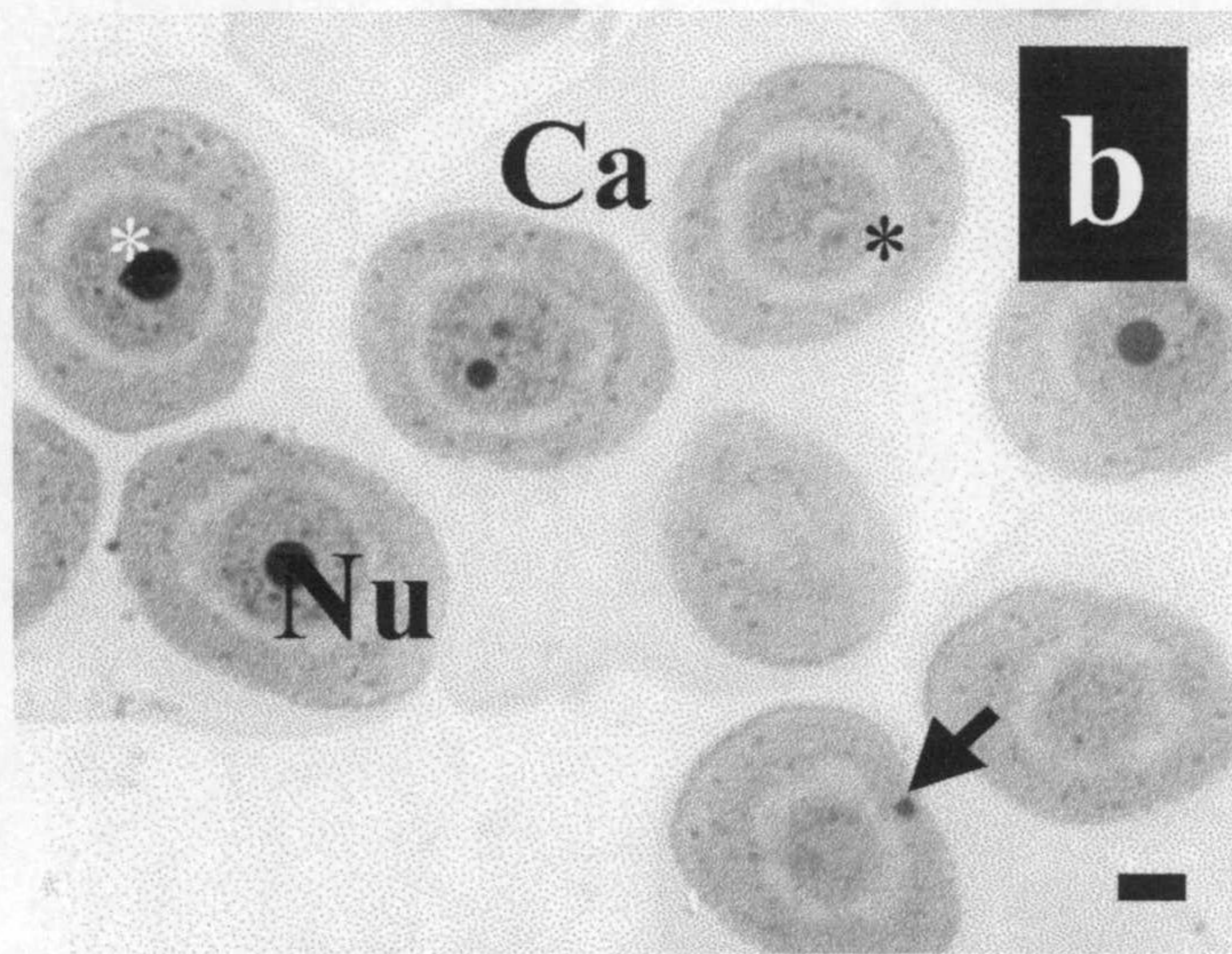
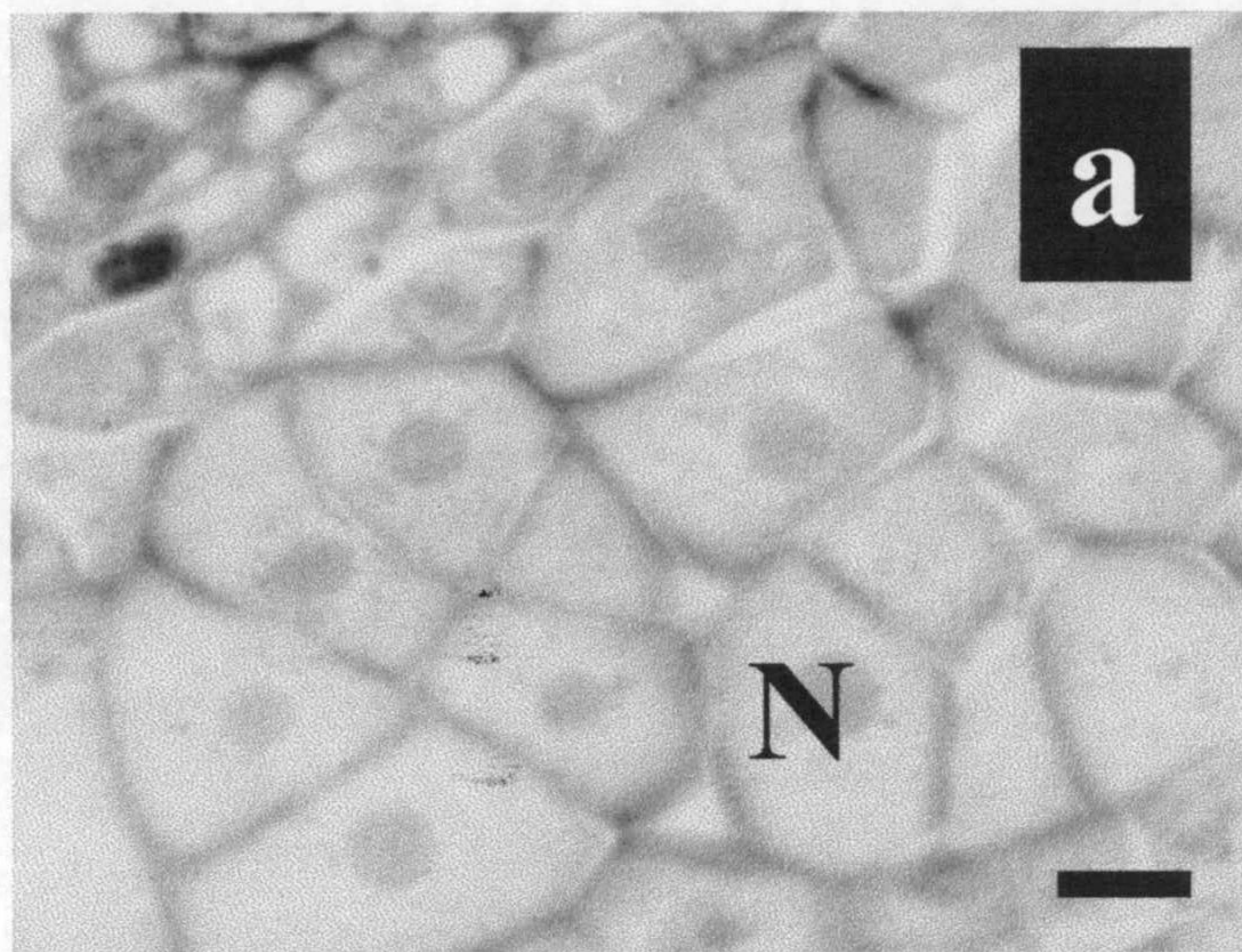


Fig. 4

Fig.5: Microspora vacuolada de guisante.

Fig. 5a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. Se observan las microsporas con el núcleo (N) en un polo de la célula (Barra = 10µm).

Figs. 5b, 5c, 5d y 5e: Cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra = 1µm).

Fig. 5b: La exina (E) está prácticamente formada presentando un tectum continuo. En el citoplasma (Cit) se observan numerosos orgánulos poco diferenciados. La cromatina (Cr) no está muy condensada.

Fig. 5c: La cromatina (Cr) está más descondensada que en el estadio anterior. En el citoplasma (Cit) las mitocondrias son pequeñas y los plastidios más diferenciados pero todavía no contienen almidón. El nucleolo (Nu) presenta una gran área clara (estrella negra).

Fig. 5d: El nucleolo presenta unas vacuolas (estrellas negras). También se observan unos cuerpos más o menos cerca del nucleolo que parecen corresponder a los "coiled bodies" (estrella blanca).

Fig. 5e: Vacuola citoplásmica (Va) con numerosos restos membranosos en su interior (flechas). Los plastidios son bastante diferenciados y la intina (I) que está más desarrollada.

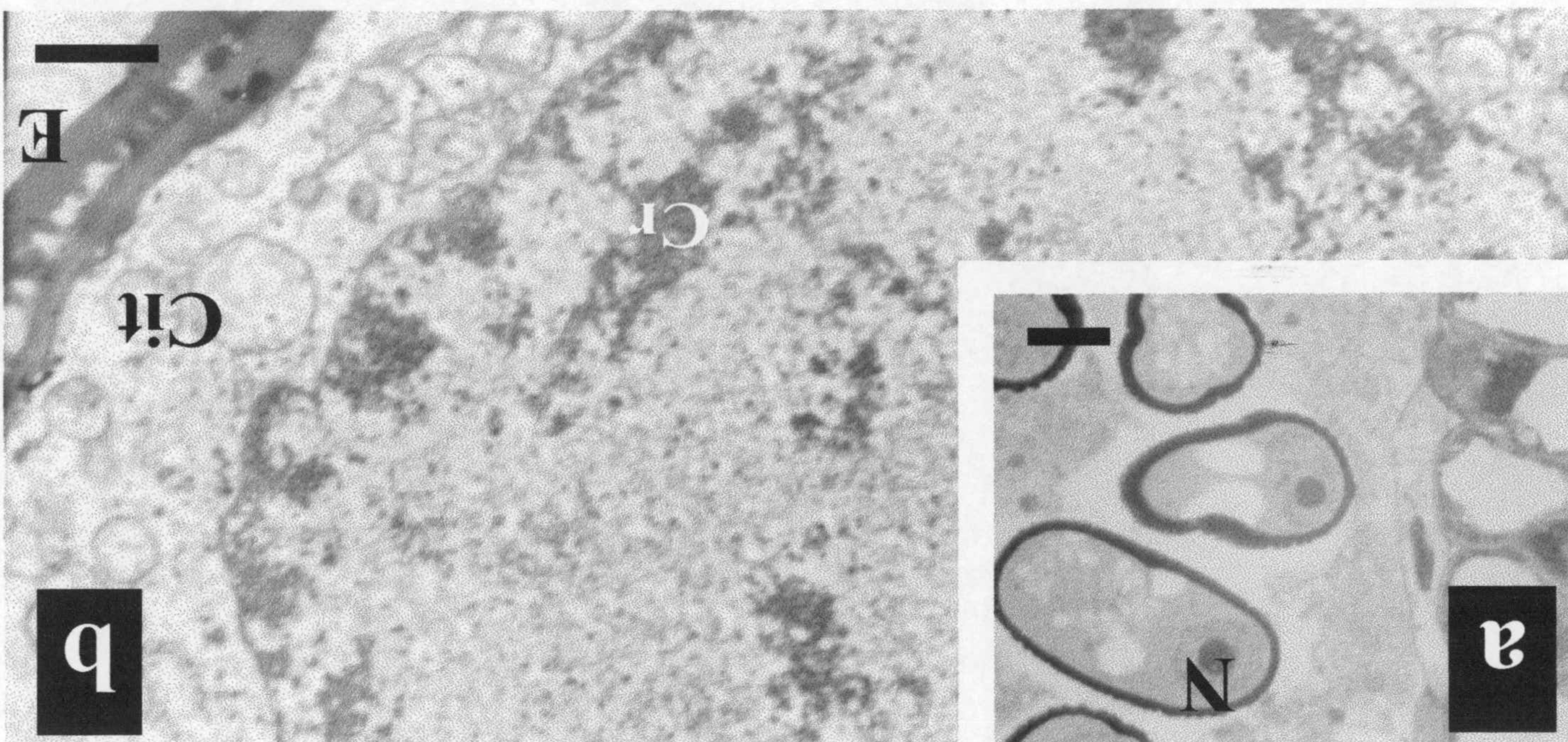
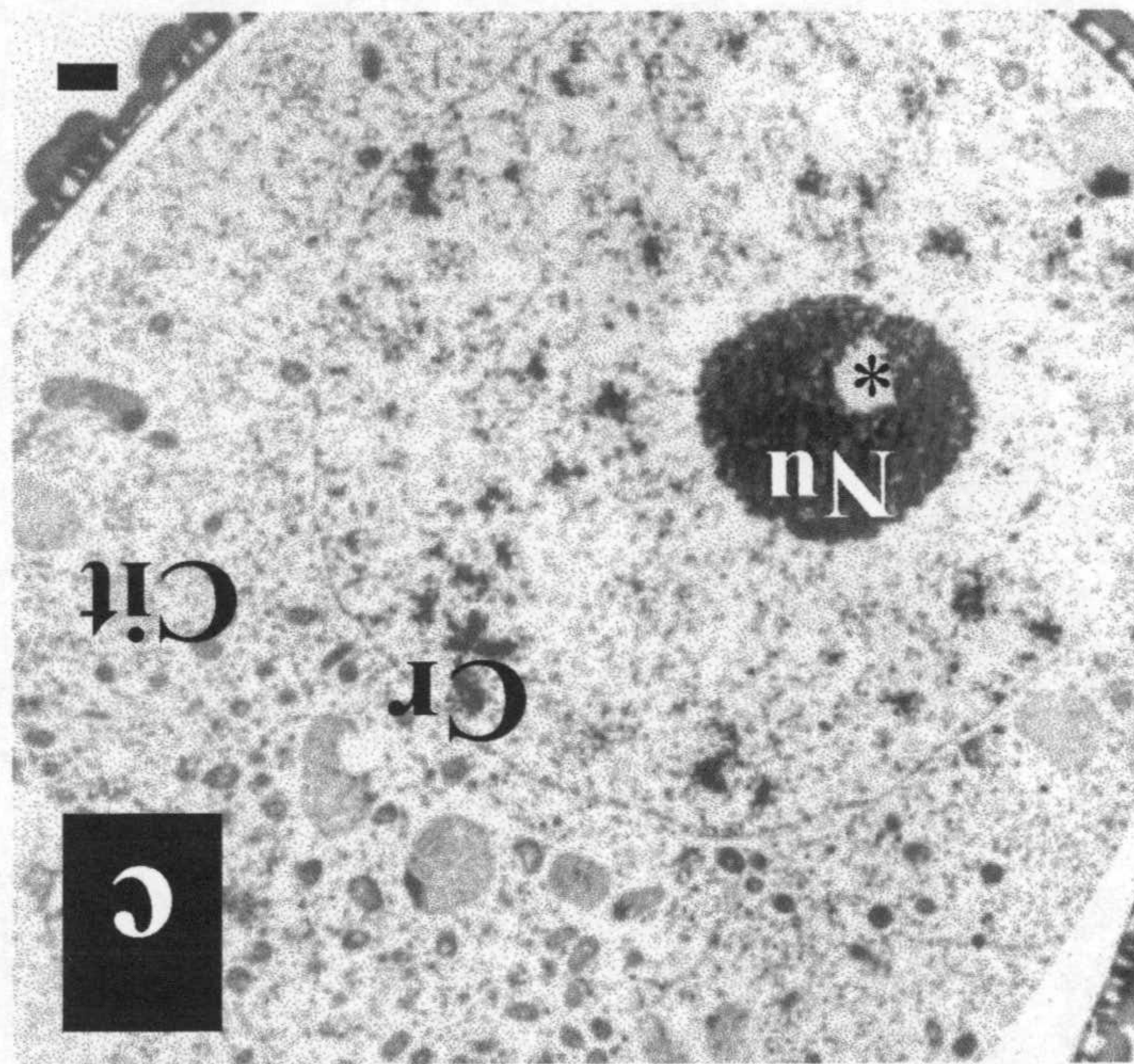
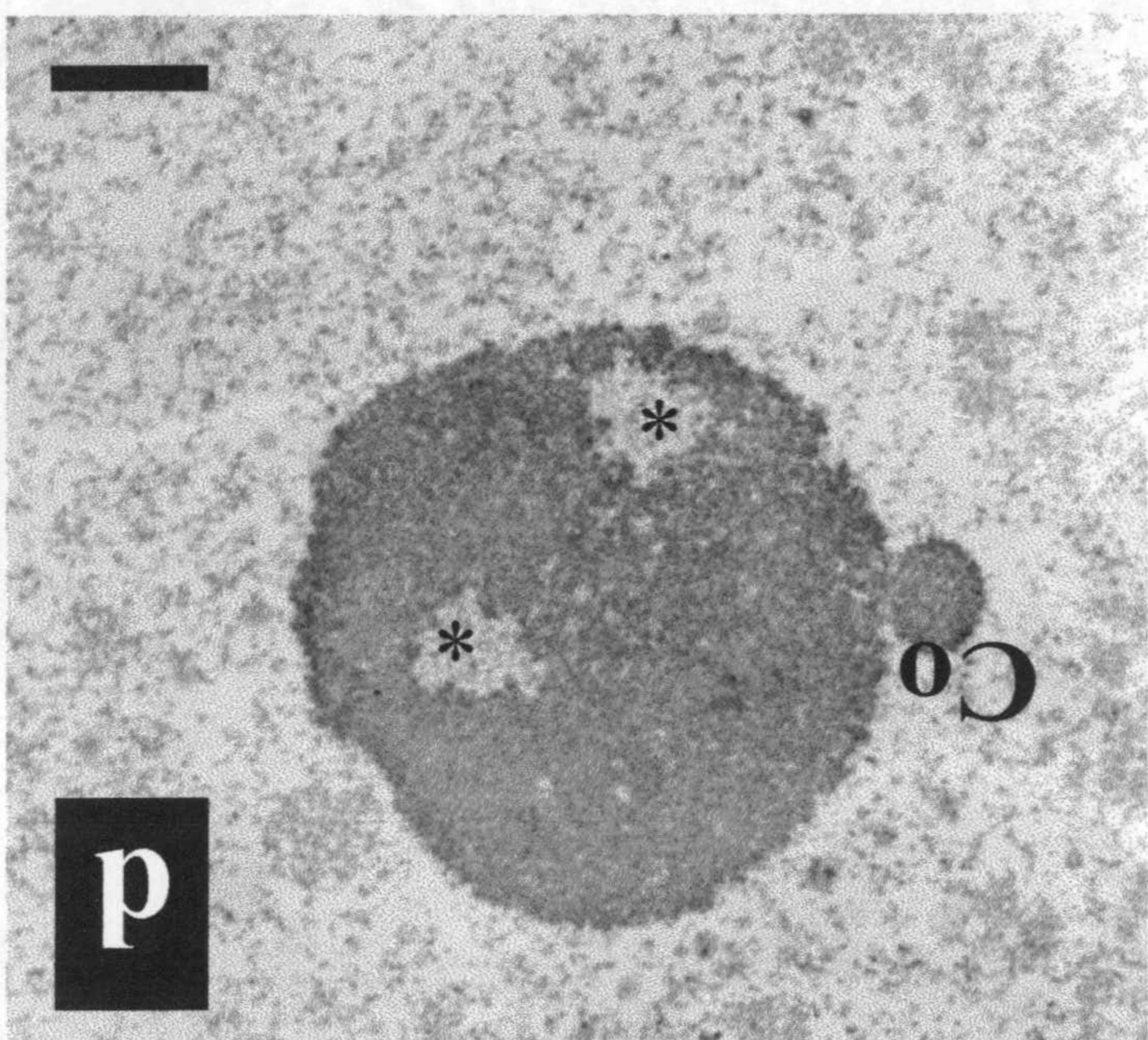
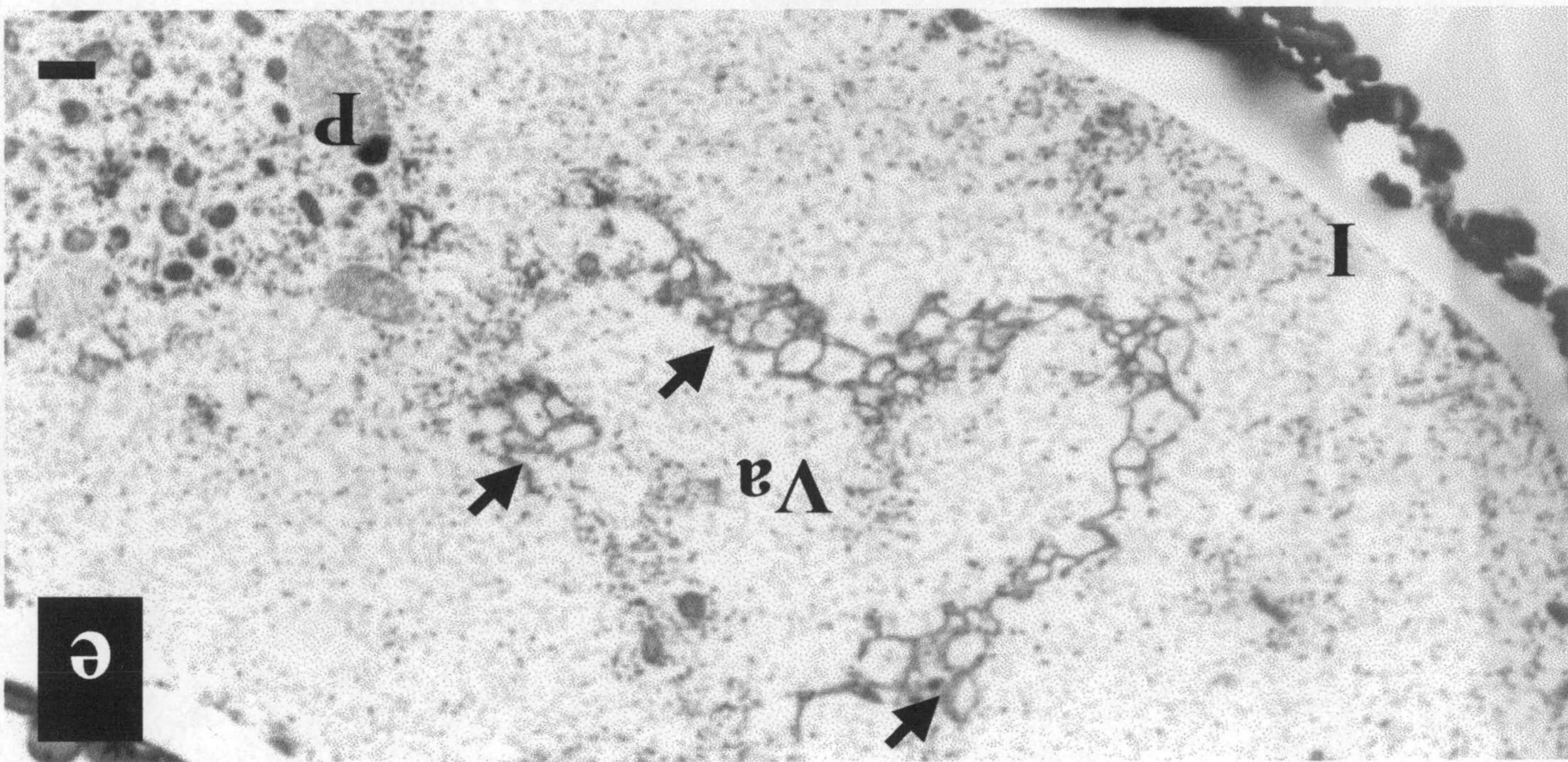


Fig. 6: Polen bicelular joven de guisante.

Fig. 6a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. La célula generativa (CG) se muestra rodeada de una pared que es continuación de la intina y presenta un núcleo con la cromatina muy condensada. El núcleo vegetativo (NV) ocupa una posición más o menos central en la célula vegetativa (Barra = 10 μ m).

Fig. 6b, 6c y 6d: Cortes ultrafinos de polen bicelular joven de guisante observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb. (Barra=1 μ m).

Fig. 6b: Se observa la pared de la célula generativa (CG) conectada a la intina. El núcleo generativo presenta una cromatina (Cr) muy condensada. En cuanto a la pared, la exina está completa con el tectum continuo.

Fig. 6c: El núcleo vegetativo (NV) presenta una cromatina muy descondensada y el nucleolo (Nu) se ve formado por componente fibrilar denso y granular entremezclados. En el citoplasma vegetativo se observan pequeñas vacuolas (Va), mucho material de reserva como gránulos lipídicos (Li).

Fig. 6d: En el citoplasma vegetativo se observa un gran número de ribosomas (R), mitocondrias con las crestas más distinguibles (M) y plastidios (P) más diferenciados.

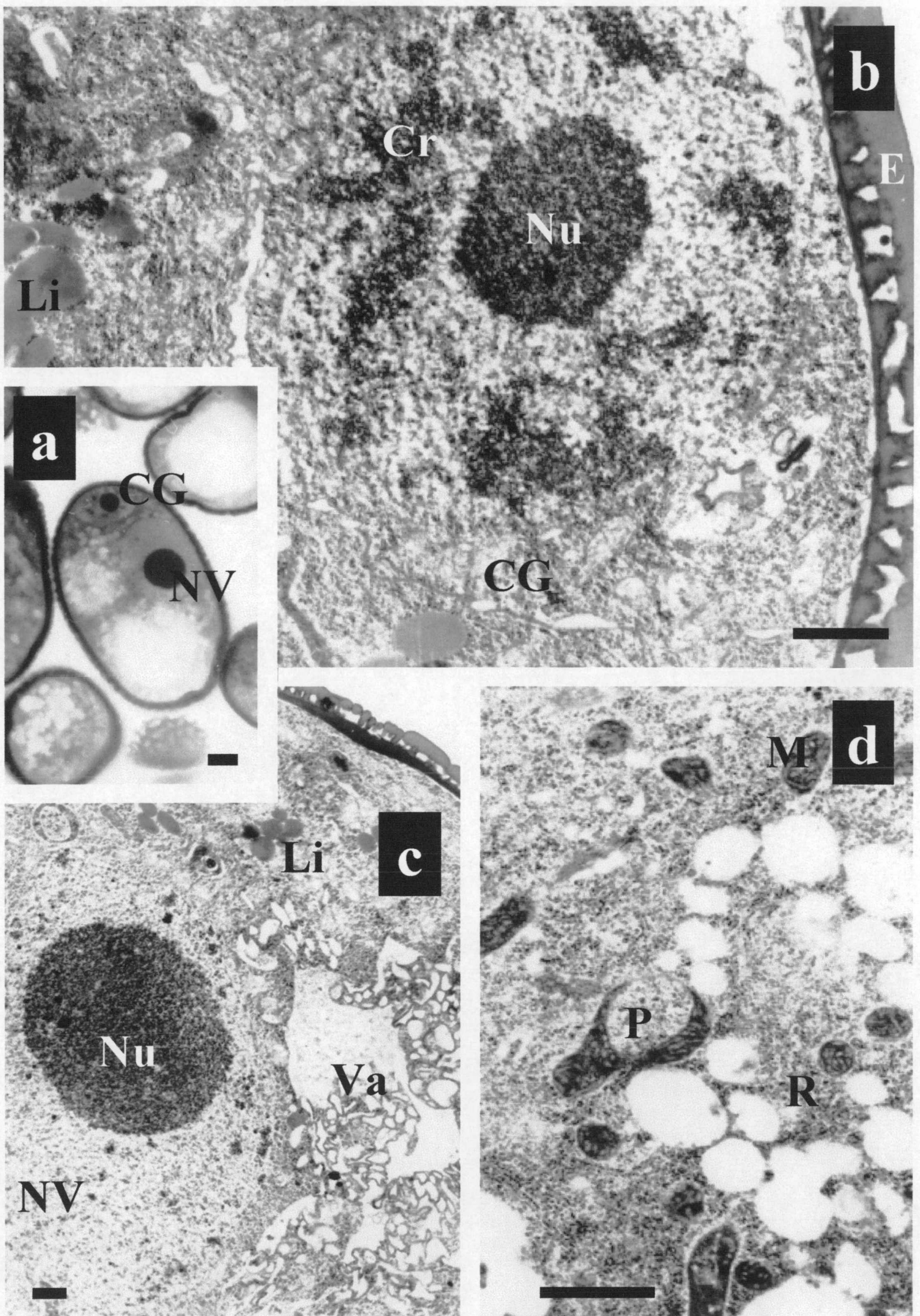


Fig. 6

Fig. 7: Polen bicelular medio de guisante.

Fig. 7a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. La célula generativa (CG) se presenta despegada de la intina y redondeada. El Núcleo vegetativo (NV) ocupa el centro del grano de polen con la cromatina laxa. El citoplasma vegetativo se observa con mucho almidón (Barra = 10 μ m).

Fig. 7b y 7c: Cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra=1 μ m).

Fig. 7b: La célula generativa (CG) despegada de la intina y que se encuentra dentro del citoplasma de la célula vegetativa (CV).

Fig. 7c: El citoplasma de la célula vegetativa presenta mucho retículo endoplásmico rugoso (RER), almidón (Al) en los plastidios (P) y numerosos ribosomas (R).

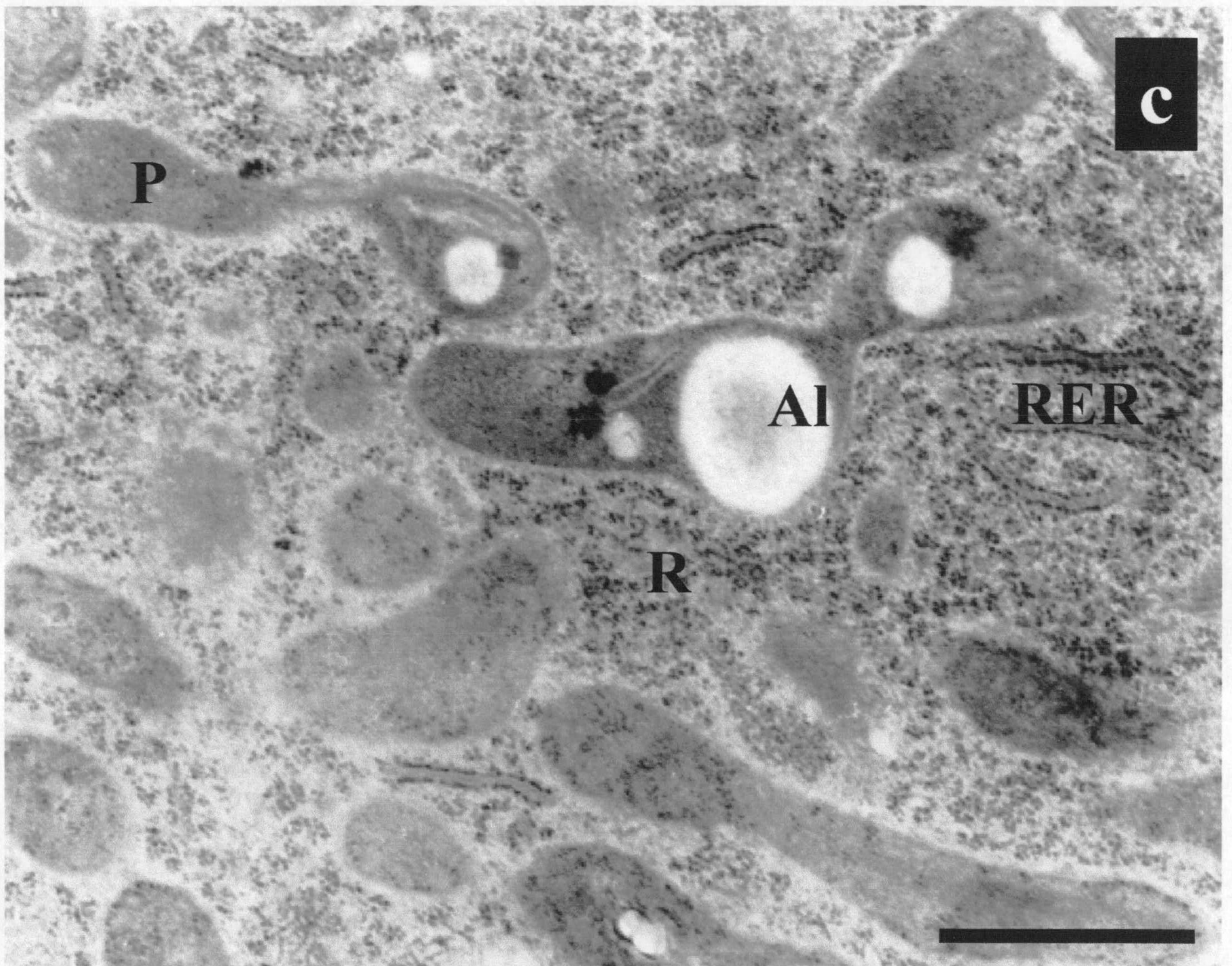
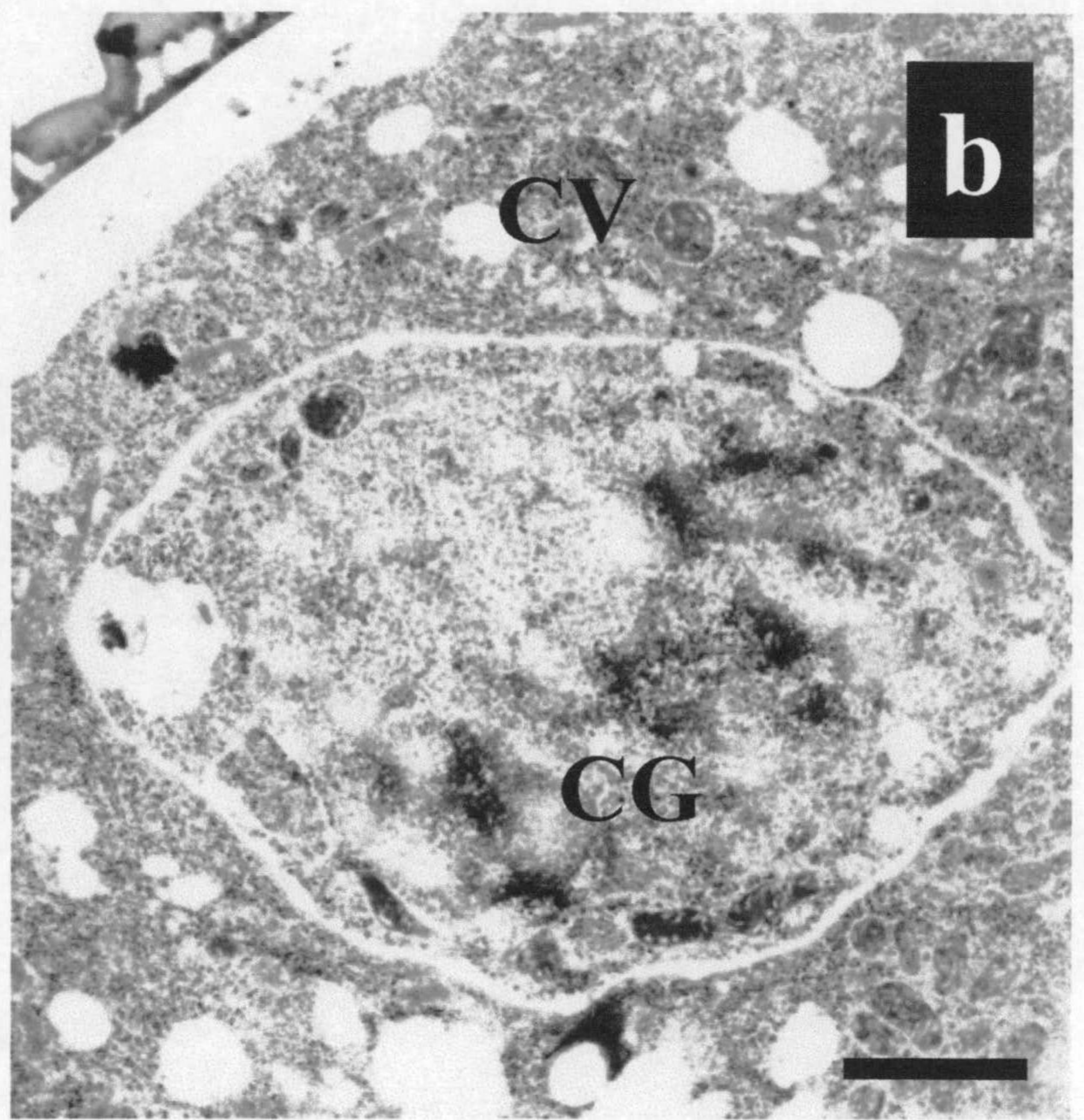
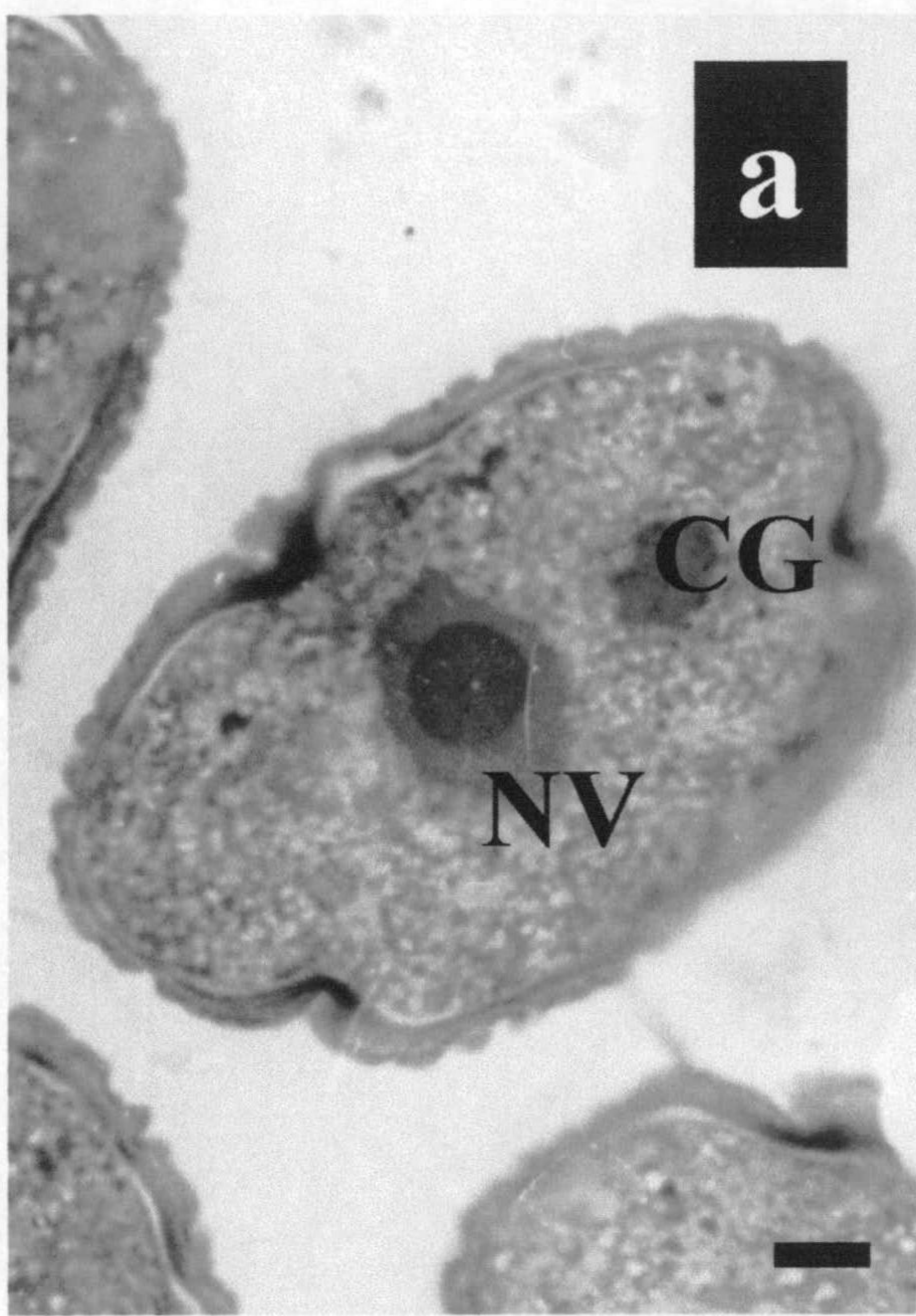


Fig. 7

Fig. 8: Polen maduro de guisante.

Fig. 8a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. La célula generativa (CG) en forma de huso está muy próxima al núcleo vegetativo (NV) que se observa muy lobulado (Barra = 10 μ m).

Figs. 8b y 8c: Cortes ultrafinos de polen bicelular maduro de guisante observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb. (Barra=1 μ m).

Fig. 8b: En la célula generativa (CG) el núcleo ocupa la mayor parte de ella y su cromatina (Cr) está muy condensada. En el citoplasma vegetativo se ven granos de almidón (Al) y lípidos (Li).

Fig. 8c: El citoplasma vegetativo presenta mucho material de reserva: almidón (Al) y lípidos (Li). Los orgánulos citoplásmicos están muy diferenciados. La exina (E) y la intina (i) se muestran completamente formadas.

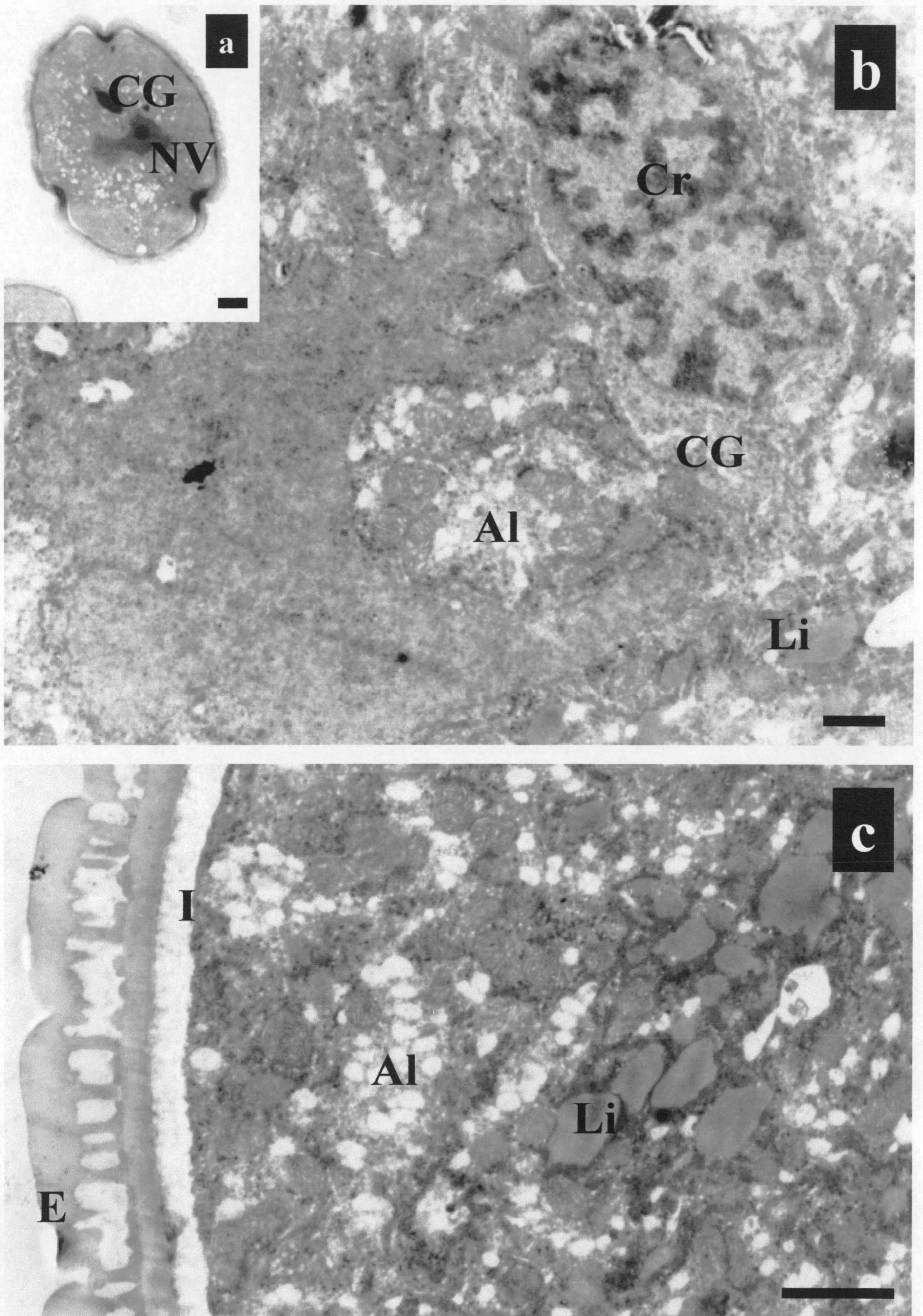


Fig. 8

Fig. 9: Célula madre del polen y tetrada de arabidopsis.

Figs. 9a y 9b: Cortes semifinos teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico (Barra=10 μ m).

Fig. 9a: Las células madres del polen presentan un gran núcleo en el centro de cada célula con un nucleolo (Nu) fuertemente teñido.

Fig. 9b: Las tetradas con las microsporas unidas por una pared de calosa (Ca). En el centro de cada microspora se observa un gran núcleo (N).

Figs. 9c y 9d: Cortes ultrafinos de tetrada de arabidopsis observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra=1 μ m).

Fig. 9c: El citoplasma está rico en ribosomas (R). Los plastidios (P) y las mitocondrias (M) son muy poco diferenciados.

Fig. 9d: El núcleo (N) presenta una cromatina (Cr) bastante condensada. La primexina (PE) rodea a las microsporas en formación.

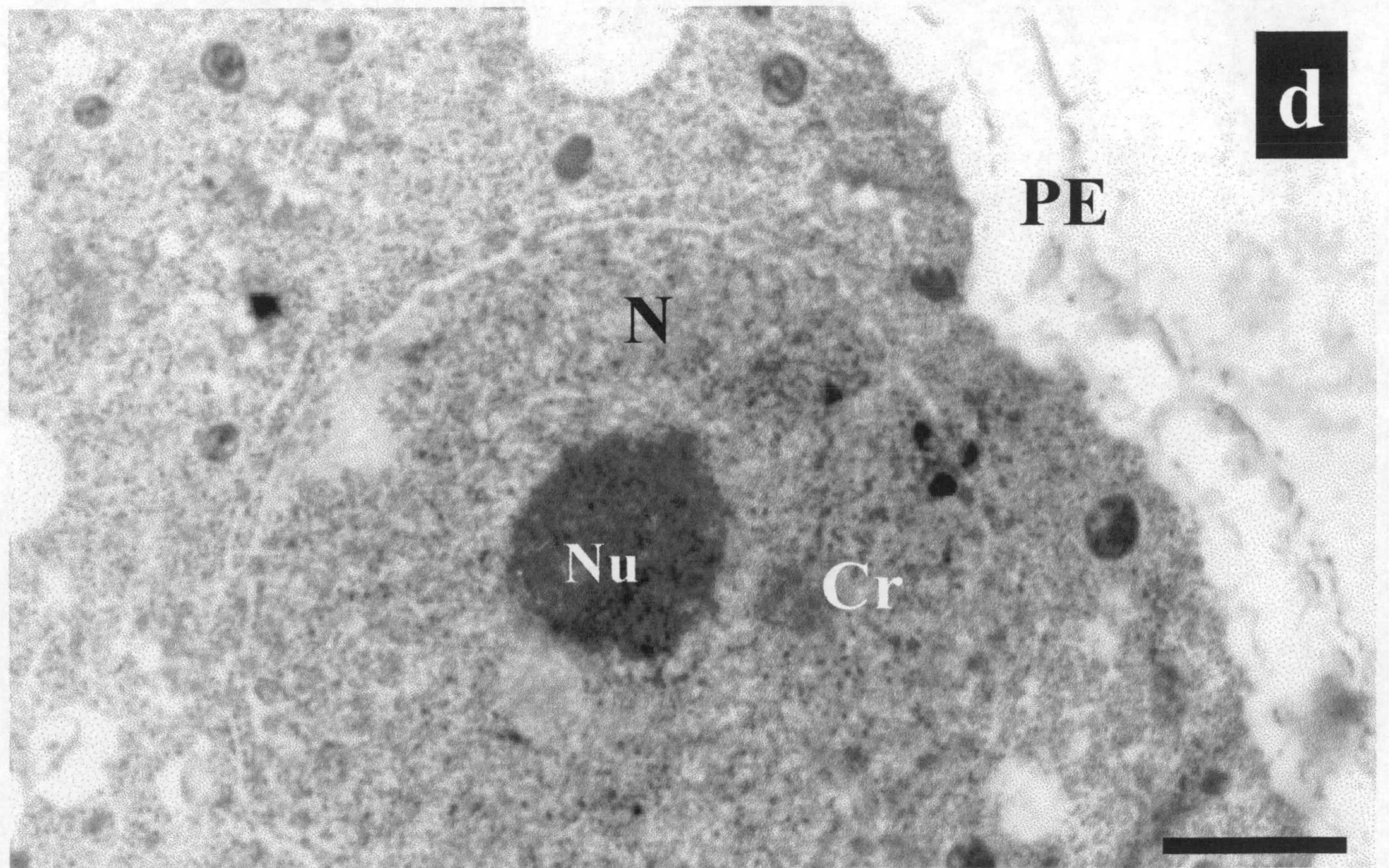
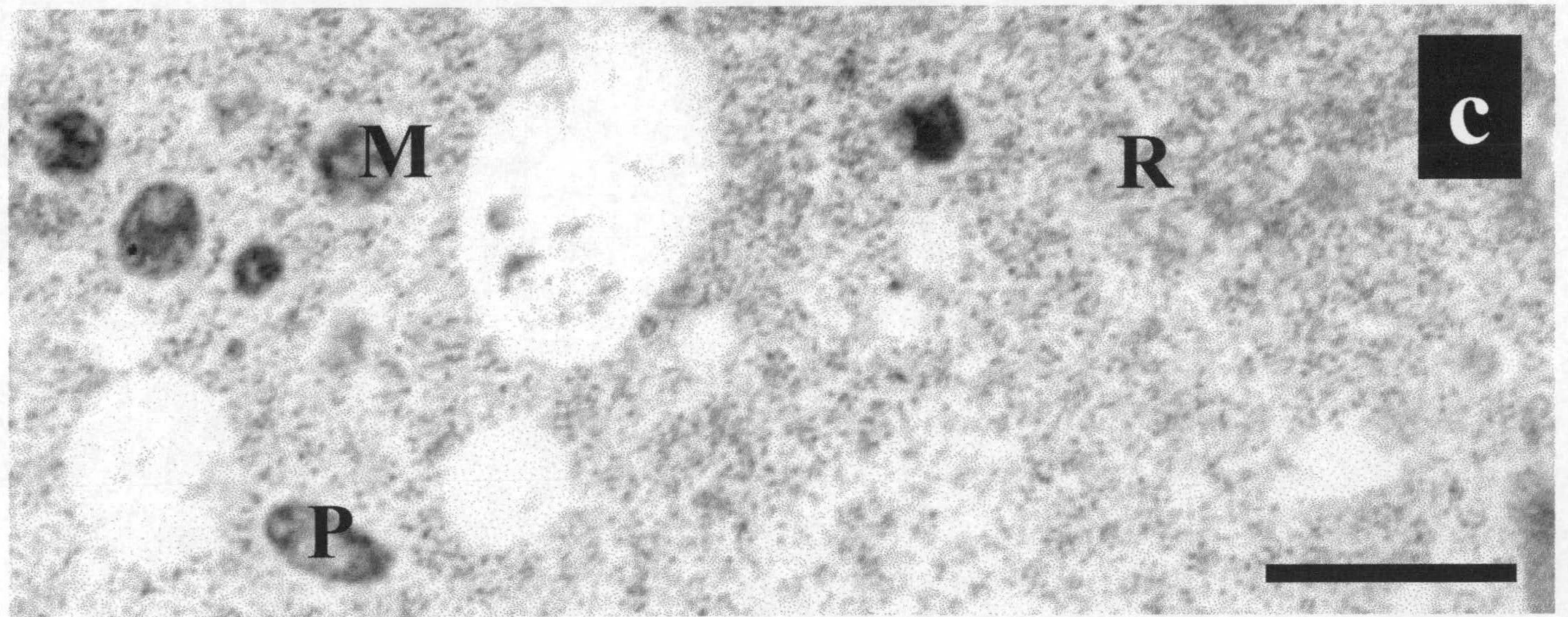
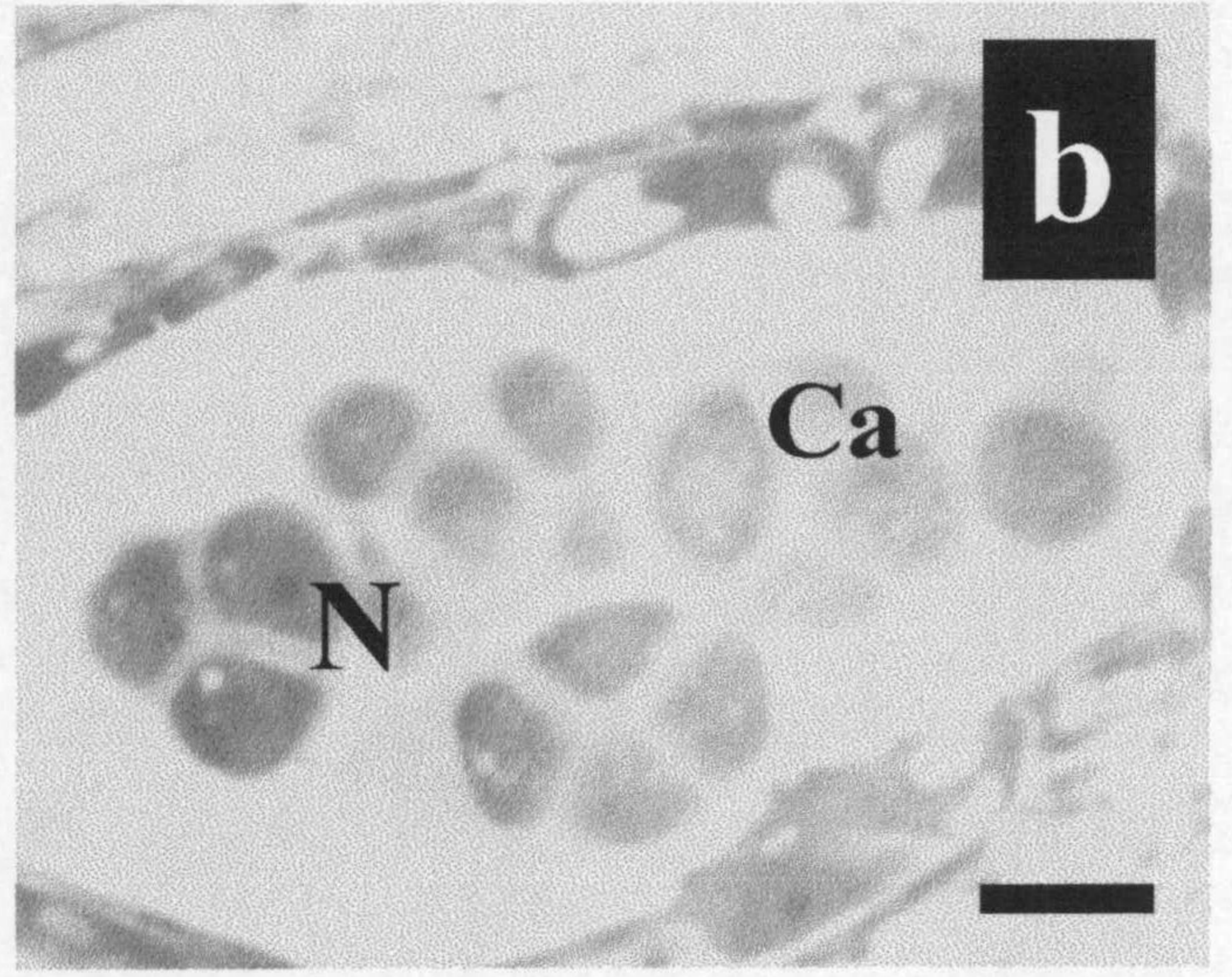
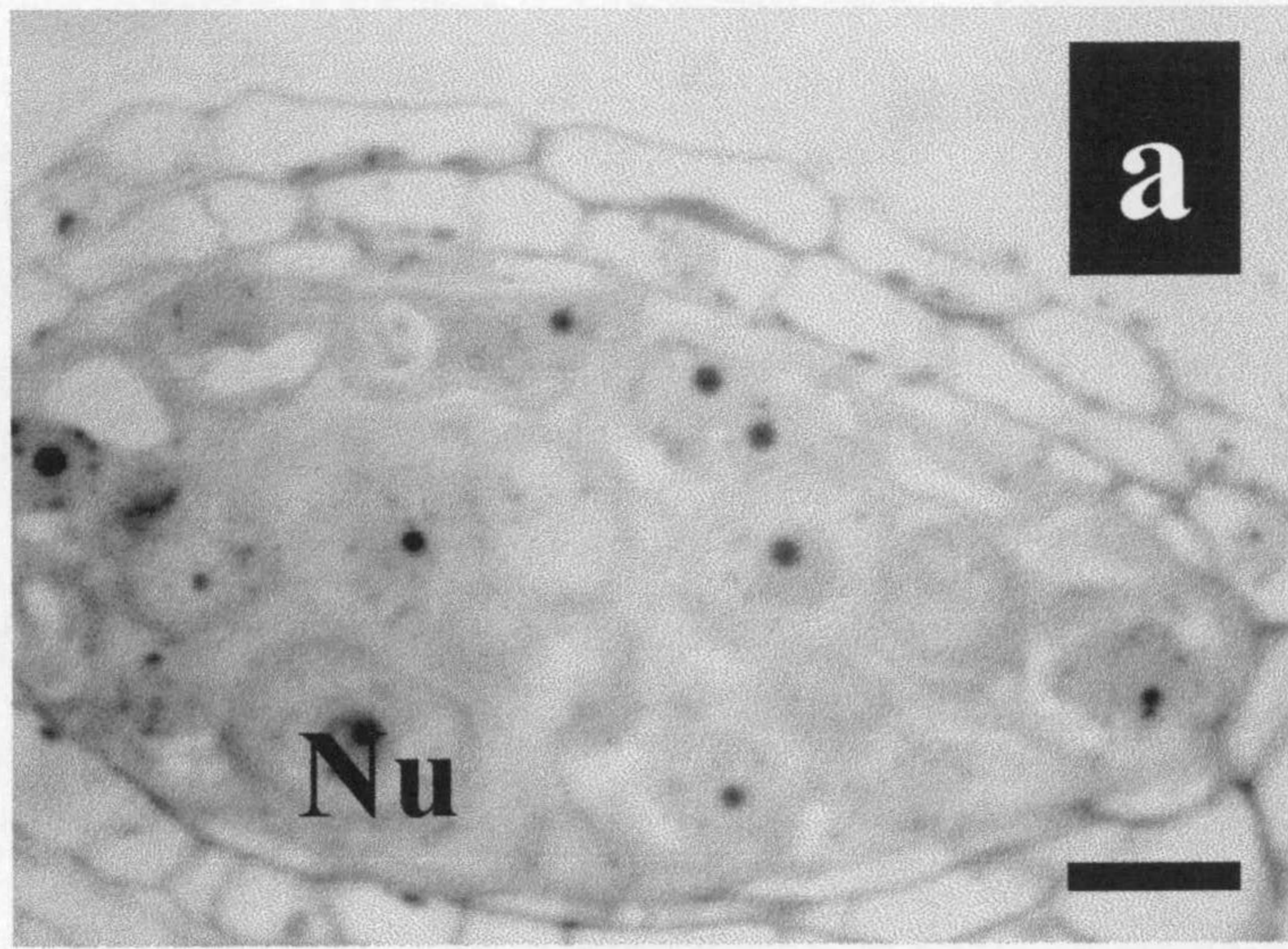


Fig. 9

Fig. 10: Microsporas de arabidopsis.

Fig. 10a y 10c: : Cortes semifinos de microspora joven (10a) y microspora vacuolada (10b) teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico (Barra=10µm).

Fig. 10a: Microsporas con un núcleo (N) en el centro y pequeñas vacuolas (Va) en el citoplasma.

Fig. 10c: Microsporas vacuoladas con el núcleo (N) en un extremo de la célula y una gran vacuola (Va) que ocupa la mayor parte de la microspora.

Figs. 10b, 10d y 10e: Cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra=1µm).

Fig. 10b: Microspora joven con un núcleo con la cromatina (Cr) muy descondensada y el nucleolo con vacuolas (estrellas negras). En el citoplasma los plastidios (P) están un poco más diferenciados que en tetrada y las mitocondrias (M) son muy pequeñas.

Fig. 10d: Microspora vacuolada con su núcleo en un polo de la célula con la cromatina muy descondensada. En el citoplasma la vacuola (Va) se observa unas estructuras membranosas en su interior. La exina (E) está ya formada.

Fig. 10e: El citoplasma de la microspora vacuolada con los plastidios (P) más diferenciados que en la microspora joven con áreas claras (flechas negras) presentan almidón (Al) en su interior. Las mitocondrias (M) están bastante diferenciados.

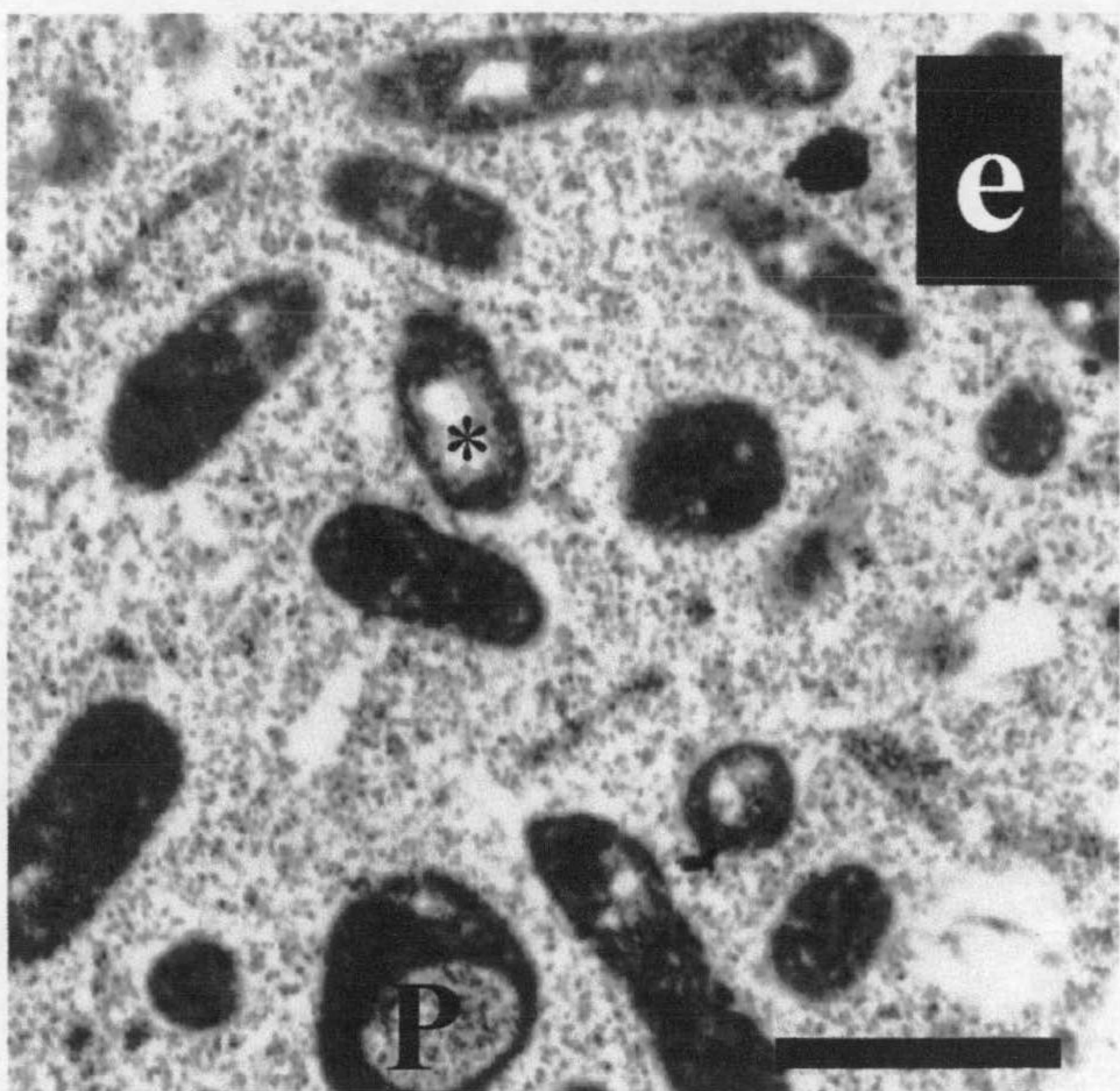
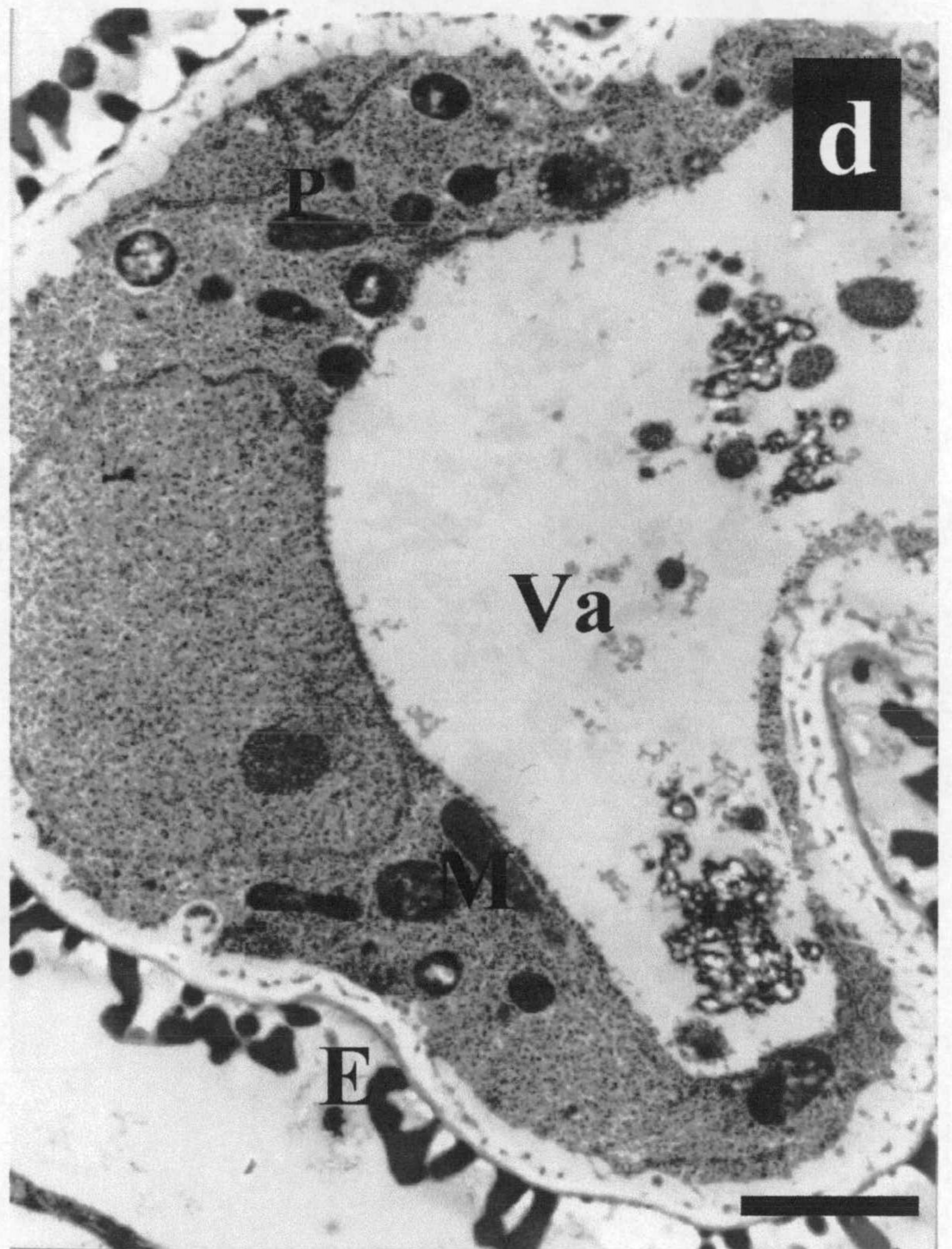
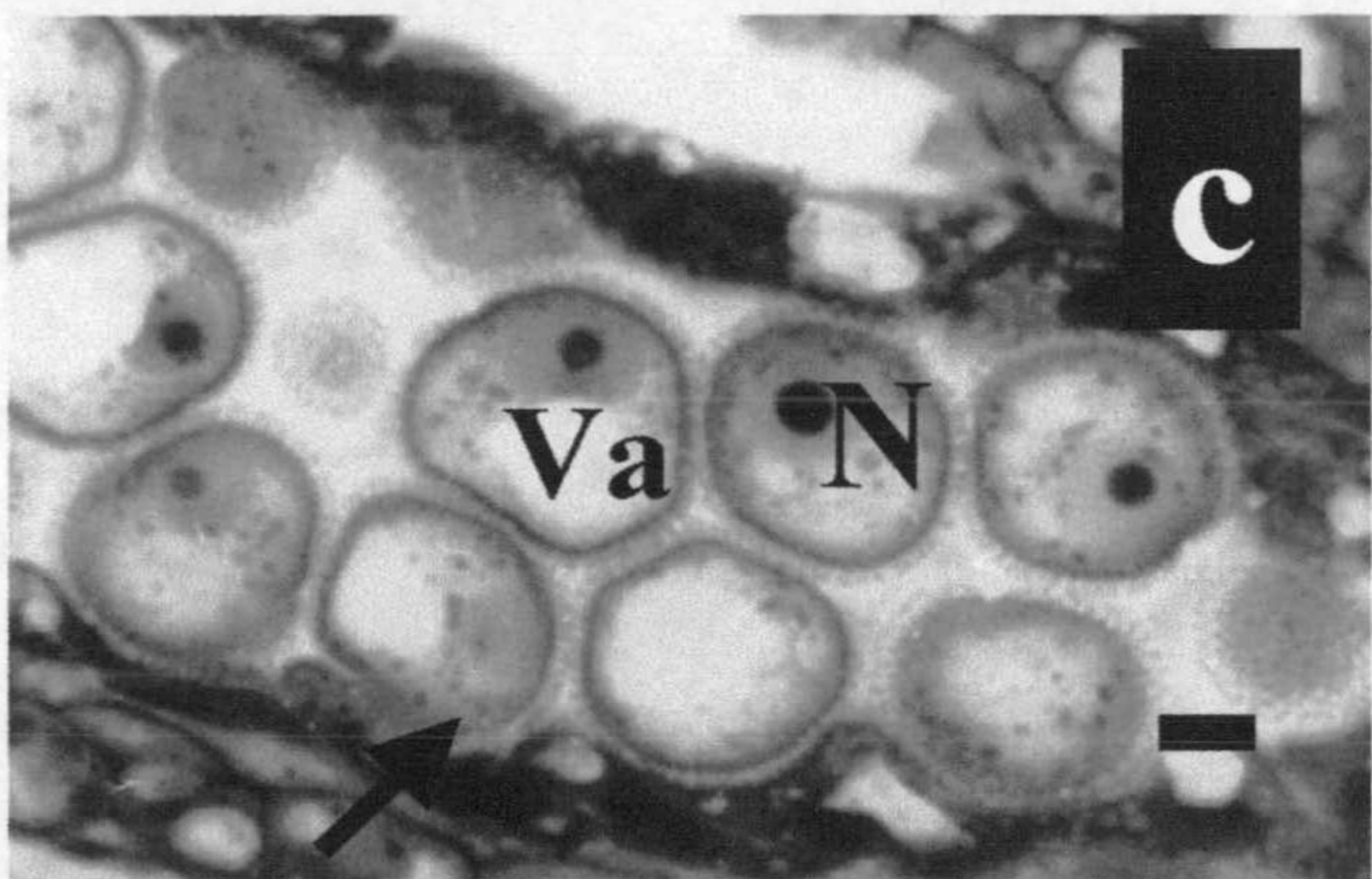
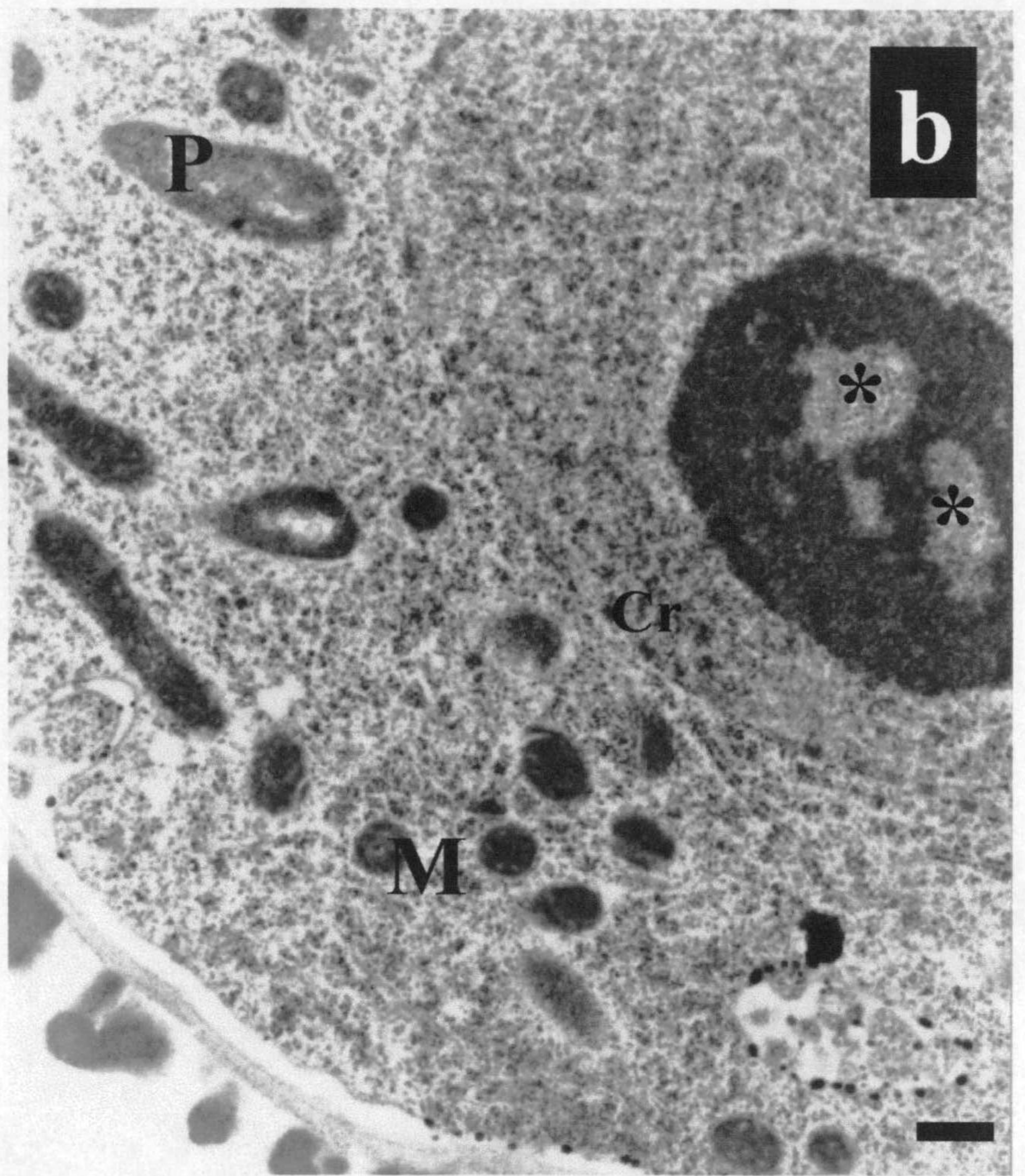


Fig. 10

Fig. 11: Polen bicelular joven de arabidopsis.

Fig. 11a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. Se observa la célula generativa (CG) en la periferia mientras que el núcleo vegetativo (NV) está en el centro del grano y presenta una cromatina poco condensada en el centro del grano (Barra=10 μ m).

Figs. 11b y 11c: Cortes ultrafinos observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra=10 μ m).

Fig. 11b: La célula generativa (CG) rodeada por una pared que es continuación de la intina. El núcleo vegetativo (NV) presenta una cromatina poco condensada. La exina (E) y la intina (I) están completamente formados.

Fig. 11c: El citoplasma de la célula vegetativa presenta orgánulos bien diferenciados: amiloplastos (Am), mitocondrias (M), muchos ribosomas (R) retículo endoplásmico rugoso (RER). Nótese que tanto la exina (E) como la intina (I) están bien desarrollados.

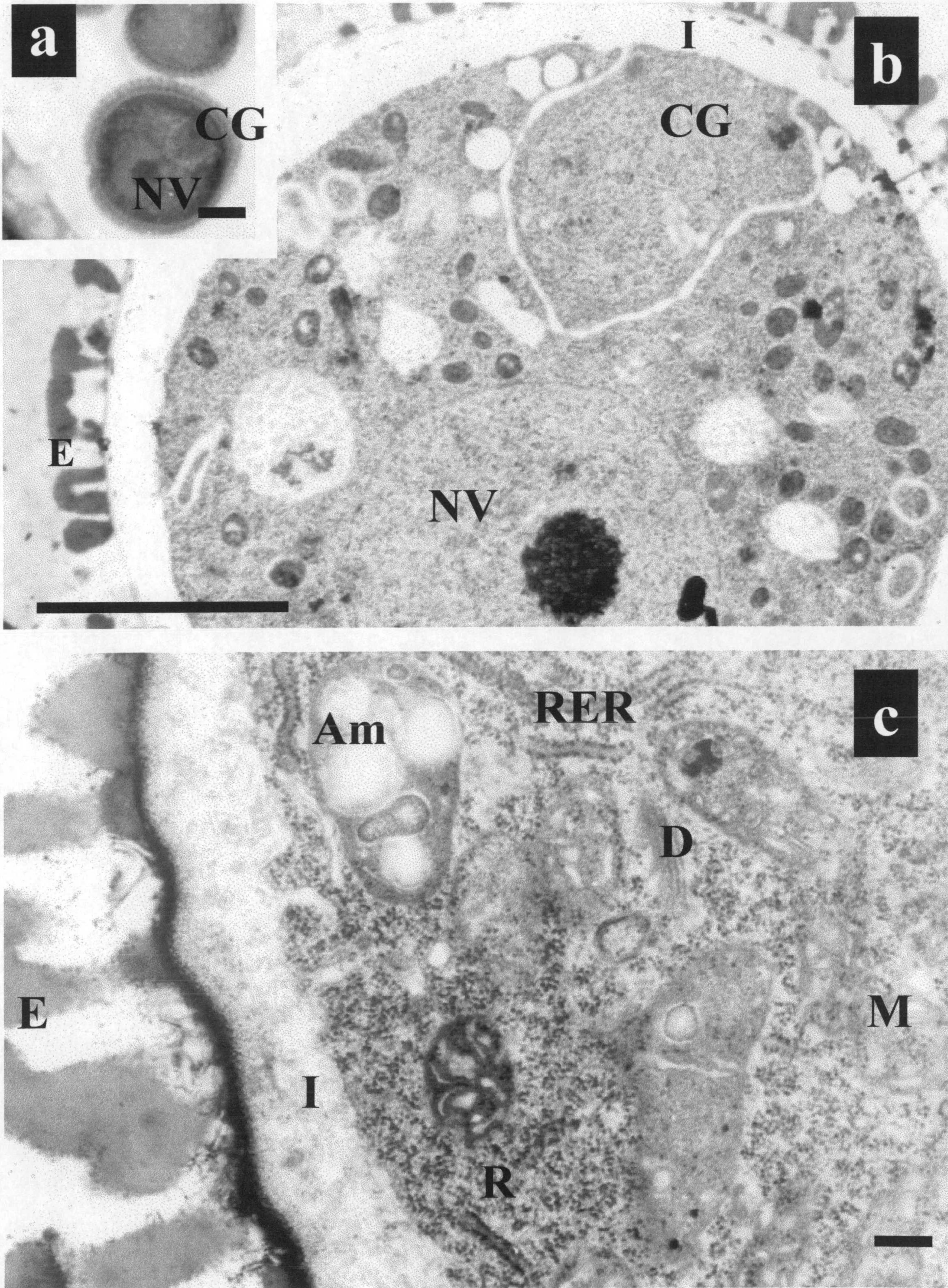


Fig. 11

Fig. 12: Polen bicelular medio de arabidopsis.

Fig. 12a: Corte semifino teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. La célula generativa (CG) ocupa una posición central en el citoplasma de la célula vegetativa. El núcleo vegetativo (NV) es redondeado (Barra=10 μ m).

Figs. 12b, 12c y 12d: Cortes ultrafinos de polen bicelular medio (12b) y maduro (12c y 12d) observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción Ur-Pb (Barra=1 μ m).

Fig. 12b: El núcleo generativo con la cromatina condensada y el nucleolo con una gran protuberancia (estrella blanca). En el citoplasma vegetativo, se observan muchas pequeñas vacuolas (Va) sobre todo alrededor de la célula generativa. Los plastidios están diferenciados en amiloplastos (Am). Se observan también muchos ribosomas (R) en el citoplasma vegetativo y generativo.

Fig. 12c: En el citoplasma vegetativo del polen bicelular maduro, los orgánulos citoplásmicos están bien diferenciados. El núcleo vegetativo presenta una cromatina muy condensada. Se observan muchos lípidos (Li) y retículo endoplásmico rugoso (RER).

Fig. 12d: En el citoplasma vegetativo del polen bicelular maduro, observamos amiloplastos (Am) bien diferenciados. En la pared se distinguen la exina (E) y la intina (I).

Fig. 12

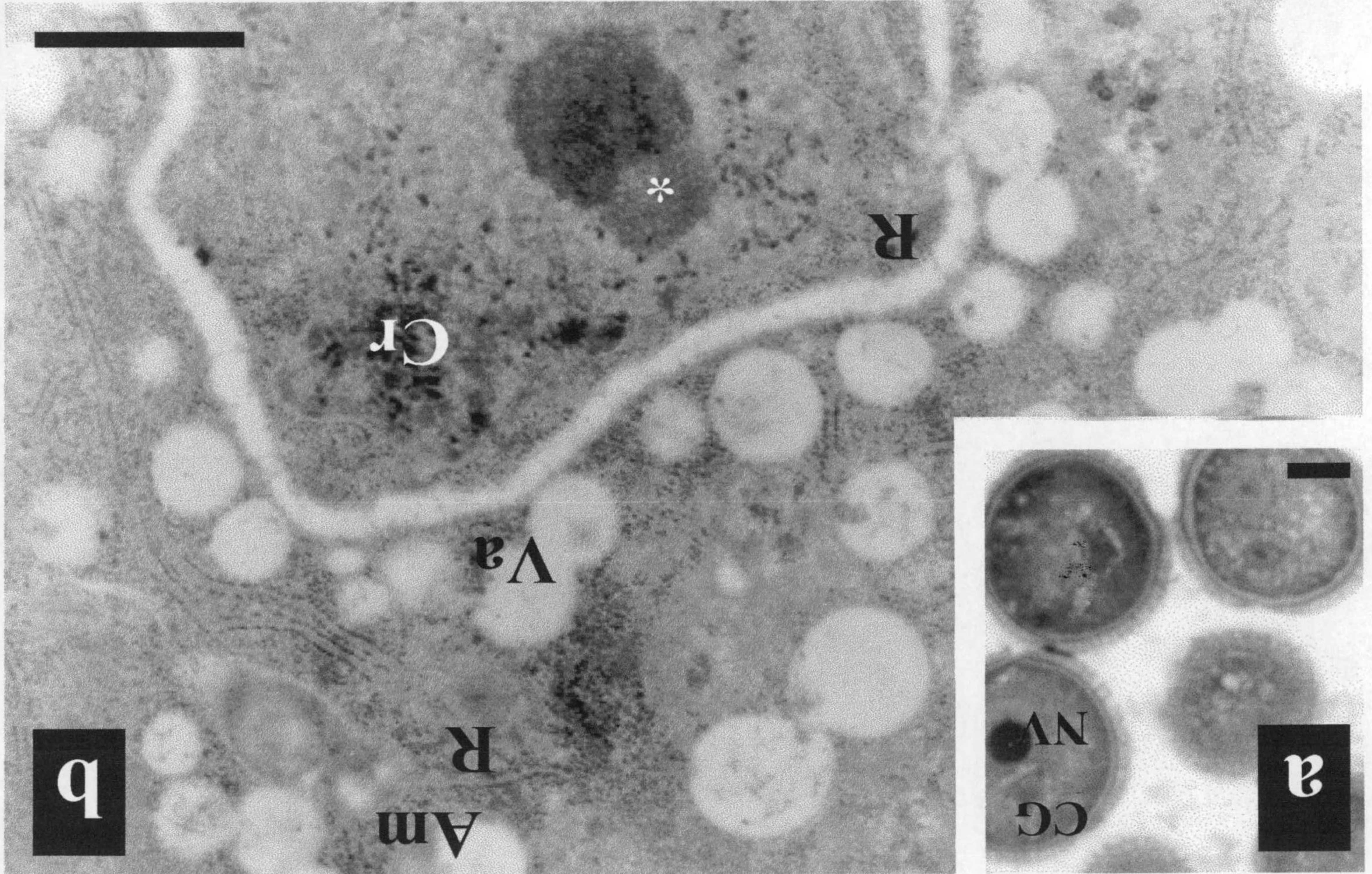
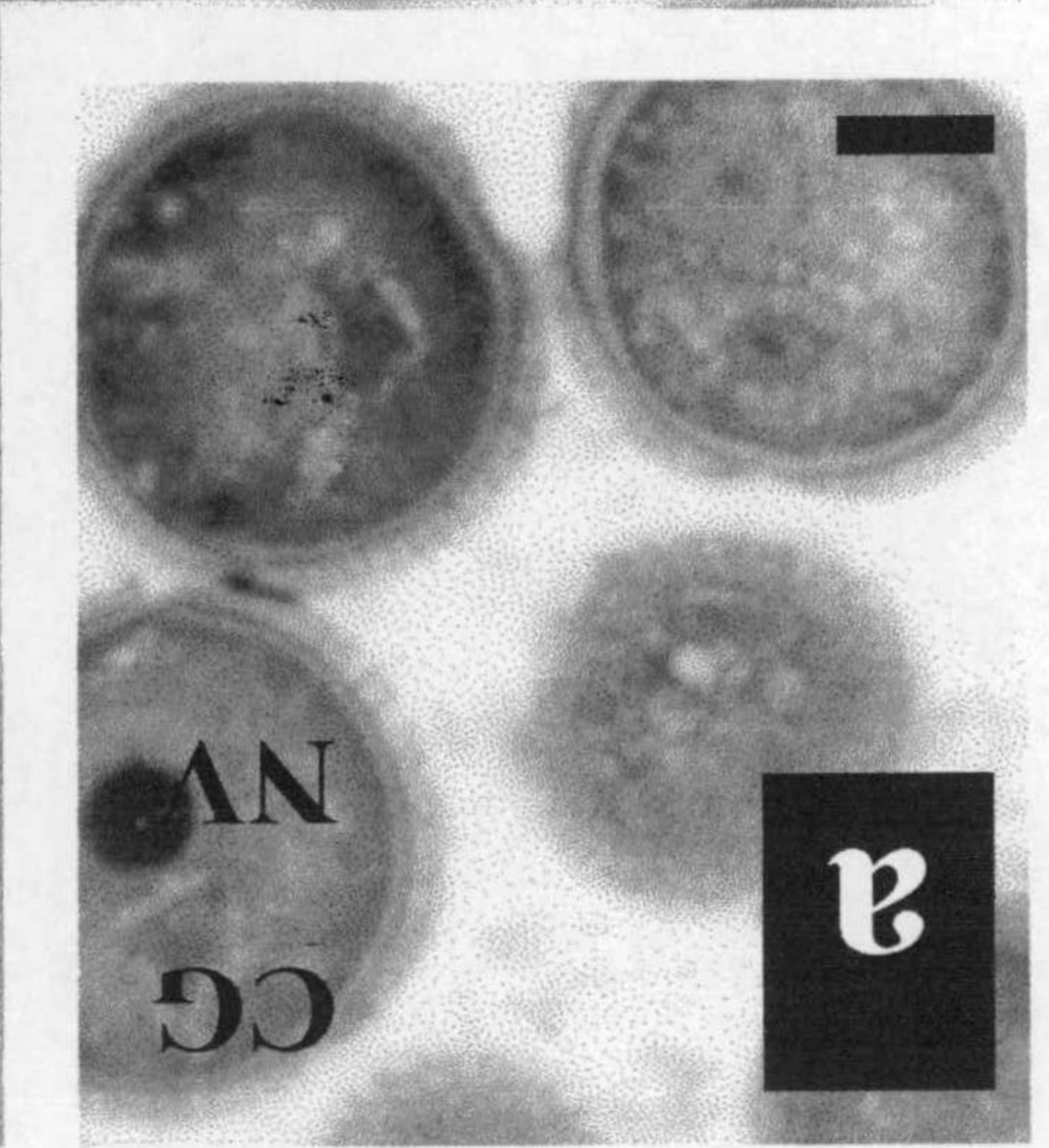
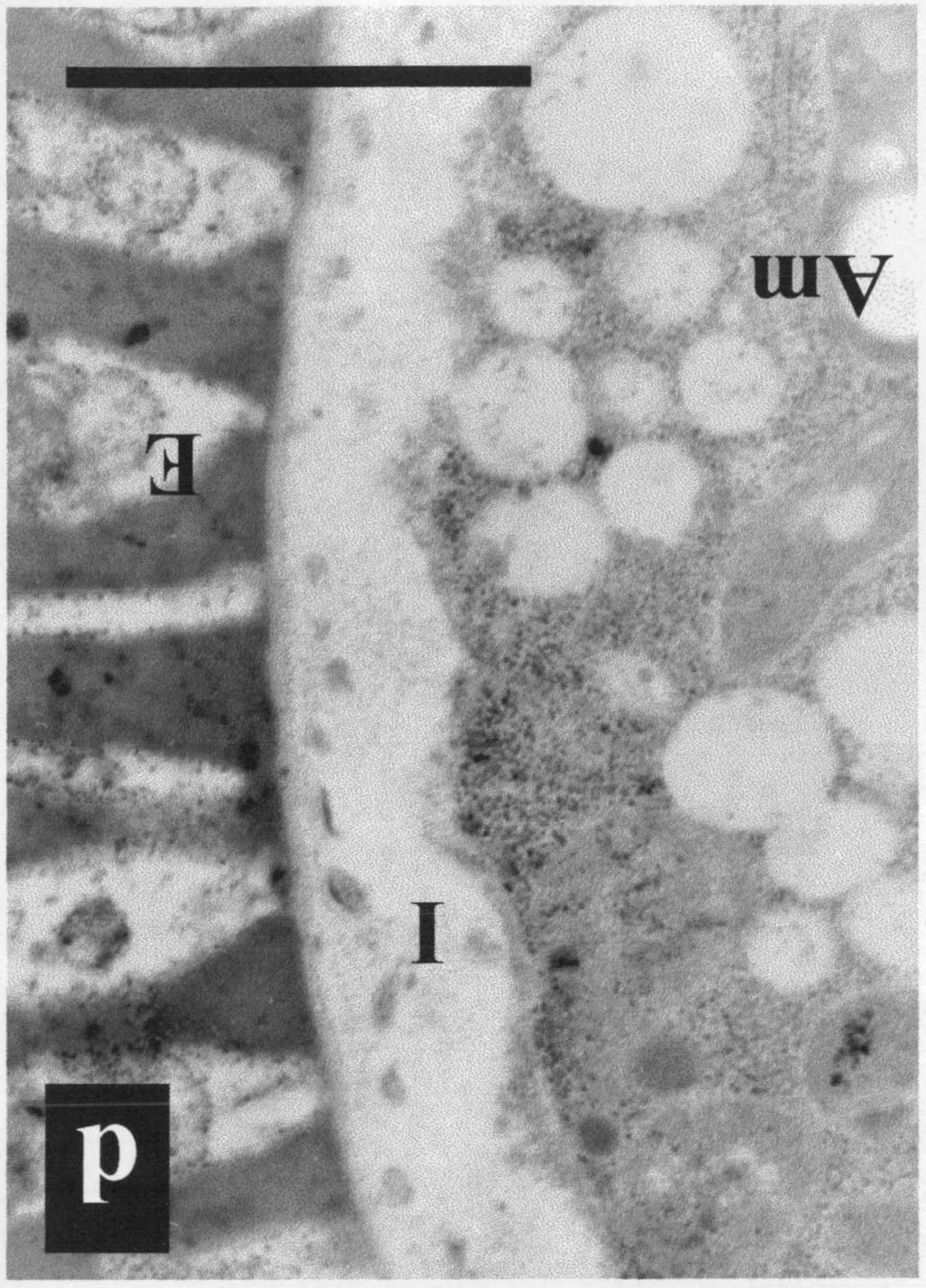
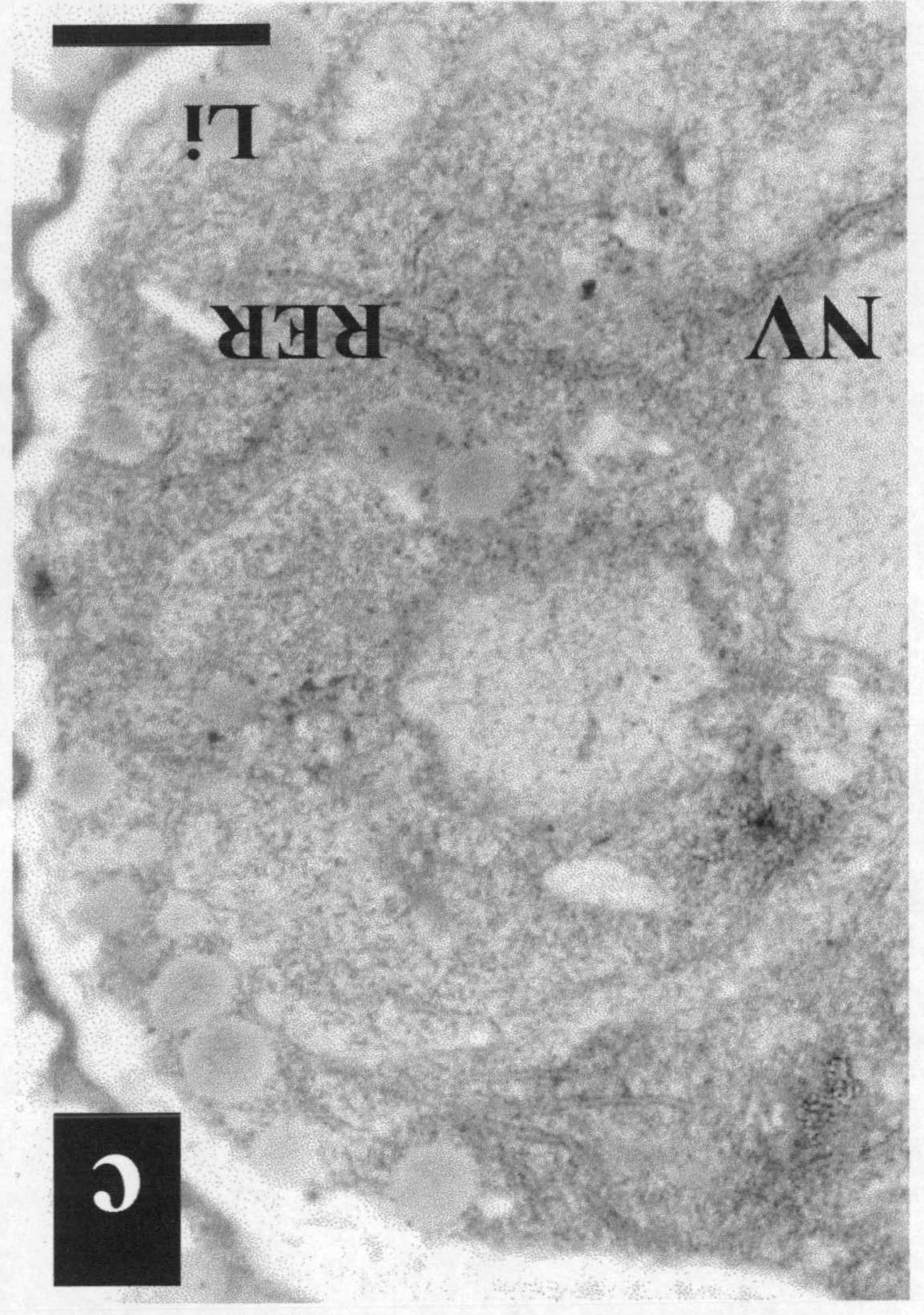


Fig. 13: Tinción con Thiery específica de polisacáridos (Barra=1µm).

Figs. 13a, 13b, 13c y 13d: Cortes ultrafinos de granos de polen de observados al microscopio electrónico de transmisión. Tinción con Thiery.

Fig. 13a: Tetrada de guisante. Los plastidos se muestran libres de tinción.

Figs.13b: Microspora vacuolada de arabidopsis. En el citoplasma (Cit) no se muestra tinción mientras que la intina está cubierta de precipitado de plata (flecha).

Figs. 13c y 13d: Polen bicelular medio y maduro de arabidopsis. Precipitado bien evidente sobre los amiloplastos (flechas).

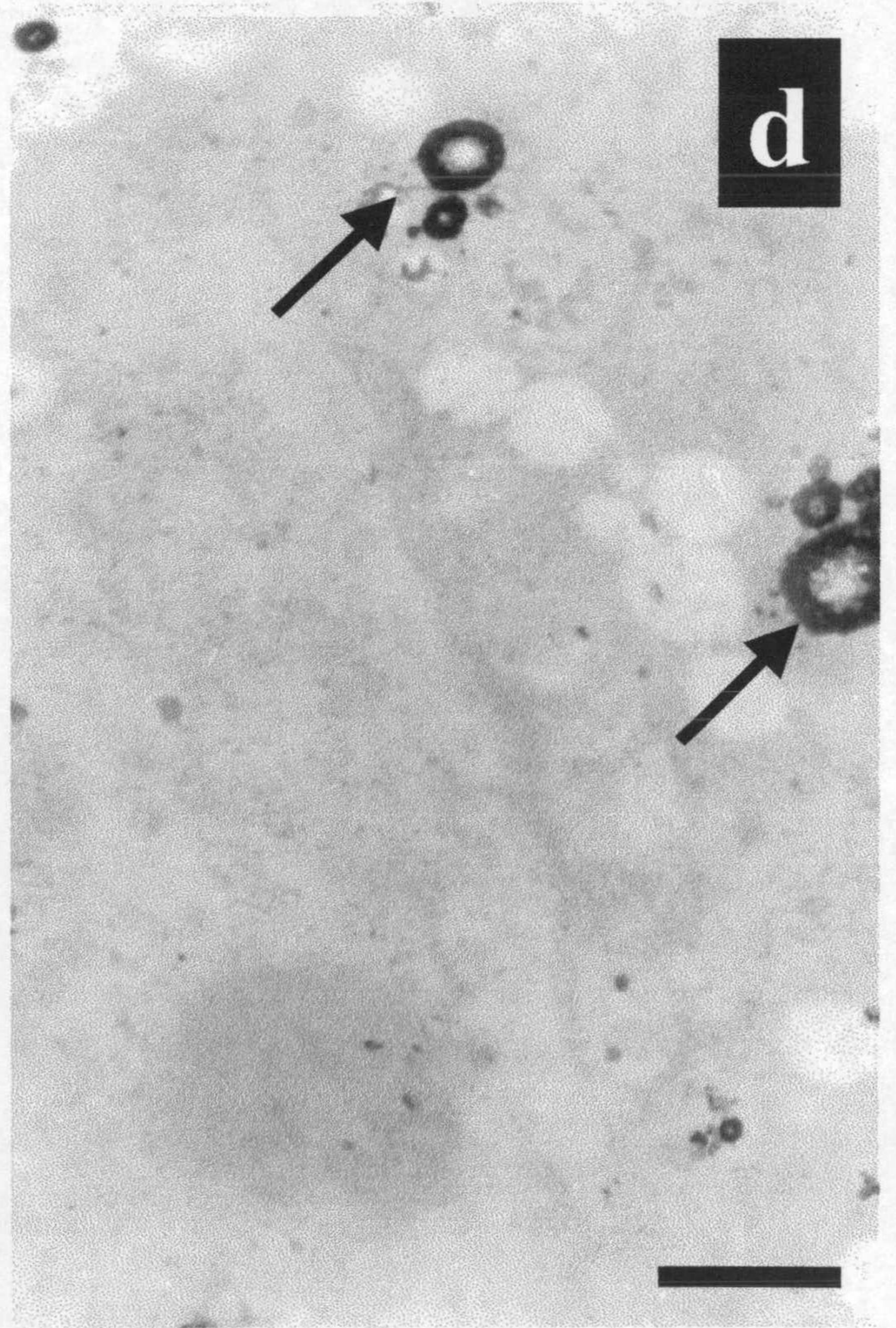
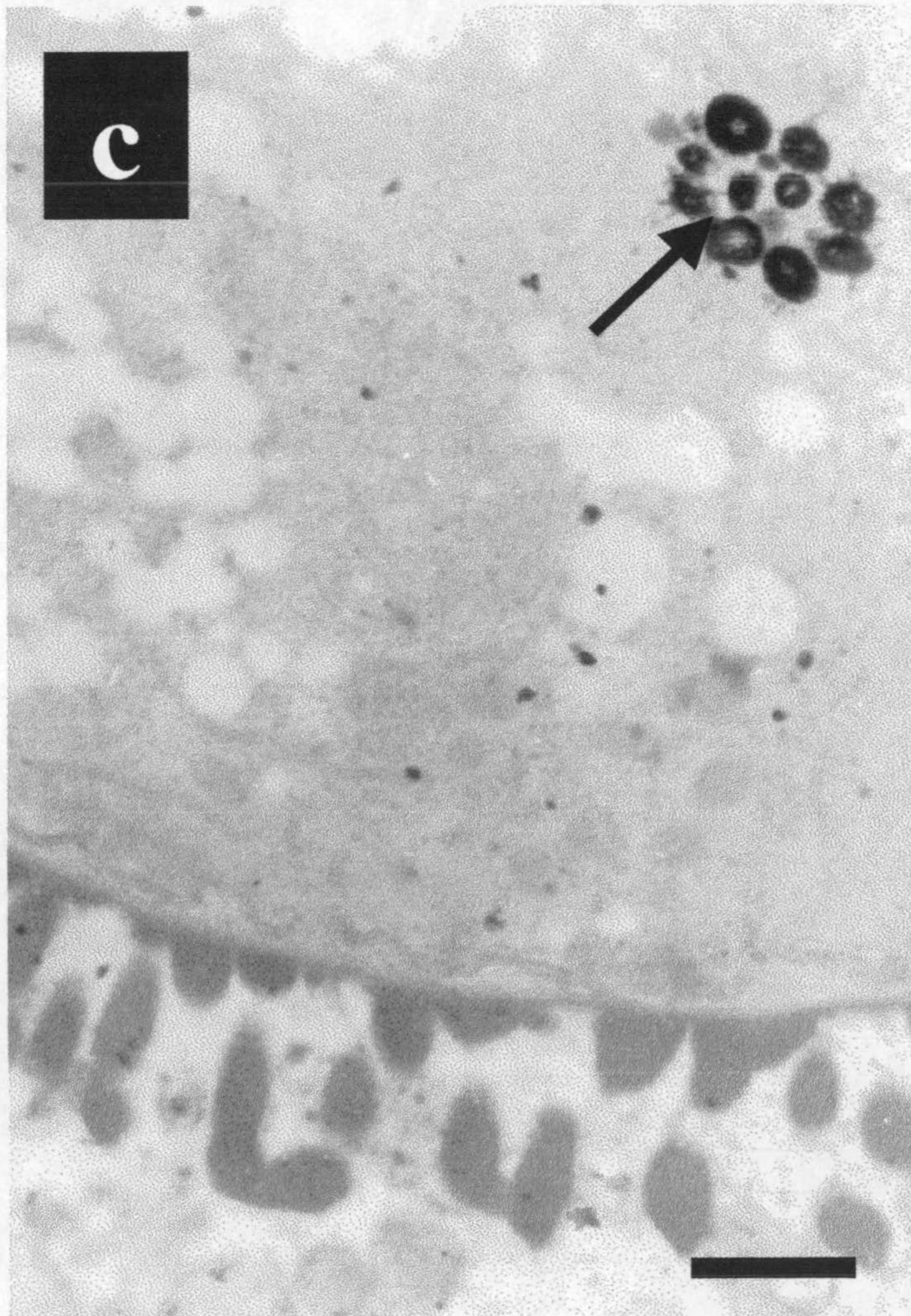
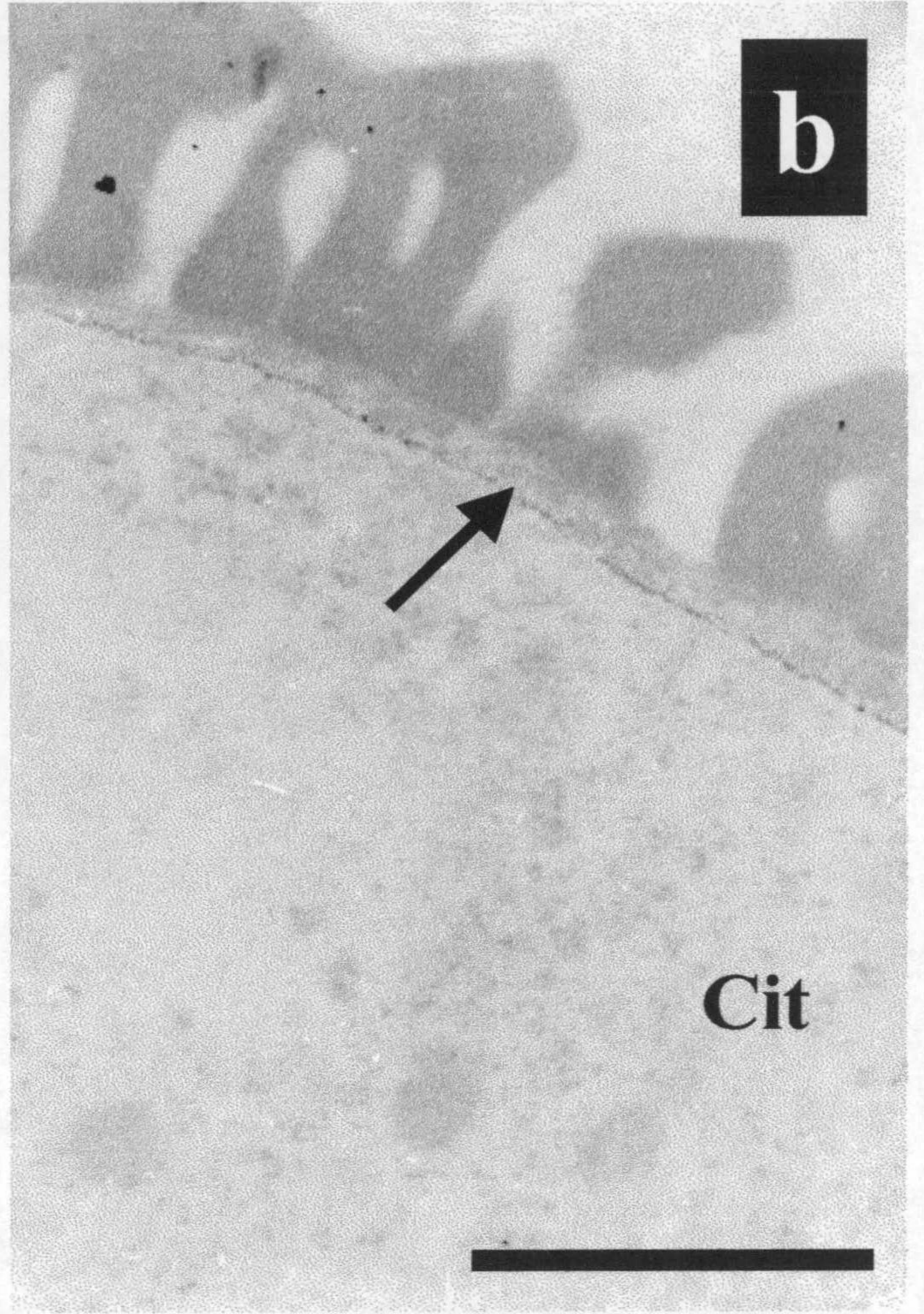
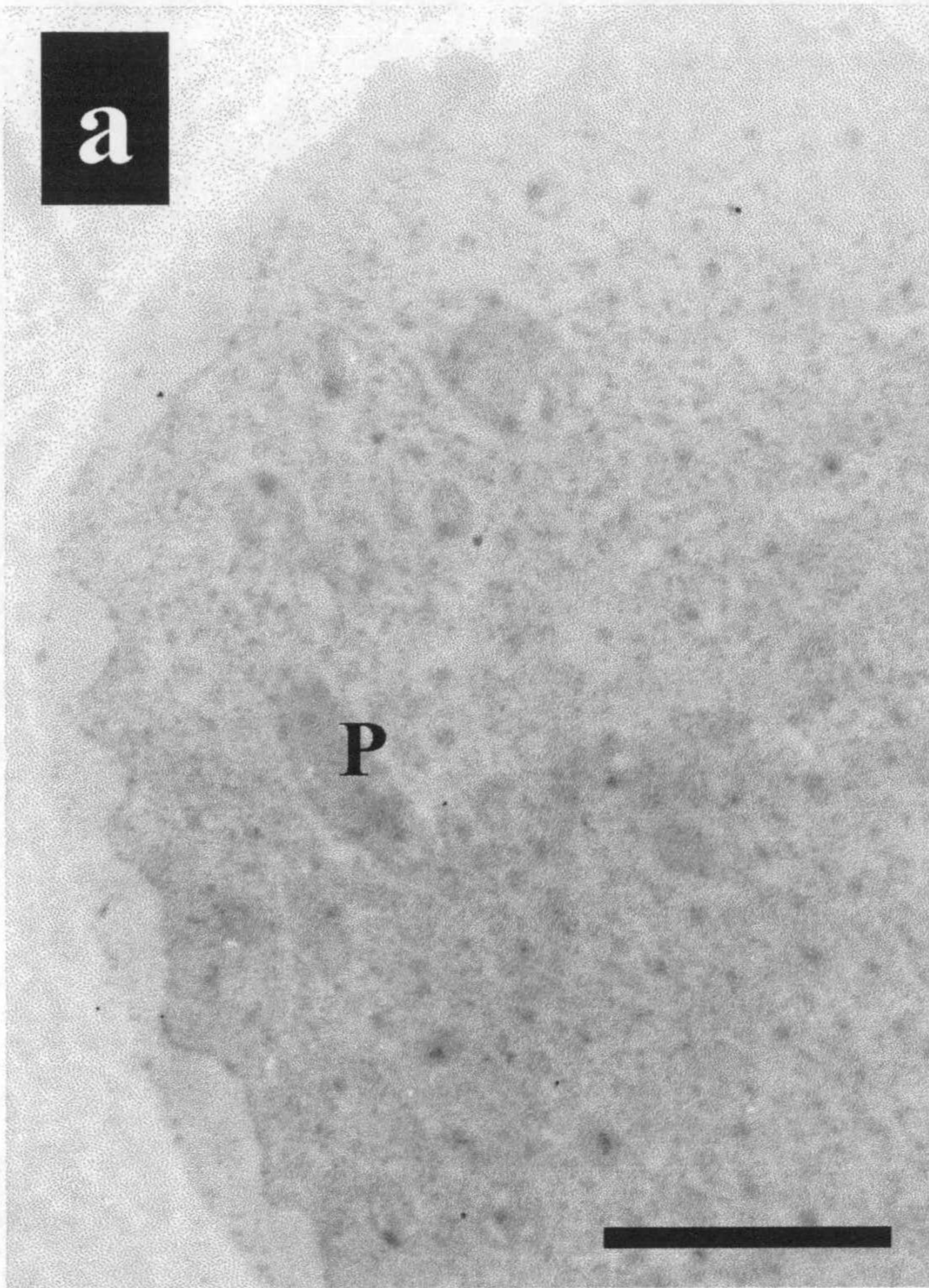


Fig. 13

Fig. 14: Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ* en tetrada de guisante (Barra=1 μ m).

Fig. 14a: En el citoplasma (Cit) los ribosomas presentan elevado señal de hibridación. Las vacuolas (Va) no muestran granos de plata. El nucleoplasma (Np) prácticamente no presenta señal de hibridación. Se observan cuerpos nucleares cubiertos de granos de oro (estrella blanca) o libres de marcado (estrella negra).

Fig. 14b: El citoplasma (Cit) presenta abundante señal de hibridación. Los nucleolos (Nu) se muestran cubiertos de granos de oro salvo la zona correspondiente a los coiled bodies (estrella negra).

Fig. 14c: Las zonas ricas en ribosomas del citoplasma (Cit) presentan abundante marcado. Nótese las vesículas (V) libres de señal de hibridación.

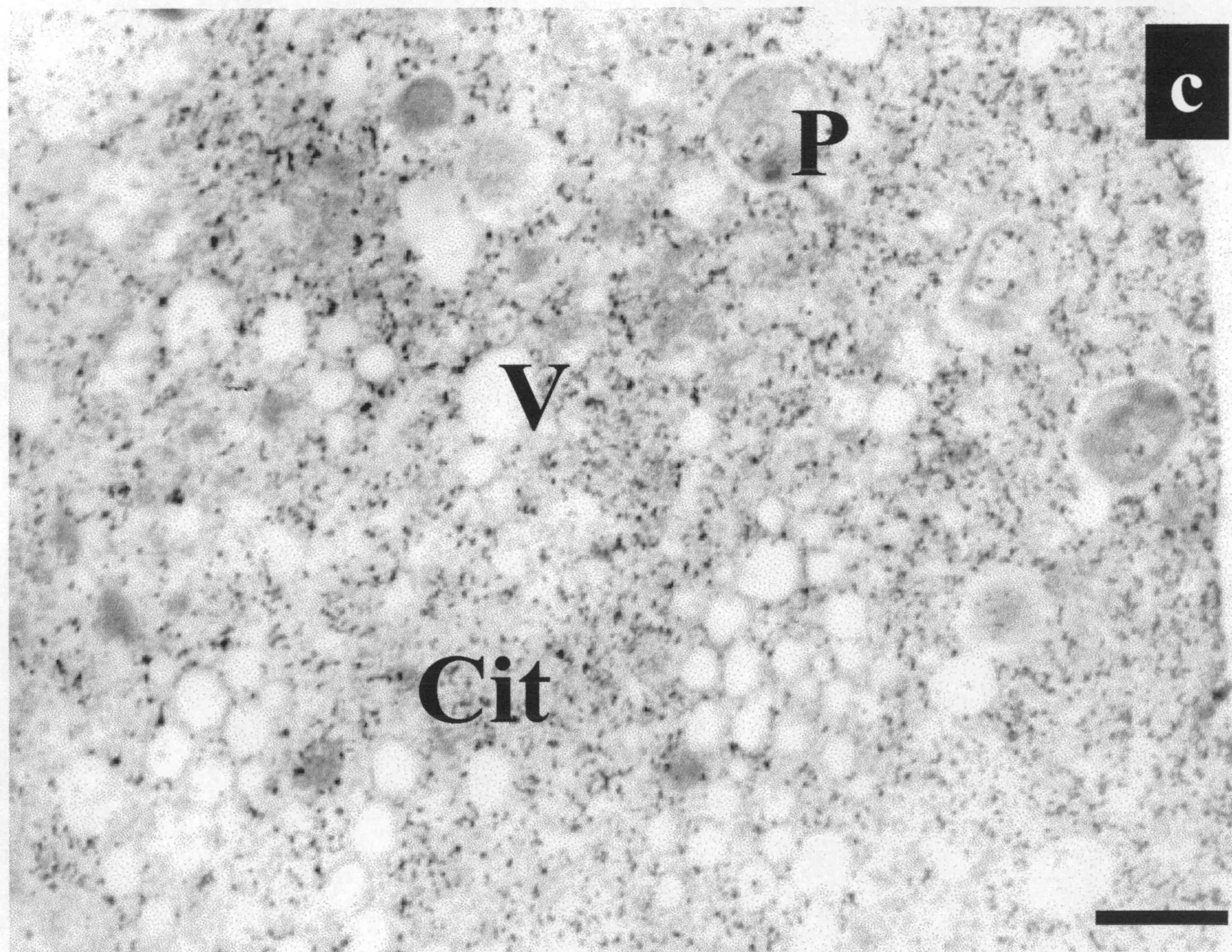
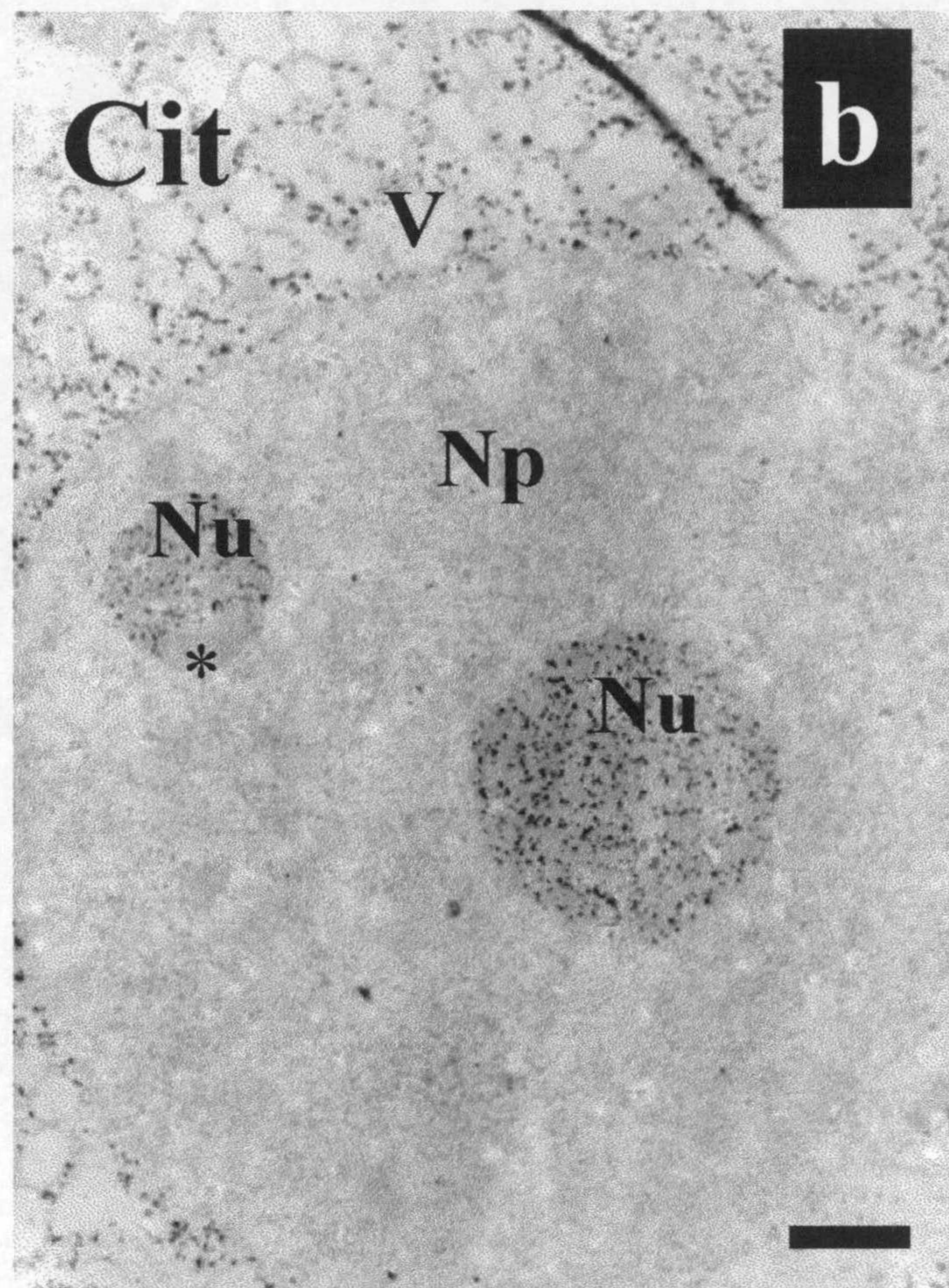
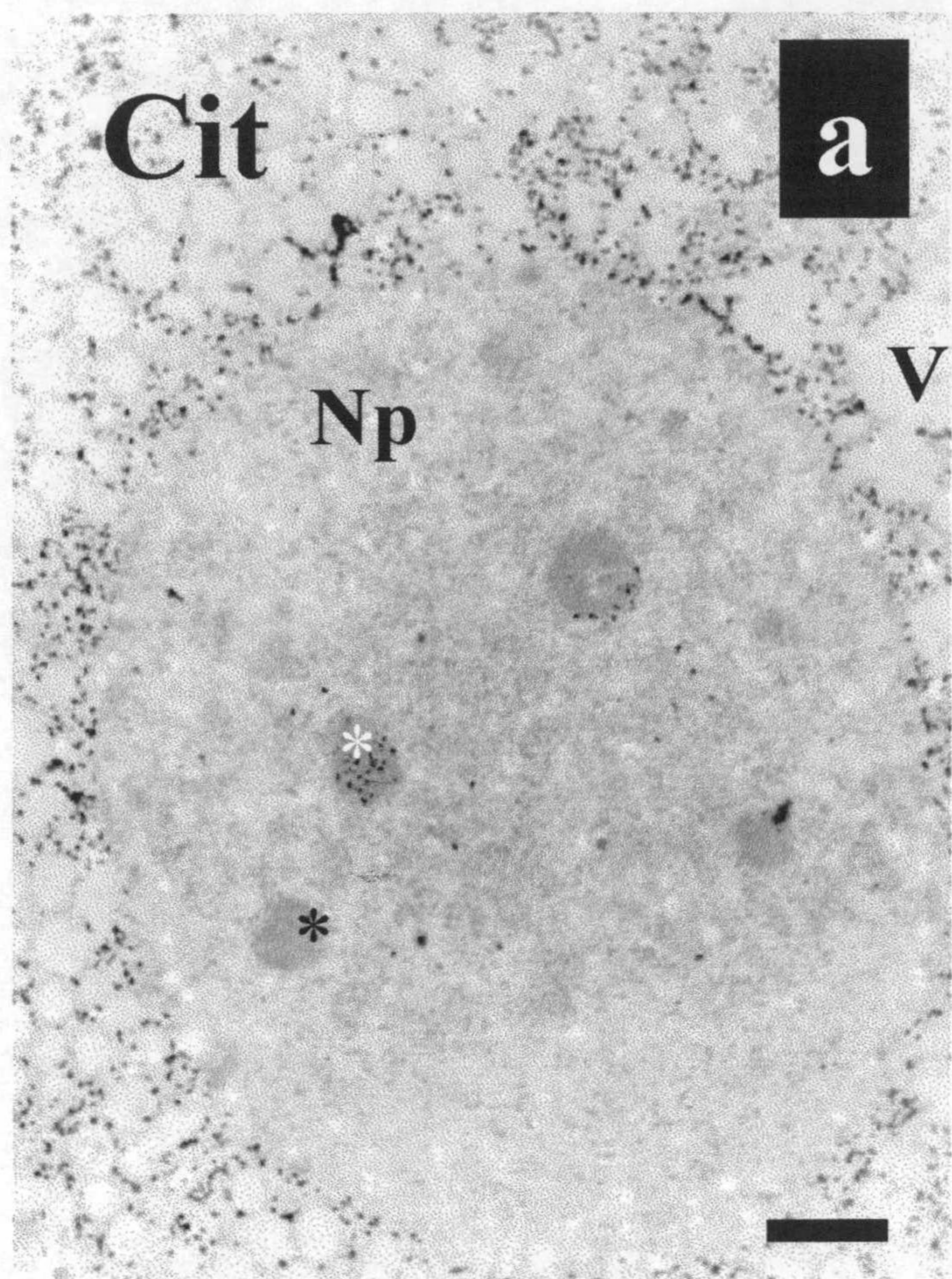


Fig. 14

Fig. 15: Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ* en microspora de guisante (Barra=1µm).

Fig. 15a: El citoplasma (Cit) presenta escasa señal de hibridación. Los orgánulos como mitocondrias (M) o plastidos (P) no presentan granos de oro. El nucleolo (Nu) está marcado mientras que en el nucleoplasma (Np) prácticamente no se ven granos de oro. Tanto la exina (E) como la intina (I) no presentan señal de hibridación.

Fig. 15b: A mayor aumento se observa el marcado en el nucleolo (Nu) y en las zonas ricas en ribosomas del citoplasma (Cit).

Figs. 15a y 15b: En el estadio de microspora de guisante, Se observa muy poca marca (flechas) en el nucleoplasma (Np) mientras que los nucleolos (Nu) aparecen fuertemente marcados.

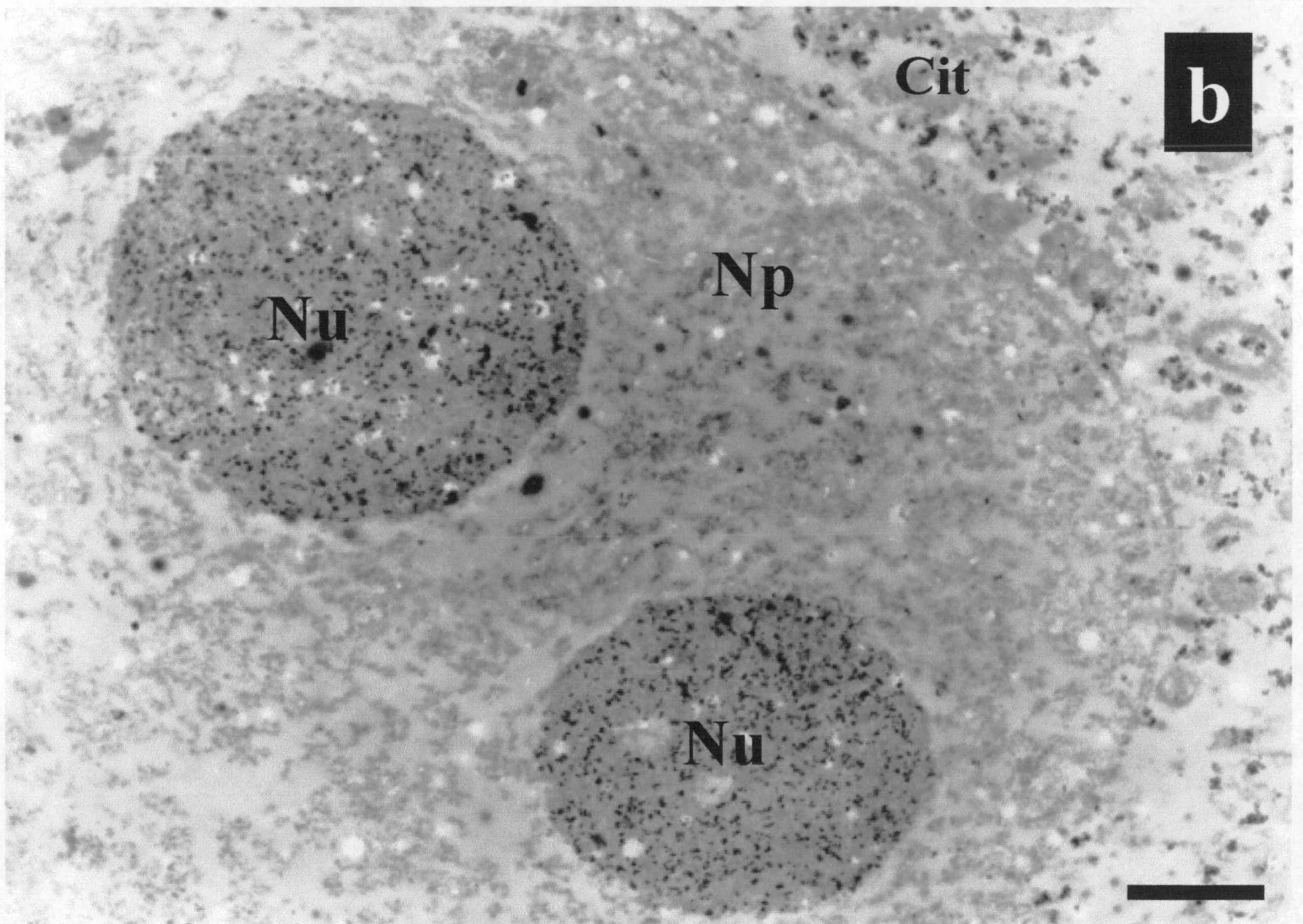
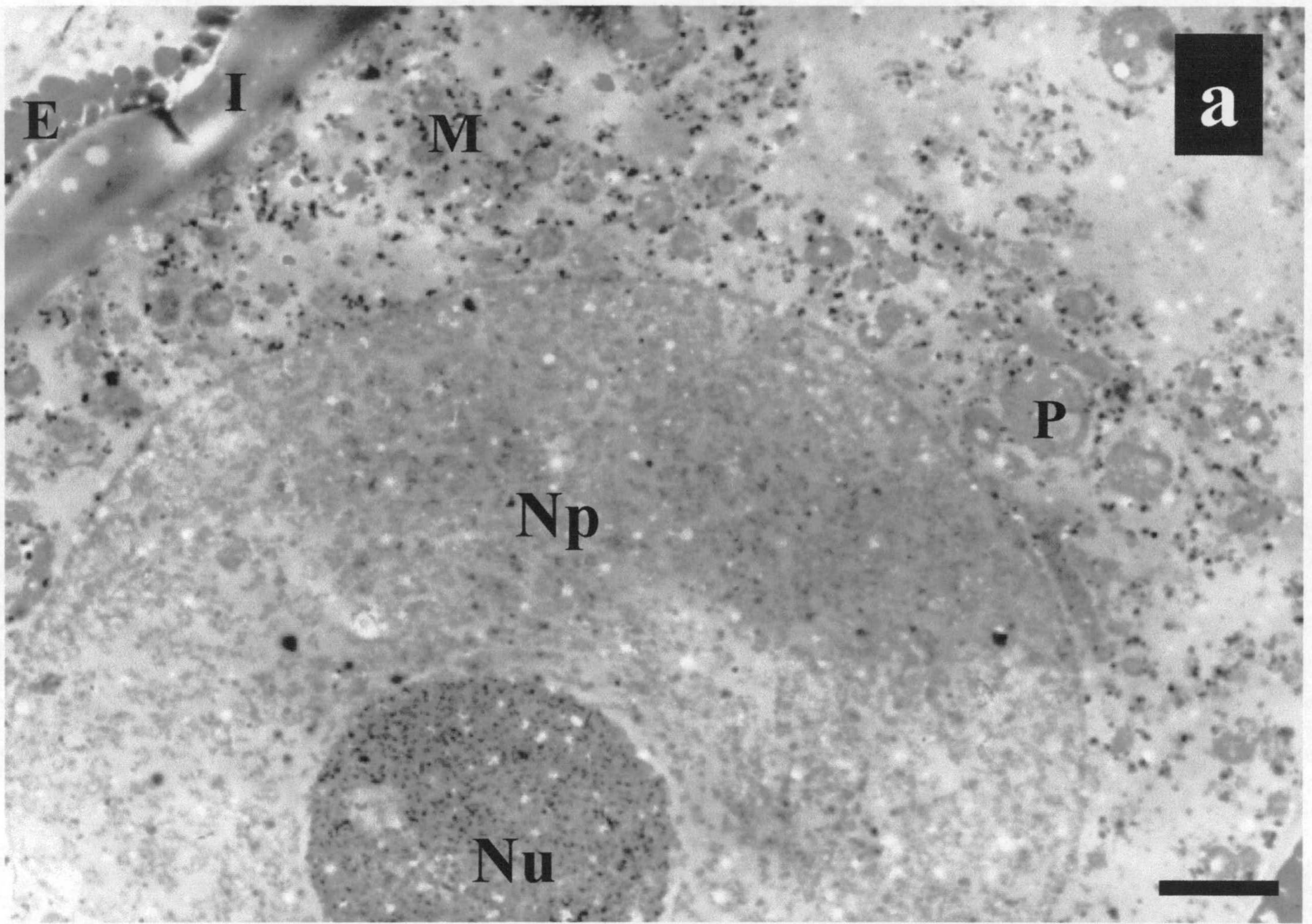


Fig. 15

Fig. 16: Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ* en polen bicelular de guisante Tanto el citoplasma generativo (CG) como el vegetativo (CV) aparecen muy fuertemente marcados en los ribosomas. El núcleo vegetativo (NV) y generativo (NG) no contienen prácticamente granos de oro. Mitocondrias (M), plastidios (P), exina (E) e intina (I) no presentan señal de hibridación (Barra = 1µm).

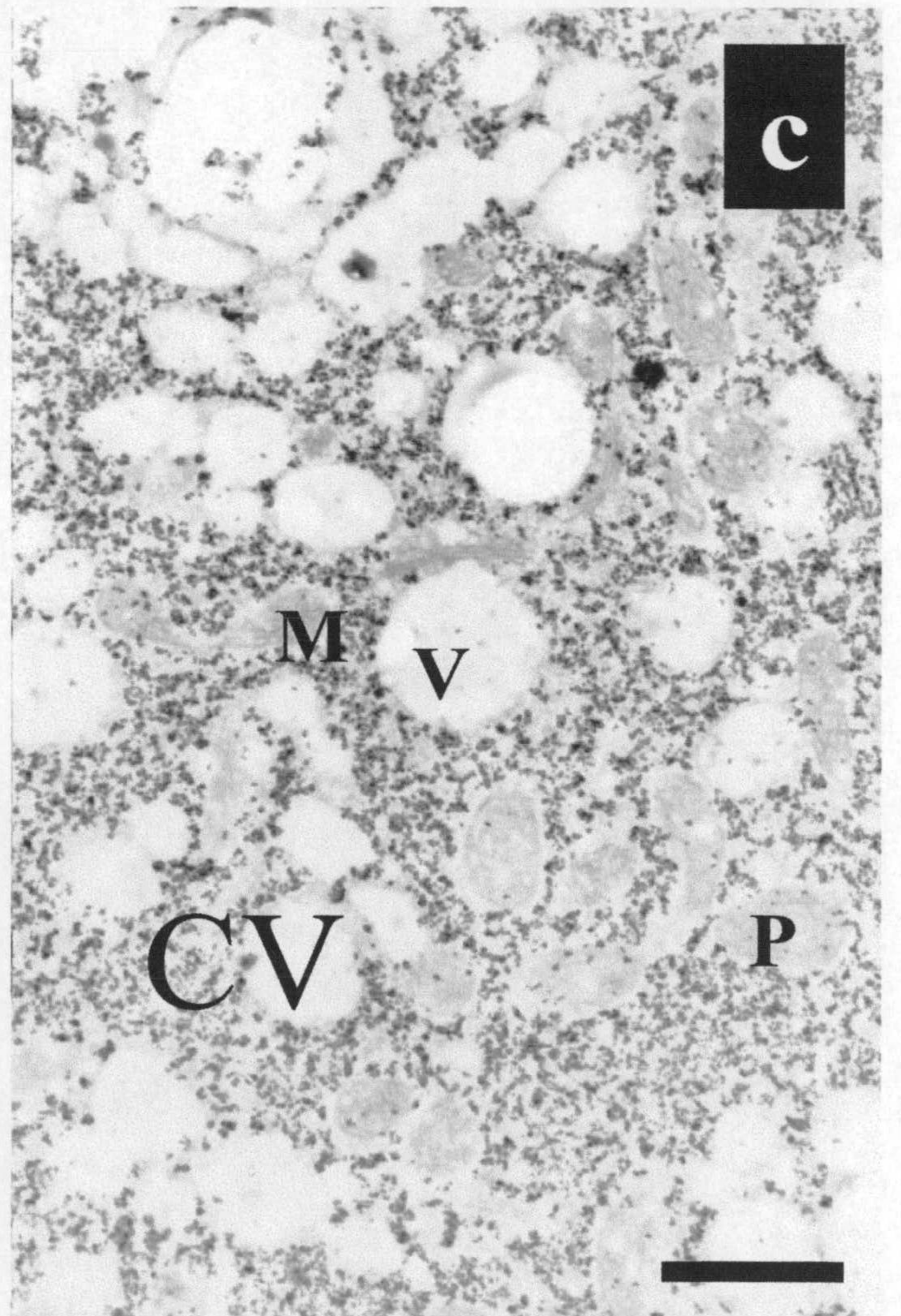
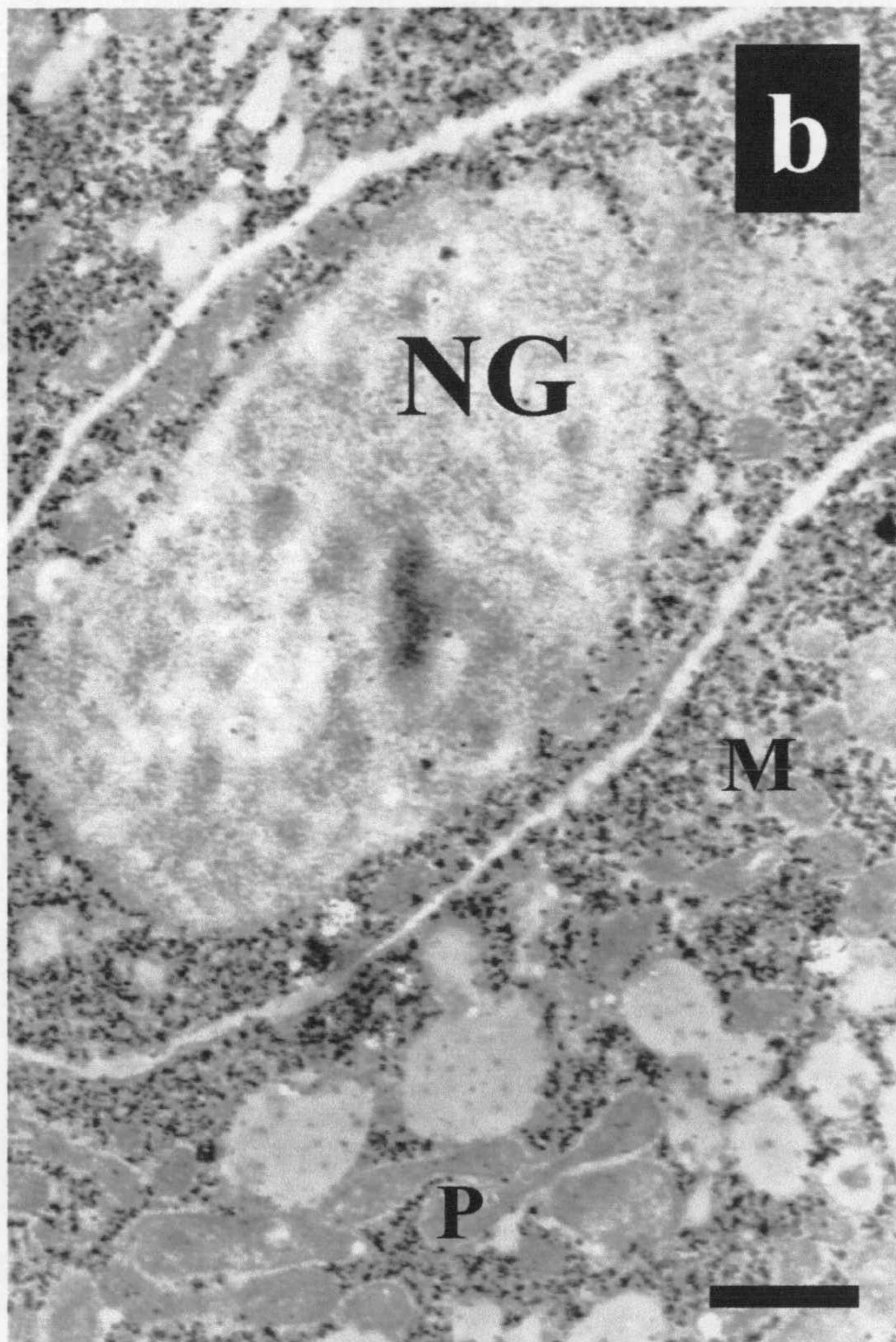
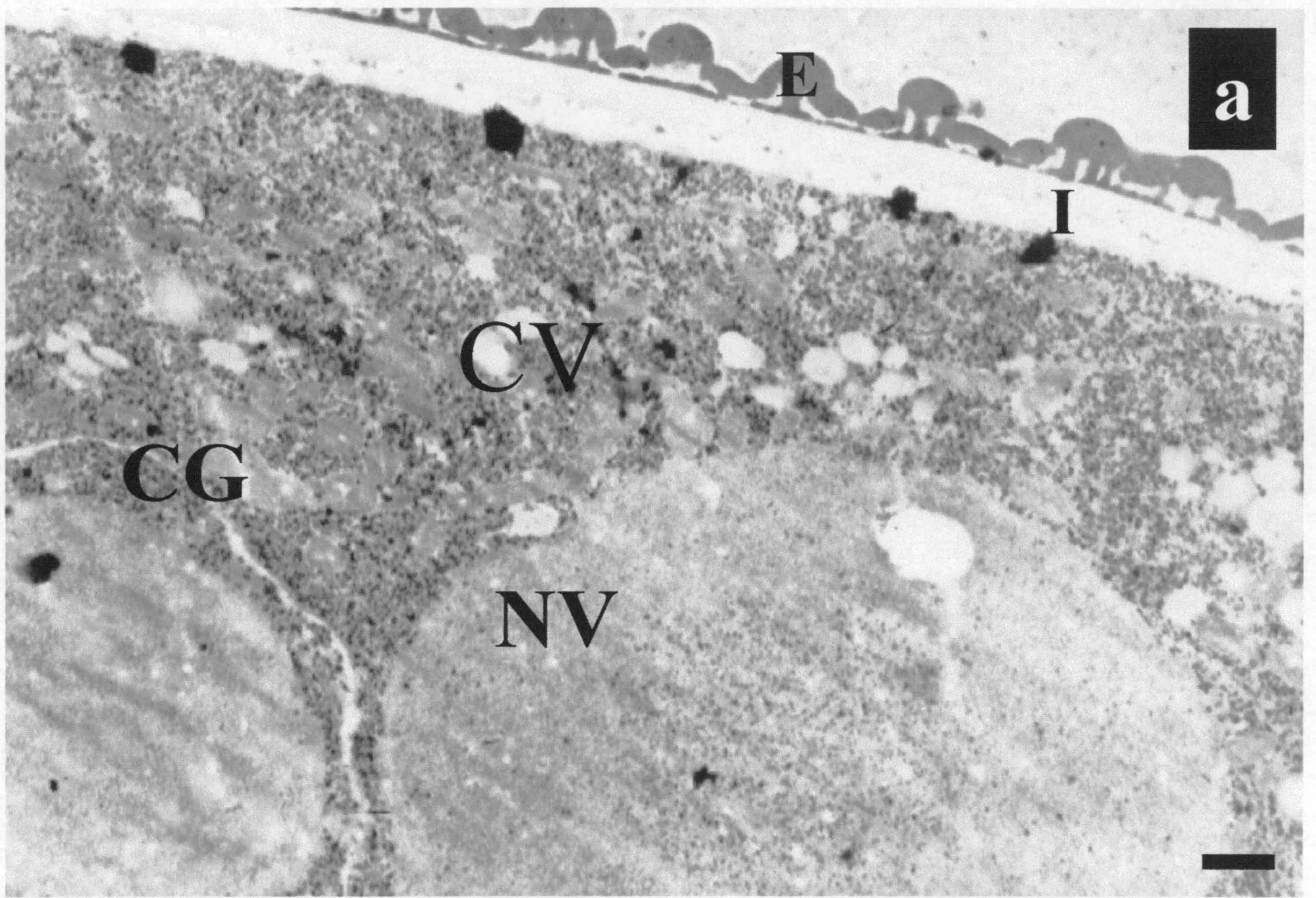


Fig. 16

Fig. 17: Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ* en tetrada de arabidopsis.

Fig. 17a: Tetrada joven. Citoplasma (Cit) y nucleolo (Nu) con abundante señal de hibridación. Calosa (Ca) libre de marcado.

Fig. 17b: Tetrada avanzada. Citoplasma ligeramente menos marcado que en la tetrada joven. Nucleolo (Nu), mitocondrias (M) y plastidos (P) libres de marcado como la calosa (Ca) y primexina (PE). (Barra = 1 μ m).

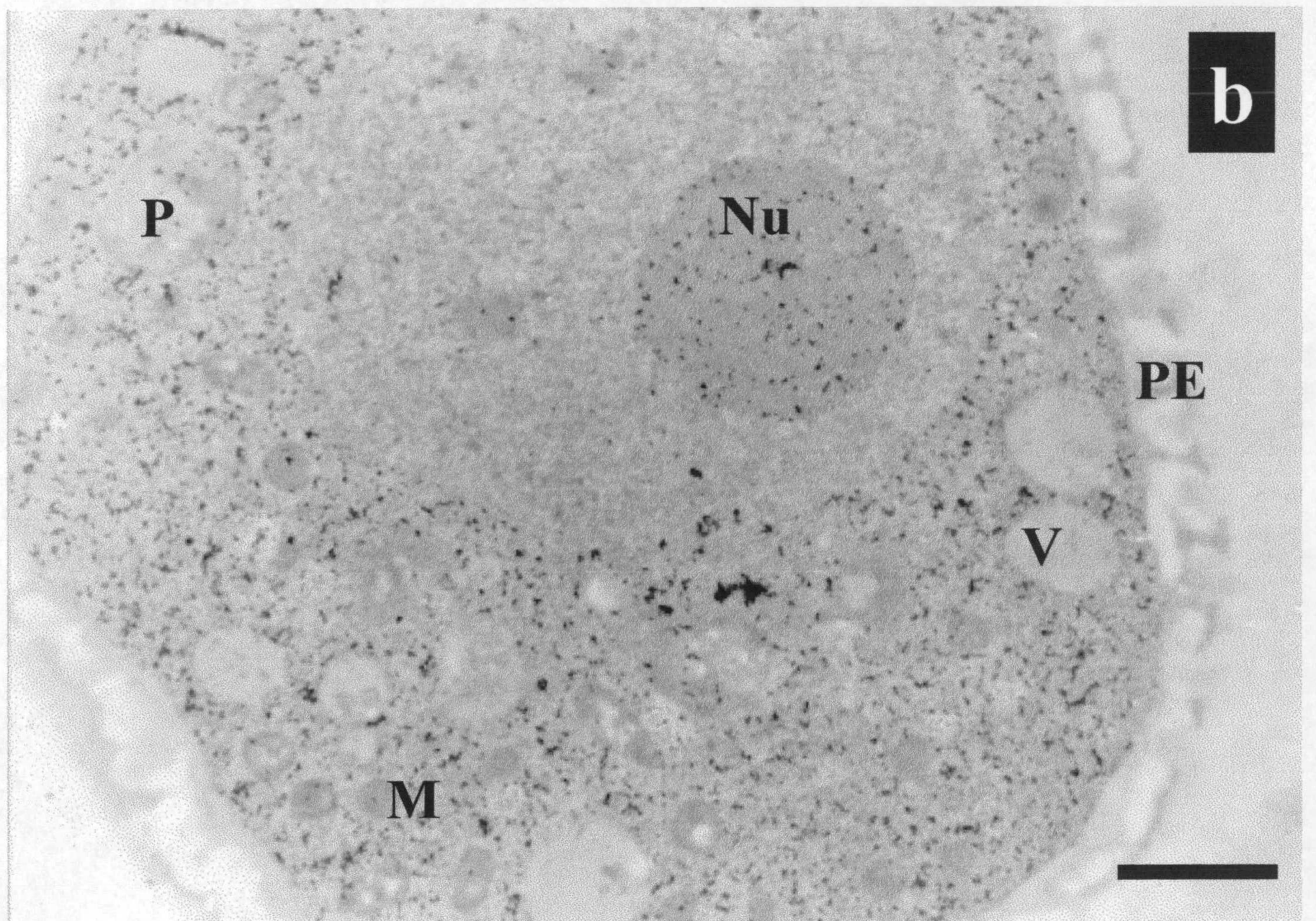
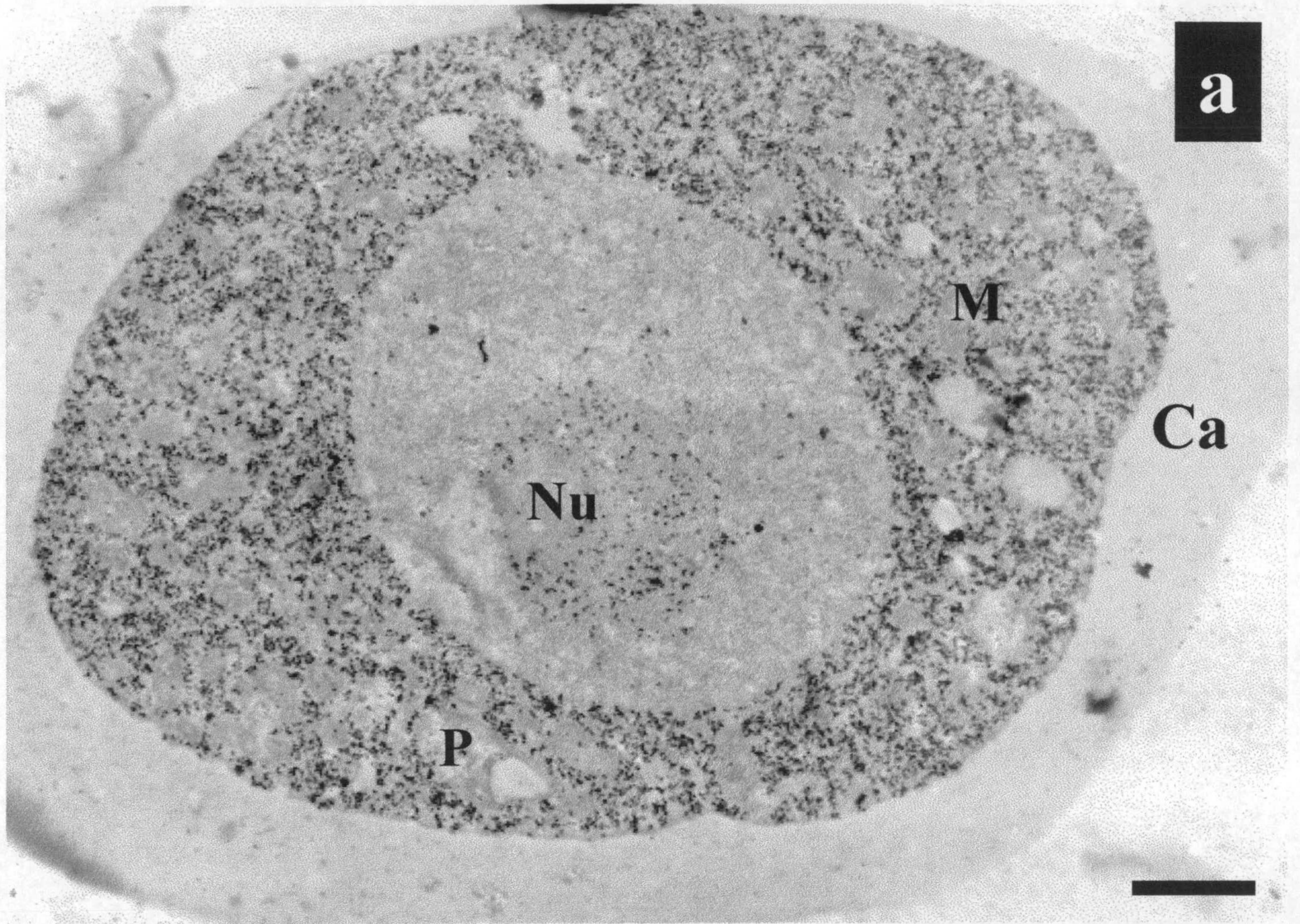


Fig.17

Fig. 18: Localización de ARN ribosómico mediante hibridación *in situ* en microspora vacuolada (18a y 18b) y polen bicelular joven(18c) (Barra=1µm).

Fig. 18a y 18b: El citoplasma (Cit) aparece marcado en las zonas ricas en ribosomas. Los orgánulos del citoplasma no presentan señal de hibridación. El nucleolo se muestra cubierto de granos de oro. En la vacuola (Va) se observa marcado en algunas áreas densas. Tanto la exina (E) como la intina (I) están libres de granos de oro.

Fig. 18c: En la célula generativa (CG) tanto el nucleolo (Nu) como el citoplasma están cubiertos de señal de hibridación mientras que no hay señal en el núcleo generativo (NG). En la célula vegetativa (CV) tanto el nucleolo (Nu) como el citoplasma (Cit) están cubiertos de señal de hibridación mientras que los amiloplastos (Am) y las vesículas (V) no presentan granos de oro.

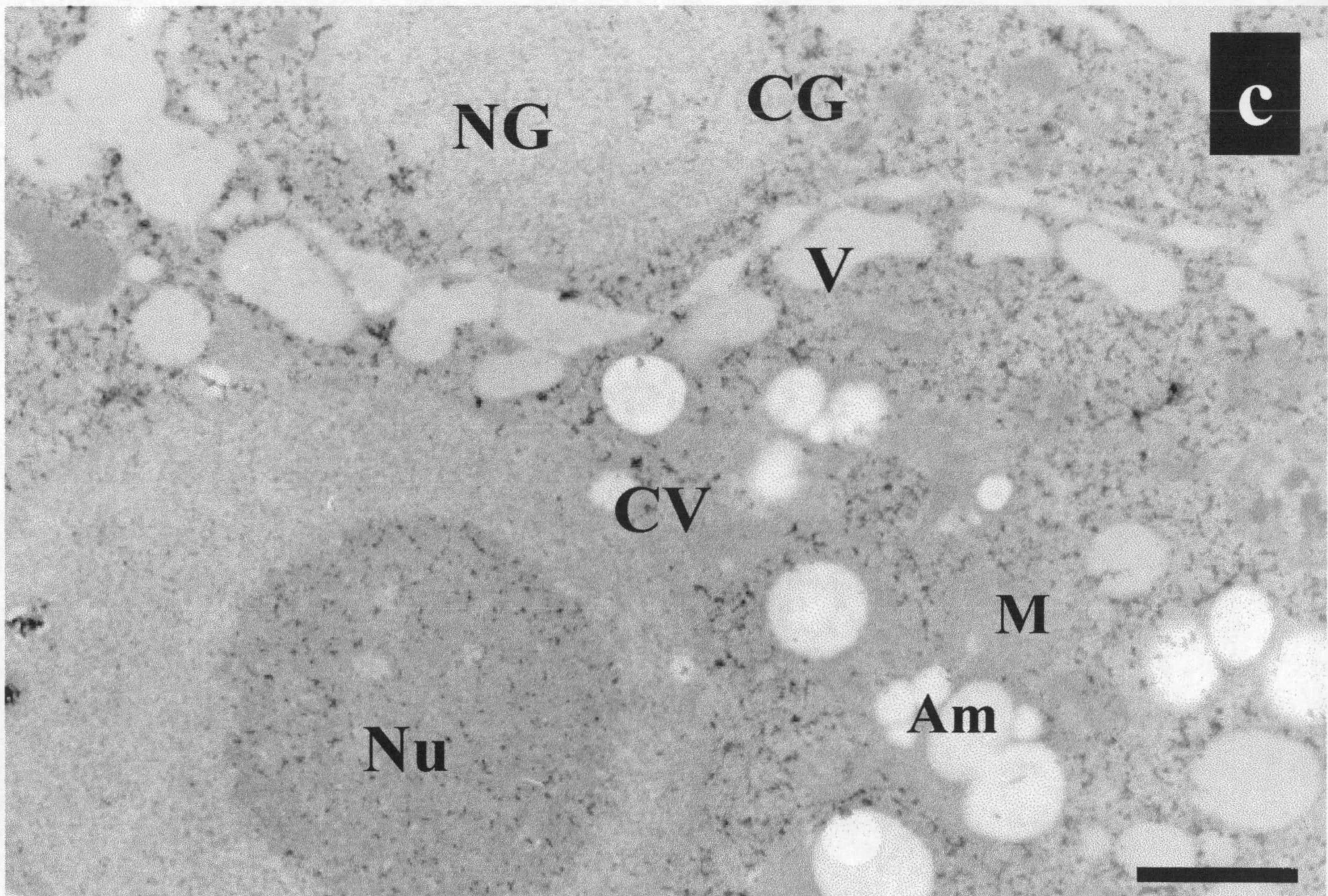
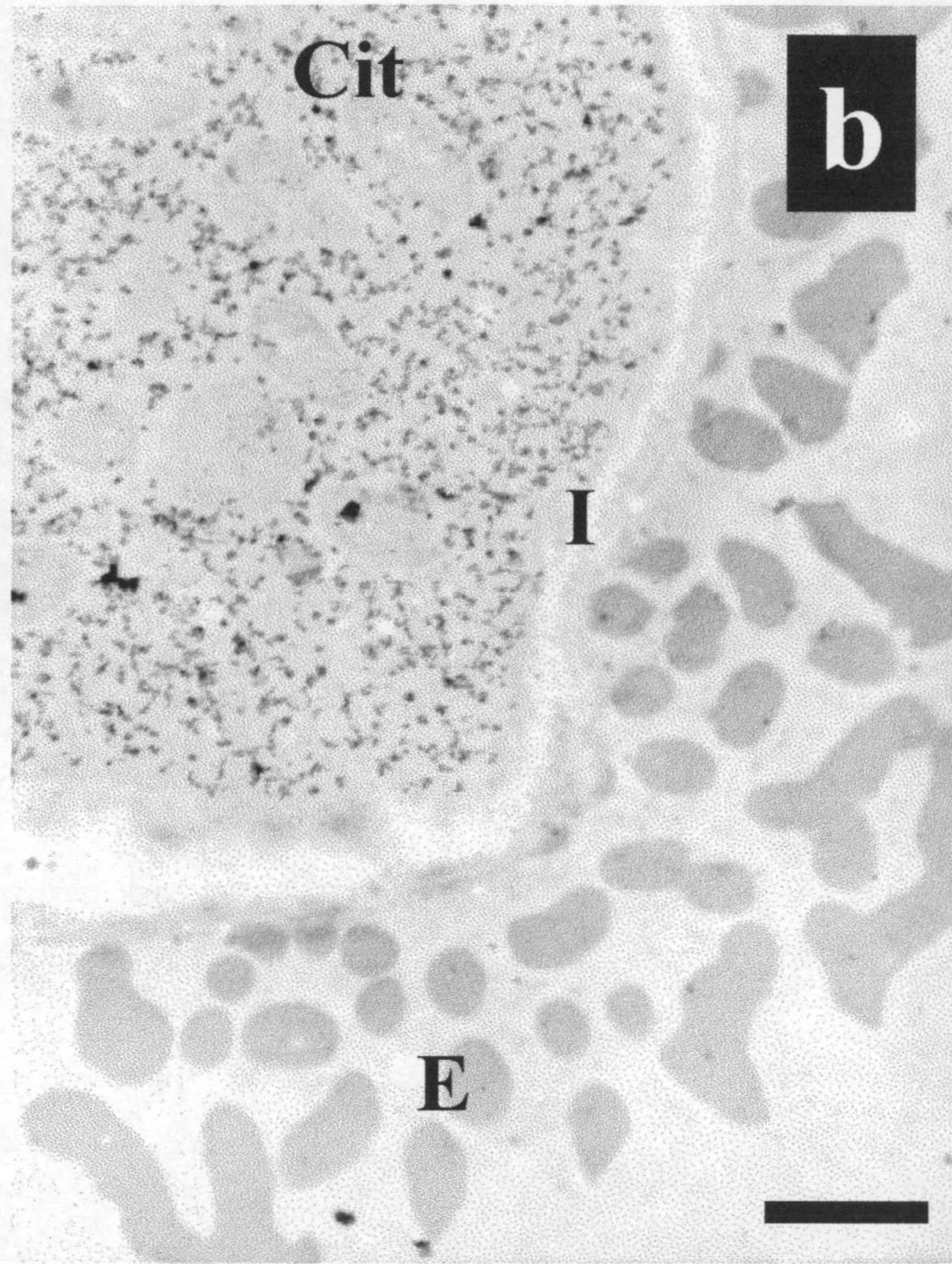
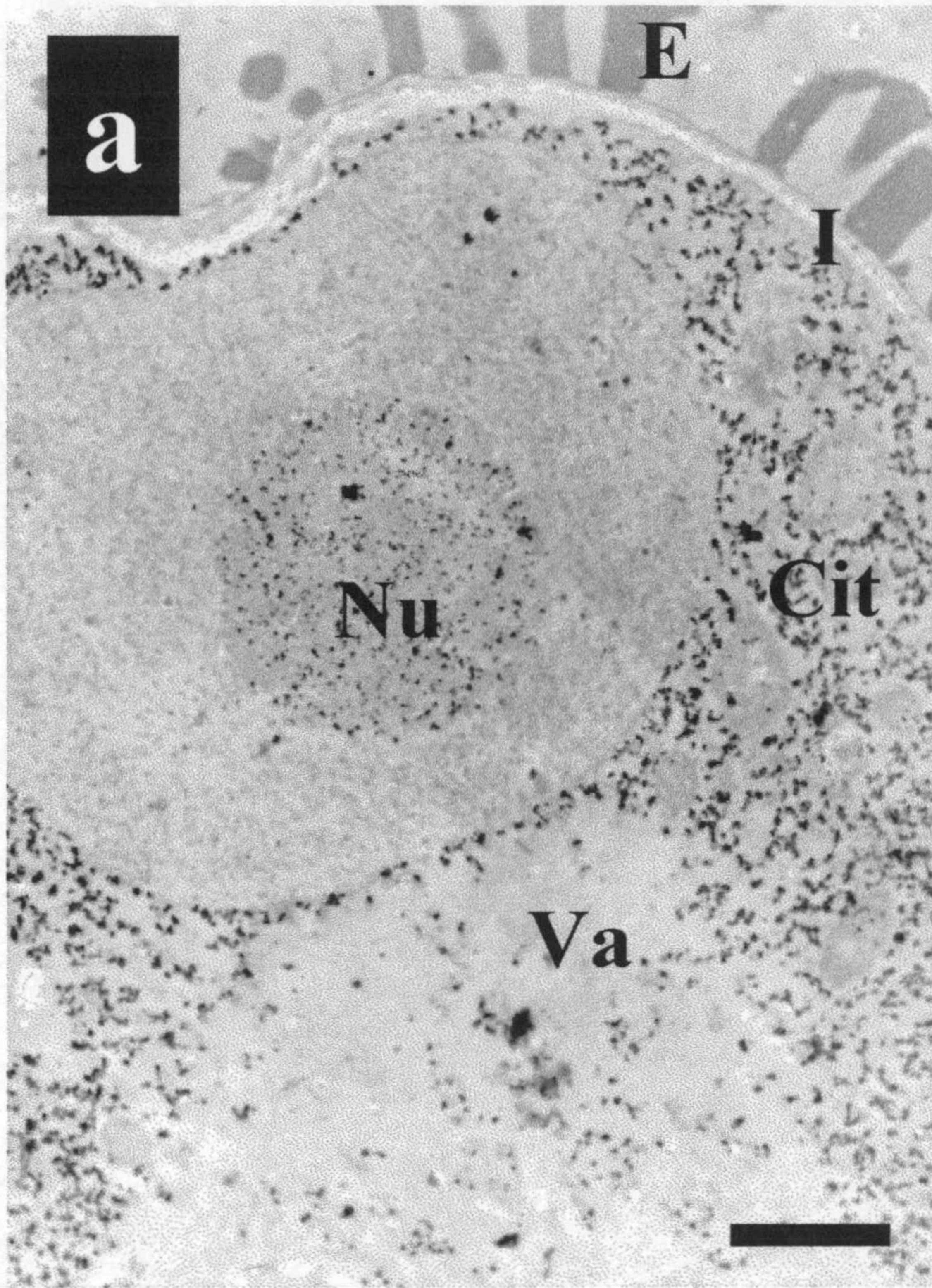


Fig. 18

Fig. 19: Anteras cultivadas observadas bajo lupa estereoscópica (Barra = 10 μ m).

Fig. 19a: Antera de guisante (Lincoln) con protuberancia o callo en la teca.

Fig. 19b: Antera de guisante (Lincoln) con callo en el filamento.

Fig. 19c: Antera de arabidopsis (Col 4) que ha aumentado su tamaño.

Fig. 19d: Antera de guisante (Lincoln) que muestra oscurecimiento de una de las tecas hasta quedar marrón mientras que la otra quedaba del color original.

Fig. 19e: Antera de guisante (Lincoln) con oscurecimiento de las dos tecas quedándose marrón.

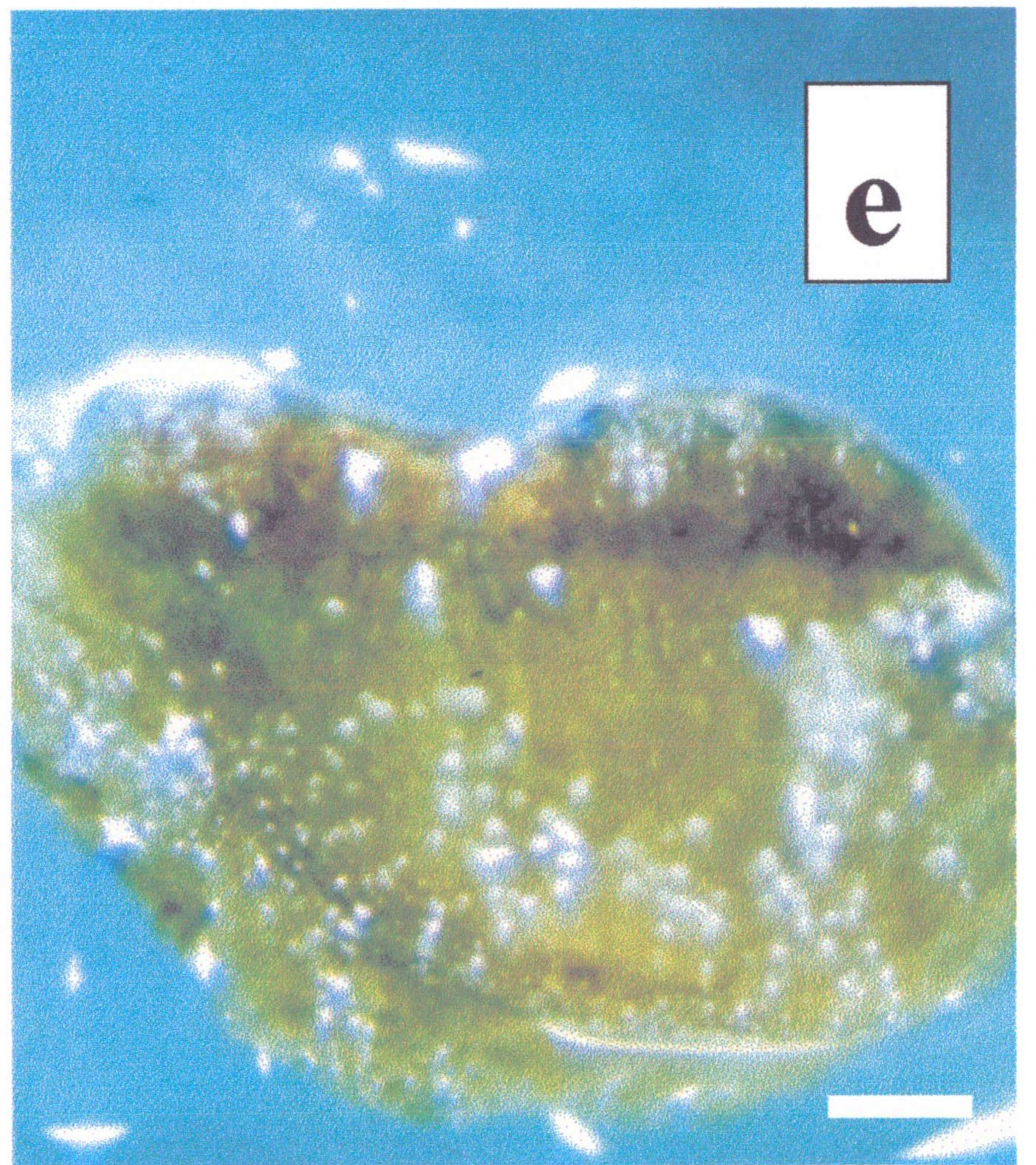
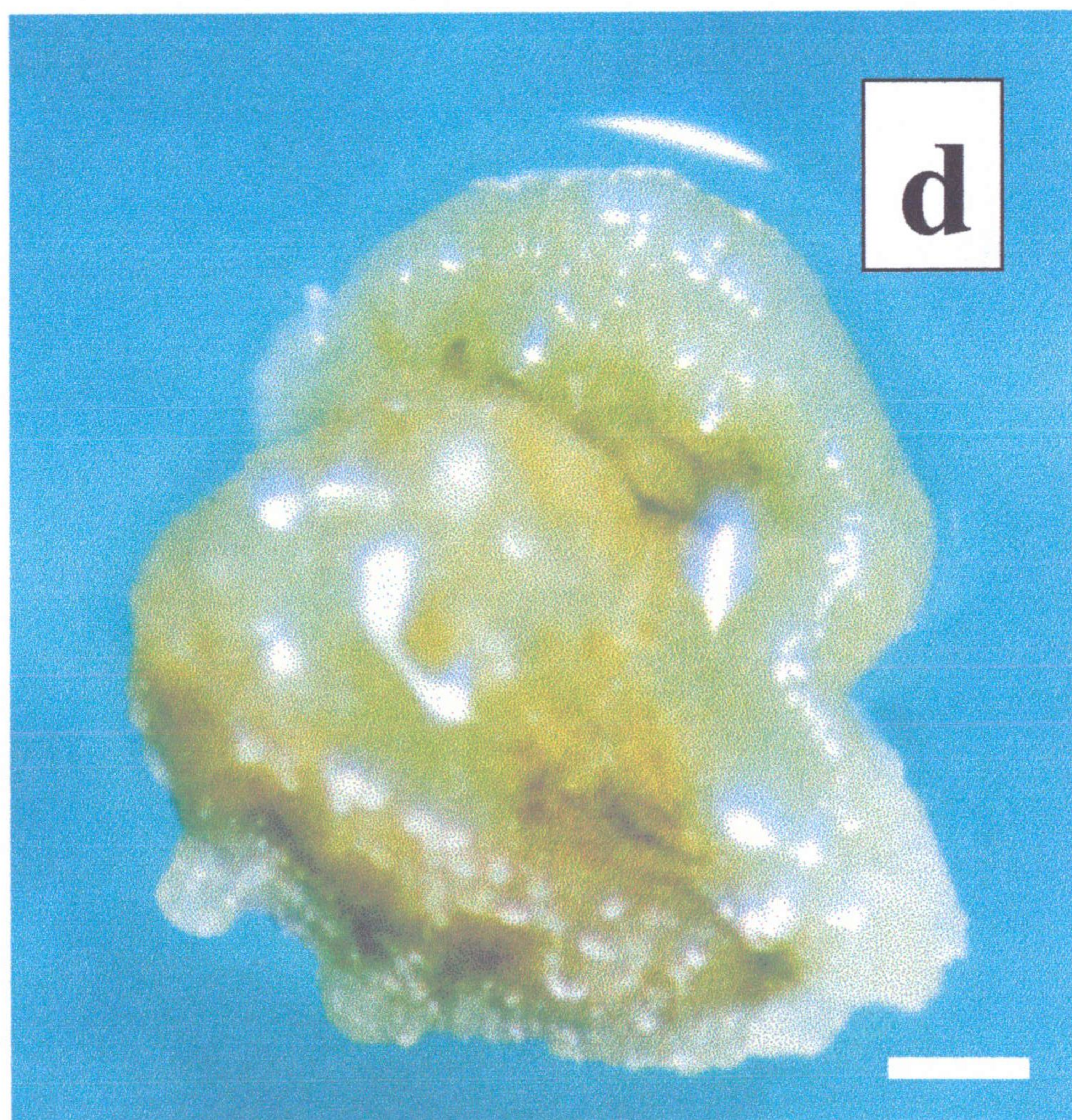
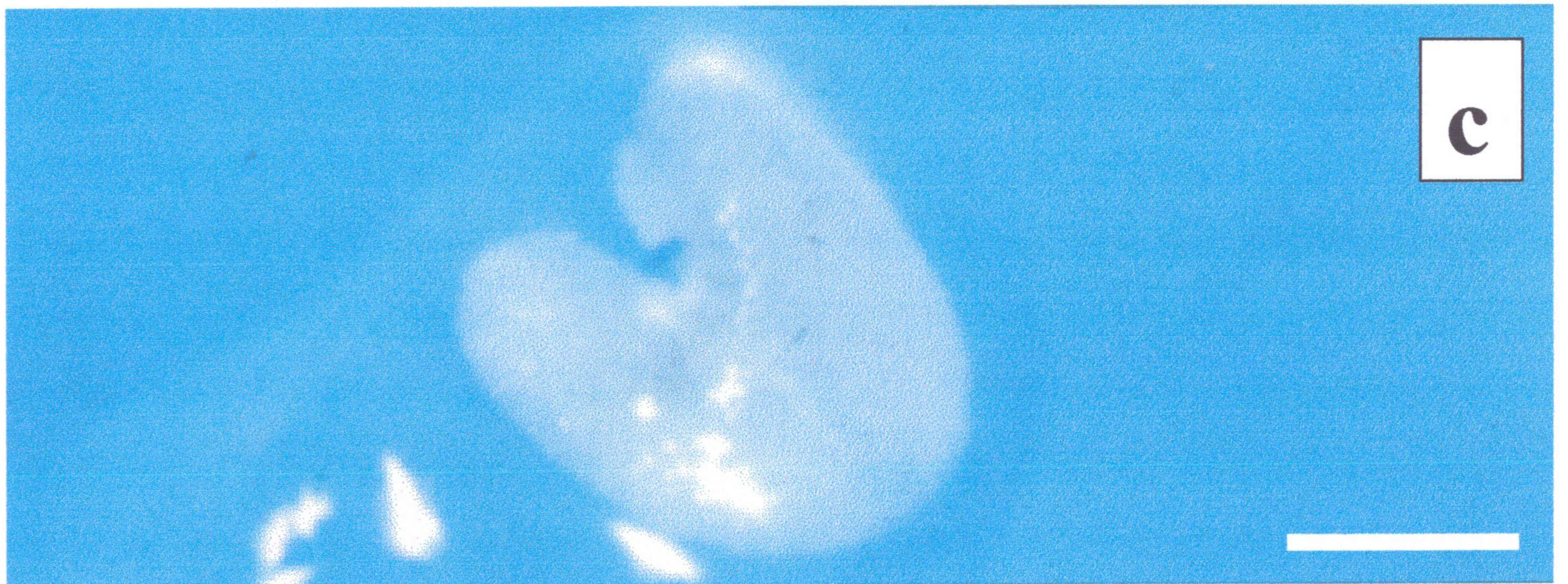
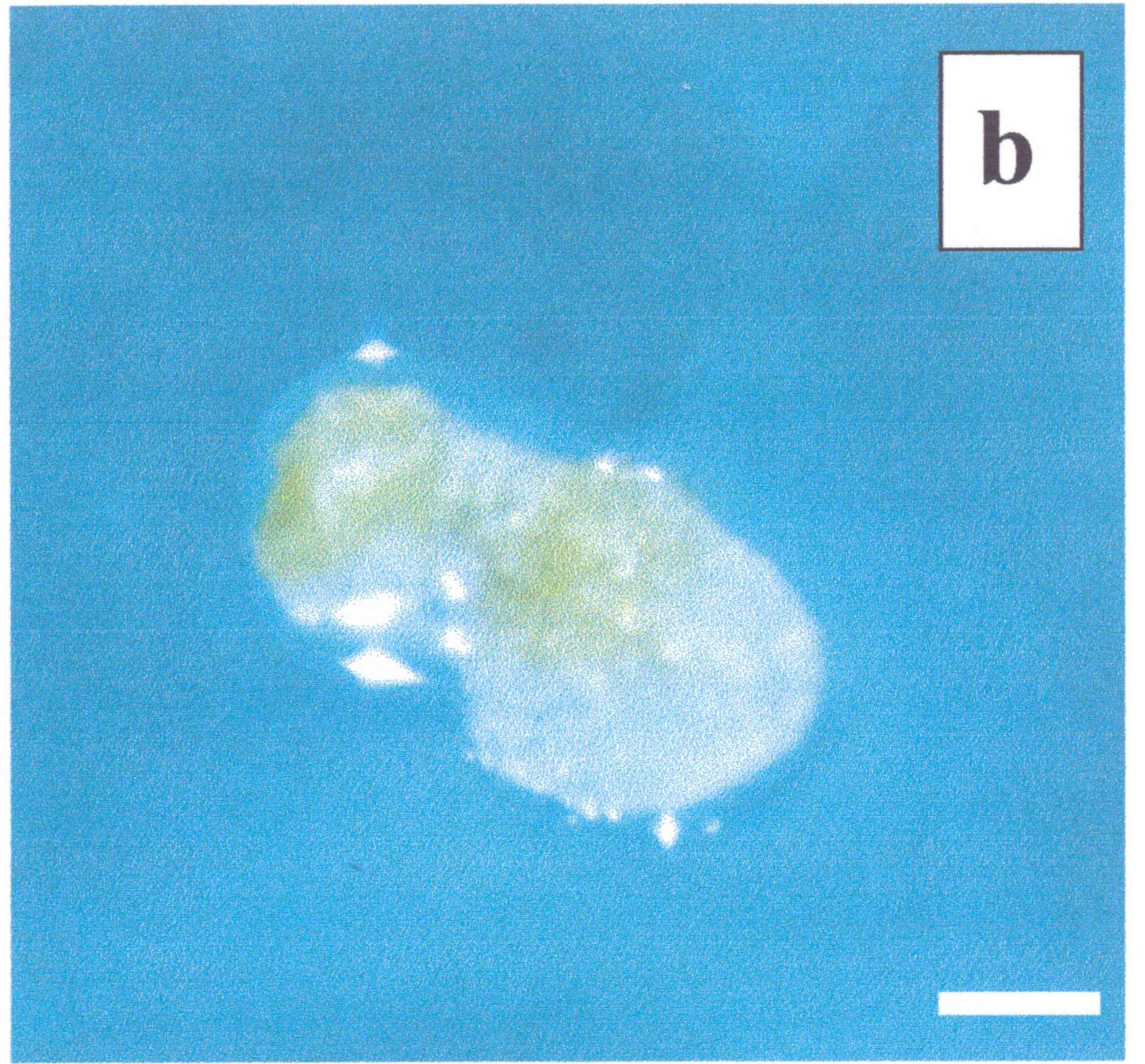
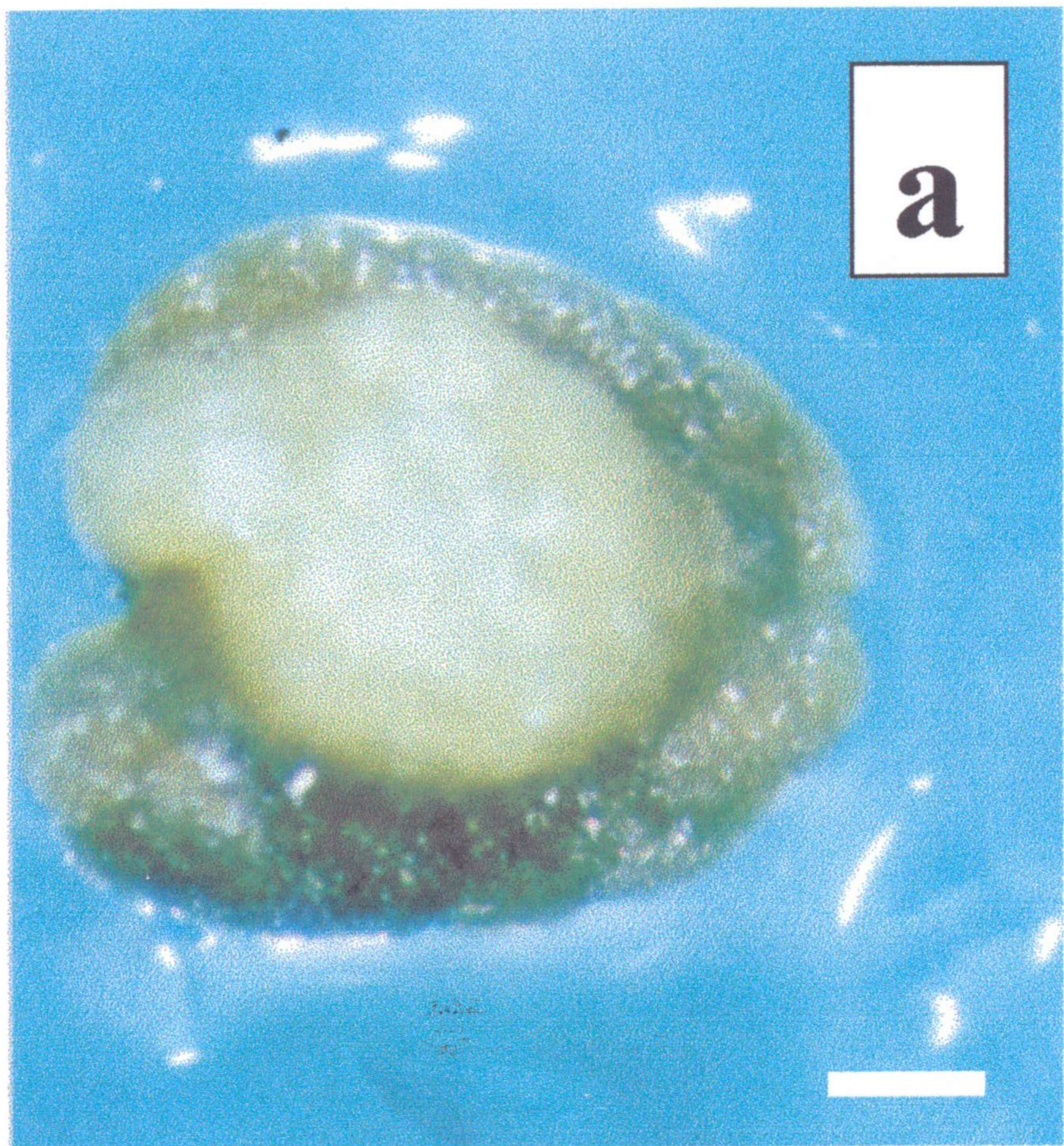


Fig. 19

Fig. 20: Tinción con DAPI para ADN en aplastados. Polinucleados obtenidos tras el cultivo de anteras de arabidopsis y guisante (cultivo 3) observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente (Barra=10µm).

Fig. 20a: Polinucleado de guisante (mutante SGE). División simétrica. Se observan dos núcleos idénticos (flechas negras).

Fig. 20b: Polinucleado de guisante (variedad Lincoln). Un núcleo con alta intensidad de fluorescencia (flecha gruesa corta blanca) y los otros fluorescen menos (flecha blanca corta).

Fig. 20c: Polinucleado de arabidopsis (ecotipo Col 4). Los núcleos tienen una intensidad semejante de fluorescencia (Flechas blancas).

Fig. 20d: Polinucleado de arabidopsis ecotipo (C24). En este caso también Los núcleos tienen una intensidad semejante de fluorescencia (Flechas blancas).

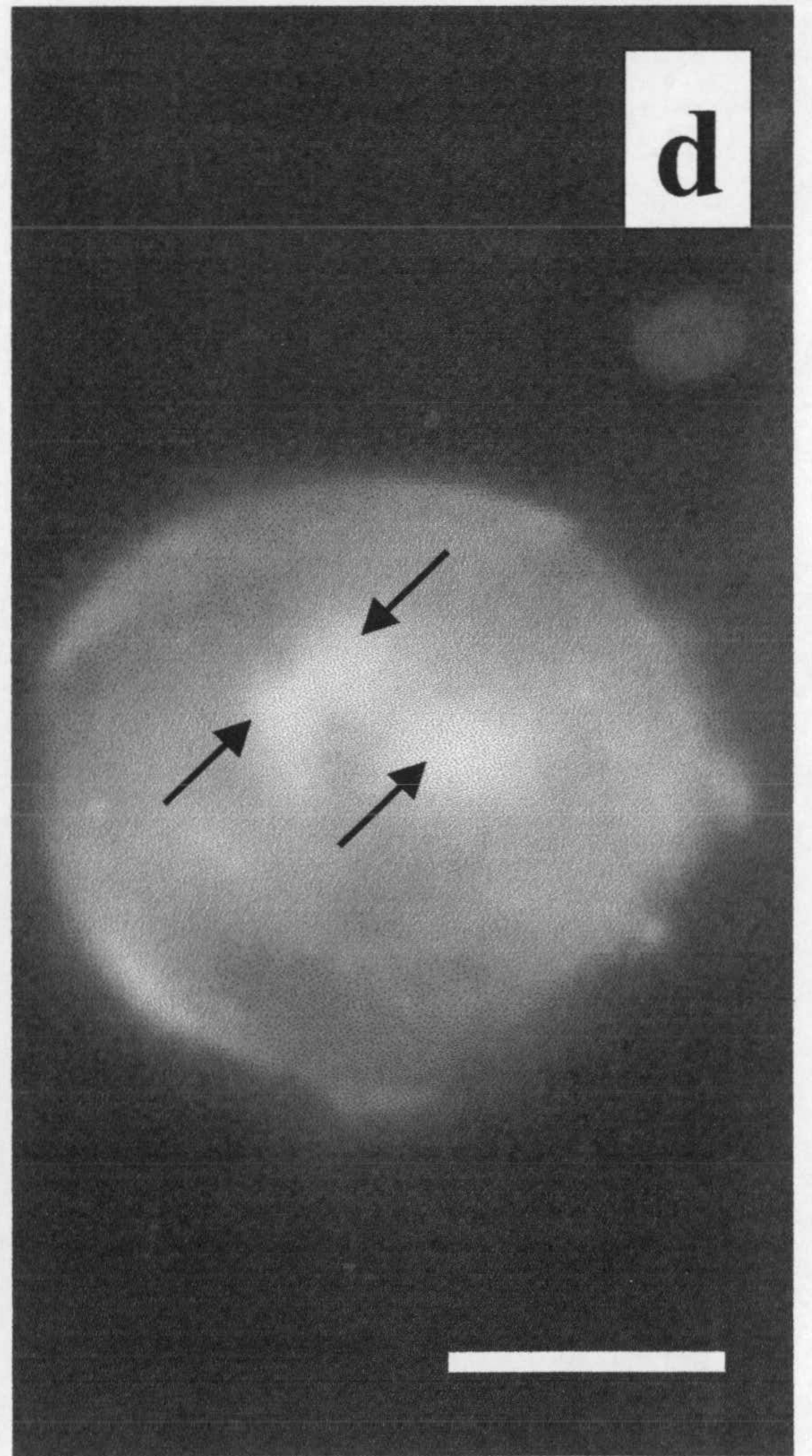
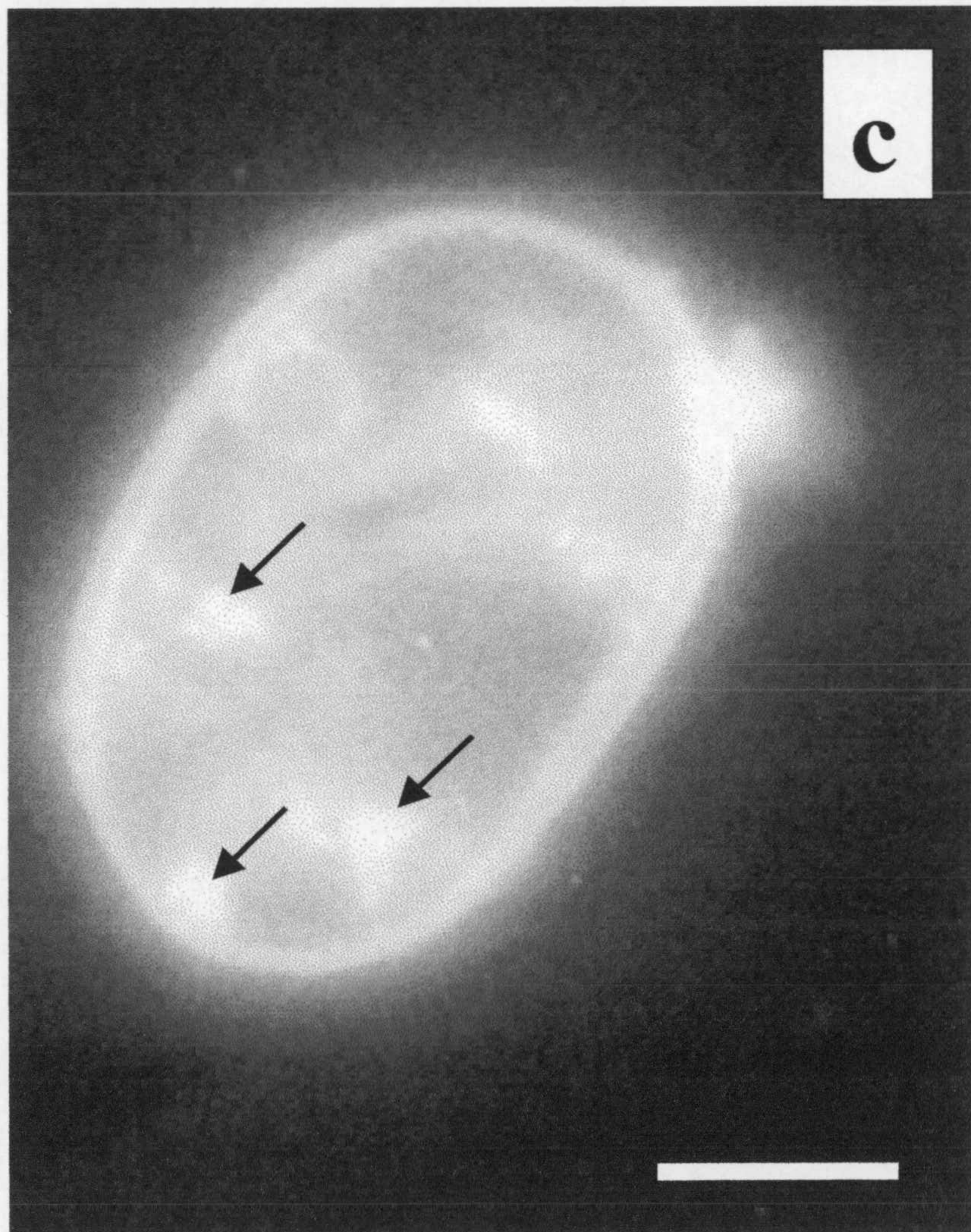
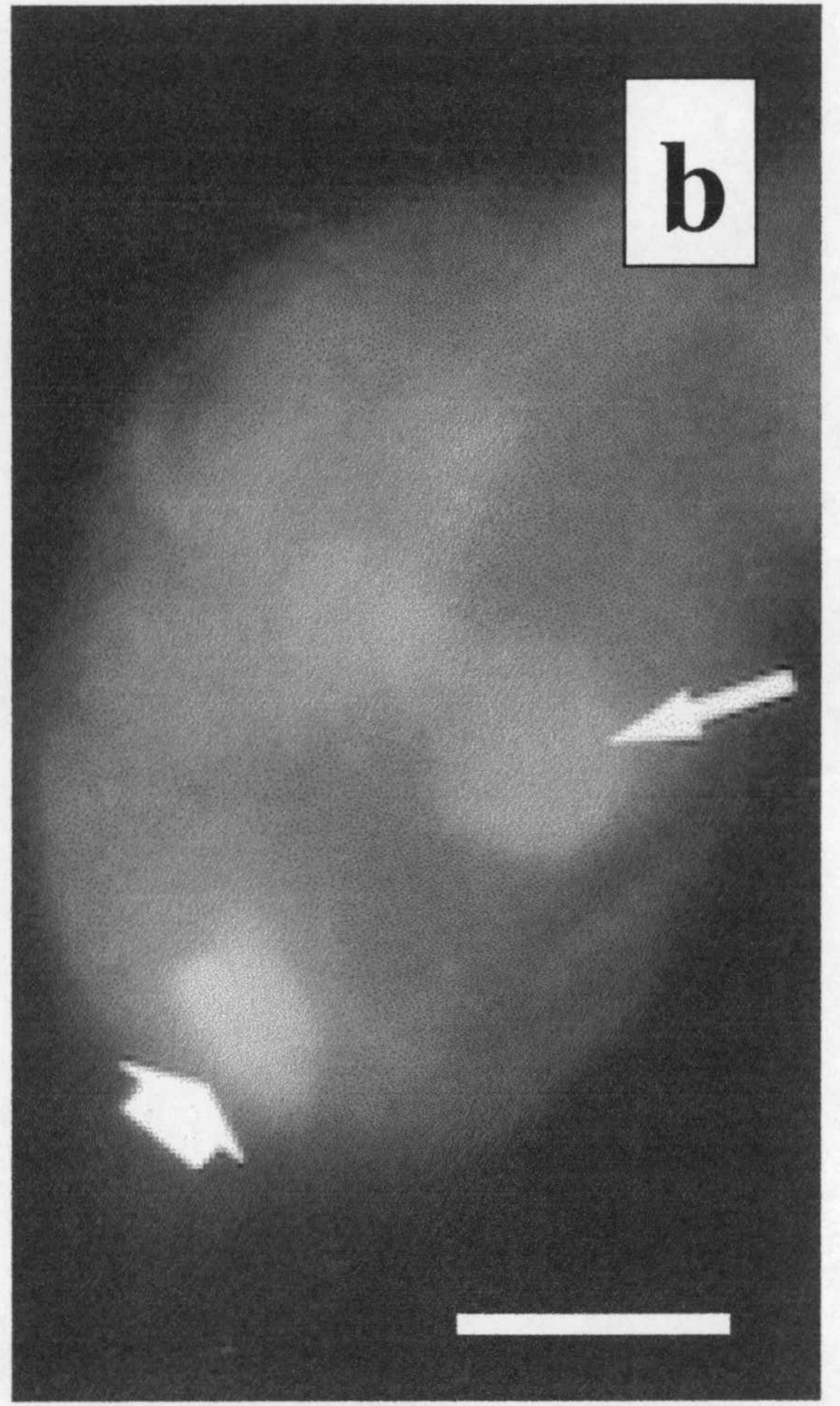
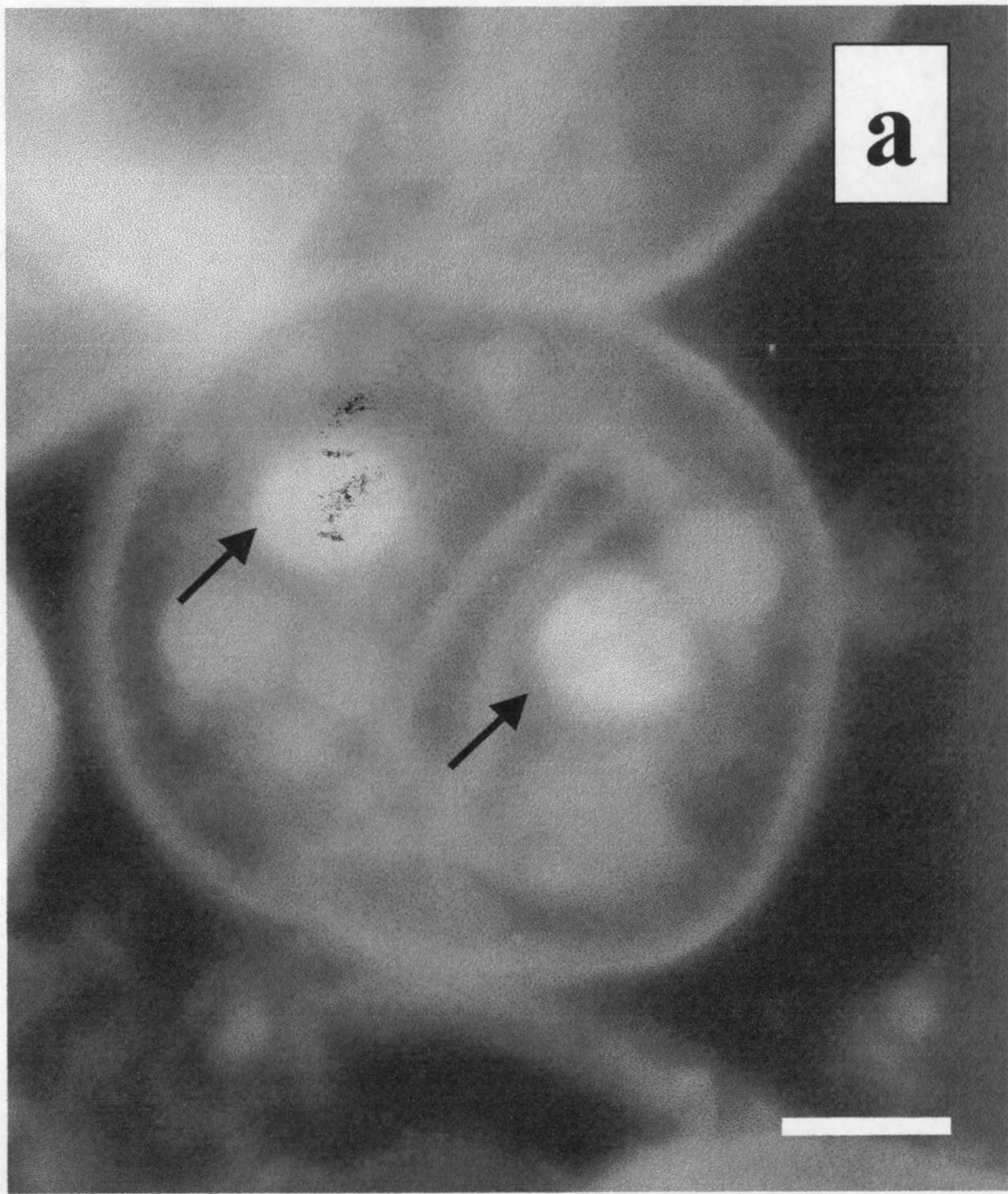


Fig. 20

Fig.21: Tinción con DAPI para ADN en aplastados. Granos de polen de control o pretratados de guisante observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente (Barra=10µm).

Fig. 21a: Granos del polen antes del cultivo: tetrada (T) y microspora joven (M).

Fig. 21b: Después de 5 días a 4°C la cromatina (Cr) de la microspora se muestra descondensada.

Fig. 21c: Después de 5 días a 4°C, las tetradas presentan núcleos con la cromatina (Cr) muy descondensada.

Fig. 21d: Después de 5 días a 4°C se observan unas microsporas que con dos núcleos con alta intensidad de fluorescencia (flechas).

Fig. 21e y 21f: Se observan unos polinucleados (P) con los núcleos que presentan una cromatina con intensidad de fluorescencia semejante.

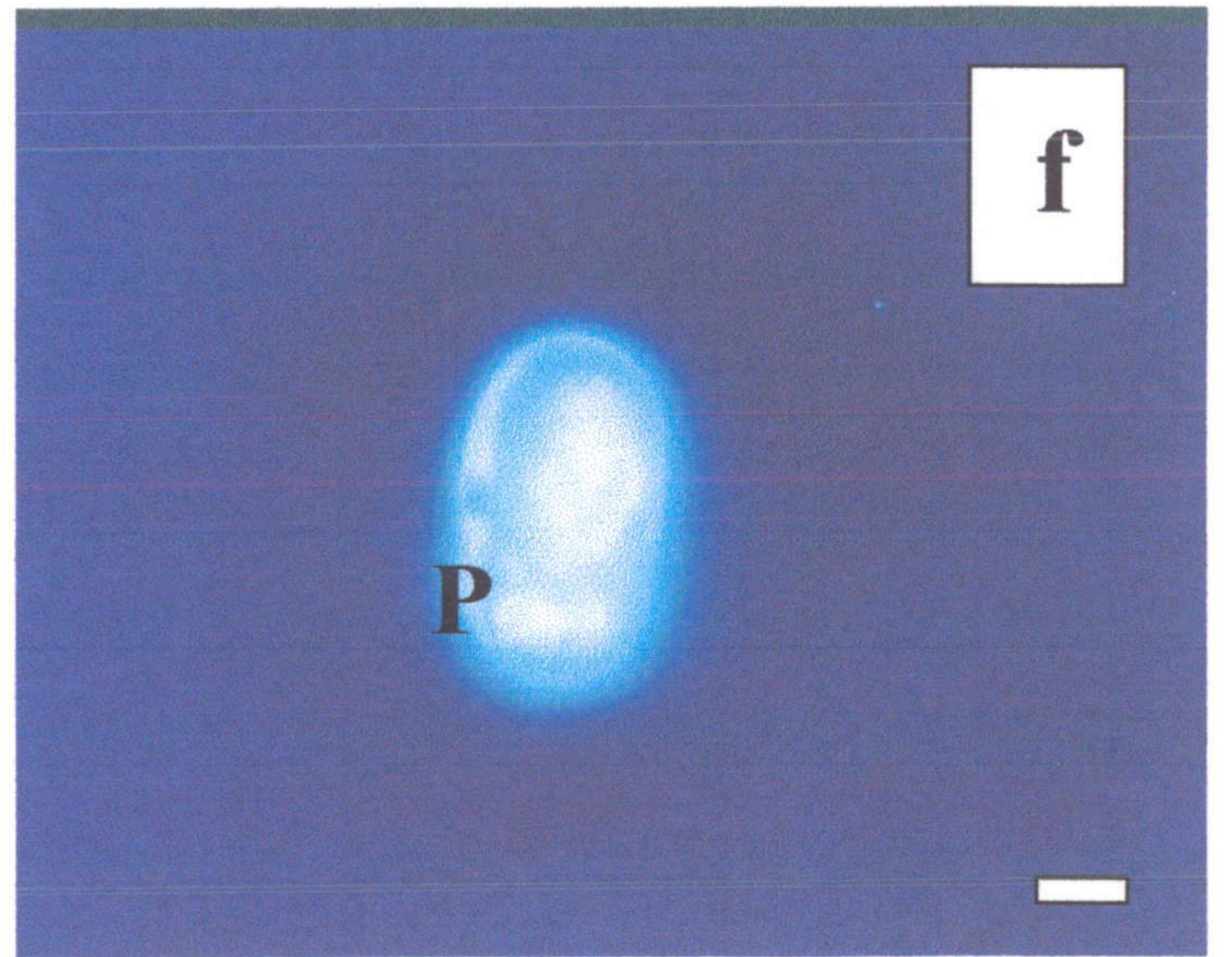
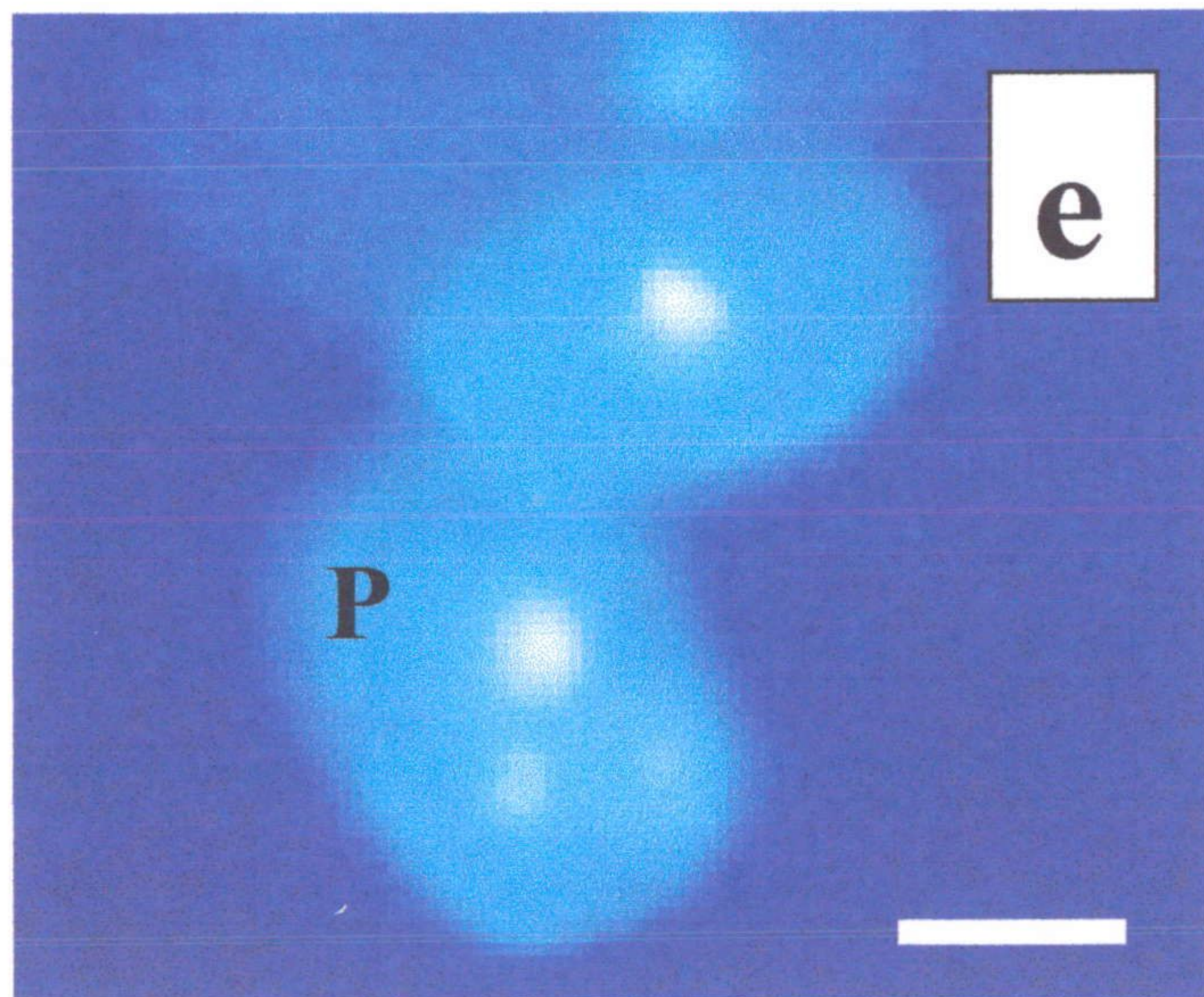
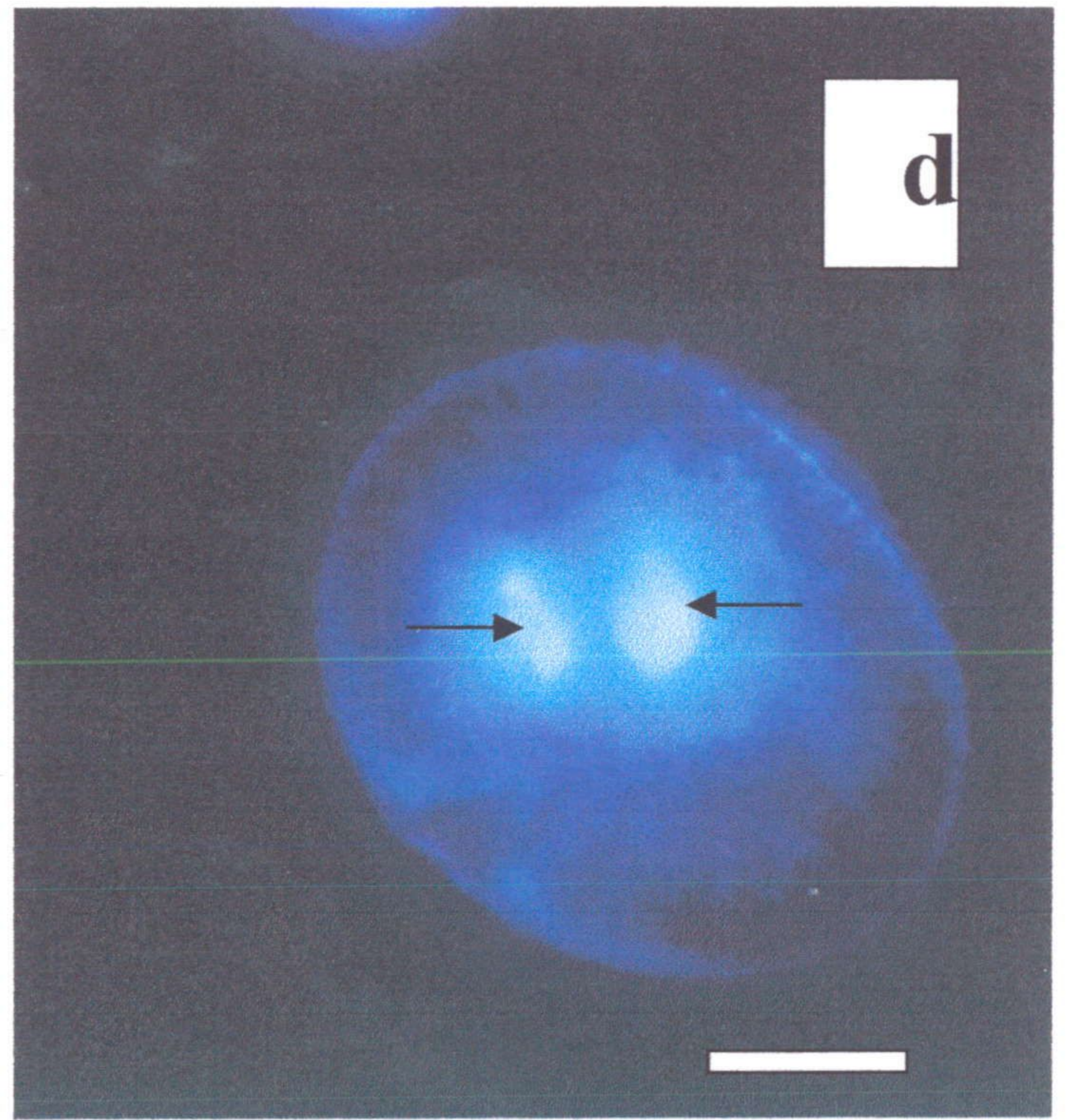
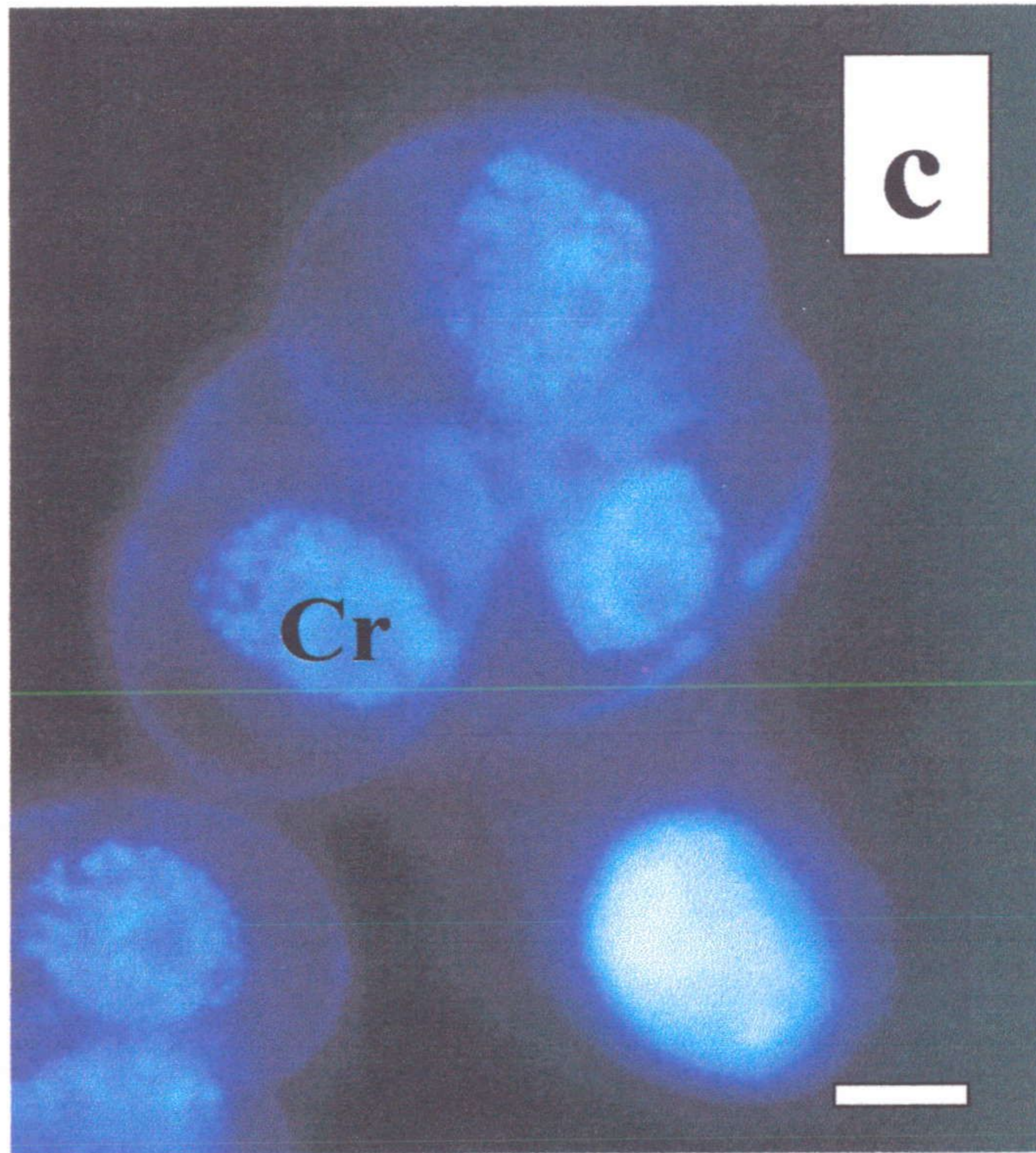
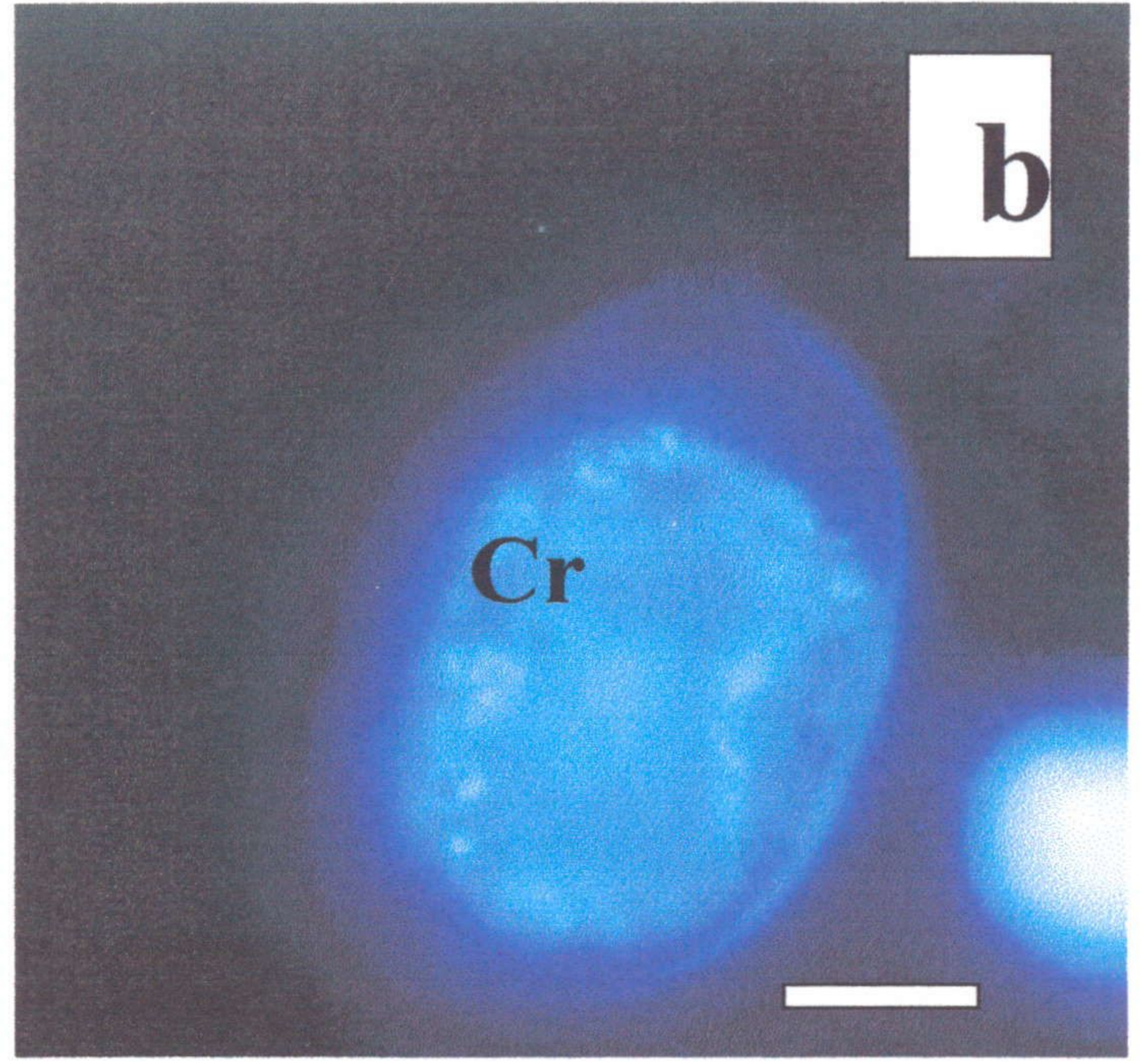
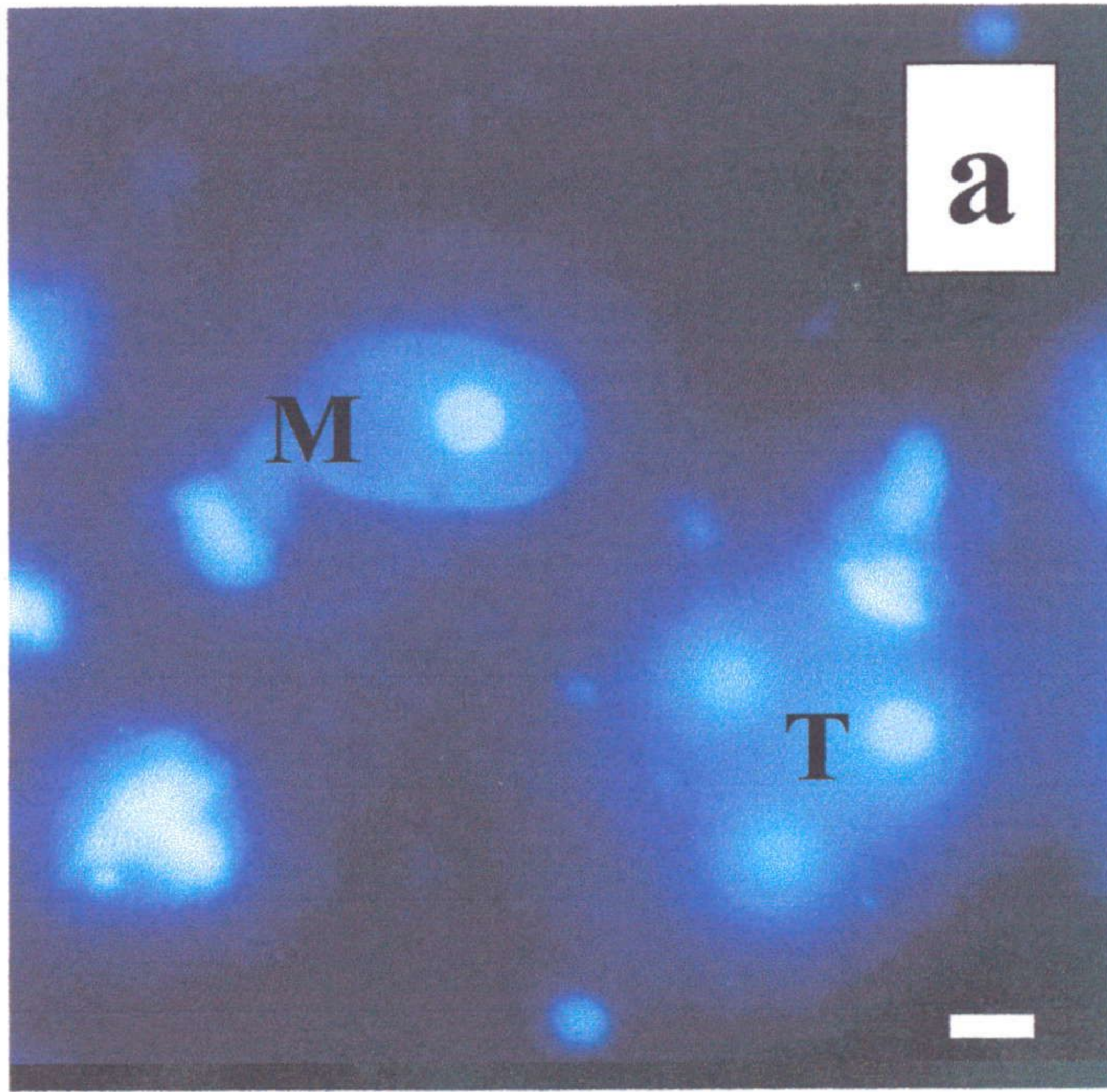


Fig. 21

Fig. 22: Tinción con DAPI para ADN en aplastados. Granos de polen observados al microscopio óptico de fluorescencia antes del cultivo o después de someter los botones florales al pretratamiento 1 (5 días a 4°C). La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente (Barra=10µm).

Fig. 21a: Granos de polen antes del cultivo: Microspora vacuolada (MV) y polen bicelular (PB).

Fig. 22b y 22c: Después de 5 días a 4°C, se observan unas divisiones anómalas con puentes cromosómicos (flechas) y dos polos de división (flechas).

Fig. 22d: Después de 5 días a 4°C Se observa aquí una división simétrica con dos núcleos (N) de fluorescencia semejante.

Fig. 22e y 22f: Después de 5 días a 4°C, Se observan polinucleados (P) que presentan una intensidad de fluorescencia parecida.

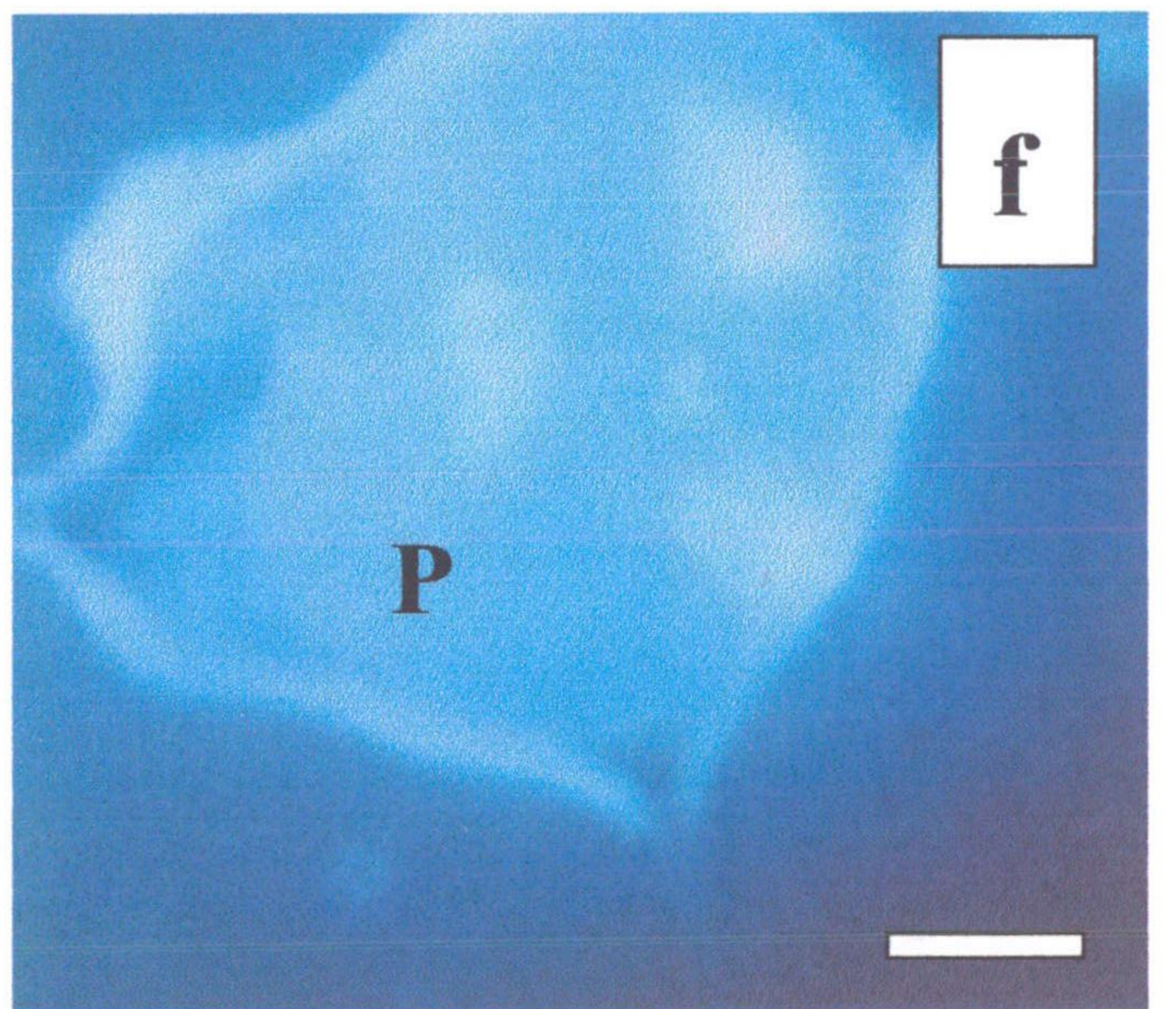
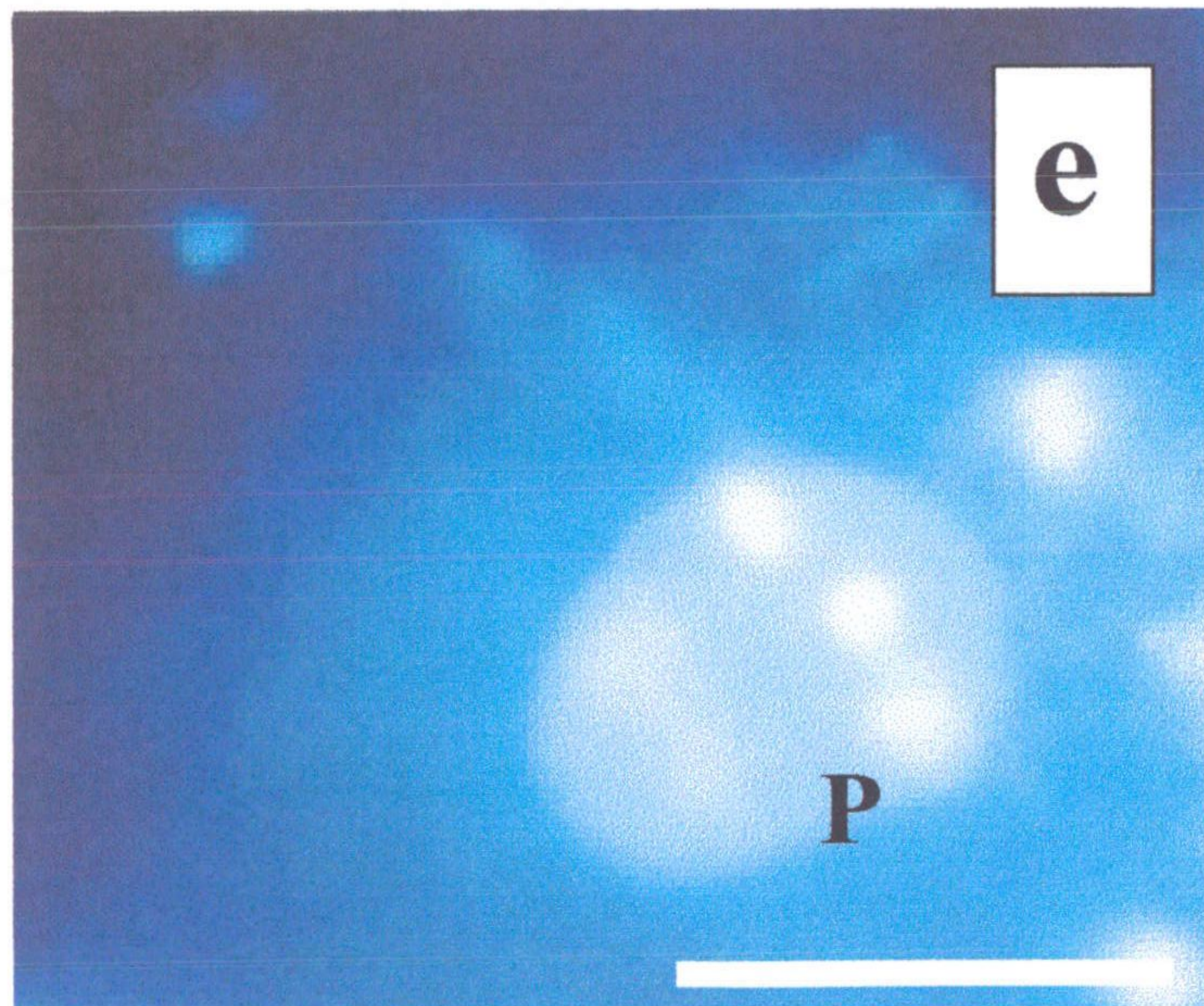
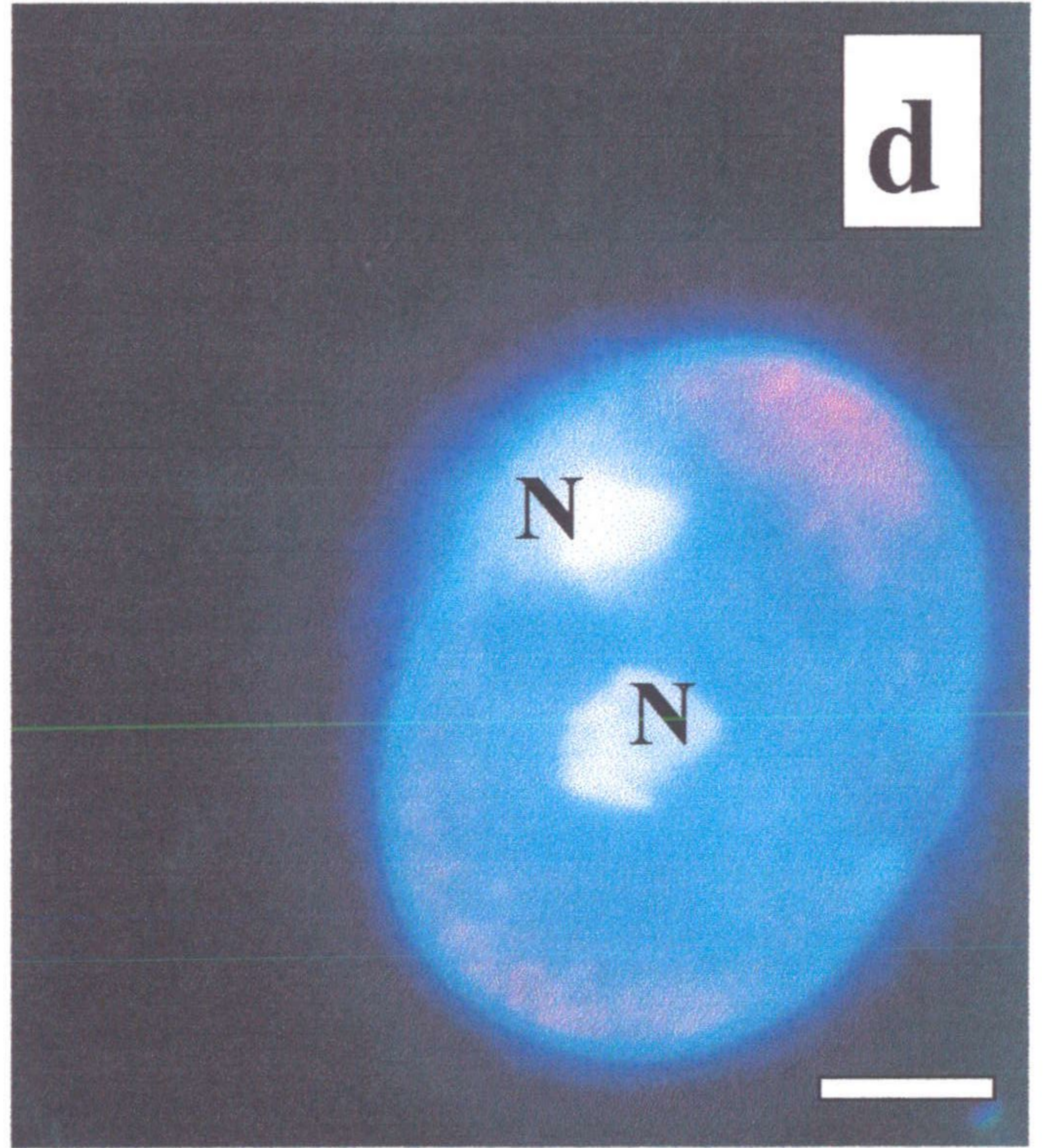
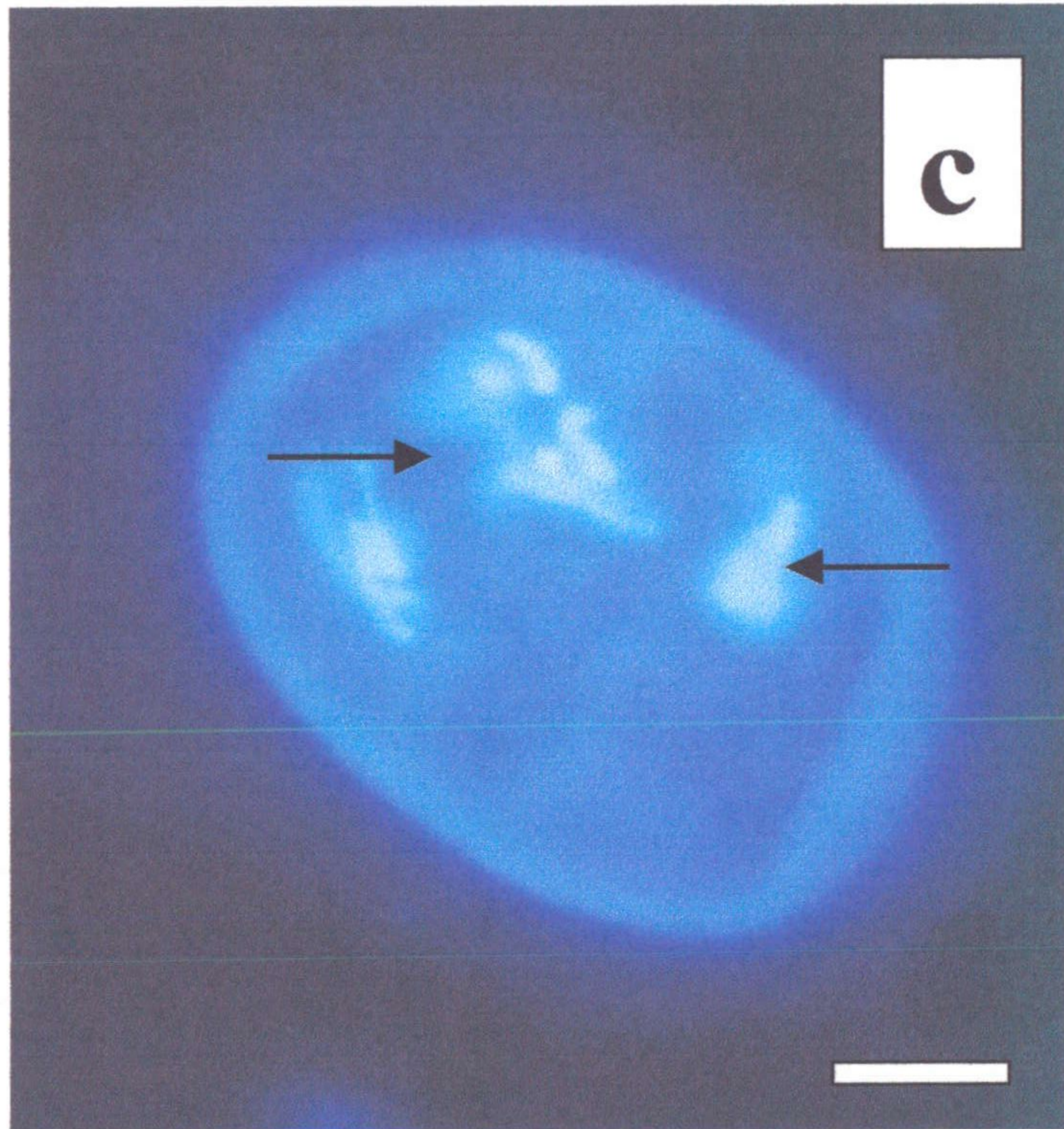
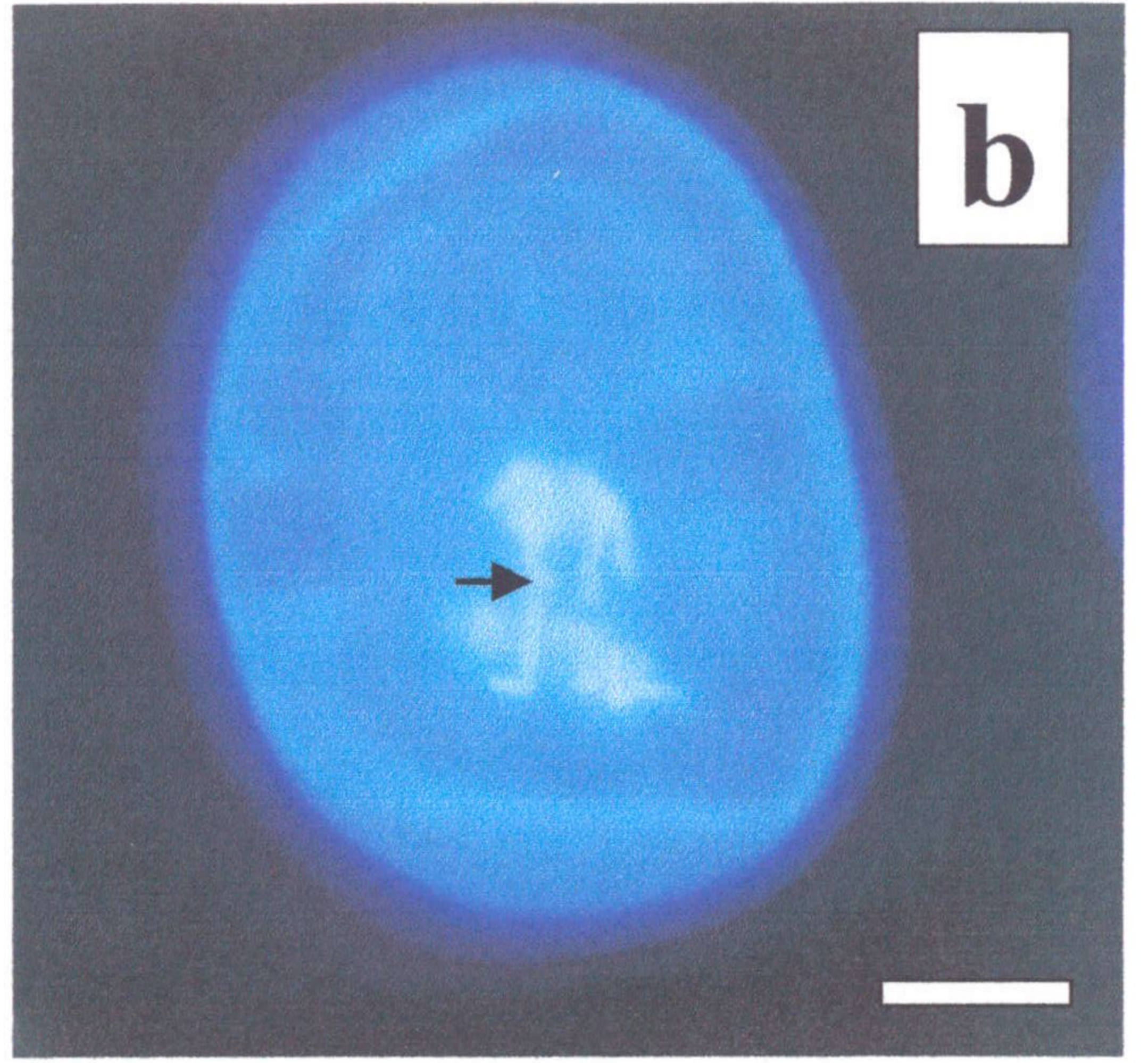
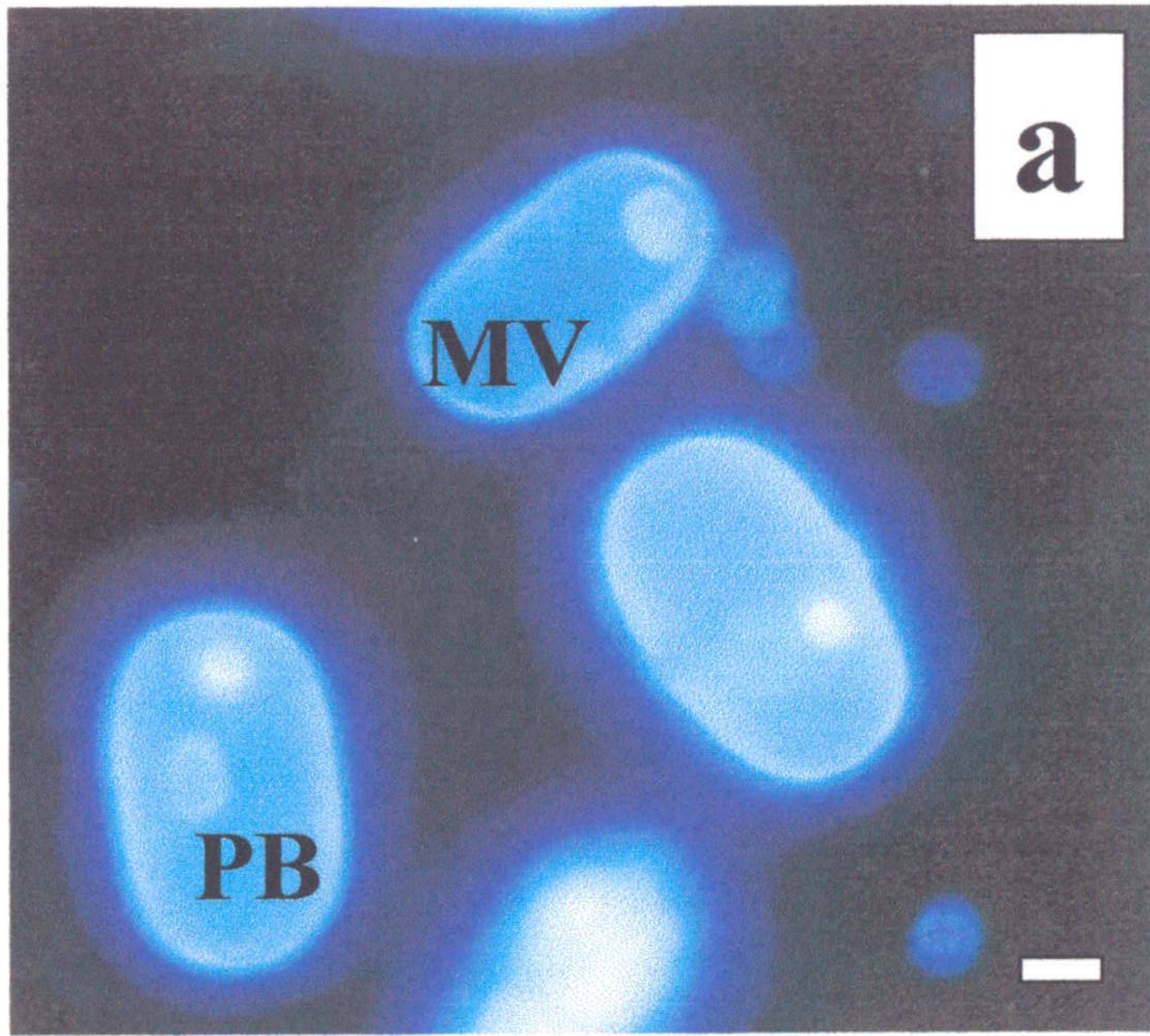


Fig. 22

Fig. 23: (a-f). Tinción con DAPI para ADN en aplastados Polinucleados (P) de guisante observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente.

Estos polinucleados se han obtenido partiendo de los estadios de tetradia y microspora joven sometiendo el polen a un choque combinado de 4°C durante 5 días a los botones florales y las anteras a 33°C durante 6 días en medio de ayuno (Barra=10µm).

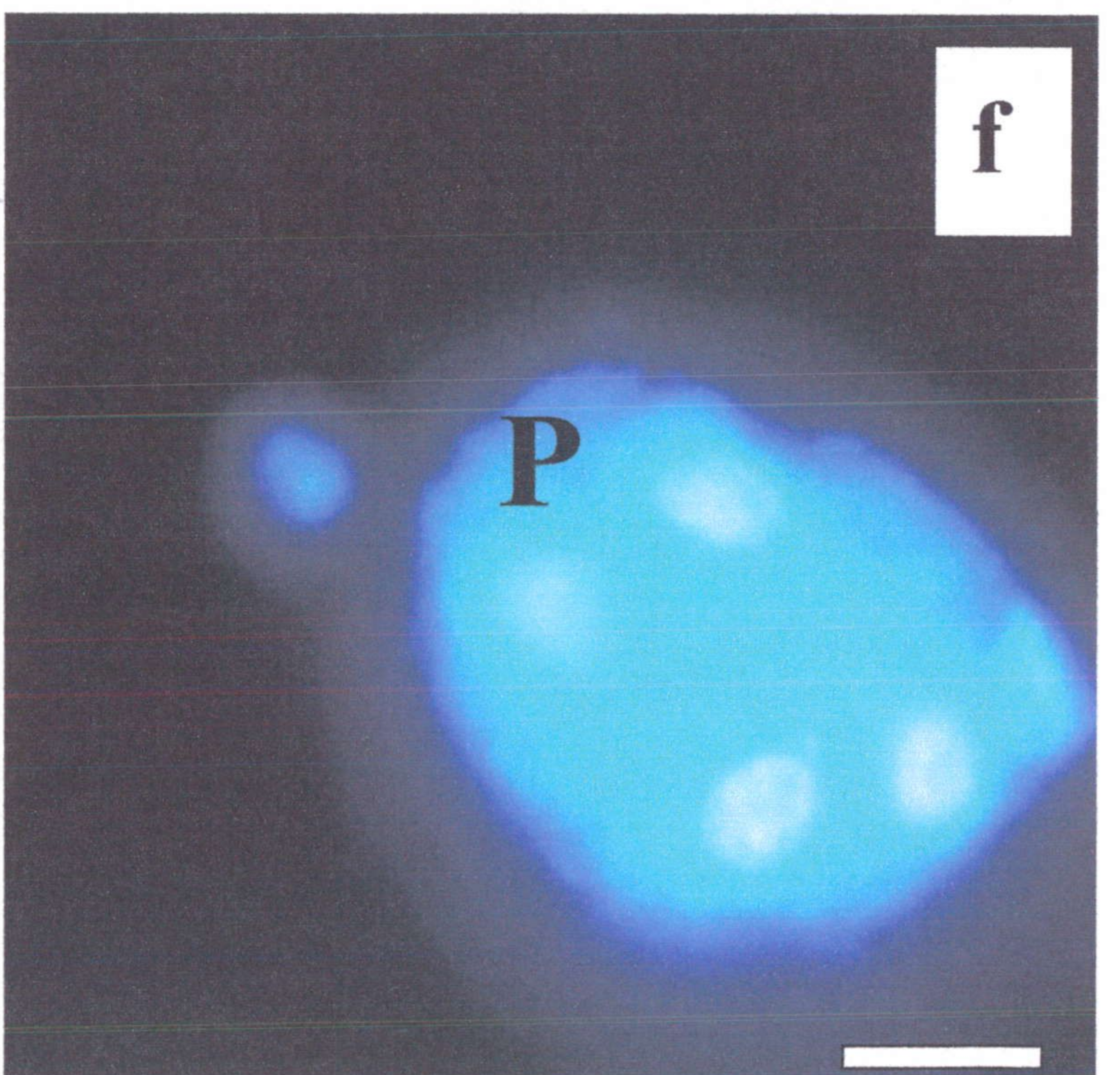
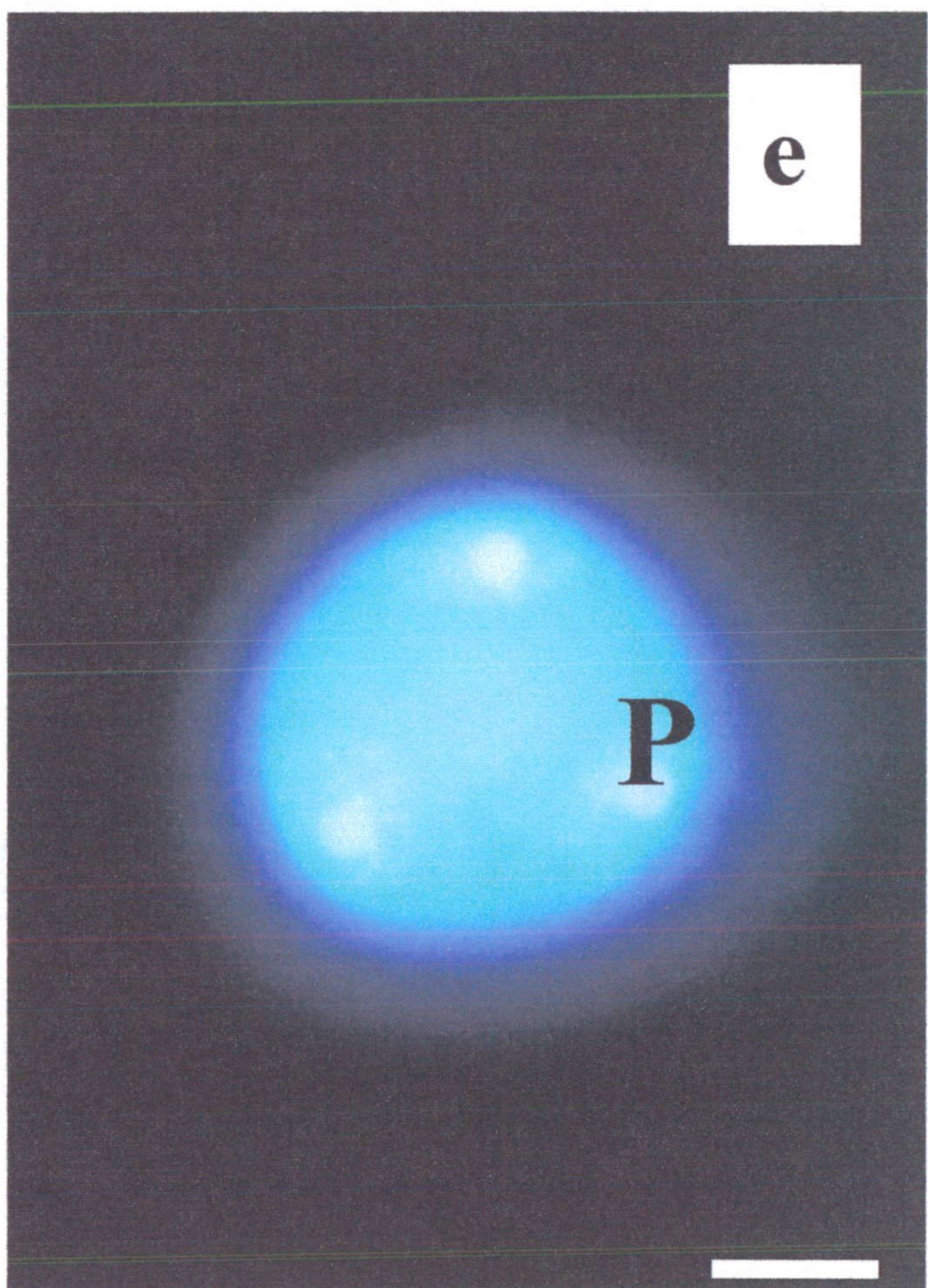
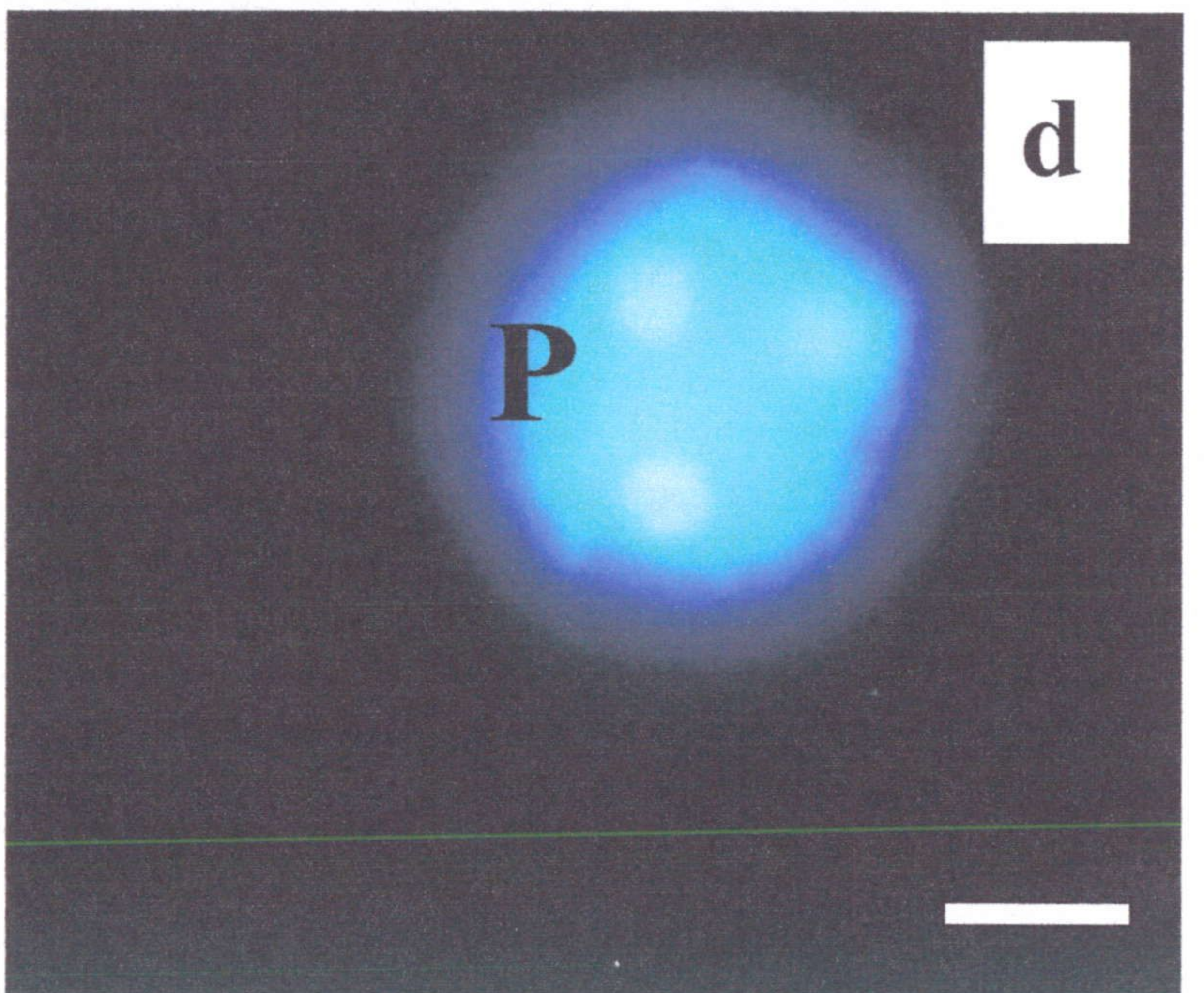
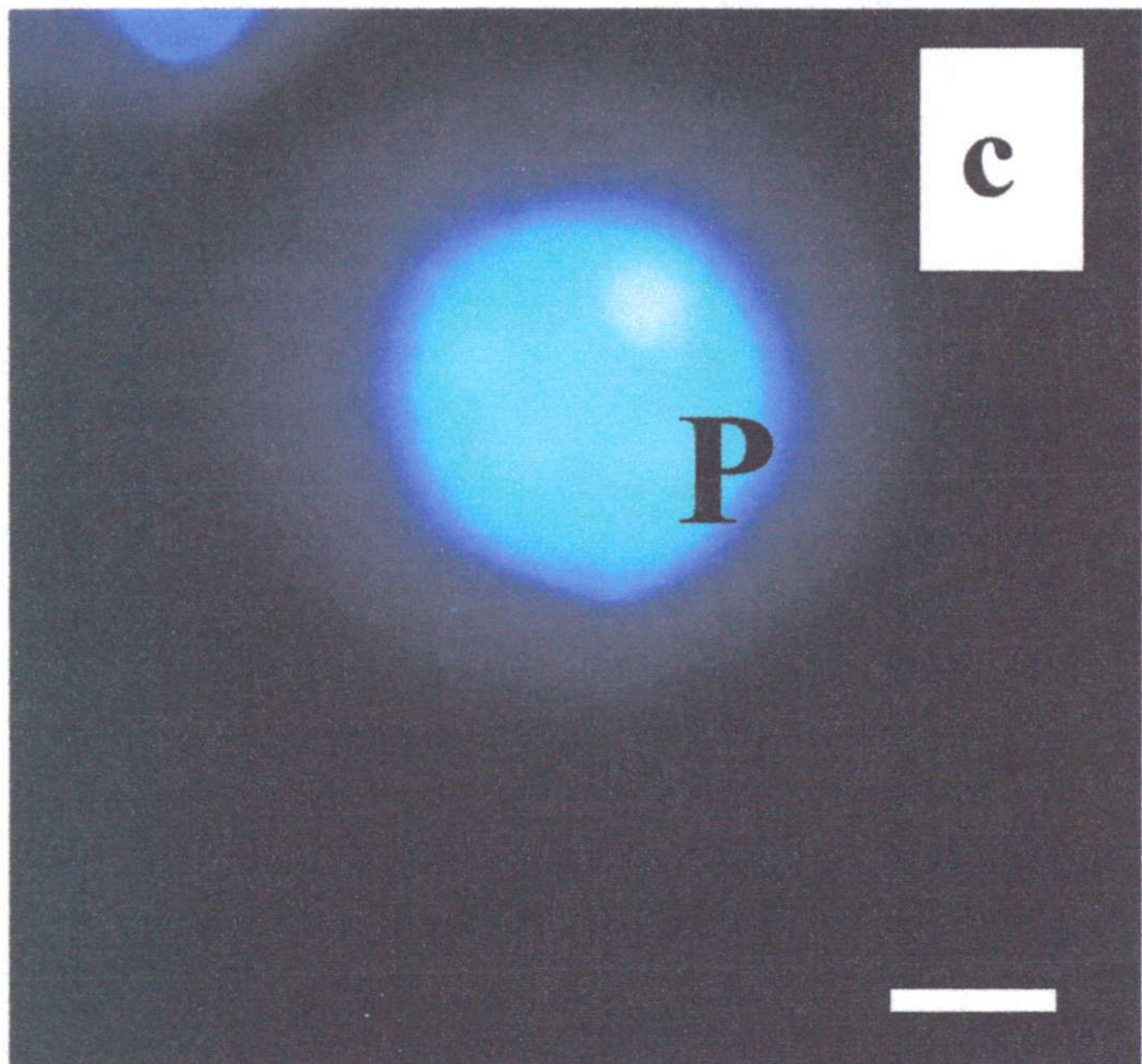
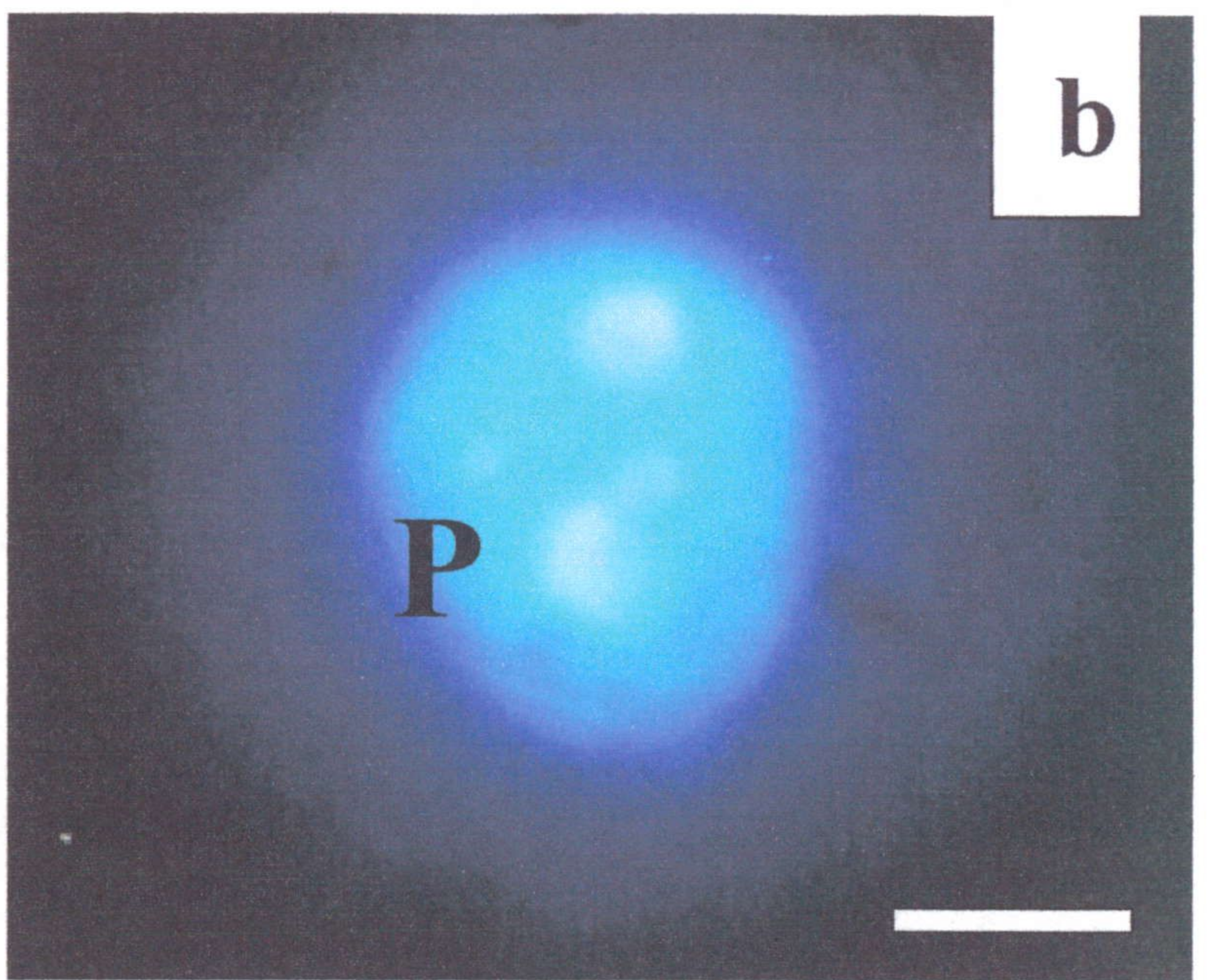
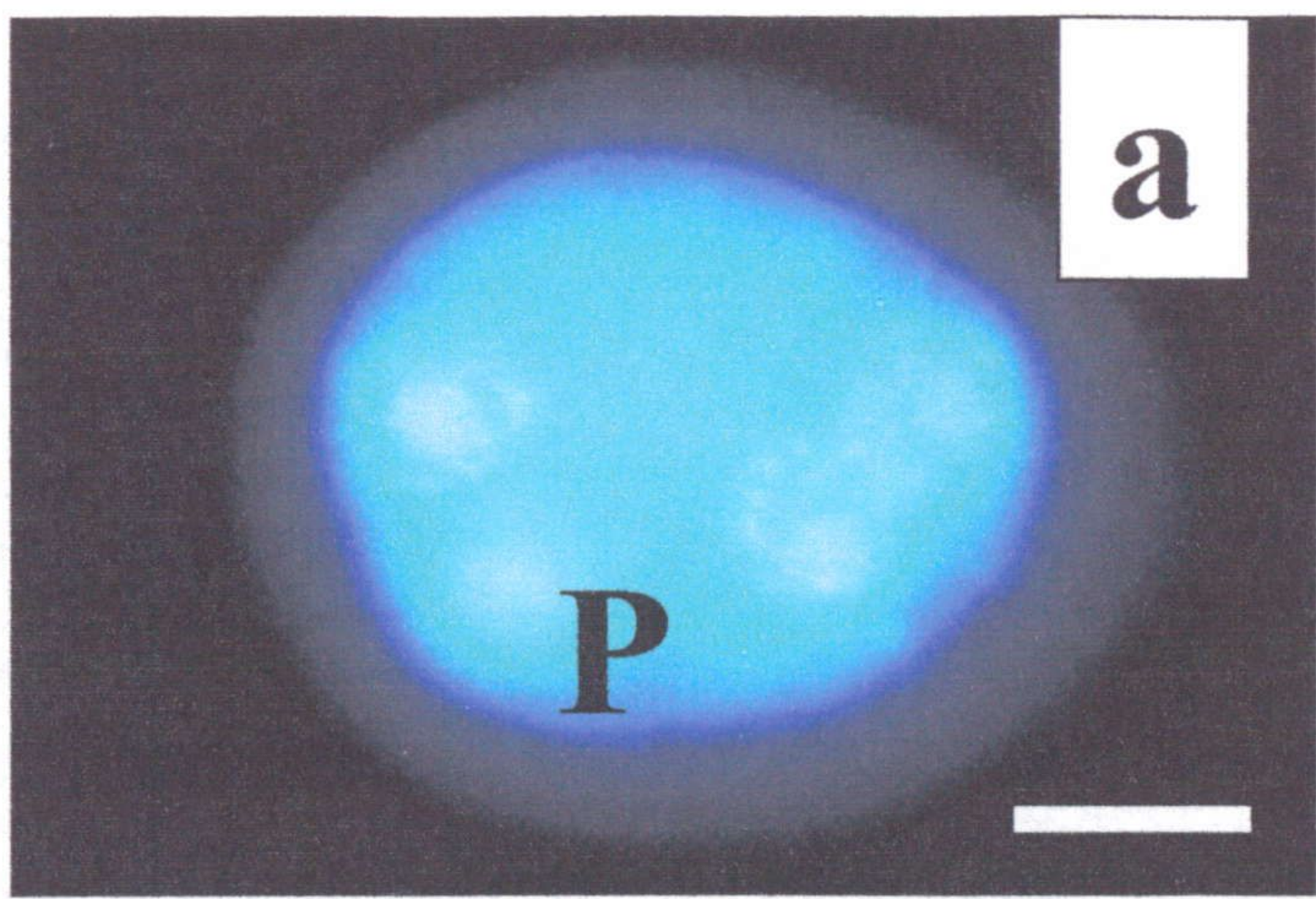


Fig. 23

Fig. 24: (a-c) Tinción con DAPI para ADN en aplastados Polinucleados (P) de guisante observados al microscopio óptico de fluorescencia. La cromatina de los núcleos fluoresce específicamente.

Estos polinucleados se han obtenido partiendo de los estadios de microspora vacuolada y polen bicelular sometiendo el polen a un choque combinado de 4°C durante 5 días para los botones florales y las anteras a 33°C durante 6 días en medio de ayuno (Barra=10µm).

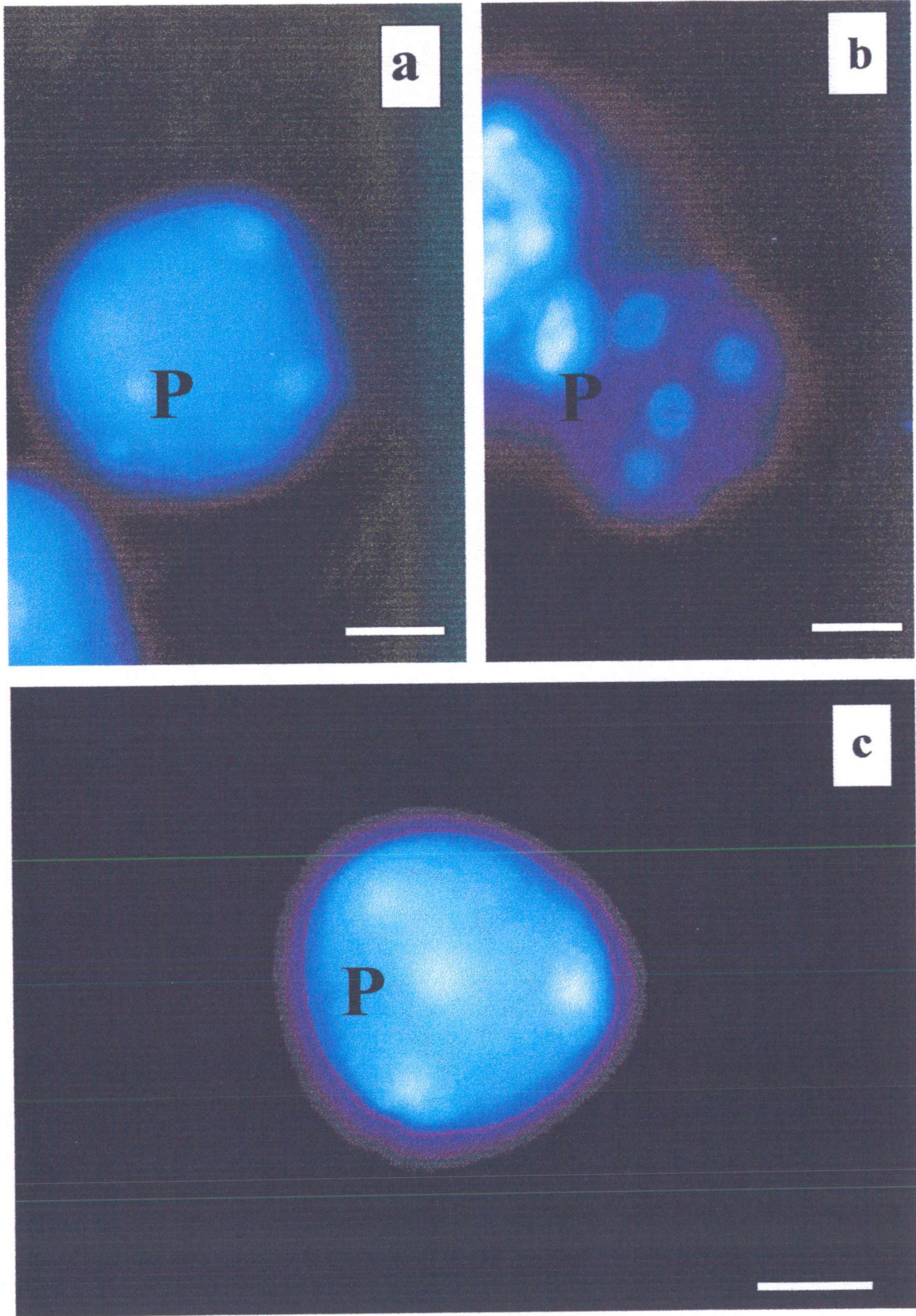


Fig. 24

DISCUSIÓN

1. Relación tamaño botón floral/estadio de desarrollo

Según numerosos autores el estadio de desarrollo en el que se encuentra el polen en el momento de la inducción androgénica es uno de los factores determinantes del éxito en dicha inducción (Raghavan 1986, Pechan y Keller 1988, Telmer et al. 1992).

Con objeto de facilitar la selección del estadio de desarrollo del polen más adecuado para iniciar la inducción, hemos determinado la relación que existe entre el tamaño del botón floral y el estadio de desarrollo del polen que contiene. Nuestros resultados indican que esta relación es válida, para *Pisum sativum* L. y *Arabidopsis thaliana* L., sólo en el caso de que la planta donadora haya crecido en condiciones óptimas. En caso contrario, el tamaño de los botones florales se reduce. La reducción del tamaño del botón floral es una clara señal de que la planta ha sufrido durante su desarrollo y no siempre viene acompañada de alteraciones en el tamaño de la planta donadora ni de cambios manifiestos de la misma. El polen que producen estas plantas que no han crecido en condiciones óptimas no es adecuado para inducir en él la androgénesis como se ha comprobado en numerosas especies (Raghavan 1986).

Por otro lado, la relación tamaño botón floral/estadio de desarrollo también depende de la variedad o ecotipo estudiado. Tomando como punto de referencia la relación en la variedad Lincoln de guisante y el ecotipo Col 4 en *Arabidopsis*, pudimos observar que los botones florales de los mutantes de guisante presentaron un tamaño menor para el mismo estadio de desarrollo del polen, mientras que en *Arabidopsis* la relación se mantuvo prácticamente constante en todos los ecotipos estudiados salvo en el mutante pt en el que los botones florales eran notablemente más pequeños. Las plantas de este mutante son también unas tres veces más pequeñas que las de los otros ecotipos estudiados. Parece pues que a parte de los factores ambientales, hay factores genéticos que determinan el tamaño del botón floral en relación con el estadio de desarrollo del polen que contiene. Por todo ello, antes de iniciar cualquier cultivo hemos tomado una antera para comprobar posteriormente cual era el estadio de desarrollo del polen del que se partía y tener una idea del estado de la planta donadora.

2. Cambios sufridos por el grano de polen durante su desarrollo

Hasta la fecha, no se conoce cual es el origen de la androgénesis y aunque este proceso de desarrollo se ha conseguido inducir en distintas especies, hay otras muchas en las que aún no ha sido posible. Tampoco se sabe si las plantas en las que la inducción androgénica directa no ha tenido éxito poseen unas características genéticas que lo impiden o simplemente no se han encontrado las condiciones de inducción que requieren estas plantas. En guisante y arabidopsis, las dos plantas de este estudio, la androgénesis directa no se ha conseguido. Por ello, se estudió el desarrollo del polen de estas plantas con el fin de encontrar posibles marcadores celulares del estadio de desarrollo más adecuado para la inducción y determinar si había signos en el desarrollo del polen que indicaran si estas plantas tenían características en común con las plantas que respondían a la inducción o con las recalcitrantes.

Son pocos los estudios realizados sobre el desarrollo del polen de guisante (Biddle, 1978, Hause 1986, Myers 1992) y arabidopsis (Kuang y Musgrave, 1996; Owen y Makaroff, 1995; Van Aelst et al., 1993; Paxson-Sowders et al., 1997). Estos estudios muestran que el desarrollo *in vivo* del polen de estas plantas sigue, en líneas generales, el esquema de la mayoría de las angiospermas (Stanley y Linskins, 1974; Heather y Makaroff, 1995) independientemente de que sean plantas recalcitrantes o no. En el guisante, el desarrollo del polen culmina con la formación del polen maduro que es bicelular, como en la mayoría de las dicotiledóneas. Mientras que en arabidopsis, como todas las plantas de la familia de las *Brassicaceae*, el polen maduro es tricolular, es decir, la célula generativa se divide antes de la formación del tubo polínico para dar lugar a las dos células espermáticas. Pero esta característica, de polen bicelular o tricolular, no parece ser determinante de la capacidad androgénica del polen puesto que existen plantas que responden o no a la inducción androgénica independientemente de que su polen sea bicelular o tricolular.

Citoplasma

Sangwan y Sangwan-Norreel (1987) realizaron un estudio comparativo de los orgánulos citoplásmicos de especies pertenecientes a familias que responden bien a la inducción androgénica (*Solanaceae*, *Gramineae* (*Poaceae*), *Cruciferae* (*Brassicaceae*), *Ranunculacea*

y *Liliaceae*) y de otras consideradas como recalcitrantes a dicha inducción (*Scrophulariaceae*, *Convulaceae* y *Chenopodiaceae*). Estos autores, observaron que no había diferencias notables entre los orgánulos citoplásmicos de estos pólenes salvo en los plastidios y su evolución a lo largo del desarrollo. Encontraron proplastidios desde tetrada hasta polen bicelular joven en plantas que respondían a la inducción androgénica (*Nicotiana tabacum*, *Datura inoxia*, *Hyosciamus niger*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Brassica napus*, *Brassica campestris*, *Paeonia hybrida*, *Lilium longiflorum*) mientras que en plantas recalcitrantes como *Antirrhinum majus* observaban amiloplastos a partir del estadio de tetrada, o de microspora lo mismo que en *Covolvulus arvensis*, *Beta vulgaris* y *Chenopodium album*. Con estos resultados Sangwan y Sangwan-Norreel (1987) propusieron que los plastidios podían ser usados como marcadores para distinguir especies androgénicas de recalcitrantes aunque no podían explicar el papel inhibidor del almidón en la rediferenciación del polen *in vitro*. En general, dentro de una misma familia, el almidón se acumula en los mismos estadios de desarrollo del polen aunque existen algunas excepciones. En *Solanaceae* los amiloplastos no aparecen hasta después del polen bicelular joven, sin embargo en el polen de *Lycopersicon esculentum* el almidón se acumula ya en microspora vacuolada. Es de destacar que mientras que los estadios óptimos de inducción de androgénesis en *Solanaceae* (*Nicotiana tabacum*, *Datura inoxia*) son justo antes o inmediatamente después de la primera división mitótica del polen, en *Lycopersicon esculentum* los mejores estadios son tetrada y microspora joven, es decir, antes de que tenga lugar la acumulación de almidón (Gresshoff y Doy, 1972).

En el presente trabajo se estudió en detalle la evolución de los plastidios a lo largo del desarrollo del polen. Además, se utilizó una técnica que detecta la presencia de polisacáridos al microscopio electrónico (Thiery, 1967) para resolver posibles dudas con respecto a si ciertas áreas claras a los electrones en los plastidios podían corresponder a inicios de formación de almidón o no. En guisante observamos que en el estadio de tetrada los plastidios son poco diferenciados y desde este estadio empiezan a diferenciarse pero sin que aparezca el almidón hasta el estadio de polen bicelular medio donde se distinguen claramente los amiloplastos. Para *arabidopsis*, los plastidios son también poco diferenciados en los estadios de tetrada y microspora joven, sus membranas internas no se distinguen todavía y no se detecta almidón. En el estadio de microspora vacuolada, el

sistema membranario interno de los plastidos empieza a diferenciarse y, a veces, se ven unas áreas claras que podrían indicar la presencia de indicios de almidón, sin embargo, después de la tinción con Thiery (1967) se confirmó que el almidón no aparece hasta el estadio de polen bicelular joven. Comprobamos así que el almidón se forma en el polen en estadios de desarrollo más jóvenes en *arabidopsis* que en guisante. Kuang y Musgrave (1996) trabajando en *Arabidopsis thaliana* L. variedad Columbia describen en microsporas vacuoladas que “ocasionalmente se observa la presencia de pequeños granos de almidón”. El aspecto de los plastidios que muestran en la fotografía correspondiente a microspora vacuolada es prácticamente idéntico al observado en nuestro material. Por otro lado, estos autores no realizan ninguna técnica citoquímica que confirme si estas pequeñas áreas claras corresponden a almidón. Por ello, pensamos que en este estadio no hay almidón todavía y que los amiloplastos no se forman en *arabidopsis* hasta el estadio de polen bicelular joven. Con estos resultados se puede decir que nuestras plantas, de acuerdo con la propuesta de Sangwan y Sangwan-Norreel (1987), no están dentro de las plantas recalcitrantes y que los mejores estadios de desarrollo para iniciar la inducción androgénica son los comprendidos hasta polen bicelular joven en guisante y hasta microspora vacuolada en *arabidopsis*. Y efectivamente hemos obtenido granos de polen polinucleados a partir del cultivo *in vitro* de anteras de guisante cuando hemos partido del estadio de microspora joven y en *arabidopsis* partiendo del estadio de microspora vacuolada, estadios ambos en los que no se había detectado almidón todavía. Sin embargo, el porcentaje de granos polinucleados es muy bajo y no hemos conseguido que ninguno de estos pocos granos prospere hasta formar embriones haploides por lo que no podemos concluir con nuestros resultados que nuestras plantas sean androgénicas o al menos no en las condiciones que hemos probado en esta tesis.

Siguiendo con el estudio del citoplasma y además de la evolución de los plastidios que nos interesaron particularmente por la relación postulada de los mismos con la androgénesis, es notoria la formación de la gran vacuola citoplasmica que tiene lugar a lo largo de la interfase de la microspora tanto de guisante como de *arabidopsis*. En tetrada el citoplasma de ambas plantas es muy denso aunque con orgánulos poco diferenciados, pero en guisante llama la atención la presencia de una gran cantidad de vesículas que podrían ser el origen de las vacuolas que se van observando en microspora joven y que van creciendo y

fundiendo para formar la gran vacuola de la microspora justo antes de la división mitótica. En *arabidopsis* como en las tetradas de la mayoría de las especies descritas no se observa esa gran cantidad de vesículas y las vacuolas van creciendo a partir de la microspora joven. En microspora joven el citoplasma es menos denso que en tetrada y sus orgánulos, aunque algo más diferenciados, siguen sin estarlo completamente lo que sugiere que la actividad metabólica es relativamente más baja en esta fase. La microspora vacuolada, de mayor tamaño, presenta un citoplasma más rico y aparentemente más activo. En el polen bicelular las vacuolas del citoplasma vegetativo se reabsorben gradualmente y se observan cada vez más dictiosomas, retículo endoplásmico, lípidos y mitocondrias bien desarrolladas reflejo de la gran actividad metabólica que tiene lugar en el citoplasma de esta célula. Este incremento progresivo de material citoplásmico estaría relacionado con el acúmulo de reservas necesario para la posterior germinación del tubo polínico.

Además hemos prestado especial atención a la evolución de la población ribosómica desde tetrada a polen bicelular utilizando la hibridación *in situ* para evaluar la cantidad de ARN ribosómico presente en las distintas fases del desarrollo del polen. Así confirmamos la gran riqueza en ribosomas en el citoplasma de la tetrada que desciende en microspora joven, se recupera en microspora vacuolada y tiene su máximo en polen bicelular. En *arabidopsis*, coincidiendo con las observaciones de Kuang y Musgrave (1996), se observa una evolución paralela a la del polen de guisante. La repoblación ribosómica que tiene lugar después de la meiosis en tetrada ha sido relacionada en algunas especies (*Lathyrus odoratus* (Latter, 1926) y *Olea europea* (Rodríguez-García y Fernández, 1989)) con la presencia en el citoplasma de las tetradas de cuerpos semejantes al nucleolo conocidos como nucleoloides (Dickinson y Heslop-Harrison, 1970). En la tetrada de guisante hemos encontrado cuerpos densos en el citoplasma que podrían corresponder a nucleoloides mientras que en el citoplasma de la tetrada de *arabidopsis* no se han observado estructuras semejantes.

Núcleo

En el núcleo hemos estudiado los cambios que tienen lugar a lo largo del desarrollo del polen en la condensación de la cromatina utilizando en primer lugar la tinción con DAPI, este fluorocromo se une específicamente a los ácidos nucleicos (Coleman et al., 1981) y es altamente sensible a las variaciones de condensación de la cromatina. Los resultados de

fluorescencia se completaron con los estudios ultraestructurales. Durante los estadios de célula madre del polen y tetrada, la cromatina está muy condensada lo que indica una baja actividad nuclear. La cromatina va progresivamente descondensándose y en el estadio de microspora vacuolada, se observa una máxima descondensación lo que está estrechamente relacionado con una actividad de replicación y transcripción muy intensa.

En el polen bicelular de las dos plantas objeto de estudio se observan dos núcleos con muy distintos estados de condensación de la cromatina. En el núcleo vegetativo está muy descondensada permitiendo una actividad transcripcional alta y en el generativo está muy condensada mostrando que este núcleo permanece inactivo en cuanto a replicación y transcripción en esta fase de desarrollo. Estas diferencias muestran la distinta expresión génica que tienen estas dos células: la célula vegetativa va a formar el tubo polínico y la generativa va a dar lugar a dos núcleos espermáticos (Zehnbauer et al., 1985; Raska et al., 1990).

La región inter y pericromatínica, que representa la expresión morfológica de la síntesis de los ARNs mensajeros (fibras inter y pericromatínicas) y del procesamiento y almacenamiento de estos ARNs (gránulos inter y pericromatínicos) (Risueño y Medina, 1986), también varía considerablemente a lo largo del desarrollo. En tetrada y microspora vacuolada se observa una gran densidad en esta zona lo que indica un alto grado de síntesis y almacenamiento de estos ARNs.

El nucleolo es la expresión morfológica de la síntesis y maduración del ARN ribosómico. Aunque todavía existe cierta controversia en determinar cual es el componente en el que se inicia la síntesis del ARN ribosómico nucleolar (los centros fibrilares o el componente fibrilar denso) se ha observado que los nucleolos más activos poseen pequeños centros fibrilares, componente fibrilar denso y componente granular entremezclados mientras que un signo de inactividad en el nucleolo es la ausencia de componente granular (donde tiene lugar la maduración de los precursores de este ARN) (Risueño y Medina, 1986, Raska, 1995). Hemos observado también nucleolos activos en tetrada y microspora vacuolada donde además se observan vacuolas nucleolares de reactivación asociadas con pequeños centros fibrilares y con gran cantidad de gránulos en su interior. Se ha sugerido que estas vacuolas nucleolares podrían estar implicadas en la traslocación o almacenamiento del material nucleolar (Johnson, 1969; Rose et al., 1972; Moreno Diaz de la Espina et al., 1980)

y son típicas de periodos de gran actividad y abundante transporte de material ribosómico al citoplasma (Risueño y Medina, 1986; Fakan y Hernández-Verdun, 1986).

En el polen bicelular el nucleolo de la célula vegetativa es más activo que el de la generativa aunque van perdiendo actividad quedando reducidos a un resto de componente fibrilar denso a medida que madura el polen.

A lo largo del desarrollo hemos observado distintos cuerpos nucleares. En tetrada, sobre todo en guisante en tetradas tempranas, observamos distintos cuerpos algunos que presentan señal de hibridación con la sonda ribosómica que podrían corresponder a cuerpos prenucleolares que están fundiendo para formar el nuevo nucleolo y otros que no hibridan por lo que podrían corresponder a "coiled bodies" que hemos visto a lo largo del desarrollo de las dos plantas. Estos cuerpos que se encuentran formando protuberancias del nucleolo, adosados al mismo o libres en el nucleoplasma están presentes tanto en núcleos activos como en núcleos menos activos. Han sido descritos en plantas y animales, su función no es del todo conocida aunque se sabe que no contienen ADN, son de naturaleza ribonucleoproteica y, a pesar de no contener ARNs ribosómicos ni mensajeros, parecen estar implicados en el procesamiento y maduración de estos ARNs puesto que poseen elementos necesarios no sólo para la maduración de los ARNs ribosómicos (U3snARN, fibrilarina) sino también para el procesamiento de los ARNs mensajeros (U1, U2, U4-U6 snARNs) (Olmedilla et al., 1997, Raska, Dundr y Koberna, 1992, Risueño y Medina, 1986)

Pared del polen

Hemos estudiado la evolución de la pared de los granos de polen de guisante y *Arabidopsis* al microscopio electrónico de transmisión con el fin de establecer criterios morfológicos adicionales que ayuden a seguir su desarrollo.

La pared del polen está formada por dos capas: la exina y la intina. La exina puede subdividirse a su vez en una capa externa o ectexina y una interna o endexina que se sitúa junto a la intina. La ectexina está formada por el tectum, el infratectum o báculas y la capa basal (Knox, 1984; Shivana y Johri, 1985).

En guisante, en el estadio de tetrada, se observa la primexina que es secretada por las microsporas de la tetrada. En el estadio de microspora empieza a formarse la intina. En el estadio de microspora vacuolada, la exina esta prácticamente completa mostrando su tectum continuo y la intina también esta ya desarrollada. En el estadio de polen bicelular joven, se ve el tectum grueso y continuo y la intina formada ya. En arabidopsis se observa un proceso de formación paralelo. En el estadio de tetrada, se forma la primexina que se deposita entre las microsporas y la calosa y que representa el molde para la exina. La exina empieza a formarse justo después de la liberación de las microsporas de la pared de calosa. Conforme va madurando el polen la exina se ve más gruesa y densa a los electrones y se completa a partir del estadio de polen bicelular joven. La secreción de la intina empieza a partir del estadio de microspora vacuolada y se hace más visible en el estadio de polen bicelular joven. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por Biddle (1978) en la pared de guisante y Regan y Moffatt (1990) sobre la pared de arabidopsis.

3. Cultivo *in vitro* de anteras

El cultivo *in vitro* de anteras es una técnica para inducir androgénesis y depende de una serie de factores que hemos intentado optimizar. Con esta técnica se puede inducir androgénesis directa, produciendo embriones directamente del polen que contienen las anteras cultivadas, o androgénesis indirecta, obteniendo primero callos a partir de los cuales se pueden inducir embriones.

En primer lugar, hemos cultivado las plantas de guisante y arabidopsis en **condiciones fisiológicas óptimas** para evitar la obtención de polen rico en sustancias de reserva poco adecuado para la inducción androgénica (Dunwell y Sunderland, 1973; Picard y De Buyser, 1975).

El **genotipo** es otro factor que juega un papel importante en el éxito en la inducción de la androgénesis (Maheshwari et al., 1980, 1982; Prakash y Giles, 1992) por lo que hemos intentado la inducción utilizando diferentes genotipos. Para guisante (*Pisum sativum* L.) usamos la variedad Lincoln y cuatro mutantes: RBT31-1, SGEF1, SGEF2 y SGE. Los cuatro mutantes tienen mutaciones que afectan a la formación del tubo polínico por lo cual son estériles lo que podría ser favorable para la inducción de la androgénesis si

consideramos la idea de Heberle-Bors (1982) que definía los granos embriogénicos o los granos-P como granos de polen estériles. Según este autor los granos-P son granos que llevan a la feminización de las flores puesto que son estériles pero tienen la ventaja de responder bien a la inducción androgénica. Para *Arabidopsis thaliana* L.) hemos utilizado 5 ecotipos: Wassilewskija (WS), C24, Columbia 4 (Col 4), Columbia 0 (Col 0), Landsberg *erecta* (L. *erecta*) y el mutante pt “primordia timing mutant”. Hemos utilizado el ecotipo WS porque ha dado buenos resultados en la inducción de androgénesis indirecta (Gresshoff y Doy, 1972), el mutante pt porque con él se ha podido inducir embriogénesis somática (Mordhorst et al., 1998) y los otros ecotipos porque, además de no haberse descrito previamente en estas plantas la inducción androgénica, se conocen muchos detalles de su genética lo que sería de gran utilidad para comprender mejor los factores que influyen en la embriogénesis del polen si se consiguiera en estos ecotipos.

La respuesta ha sido distinta según el genotipo utilizado: en guisante, obtuvimos granos de polen polinucleares solamente en el ecotipo Lincoln y en el mutante SGE, en los otros mutantes no hubo respuesta. En *Arabidopsis* solamente hemos obtenido granos de polen polinucleados en los ecotipos Col 4 y C 24.

Estos estudios coinciden con los realizados sobre otras plantas que demostraron también que la respuesta androgénica depende del genotipo de la planta donadora. Así, en *Nicotiana tabacum* por ejemplo los mejores resultados se obtuvieron en las variedades Petit Havana SRI (Chibi et al., 1993; Garrido et al., 1993) Samsun (Kyo y Ohkawa, 1991; Zarsky et al., 1992) y Wisconsin 38 (Martensson y Widell, 1993).

El genotipo también es importante para la inducción de la androgénesis indirecta como pudieron comprobar Gresshoff y Doy (1972) en su estudio con 18 ecotipos de *Arabidopsis thaliana* L. en el que sólo consiguieron inducir androgénesis a través de la formación de callos en 3 de estos ecotipos: WS, EST, MT.

Otro factor que también parece influir notablemente en el éxito de la inducción es el **estadio de desarrollo del polen** del que se parte para la inducción de la androgénesis. Estudios previos en distintas especies demostraron que los estadios más favorables para la inducción de androgénesis eran la microspora vacuolada o el polen bicelular joven, es decir, justo antes o inmediatamente después de la primera división mitótica (Chuong y Beversdorf, 1985; Kyo y Harada, 1986; Pechan y Keller, 1988; Heberle-Bors, 1989;

Vicente et al., 1991; Telmer et al., 1992). Sin embargo hay descritos en la literatura casos en los que se obtiene en estadios anteriores: tetrada en tabaco (Nakata y Tanaka, 1968; Carlson, 1970) y arroz (Guha, 1973) o microspora joven en tomate (Sangwan y Sangwan-Norreel, 1987) y trigo (Ouyango et al., 1973; Pan et Kao, 1978; Wei, 1982; He y Ouyango, 1984; Mejza et al., 1993). Además, recientemente se ha descrito la inducción en *Brassica napus* no sólo en estadios próximos a la división mitótica del polen sino también en polen maduro (Binarova et al., 1997). Por todo ello, en este estudio se probó desde tetrada hasta polen bicelular maduro.

Tras el cultivo de anteras en estas fases del desarrollo los mejores resultados los obtuvimos en arabis (C 24 y Col 4) con anteras conteniendo microsporas vacuoladas y en guisante (variedad Lincoln y mutante SGE) partiendo de microsporas jóvenes.

Nuestros resultados y los descritos en la literatura nos llevan a pensar en que, si bien el estadio de desarrollo de partida es importante, cuando con una determinada planta se obtienen buenos resultados de inducción (*Nicotiana tabacum* o *Brassica napus*) se puede inducir la androgénesis partiendo de anteras con polen en distintos estadios de desarrollo mientras que en los casos más recalcitrantes (*Arabidopsis thaliana* L. y *Pisum sativum* L.) es más probable conseguir alguna respuesta en microspora o polen bicelular joven.

Otro factor que hemos tenido en cuenta es el **tratamiento de estrés o choque** aplicado como medio de inducción. Por ello, hemos sometido los botones florales a choques de frío a 4°C aplicando además o no un choque de luz a las anteras antes de pasarlas a cultivar en oscuridad y a 25°C.

Se han formulado distintas teorías sobre el efecto del choque frío aplicado para la inducción androgénica. Nitsch y Norreel (1973) propusieron que este choque parecía afectar al huso mitótico y así favorecer la división mitótica simétrica de las microsporas vacuoladas en lugar de la división asimétrica que tiene lugar en el desarrollo gametofítico normal del polen.

Con nuestras plantas hemos obtenido divisiones androgénicas o divisiones distintas de las observadas en el desarrollo normal del polen solamente cuando se aplicaba la combinación de un choque de frío a 4°C a los botones florales seguida de un choque de luz a las anteras. Estos choques por separado no producían divisiones anómalas. En el caso de las dos variedades de arabis que respondían: Col 4 y C 24, y en el caso del mutante SGE de

guisante los polinucleados formados tenían núcleos que presentaban una fluorescencia de intensidad semejante lo que parecía indicar que provenían de divisiones simétricas de la microspora. Sin embargo, en el caso de la variedad Lincoln de guisante las intensidades de fluorescencia de los núcleos obtenidos no eran las mismas lo que parecía indicar que previamente se había producido una división asimétrica y que después el núcleo generativo, de intensa fluorescencia, no se dividía mientras que era el núcleo vegetativo, con una cromatina más descondensada y por ello con menos fluorescencia, el que se dividía. En la inducción androgénica se pueden seguir distintas rutas pero según nuestros resultados y otros de la literatura (Raghavan, 1986) no parece haber ninguna relación entre la ruta seguida y el tipo de estrés que se haya aplicado para inducirla.

Lo que sí hemos observado en nuestro material es que ni el choque frío ni el de luz inician divisiones androgénicas por si solos sino que es la combinación de estos dos choques lo que ha produce la formación de los polinucleados. No se sabe todavía el papel del choque de luz en la inducción androgénica pero Gresshoff y Doy (1972) cultivando anteras de varios ecotipos de *arabidopsis* y aplicando solamente dicho choque de luz obtuvieron la formación de callos en algunos ecotipos mientras que no detectaron polinucleados. Esto refuerza nuestros resultados de que el choque de luz o el de frío por si solos no producen la formación de granos de polen polinucleados.

En general cultivamos las anteras en medio sólido pero probamos también con medio líquido porque se había descrito que podía presentar una serie de ventajas tales como un mejor acceso a los nutrientes por parte de las anteras o favorecer la dispersión de las sustancias tóxicas producidas por las mismas (Wernicke y Kohlenbach, 1976; Sunderland y Roberts, 1977; Lichter, 1981). Además el cultivo en medio líquido al no utilizar agar evitaba la presencia de agentes tóxicos para la embriogénesis que este componente puede añadir al medio de cultivo y evitaba que este componente disminuyera la disponibilidad de las hormonas (Scholl y Amos, 1980). A pesar de las ventajas teóricas descritas nosotros no obtuvimos mejores resultados con él. Tampoco coincidieron nuestros resultados con los de Keathley y Scholl (1982) que encontraban en medio líquido una mayor producción de callos comparada con la producida en medio sólido.

También probamos distintas concentraciones de hormonas. Los mejores resultados los obtuvimos tanto para *arabidopsis* como para guisante utilizando una combinación de 8mg/l

de NAA (ácido α -naftalenacético) y de 0.1 mg/l de kinetina añadida al medio de Gresshoff y Doy. Con esta combinación de hormonas Gresshoff y Doy (1972) obtuvieron callos cultivando anteras de *arabidopsis* aunque variando las otras condiciones (estadio de desarrollo del polen en el momento de cultivo, choques previos, genotipos...). Con las otras combinaciones de hormonas no se obtuvieron divisiones distintas a las observadas en el desarrollo gametofítico. Se ha descrito (Keathley y Scholl, 1982) que para una alta producción de callos la combinación de hormonas 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) /kinetina es más favorable que NAA/kinetina. También se ha propuesto que el NAA y el IAA (ácido indoloacético) favorecen la androgénesis directa mientras que el 2,4-D favorece más la androgénesis indirecta (Gupta 1975, Liang et al., 1987). Lo que está de acuerdo con nuestros resultados en los que al usar la hormona 2,4-D lo único que hemos conseguido han sido callos en las dos plantas de estudio.

Las citoquininas se ha visto que han sido muy eficaces al inducir la androgénesis en *Brassica napus* (Charne y Beversdorf, 1988) mientras que alteraban negativamente la inducción androgénica en *Brassica oleracea* (Sopory y Munshi, 1996).

Por todo ello, se puede decir que la combinación de factores es lo que provoca la inducción de las divisiones androgénicas aunque la presencia de una mezcla de hormonas específicas a una concentración determinada en el medio de cultivo juega un papel importante en el éxito de la inducción de la androgénesis (Ball et al., 1993; Armstrong et al., 1987).

En cuanto al estudio del aspecto externo que presentaban las anteras a la lupa estereoscópica después del cultivo no hemos encontrado una relación entre dicho aspecto y la evolución del polen que contenían. Encontramos polinucleados en la variedad Lincoln de guisante cuando las anteras estaban completamente marrones lo que en un principio parecía indicarnos la muerte de la antera y del polen en su interior. Tampoco las anteras marrones eran signo de polen con divisiones embriogénicas porque se encontraban otros polinucleados en anteras con el volumen aumentado o con una teca amarilla y otra marrón. Además, los cambios morfológicos sufridos por la antera después del cultivo parecen independientes del estadio de desarrollo de partida y de las condiciones de cultivo. Por ello, tuvimos que comprobar los resultados con DAPI. Con esta técnica observamos que en el polen de guisante los polinucleados parecían proceder de la división del núcleo vegetativo que se había formado tras una división asimétrica de la microspora joven por lo que parecía

que la ruta androgénica seguida en este caso era la ruta A (Sunderland y Wicks, 1971; Iyer y Raina, 1972; Pechan y Keller, 1988). En cambio los polinucleados de *arabidopsis* parecían proceder de la división simétrica de la microspora vacuolada siguiendo por tanto la ruta androgénica B ((Nitsch, 1972; Zaki y Dickinson, 1991; Bonet y Olmedilla, 1999). El porcentaje de polinucleados obtenido era tan bajo que prácticamente no se podía evaluar por lo que resultaba necesario recurrir a otro método de inducción de androgénesis.

4. Cultivo *in vitro* del polen aislado

Aunque el cultivo *in vitro* de anteras con el fin de inducir androgénesis es una técnica de interés económico que se usa en los laboratorios comerciales para producir plantas doble haploides (Morrison y Evans, 1989; Heberle-Bors, 1989; Heberle-Bors et al., 1996), presenta problemas como el de extraer las anteras del botón floral sin dañarlas, este inconveniente es especialmente grave cuando los botones florales son tan pequeños como en el caso de *arabidopsis*. Además, cuando se consigue inducir embriones es complejo saber si tienen como origen los granos de polen u otras partes de la antera puesto que algunas rutas androgénicas conducen a la formación de embriones que no son haploides. Por el contrario, se ha observado que la frecuencia de inducción androgénica mejora con el cultivo *in vitro* de polen aislado (Touraev et al., 1996), este material resulta, en principio, más fácil de estudiar para hacer un seguimiento continuo del cultivo puesto que cultivando anteras cada vez que se toma una para estudiarla no se puede seguir observando el proceso (Kyo y Harada, 1990; Zarsky et al., 1990) y por último, en cultivo de polen aislado no es necesario usar factores reguladores en los medios de cultivo por lo que disminuye la probabilidad de producir callos (Pechan et al., 1991; Vicente et al., 1991) Por todas estas razones probamos la inducción androgénica mediante el cultivo *in vitro* de polen aislado. Con este método se ha conseguido inducir androgénesis en muchos géneros como por ejemplo *Brassica* (Lichter, 1989; Pechan y Keller, 1988; Takahata y Keller, 1991), *Nicotiana* (Benito Moreno et al., 1988; Garrido et al., 1991; Kyo y Harada, 1986) y *Hordeum* (Hoekstra et al., 1993; Kuhlmann et al., 1991; Olsen, 1991). Para simplificar el número de variantes que podíamos probar y dado que habíamos obtenido polinucleados al cultivar *in vitro* las anteras de las variedad Lincoln y el mutante

SGE de guisante y los ecotipos Col 4 y C24 de *Arabidopsis* seleccionamos estos genotipos para realizar el presente estudio.

Del mismo modo que para el cultivo *in vitro* de anteras el principal problema práctico que se planteó fue la extracción de las anteras sin dañarlas, en este caso, al tener que manipular más el material antes del cultivo, el principal problema fue el alto grado de contaminación que se producía al extraer el polen. Por ello hubo que extremar las medidas de esterilización de las condiciones de cultivo.

La inducción androgénica mediante cultivo *in vitro* del polen aislado exige un pretratamiento de choque antes del cultivo, este choque se aplica al botón floral, a la antera o directamente al polen aislado (Sunderland, 1982; Touraev et al., 1997) en el presente trabajo se aplicaron distintos choques y combinaciones (Tabla 2). Pero antes de aplicar estos choques hay que asegurarse de que la planta donadora no sufra ningún estrés durante su crecimiento para estar seguros de que estudiamos sólo el efecto de los choques que se aplican para inducir la androgénesis.

Después de someter los botones florales a un choque frío a 4°C durante 5 días (pretratamiento 1) observamos distintas anomalías en las divisiones mitóticas lo que parece estar de acuerdo con los datos de Nitsch y Norreel (1973) que mostraban que este choque altera el huso mitótico. Para guisante (variedad Lincoln), partiendo de los estadios de tetra y microspora joven, se indujeron mediante este choque divisiones simétricas que dan lugar a un par de núcleos así como algunos granos de polen polinucleados que parecían provenir de divisiones simétricas de la microspora. En este caso, al contrario que en el cultivo de anteras la ruta androgénica seguida era la ruta B (Raghavan, 1986) Esto indica que el responder siguiendo una ruta u otra no depende de la planta donde se induzca la androgénesis sino de los tratamientos de inducción. Lo que podemos deducir es que cambiando los pretratamientos de choque y las condiciones de cultivo, la ruta androgénica seguida por el polen embriogénico cambia. Como también señalaron Hu y Kasha (1999) al observar que al someter el polen de trigo a un choque de ayuno, las microsporas se dividían simétricamente (ruta B), mientras que si sometían a un choque frío seguían la ruta A (división asimétrica seguida de divisiones en la célula vegetativa).

Al contrario que en guisante existen casos en los que la ruta androgénica puede cambiar según el estadio de desarrollo de partida, en *Brassica* y *Nicotiana* un choque de calor

aplicado a microspora provoca divisiones simétricas (ruta B) (Custers et al., 1994 ; Cordewener et al., 1996) mientras que el mismo pretratamiento aplicado a polen bicelular joven provoca la división de la célula vegetativa.

Cuando no se inducían divisiones observábamos, tanto en las tetradas como en las microsporas jóvenes, una clara descondensación de la cromatina después del choque frío indicando la entrada del núcleo en una fase de actividad lo que podría sugerir que se están sintetizando elementos para la entrada en androgénesis o más probablemente como defensa al tratamiento de estrés. Partiendo del estadio de microspora vacuolada y polen bicelular, también en guisante variedad Lincoln, y aplicando el choque frío a los botones florales (pretratamiento 1) observamos unas divisiones anómalas con puentes cromosómicos y dos polos de división además de algún polinucleado también con núcleos idénticos lo que indicaba de nuevo que probablemente se estaba siguiendo la ruta androgénica B (Raghavan, 1986).

En arabidopsis, no hemos conseguido ningún cambio al someter los botones florales a un choque frío en ninguno de los dos ecotipos probados (Col 4 y C24) lo que coincide con los estudios realizados sobre *Brassica campestris* y *Brassica oleracea* que demostraron que estas plantas no dan buenos resultados cuando se somete su polen a un choque frío (Keller et al., 1983; Osolnick et al., 1993).

Al cultivar el polen aislado de guisante, después de la aplicación del choque frío a los botones florales, las divisiones no continuaban y no pudimos conseguir embriones.

Además del choque frío a los botones florales aplicamos choques de calor a las anteras. Se había descrito que el choque térmico tenía un efecto positivo en la inducción androgénica en *Brassica* (Keller et al., 1987; Pechan y Keller, 1988; Custers et al., 1994; Lichter, 1982; Pechan et al., 1991) sin embargo en nuestro material no hubo respuesta al choque de calor con ninguna de las dos plantas utilizadas (pretratamiento 5).

Otros autores (Kyo y Harada, 1985, 1986) observaron que un pretratamiento de ayuno sustituyendo la sacarosa del medio de cultivo por manitol produce buenos resultados en la inducción androgénica y que si este pretratamiento se combinaba con un choque de calor los resultados mejoraban notablemente (Touraev et al., 1996). Utilizando material cuyos botones florales habían sido sometidos a frío y aplicando dicha combinación de pretratamientos (anteras a 33°C durante 6 días en un medio B5 de ayuno, pretratamiento 2),

observamos en guisante (variedad Lincoln) que partiendo tanto de tetrada y microspora joven como de microspora vacuolada y polen bicelular se obtenían algunos polinucleados con núcleos idénticos, de nuevo parecen seguir la ruta B.

De todo esto podemos pensar que las divisiones androgénicas que se iniciaban en guisante con el choque frío continúan con la combinación del choque de calor y ayuno. Llama la atención que en cultivo de polen aislado el choque frío produce por si solo la formación de polinucleados.

Sometiendo los botones florales al choque frío y aplicando la combinación del choque de calor y ayuno directamente al polen aislado (pretratamiento 3) aunque durante menos tiempo que a las anteras para evitar dañar a los granos de polen no se obtuvieron polinucleados. En este caso la antera parece jugar un papel moderando los choques de inducción.

Otro pretratamiento que también probamos fue el choque de calor a 41°C durante una hora a las anteras este choque dio buenos resultados en *Brassica napus* (Binarova, 1997) pero no en nuestro material, ni siquiera en *Arabidopsis thaliana* L. que es también una *Brassicaceae*.

Realizamos el cultivo en dos medios diferentes: el NLN y el AT3. El AT3 que es más rico en micronutrientes y macronutrientes es el que dio mejores resultados.

Nuestros resultados parecen indicar que la inducción de divisiones anómalas que podrían conducir a la formación de embriones haploides no depende del estadio de desarrollo de partida puesto que estas divisiones se han observado independientemente del estadio en el que se cultiva el polen.

No nos ha sido posible estudiar la ultraestructura de los polinucleados obtenidos puesto que el porcentaje de inducción tanto para cultivo de anteras como de polen aislado fue extremadamente bajo por lo que tuvimos que contentarnos con los estudios con DAPI. Tampoco conseguimos llegar a más de cinco núcleos por lo que no podemos decir si estas primeras divisiones son verdaderamente divisiones embriogénicas o no, pero lo que sí podemos decir es que estas divisiones anómalas sólo se producen si se van a formar callos o embriones luego en alguna de estas situaciones deben estar nuestros granos de polen si bien no hemos conseguido encontrar el medio que los haga prosperar a embriones.

En general, el estudio ultraestructural de los polinucleados o embriones procedentes de polen está limitado a unas pocas plantas como pueden ser *Nicotiana tabacum* (Vazart, 1973; Dunwell y Sunderland, 1974, 1975; Rashid et al., 1982; Singh et al., 1979; Zarsky et al., 1990; Garrido et al., 1995), *Hordeum vulgare* (Mlodzianowski y Idzokowska, 1978; Huang, 1982; Kott et al., 1985; Chen et al., 1984), *Brassica napus* (Hause et al., 1993, 1994; Telmer et al., 1995; Hause y Hahn, 1998; Zaki y Dickinson, 1990, 1991) o *Zea mays* (Barnabas et al., 1987; Pretova et al., 1993). Estas plantas y otras en las que se han hecho estos estudios, tienen una muy buena respuesta a la inducción androgénica dando lugar a numerosos embriones lo que hace que se disponga de suficiente material para procesarlo. De lo contrario estos métodos se complican considerablemente y más si se considera que los granos de polen pluricelulares conservan su exina intacta y presentan numerosas vacuolas que dificultan el procesamiento de este material

5. Origen de la androgénesis. Una hipótesis

Tal como está definida, la androgénesis no es más que un claro ejemplo de la llamada totipotencialidad de las células vegetales: Todas las células vivas tienen la capacidad inherente de desdiferenciarse para posteriormente rediferenciarse y dar lugar a la planta adulta cuando son puestas en cultivo. Es decir, las células de una planta pueden regenerar el organismo del que proceden con tan solo cultivarlas bajo ciertas condiciones de laboratorio. Sin embargo, esta interpretación de la androgénesis como ejemplo de la totipotencia vegetal, no nos parece del todo adecuada, como mostramos a continuación:

El grano de polen, o sus estadios ontogénicamente anteriores (microsporas) son estructuras altamente diferenciadas dentro del reino vegetal. Esta diferenciación se manifiesta tanto en su morfología como en su fisiología, que presentan adaptaciones interesantes para lograr la polinización. La resistente pared de esporopolenina o la deshidratación del polen maduro son ejemplos de estas adaptaciones. Por otro lado, en las plantas, los tejidos germinales son los últimos en aparecer en la ontogenia de un meristemo dado. Según esto, y siguiendo la lógica de la totipotencia, el cultivo de células tan diferenciadas debería ser menos efectivo que el cultivo de meristemos o de otros tejidos menos especializados. Es decir, la

embriogénesis somática debería ser más fácil que la androgénesis, ya que en la primera se parte de células menos diferenciadas (y por tanto más totipotentes) que en la segunda. Esto ocurre en la mayoría de las plantas estudiadas, pero no en todas. Se han descrito varios casos en los que la androgénesis ocurre con una sorprendente facilidad, considerando el alto grado de diferenciación del tejido de partida. Nos fijaremos en estas especies particulares para continuar la exposición. Dentro de las angiospermas, las *Solanaceae* son las plantas en las que más fácilmente se induce la androgénesis: Desde hace tiempo se sabe que la androgénesis en *Nicotiana tabacum* sólo requiere un medio con sales minerales y con azúcares (Sunderland, 1971). Algo parecido ocurre en otras especies como *Hyosciamus niger* y *Datura innoxia* (Nitsch, 1972; Raina et al, 1982), donde la embriogénesis del polen no implica la adición de hormonas al medio. Frente a esto tenemos la embriogénesis somática, en la que la adición de hormonas al medio es casi imprescindible para la formación de callos y de embriones somáticos (Zimmerman, 1993). En las especies anteriores, se comprueba como la inducción de morfogénesis y organogénesis parece ser más fácil en el polen (tejido altamente diferenciado) que en tejidos somáticos como el hipocótilo de zanahoria (tejido poco especializado usado como modelo en la embriogénesis somática) (Zimmerman, 1993). Estas observaciones parecen estar en contra de la ley de la totipotencia, la cual afirma que cuanto más diferenciado esté un tejido, menor capacidad tendrá para regenerar la planta completa.

Si bien las hormonas no parecen ser el factor clave en la inducción de la androgénesis, no ocurre lo mismo con el tratamiento de choque. En los últimos años se viene comprobando que es casi imprescindible someter a las microsporas a un cierto estrés (nutricional, térmico, químico, etc.) antes de ponerlas en cultivo (Touraev et al., 1996). Este paso es el que parece desviar definitivamente al polen de su ruta de desarrollo gametofítica. La importancia del estrés se pone claramente de manifiesto en *Petunia hybrida*, en la que se han conseguido divisiones embriogénicas con tan solo dar un choque térmico a las anteras (Babbar y Gupta, 1980). En esta planta, no es necesario el cultivo de las anteras, ya que sólo con el el choque térmico se induce la androgénesis. Sin embargo, es probable que la inducción de embriogénesis somática en esta planta requiera un medio complejo, donde las hormonas jueguen un papel fundamental en la formación del callo.

En los ejemplos anteriores, en determinadas plantas, se observa que la embriogénesis del polen es un proceso relativamente fácil de conseguir en el laboratorio. De hecho, parece más sencillo que la embriogénesis somática. Es como si hubiera cierta predisposición dentro de la planta para que el polen manifieste esta ruta de desarrollo esporofítico. Esto nos hace pensar que la embriogénesis del polen no se debe sólo a la totipotencia, sino que debe haber algún fenómeno biológico detrás de este proceso. Un interesante fenómeno que apoya esta idea, es la formación espontánea de embriones a partir del polen. Esto se ha descrito en algunos híbridos del género *Solanum* (Ramanna, 1974; Ramanna y Hermsen, 1974) y en *Paeonia* (Li, 1982). En estos casos se observa la formación espontánea de granos polinucleados sin que sean necesarios ni el tratamiento de choque ni la puesta en cultivo de la antera. Resulta fácil de admitir, que en las especies anteriores, la androgénesis difiere bastante de la embriogénesis somática. Es decir, si una planta manifiesta el carácter "embriogénesis del polen" de una forma espontánea, debe haber alguna explicación biológica diferente a la totipotencia, ya que esta sólo se manifiesta en el laboratorio.

Otro proceso interesante que aleja a la androgénesis de la totipotencia es el dimorfismo. El dimorfismo consiste en la existencia de dos tipos de microsporas diferentes en cuanto a su tamaño en una misma antera. Las más grandes se caracterizan por su reducida capacidad androgénica ya que al cultivarlas no producen embriones. Sin embargo, las pequeñas sí son fuertemente embriogénicas y se desvían con facilidad hacia la ruta esporofítica (Rashid, 1983), pero lo más interesante de este fenómeno, es que en algunas plantas como *Nicotiana tabacum*, la frecuencia de granos embriogénicos puede variar según sean las condiciones de cultivo de la planta donadora. Esto nos hace pensar que hay una cierta predeterminación en el proceso del dimorfismo. Es decir, las microsporas muestran capacidad embriogénica incluso antes de ser puestas en cultivo.

Estos y otros argumentos nos hacen pensar que la embriogénesis del polen podría deberse no únicamente a la totipotencia vegetal, sino que posiblemente haya otros factores implicados. Según los ejemplos anteriores, parece como si la capacidad androgénica de ciertas especies fuera un hecho más o menos definido dentro de su material genético. Es como si existiese un programa morfogénico preestablecido para el grano de polen, permitiendo así la formación de un embrión. Este programa morfogénico se expresaría sólo

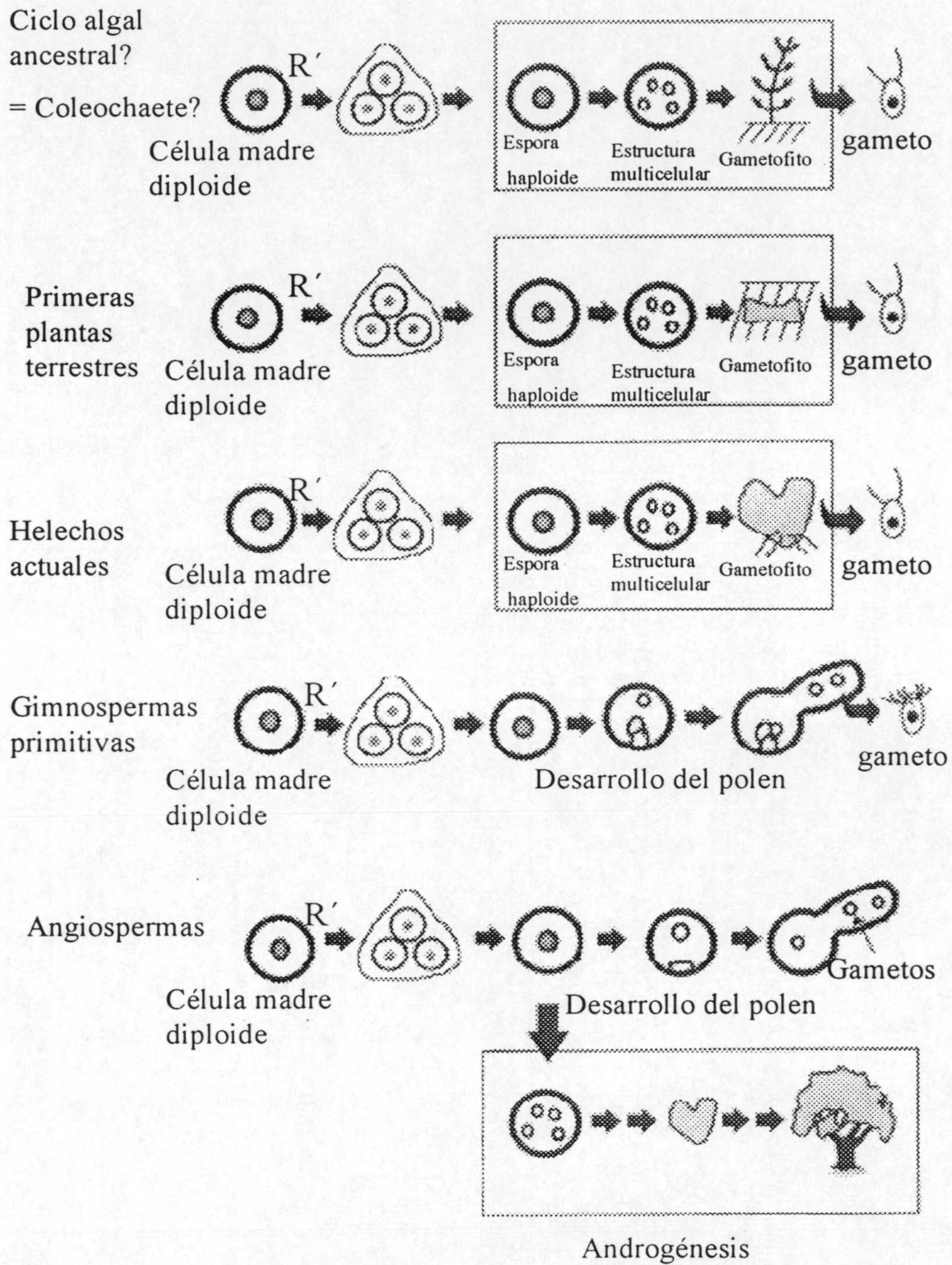
en ciertas ocasiones y en especies aisladas, provocando una desviación de la ruta normal de desarrollo.

Hasta ahora hemos intentado "demostrar" que existe un trasfondo biológico que explica la androgénesis. Es decir, este proceso no es equivalente a la embriogénesis somática, desde un punto de vista biológico. De ser esto cierto, ¿Cuál sería la interpretación biológica de la embriogénesis del polen?

Bajo nuestro punto de vista, la respuesta a la pregunta anterior, se encuentra en la historia evolutiva de lo que llamamos grano de polen. Nuestra hipótesis propone que la androgénesis es un caso de atavismo, dentro del mundo de las plantas. Se puede definir un atavismo como la reaparición de un carácter perdido (morfológico o de comportamiento) típico de ancestros remotos y no expresado en los padres o ancestros recientes del organismo que muestra el carácter atávico (Hall, 1984). Es decir, durante el desarrollo normal de un órgano o tejido aparecen características que, si bien en la especie en cuestión no son habituales, si lo eran en los ancestros de la misma. Aplicando este concepto a nuestro caso, podemos decir que la capacidad morfogénica del polen es un carácter antiguo que poseían las estructuras "precursoras" del mismo, pero que actualmente se ha perdido. Sólo bajo determinadas situaciones de estrés, se produce la expresión de este carácter antiguo, que en el caso de la androgénesis es una elevada capacidad morfogénica.

Para tratar de demostrar nuestra hipótesis nos basaremos en dos líneas de razonamiento diferentes. Por un lado, trazaremos la historia evolutiva del grano de polen (Esquema 4), buscando aquellas estructuras ancestrales en las que la capacidad morfogénica sea importante. Como es de esperar, la filogenia del grano de polen va ligada a la de las plantas con semilla (espermatofitas), que son las que presentan esta estructura. La existencia de estos ancestros, que en lugar de originar el tubo polínico, tenían capacidad proliferativa, es fundamental para apoyar la hipótesis de la androgénesis como un atavismo. Por otro lado, compararemos algunos ejemplos de atavismos reconocidos como tales, con el caso de la embriogénesis del polen.

Aunque la filogenia de las espermatofitas (plantas con semilla) no está en absoluto resuelta, parece claro que proceden de algún tipo de helecho arborescente que vivió a mediados del Devónico. Sea cual sea la estructura de esta planta ya extinguida, se sabe que



Esquema 4: Representación esquemática del modelo propuesto para la evolución del polen desde las algas primitivas hasta las angiospermas actuales.

producía esporas para reproducirse (de forma similar a como lo hacen los helechos actuales). Pues bien, basándose en la morfología, composición química y otros argumentos, podemos decir que las esporas de estas "proto-espermatofitas" son unas estructuras filogenéticamente equiparables al polen actual. Es decir, el polen procede evolutivamente de estas esporas. Se supone que en estos helechos primitivos se producían meiosporas cuya morfología era similar a la del polen actual. Estas meiosporas tenían una alta capacidad proliferativa y daban lugar a un gametofito haploide multicelular (característica que también es compartida por la mayoría de los helechos actuales). En este gametofito se producían los gametos masculinos y femeninos (que están separados en dos gametofitos distintos si el helecho es heterospórico). Se supone que el gameto masculino era una célula con múltiples flagelos. La fecundación daba lugar a un cigoto diploide que cerraba el ciclo. La identidad entre las esporas de los helechos y el polen es tal, que el ciclo biológico de las espermatofitas se considera como una simplificación drástica del de los helechos. Esta simplificación implicaría una reducción en el gametofito masculino, que pasa de ser multicelular en los helechos a unicelular en las plantas con semilla.

El ciclo biológico de los helechos primitivos y de los actuales supone la primera prueba para nuestra hipótesis: La meiospora de los helechos, que es el ancestro más directo del polen, presenta capacidad morfogénica, siendo capaz de proliferar dando una estructura multicelular. Es posible que las plantas actuales, en su proceso evolutivo a partir de los helechos, hayan heredado los genes responsables de esta capacidad organogénica. En los helechos, la espora da lugar a un gametofito, mientras que en la androgénesis, la microspora produce un embrión. Proponemos que el patrón de desarrollo (genes "homeóticos") que se expresa durante las primeras divisiones embriogénicas de una microspora, es equivalente al que hace lo mismo cuando germina una espora de un helecho para dar lugar al protalo (gametofito multicelular). En el primer caso el comportamiento proliferativo es el resultado de un estrés sobre la microspora (atavismo), mientras que en el segundo forma parte del ciclo biológico natural del helecho (en el cual también juega un papel importante el estrés).

Tanto los helechos primitivos como las plantas actuales, proceden con casi total seguridad de algas que colonizaron la superficie de la Tierra hace unos 450 millones de años. El escaso registro fósil dejado por estas algas dificulta enormemente su identificación con

algunos de los grupos existentes en la actualidad. De todas formas, casi todos los autores coinciden en que las algas precursoras de las plantas terrestres pertenecían a las denominadas "algas verdes". Dentro de este nombre genérico se incluye una enorme diversidad de táxones, que va desde organismos unicelulares hasta otros que forman estructuras similares a tejidos verdaderos. Asimismo, las algas verdes se pueden dividir en dos grupos totalmente diferentes: las carofitas y las clorofitas. La diferenciación en estos dos grupos se hace basándose en caracteres citológicos, bioquímicos y morfológicos.

Actualmente, tanto las clorofitas como las carofitas son el caballo de batalla de dos hipótesis opuestas que tratan de explicar el origen de las plantas terrestres. Sin embargo, estas discusiones no afectan a nuestros objetivos, ya que lo que pretendemos es buscar una estructura filogenéticamente relacionada con el polen de las plantas actuales. Para ello podemos basarnos en las algas verdes actuales, cuyos ancestros fueron los primeros organismos vegetales en colonizar la tierra firme.

Dentro de las algas verdes, son las carofitas las que parecen tener una relación más cercana con las plantas terrestres. Esta es la razón por la que trataremos de buscar el origen evolutivo del polen en un alga perteneciente a este grupo. Se trata del género *Coleochaete*, cuyo ciclo biológico se describe a continuación.

Las especies del género *Coleochaete* se caracterizan por tener un talo haploide relativamente simple morfológicamente. Se trata de una lámina uniestratificada con aspecto circular. A partir de este talo haploide (gametofito), se producen gametos que al fusionarse dan lugar a un cigoto diploide. Una particularidad interesante de este alga es que los cigotos son retenidos por el gametofito. Esto es un rasgo evolucionado de este alga, ya que se insinúa un cierto "cuidado" de la descendencia, que se ve plasmado en las plantas terrestres con la formación de un embrión.

El cigoto de *Coleochaete* suele rodearse de esporopolenina, que en este caso podría tener un papel protector. Curiosamente esta sustancia forma parte importante en la composición química de las microsporas actuales. Por otro lado, durante la meiosis del cigoto de *Coleochaete* se observa la deposición de calosa alrededor de los meiocitos resultantes. Este mismo hecho se da también durante la meiosis de las células madres del polen, en las anteras de las plantas terrestres.

Así las otras características hacen pensar que la meiosis del cigoto de Coleochaete y la meiosis necesaria para la formación del grano de polen, son procesos que tienen un origen filogenético común.

Según lo anterior, lo que actualmente llamamos polen, procede filogenéticamente de una meiospora producida por una hipotética alga de agua dulce. Pero lo más interesante es la capacidad morfogénica de estas meiosporas. En la mayoría de las algas pluricelulares que presentan reproducción sexual, las meiosporas (sea cual sea su estructura) tienen una gran capacidad organogénica. Es decir, son estructuras que pueden dar lugar a un organismo pluricelular, mediante un proceso de morfogénesis más o menos complejo. La meiospora del alga puede, como en el caso de Coleochaete, dar lugar al gametofito del que procede. Si el alga tiene un ciclo distinto la meiospora puede germinar dando lugar al gametofito haploide. Este gametofito puede producir gametos que al fusionarse permitirán la formación del esporofito diploide.

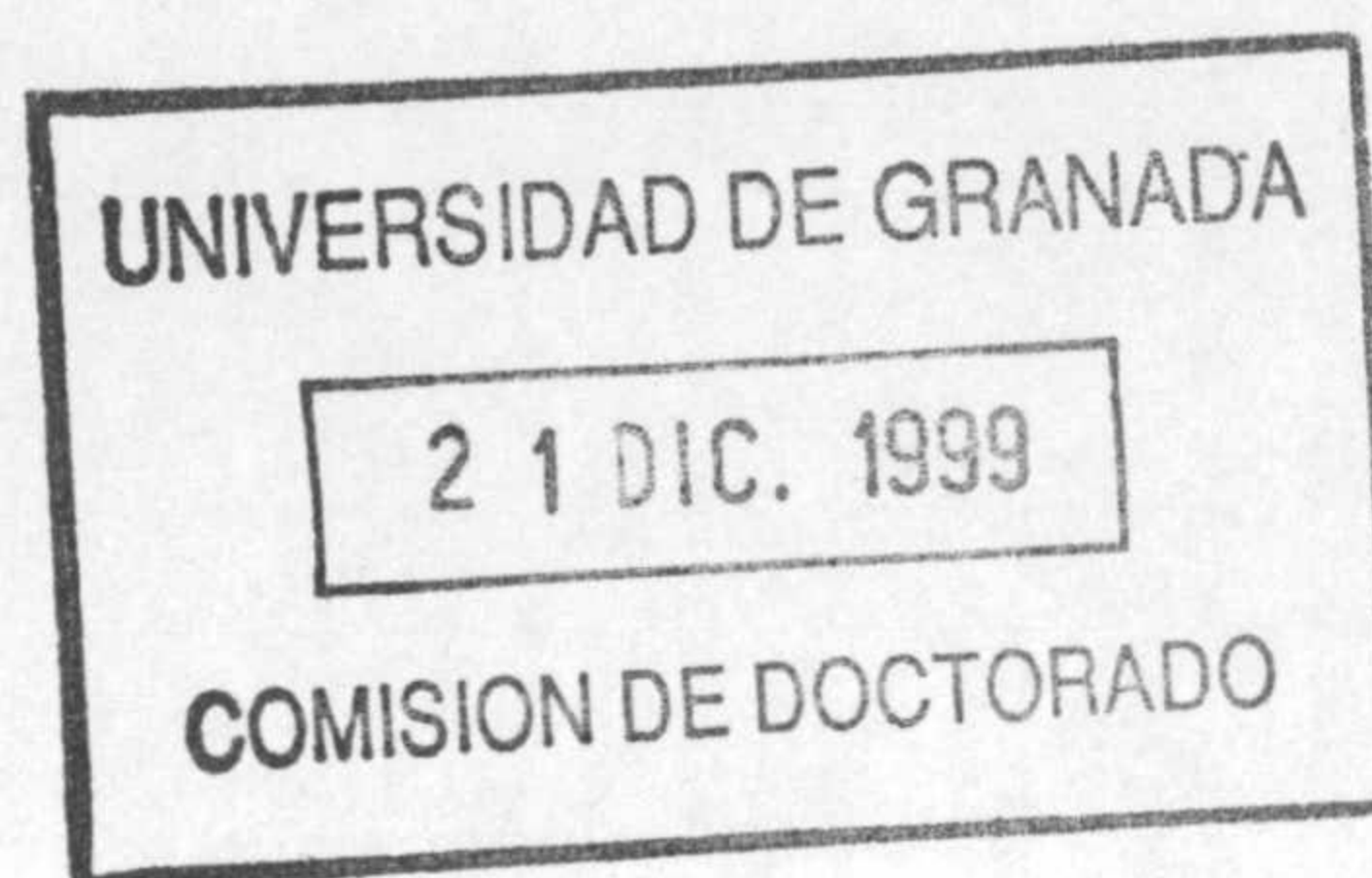
Hasta aquí hemos tratado de demostrar que la capacidad morfogénica del polen es un rasgo que deriva de las meiosporas de las algas en primer lugar, y de las esporas de los helechos en segundo. Esta capacidad morfogénica se expresa de forma natural en algas y helechos, mientras que lo hace tras un estrés en las plantas con semilla. A continuación describiremos algunos ejemplos de atavismos dentro de las plantas, comparándolos con el proceso androgénico.

Tal y como ha sido definido anteriormente, un atavismo es el proceso mediante el cual un órgano de la planta adquiere durante la ontogenia una morfología que recuerda a la que tenían sus ancestros u otras especies relacionadas evolutivamente. Por ejemplo, la morera (*Morus alba*) presenta normalmente unas hojas enteras con los márgenes algo aserrados. Sin embargo, en ciertas ocasiones se observan unas hojas claramente lobuladas, que resultan ser similares a la de la higuera común (*Ficus carica*). Resulta que ambas especies pertenecen a la misma familia, lo cual las relaciona evolutivamente. Podemos decir que en algunos momentos, la morera manifiesta caracteres pertenecientes a una especie ancestral que tenía las hojas como la higuera. Resulta interesante que la expresión de este atavismo se da con más frecuencia en las variedades cultivadas de morera. Al igual que la domesticación de animales, el cultivo de plantas "distorsiona" un poco su ontogenia pudiendo obtenerse estructuras o individuos algo diferentes de las homólogas silvestres. En

este caso, el cultivo de la morera durante cientos de años puede haber facilitado la expresión de un carácter atávico como son las hojas de higuera. Pero los atavismos no se ven restringidos a los tejidos somáticos, también se han descrito en el grano de polen: Algunos autores han encontrado similitudes morfológicas entre las células espermáticas de algunas angiospermas (*Asclepias*, *Monotropa*) y los espermatozoides de los helechos. Esta expresión de un carácter ancestral dentro del polen, puede considerarse como atavismo. En estos ejemplos se observa que la forma atávica se manifiesta espontáneamente, aunque hay algunos casos en que esto no es así: Un buen ejemplo lo tenemos en el Castaño de Indias (*Aesculus hippocastanum*). Este árbol suele presentar una hoja claramente palmeada, que es característica del género. Sin embargo, como consecuencia de ciertos estreses ambientales (heladas, depredación, daño mecánico, etc.), se producen hojas pinnadas más parecidas a las que presenta la familia *Sapindaceae*, que parece estar filogenéticamente relacionada con *Aesculus* (según la clasificación de Cronquist, ambos se incluyen en el orden Sapindales). Este último ejemplo nos resulta muy útil a la hora de relacionar la androgénesis con los atavismos. Como se ha mencionado anteriormente, la ruta embriogénica del polen se manifiesta sólo después de someter a las microsporas a un cierto estrés. Este mismo estrés es el que provoca la formación de hojas atávicas en el castaño de indias. La equivalencia entre ambos procesos supone una prueba más en favor de nuestra hipótesis, que considera la androgénesis como un atavismo (Bonet et al. 1998).

En términos genéticos un atavismo implica que los organismos más evolucionados (por ejemplo las angiospermas) conservan ciertos genes procedentes de grupos taxonómicos más primitivos (por ejemplo algún helecho con semilla). Estos genes "antiguos" se encontrarían en el genoma de la especie actual, quedando su expresión suprimida por la de genes más "modernos".

Según esto, la expresión bajo ciertas circunstancias de estos genes "antiguos" es lo que constituye un atavismo. De esta forma se puede explicar la formación de hojas de higuera en la morera, así como los demás ejemplos anteriores. La manifestación o no de un atavismo depende de la cantidad de mutaciones que hayan acumulado los genes "antiguos", ya que al estar "fuera de uso" no sufren la presión de la selección natural y pueden mutar casi libremente.



A modo de conclusión podemos dar una definición alternativa de androgénesis, considerando el proceso como un atavismo: La androgénesis sería el proceso mediante el cual una microspora sometida a un estrés determinado, cambia su patrón de expresión génica para adquirir capacidad embriogénica. El nuevo patrón de desarrollo implica la expresión de genes primitivos, que se manifestaban comúnmente en los ancestros de las plantas con semilla. Estos genes androgénicos serían genes reguladores, que a su vez "dispararon" la formación del embrión, que es un carácter exclusivo de las espermatofitas.

CONCLUSIONES

- 1) Las condiciones adversas que puede sufrir una planta durante su desarrollo llevan a la reducción de los botones florales que produce. Por ello, la relación establecida para guisante y arabis entre el tamaño del botón floral y el estado de desarrollo del polen que contiene puede servir como indicativo de las condiciones en las que han crecido dichas plantas.

- 2) El estudio secuencial de los plastidios a lo largo del desarrollo del polen indica que los amiloplastos no aparecen ni en guisante ni en arabis antes de la primera división mitótica del polen por lo que, de acuerdo con las observaciones de Sangwan y Sangwan Norreel, estas plantas no pueden considerarse en principio recalcitrantes a la inducción androgénica.

- 3) Hemos inducido en el polen divisiones distintas a las del desarrollo gametofítico tras el cultivo de anteras en ambas plantas.

- 4) Para conseguir esta inducción en cultivo de anteras fue fundamental seleccionar:
 - El genotipo de la planta de la que se toma el polen:
 - a) Para guisante: la variedad Lincoln y el mutante SGE.
 - b) Para arabis: los ecotipos Col 4 y C24.
 - El tratamiento de estrés aplicado previo al cultivo. Para ambas plantas: la combinación de un choque frío a los botones florales y de luz a las anteras.
 - El tipo de medio de cultivo utilizado. Para ambas plantas el medio sólido Gresshoff y Doy.
 - La inclusión en el medio de hormonas. Para ambas plantas NAA y kinetina.
 - El estadio de desarrollo del polen del que se parte para la inducción:
 - a) Para guisante microspora joven recién liberada
 - b) Para arabis microspora vacuolada.

- 5) Teniendo en cuenta la condensación de la cromatina en los polinucleados obtenidos tras el cultivo de anteras podemos decir que:
- Los polinucleados de guisante provienen de la división asimétrica de la microspora, por lo que siguen la ruta androgénica B.
 - Los polinucleados de arabidopsis se forman de la división simétrica de la microspora, siguiendo por lo tanto la ruta androgénica A.
- 6) El estudio de los cambios morfológicos sufridos por las anteras tras el cultivo indica que la evolución del aspecto externo de las mismas no refleja la evolución de los granos de polen que contienen.
- 7) En el caso de cultivo de polen aislado solamente hemos conseguido obtener polinucleados en guisante.
- 8) Para la obtención de estos polinucleados tras el cultivo de polen aislado fue fundamental:
- El genotipo seleccionado, se obtuvieron resultados con la variedad Lincoln
 - El tratamiento de estrés aplicado antes del cultivo, los mejores resultados se obtuvieron con:
 - Choque de frío a los botones florales y
 - Combinación de choque de frío en los botones florales con choque de calor y ayuno a las anteras. Este choque produjo un mayor número de polinucleados que el anterior.
 - Los estadios de desarrollo del polen del que se parte para la inducción con ambos choques fueron tanto tetra y microspora joven como microspora vacuolada y polen bicelular.

- 9) Dado que hemos encontrado numerosos argumentos en contra de la idea que relaciona el origen de la androgénesis con la totipotencia de las plantas, hemos propuesto una hipótesis que postula que el origen de la andogénesis puede estar ligada al fenómeno del atavismo.

BIBLIOGRAFÍA

ANAND, V.V., AREKAL, G.D. y SWAMY, B.G.L. (1980) Chimeral embryoids of pollen origin in tobacco. *Curr Sci*, 49, 603-604

ARMSTRONG, T.A., METZ, S.G. y MASCIA, P.N. (1987) Tow regeneration systems for the production of haploid plants from wheat anther culture. *Plant Sci*, 51, 231-237

ARNISON, P.G., DONALDSON, A., JACKSON, A., SIMPLE, C. y KELLER, W.A. (1990) Genotype specific response of cultured broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica) anthers to cytokinins. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 20, 217-222

ARNISON, P.G., DONALDSON, P., HO, L.C.C. y KELLER, W.A. (1990) The influence of various physical parameters on anther culture of broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 20, 147-155

BAJAJ, Y.P.S. (1983) *In vitro* production of haploids. En: Handbook of plant cell culture. (Eds: D. A. Evans, W. R. Sharp, P.V. Amirato and Y. Yamada). New York: Macmillan Publishing Co. 1, 228-287

BALL, S.T., ZHOU, H.P. y KONZAK, C.F. (1993) Influence of 2,4-D, IAA and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Sci*, 90, 195-200

BARNABÀS, B., FRANSZ, P.F. y SCHEL, J.H. (1987) ultrastructure studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Rep*, 6, 212-215

BENCHEIKH, M. y GALLAIS, A. (1996a) Study of the variation in the somatic embryogenesis ability of some pea lines (*Pisum sativum* L. and *Pisum arvense* L.). *Euphytica*, 90, 251-256

BENCHEIKH, M. y GALLAIS, A. (1996b) Somatic embryogenesis in pea (*Pisum sativum* L. and *Pisum arvense* L.). *Euphytica*, 90, 257-264

BENITO MORENO, R.M., MACKE, M.T., HAUSER, M.T., ALWEN, A. y HEBERLE-BORS, E. (1988) sporophytes and male gametophytes from "*in vitro*" cultures, immature tobacco pollen. En: Sexual reproduction in plant growth regulation. (Eds: Cresti M., Gori P. and Pacini A.). Springer-Verlag, Berlin, 137-142

BIDDLE, J.A. (1979) Anther and pollen development in garden pea and cultivated lentil. Can. J. Bot. 57, 1883-1900

BINAROVA, P., STRAATMAN, K., HAUSE, B, HAUSE, G y VAN LAMMEREN, A. A.M. (1993) Nuclear DNA synthesis during the induction of embryogenesis in cultured microspore and pollen of *Brassica napus* L. Theor Appl Genet, 87, 9-16

BINAROVA, P., HAUSE, G., CENKLOVÁ, V., CORDEWENER, J.H.G. y LOOKEREN, M.M.V. (1997) A short severe heat shock is required to induce embryogenesis in late bicellular pollen of *Brassica napus* L. Sex Plant Reprod, 10, 200-208

BINDING, H. (1972) Nuclear and cell division in isolated pollen of *Petunia hybrida* in agar suspension cultures. Nature New Biol, 237, 283-285

BLACKMORE, S. y KNOX, R.B. (1990) Microsporogenesis: the male programme of development. En: Evolution and ontogeny. (Eds: S. Blackmore and R. B. Knox). Academic Press, New York, 1-10

BONET, F.J., AZBAID, L. y OLMEDILLA, A. (1998) Pollen embryogenesis: atavism or totipotency? Protoplasma 202, 115-121

BONET, F.J. y OLMEDILLA, A. (1999) Structural changes during early embryogenesis in wheat pollen. Protoplasma. En prensa.

BOROJEVIC, S. (1990) Principles and methods of plant breeding. Developments in crop science 17. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo.

BOUHARMONT, J. (1977) Cytology of microspore and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*. *Caryologia*, 30, 351-360

BOURGIN, J.P. y NITSCH, J.P. (1967) Obtention de *Nicotiana* haploids á partir d'étamines cultivées *in vitro*. *Ann Physiol Veg*, 9, 377-382

BRIGHIGNA, L., CECCI-FIORDI, A. y PALANDRI, M.R. (1981) Ultraestructural investigations on the two nucleate pollen grain of *Tillandsia caput-medusae* Morr. (*Bromeliaceae*). *Am. J. Bot*, 68, 1033-1041

BUENO, M.A., GOMEZ, A., BOSCAIU, M., MANZARENA, J.A. y VICENTE, O. (1997) Stress-induced formation of haploid plants through anther culture in cork oak (*Quercus suber*). *Physiol Plant*, 99, 335-341

BYSCOV, A.G. (1978) Regulation of initiation of meiosis in fetal gonads. 5th Annual Workshop on the testis. Geilo, Norway. *Endocrine Approach to the Male Contraception*. *Int. J. Androl. Suppl.* 2.

CARLSON, P.S. (1970) Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science*, 168, 487-489

CHARNE, D.G. y BEVERSDORF W.D. (1988) Improving microspore culture as a rapeseed breeding tool: The use of auxins and cytokinins in an induction medium. *Can. J. Bot*, 66, 1671-1675

CHEN, Z.Z. y CHEN, Z.H. (1983) Induction of rape embryoids from stage float culture of anthers. En: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Proceedings of a workshop cosponsored by Institute of Genetics (Ed: Acadmic Sincia y IRRI) Science Press, Beijing, 436

CHEN, C.C., HOWARTH, M.J. y PETERSON, R.L. (1984) Ultrastructure and androgenic microspores of barley during early stages of anther culture. *Can. J. Genet. Cytol*, 26, 484-491

CHIBI, F., ANGOSTO, T., GARRIDO, D. y MATILLA, A. (1993) Requirements of polyamines for in vitro maturation of the mid-binucleate pollen of *Nicotiana tabacum*. *J. Plant. Physiol*, 142, 452-456

CHUONG, P.V. y BEVERSDORF W. D. (1985) High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata*. *Plant Sci*, 39, 219-226

COLEMAN, A.W., MAGUIRE, M.J. y COLEMAN, J.R. (1981) Mitharamycin and 4, 6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids and virus particles. *J. Hystochem. Cytochem*, 29, 959-968

CORDEWENER, J.H.G., CUSTERS, J.B.M., DONS, H.J.M. y VANLOOKER CAMPAGNE, M.M. (1994) Molecular and biochemical events during the induction of microspore embryogenesis. En: *In vitro* production of higher plants. (Eds: S. M. Jain, S.K. Sopory and R. E. Veilleux). Kluwer Academic Press, 1, 111-124

CORDEWENER, J.H.G., CUSTERS, J.B.M., DONS, H.J.M. y VANLOOKER CAMPAGNE, M.M. (1996) Cytological and biochemical aspects of *in vitro* androgenesis in higher plants. En: *In vitro* haploid production in higher plants. (Eds: Jain S. M., Sopory S. K. And Veilleux R. F.). Kluwer, Dordrecht, 111-124

CORDUAN, G. (1975) Regeneration of anther culture derived plants of *Hyosciamus niger*. *Planta (Berl.)*, 127, 27-36

CORDUAN, G. y SPIX, C. (1975) Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. *Planta (Berl.)*, 124, 1-11

CRANE, P.R. (1990) The phylogenetic Context of microsporogenesis. En: Evolution and ontogeny. (Eds: S. Blackmore and R. B. Knox). Academic Press, New York, 11-42

CRONQUIST, A. (1988) The evolution and classification of flowering plants. 2nd edn. The New York Botanical Garden.

CUSTERS, J.B.M., CORDEWENER, J.H.G., NOLLEN, Y., DONS, H.J.M. Y VAN LOOKEREN CAMPAGNE, M.M. (1994) Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. Plant Cell Rep, 13, 267-271

DALE, P.J. (1975) Pollen dimorphism and anther culture in barley. Planta, 127, 213-220

DE BUYSER, J. y HENRY, Y. (1986) Wheat: Production of haploids, performance of doubled haploids and yield trials. En: Crop I (Ed: Y.P.S. Bajaj). Springer-Verlag, Berlin, 73-88

DEL RIO, L.A., SANDALIO, L.M., YÁÑEZ, J. y GÓMEZ, M. (1985) Induction of a manganese-containing superoxide dimutase in leaves of *Pisum sativum* L. by high nutrient levels of zinc and manganese . J Inorg Biochem, 24, 25-34

DICKINSON, H.G. y HESLOP-HARRISSON, J. (1970) The ribosome cycle, nucleoli and cytoplasmic nucleoloides in meiocytes of *Lilium*. Protoplasma, 69, 181-200

DICKINSON, H.G. y HESLOP-HARRISSON, J. (1977) Ribosomes, membranes and organelles during meiosis in angiosperms, Phil. Trans. Lond. B, 277, 327-342

DICKINSON, H.G. y SCELDOR, J.M. (1984) A radial system of microtubules extending between the nuclear envelope and the plasma membrane during early male haplophase in flowering plants. Planta, 161, 86-90

DUIJS, J.G., VOORRIPS, R.E., VISSER, D.L. y CUSTERS, J.B.M. (1992) Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*, 60, 45-55

DUNBAR, A. (1973) Pollen ontogeny in some species of *Campanulaceae*. A study by electron microscopy. *Bot Notiser*, 126, 277-315

DUNBAR, A. (1973) Pollen development in the *Elocharis palustris* group (Cyperaceae) I. Ultrastructure and ontogeny. *Bot Notiser*, 126, 197-254

DUNCAN, E.J. y HEBERLE-BORS, E. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma*, 173-177

DUNWELL, J.M. (1976) A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Environ Exp Bot*, 16, 109-118

DUNWELL, J.M. (1996) Microspore culture. En: *In vitro* haploid production in higher plants (Ed: S.M: Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux), 1, 205-216

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1973) Anther culture of *Solanum tuberosum*. *Euphytica*, 22, 317-323

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1974) Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* I. Early stages of culture. *J. Exp Bot*, 25, 352-361

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1974) Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* II. Changes associated with embryogenesis. *J. Exp Bot*, 25, 363-373

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1975) Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* III. The first sporophytic division. *J. Exp Bot*, 26, 240-252

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1976) Pollen ultrastructure in anther culture of *Datura innoxia* I. Division of the presumptive vegetative cell. *J. Cell. Sci*, 22, 469-480

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1976) Pollen ultrastructure in anther culture of *Datura innoxia* II. The generative cell wall. *J. Cell. Sci*, 22, 481-491

DUNWELL, J.M. y SUNDERLAND, N. (1976) Pollen ultrastructure in anther culture of *Datura innoxia* III. Incomplete microspore division. *J. Cell. Sci*, 22, 493-501

DUNWELL, J.M., CORNISH, M. y DE COURCEL, A.G.L. (1983) Induction and growth of "microspore-derived" embryo of *Brassica napus* ssp. *Oleifera*. *J. Exp. Bot*, 34, 1768-1778

EADY, C., LINDSEY, K. y TWELL, D. (1995) The significance of microspore division and division symmetry for vegetative cell-specific transcription and generative cell differentiation. *The Plant Cell*, 7, 65-74

ECHLIN, P. (1971) The ultrastructure and ontogeny of pollen in *Helleborus foetidus* L: IV. Pollen grain maturation. *J. Cell. Sci*, 11, 111-129

EKIZ, H. y KONZAK, C.F. (1991) Nuclear and cytoplasmic control of anther culture response in wheat. III. Common wheat crosses. *Crop Sci*, 31, 1432-1436

FAKAN, S. y HERNÁNDEZ-VERDUN, D. (1986). The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Bio. Cell*, 56, 189-206

FAN, Z., ARMSTRONG, K.C. y KELLER, W.A. (1988) Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L. *Protoplasma*, 147, 191-199

FRANKEL, R., IZHAR, S. y NITSEN, J. (1969) The timing of calose activity and cytoplasmic male sterility in *petunia*. *Biochem. Genet*, 3, 451-455

FERNANDEZ, H.A., BERTRAND, A. y SANCHEZ-TAMES, R. (1993) *In vitro* regeneration of *Asplenium nidus* L. from gametophytic and sporophytic tissue. *Sci Hortic*, 56, 71-77

GALLARD, A., VERGNE, P. y BECKERT, M. (1991) Optimization of maize microspore isolation and culture conditions for reliable plant regeneration. *Plant Cell Rep*, 10, 55-58

GAMBORG, O.L., MILLER, R.A. y OJIMA, L. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells. *Exp. Cell. Res*, 50, 151-158

GARRIDO, D., CHARVAT, B., BENITO MORENO, R.M., ALWEN, A., VICENTE, O. y HEBERLE-BORS, E. (1991). En: A laboratory guide for cellular and molecular plant biology. (Eds: Negrutiu I. and Gharti-Chhertri G.). Birkhäuser, Basel, 59-69

GARRIDO, D., ELLER, N., HEBERLE-BORS, E. y VICENTE, O. (1993) De novo transcription of specific mRNAs during the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex Plant Reprod*, 6, 40-45

GRAHAM, L.E. (1990) Meiosis formation in charophycean algae. En: Evolution and ontogeny. (Eds: Blackmore S., Knox R. B.) Academic Press, New York, 43-55

GRESSHOFF, P.M. y DOY, C.H. (1972) Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. *Aust. J. Biol. Sci*, 25, 259-264

GUHA-MUKHERJEE, S. (1973) Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J. Expt. Bot*, 24, 139-144

GUHA, S. y MAHESHWARI, S.C. (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature (London) 204,497

GUHA, S. y MAHESHWARI, S.C. (1966) Cell division and differentiation of embryoids in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature (London), 212, 97-98

GUPTA, S. (1975) Morphogenesis response of haploids callus tissue of *Pisum sativum*. Indian Agric, 19, 11-21

HAUSE, G. (1986) Organelle distribution during pollen development in *Pisum sativum* L. Biologisches Zentralblatt 105, 3 283-288

HE, D.G. y OUYANG, J.W. (1984) Callus and plantlet formation from cultures wheat anthers at different developmental stages. Plant Sci. Lett, 33, 71-79

HEBERLE-BORS, E. (1989) Isolated pollen culture in tobacco: plant reproductive development in a nutshell. Sex. Plant. Reprod, 2, 1-10

HEBERLE-BORS, E. (1981) Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. Protoplasma, 109, 249-255

HEBERLE-BORS, E. (1982) *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of the pollen donor plants. Planta, 156, 396-401

HEBERLE-BORS, E. y REINERT, J. (1977) Factors of haploid production by isolated cultures. Naturwis-senschaften, 64, 100-101

HEBERLE-BORS, E. y REINERT, J. (1979) Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: Dependence upon pollen development. Protoplasma, 99, 237-245

HEBERLE-BORS, E. y REINERT, J. (1980) Isolated pollen culture and pollen dimorphism. *Naturwissenschaften*, 67, 311

HEBERLE-BORS, E. y REINERT, J. (1981) Environmental control and evidence for predetermination of pollen plant formation *Nicotiana tabacum* pollen. *Protoplasma*, 109, 249-255

HESLOP-HARRISON, J. (1964) Cell walls, cell membranes and protoplasmic connections during meiosis and pollen development. *Polen Physiology and Fertilization*. (Ed: Linskens H.F.) North-Holland Publ. Amsterdam The Netherlands, 39-47

HESLOP-HARRISON, J. (1966) Cytoplasmic connections between angiosperms meiocytes. *Ann. Bot*, 30, 221-230

HESLOP-HARRISON, J. (1966) Cytoplasmic continuities during spore formation in flowering plants. *Endeavour*, 25, 65-72

HESLOP-HARRISON, J. (1968) Synchronous pollen mitosis and the formation of generative cell in massulate *orchids*. *J Cell Sci* 3, 457-466

HESLOP-HARRISON, J. (1979) Pollen walls as adaptative systems. *Ann. Missouri Bot. Gard*, 66, 813-829

HENRY, Y. y DE BUYSER J. (1981) Float culture of wheat anthers. *Theor Appl Genet*, 60, 77-79

HOEKSTRA, S., VAN ZIJDERVEILD, M.H., HEIDENKAMP, I. y VANDER MARK, I. (1993) Microspore culture of *Hordeum vulgare* L. The influence of density and osmolarity. *Plant Cell Rep*, 12, 661-663

HORNER, M. y SREET, H.E. (1978) Pollen dimorphism origin and significance in pollen plant formation by anther culture. *Ann Bot*, 42, 763-771

HU, T. y KASHA, K.J. (1999) A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome*, 42, 432-441

HUANG, B. (1982) Developmental studies of anther cultures of *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. Ph D Thesis. Univ East Anglia, Norwich, UK

HUANG, B. (1986) Ultrastructural aspects of pollen embryogenesis in *Hordeum*, *Triticum* and *Paeonia*. En: Haploids of higher plants in vitro. (Eds: H.Han and Y. Hongyuang). China Acad. Publ. Beijing, 91-117

HUANG, B.C. y YEOMAN, M.M. (1984) Callus proliferation and morphogenesis in tissue cultures of *Arabidopsis thaliana* L. *Plant.Sci. Lett.* 33, 353-363. **MARTON, L. y BROWSE, J.** (1991) Facile transformation of *Arabidopsis* *Plant Cell Rep*, 10, 235-239

HUYGHE, C. (1990) Les cultures *in vitro* chez les légumineuses à grosses graines. *Agronomie*, 10, 29-49

IMAMURA, J. y HARADA, H. (1980) Effect of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol*, 100, 285-289

IMAMURA, J. y HARADA, H. (1980) Stimulatory effects of reduced atmospheric pressure on pollen embryogenesis. *Naturwissenschaften*, 67, 357-357

IQBAL, M.C.M., MOLLERS, C y ROBBELEN, G. (1994) Increased embryogenesis after colchicine treatment of microspore cultures of *Brassica napus*. *J. Plant Physiol*, 143, 222-226

- IYER, R.D. y RAINA, S.K.** (1972) The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. *Planta*, 104, 146-156
- IZHAR, S. y FRANKEL, R.** (1971) Mecanism of male sterility in *petunia* II. Free amino acids in male fertile and male sterile anthers during microsporogenesis. *Theor Appl Genet*, 43, 13-17
- JAHNE, A. y LORZ, H.** (1995) Cereal microspore culture. *Plant Sci*, 109, 1-12
- JOHNSON, J.M.** (1969) A study of nucleolar vacuoles in cultured tobacco cells using radioautography, actinomycin D and electron microscopy. *J. Cell. Biol*, 43, 197-206
- KALTCHUK-SANTOS, E., BODANESE ZANETTINI, M. H. y MUNDSTOCK, E.** (1993) Pollen dimorphism in soybean. *Protoplasma*, 174, 74-78
- KAMEYA, T. y HINATA, H.** (1970) Induction of haploid plant from pollen grains of *Brassica*. *Jpn. J. Breed*, 20, 82-87
- KARNOVSKY, M.J.** (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use en electron microscopy. *J Cell Biol*, 27, 137A-137B
- KEATHLEY, D.E. y SCHOLL, R.L.** (1982) Culture of *Arabidopsis thaliana* anthers on liquid medium. *Z. Pflanzenphysiol*, 106, 199-212
- KELLER, W.A. y ARMSTRONG, K.C.** (1978) High frequency production of microspore derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzenphysiol*, 80, 100-108
- KELLER, W.A. y ARMSTRONG, K.C.** (1979) Stimulation of embryogenesis in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. *Theor Appl Genet*, 55, 65-67

KELLER, W.A. y ARMSTRONG, K.C. (1983) Production of haploid via anther culture in *Brassica oleracea* var. Italica. *Euphytica*, 32, 151-159

KELLER, W.A., ARMSTRONG, K.C. y DE LA ROCHE, I.A. (1983) The production and utilization of microspore derived haploids in *Brassica* crops. En: *Plant Cell Culture in Crop Improvement*. (Eds: S. K. Sen and K. L. Giles). Plenum Publishers. New York, 169-183

KELLER, W.A., ARNISON, R.G. y CARDY, B.P. (1987) Haploids from gametophytic cells-recent developments and future prospects. En: *Plant Tissue and Cell Culture*. (Eds: C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett and D. D. Biesboer). A. R. Liss, New York, 223-241

KESSEL, R.H.J. y CARR, A.H. (1972) The effect of dissolved oxygen concentration and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J. Exp. Bot*, 23, 996-1007

KITTO, S.L. (1992) Identification of embryoid-abundant genes that are temporally expressed during pollen embryogenesis in wheat anther cultures. *Physiol plant*, 100, 1744-1750

KNOX, R.B. (1984) The pollen grain. En: *Embryology of angiosperms* (Ed: Johri B.M.) Berlin and Heidelberg: Springer and Verlag, 197-271

KNOX, R.B. y DUCKER, S.C. (1991) The evolution of gametes from motility to double fertilization. En: *Pollen and spores*. (Eds: Blackmore S., Barnes S. H.). Clarendon Press, Oxford, 44, 345-361

KOHLLENBACH, H.W. y WERNICKE, W. (1978) Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. *Z. Pflanzenphysiol*, 86, 463-472

- KOTT, L.S. y KASHA, K.J.** (1984) Initiation and morphological development of somatic embryoids from barley cell cultures. *Can. J. Bot.*, 62, 1245-1249
- KOUL, A.K. y KARIHALOO, J.L.** (1977) *In vivo* embryoids from anthers of *Narcissus biflorus*. *Curt. Euphytica*, 26, 97-102
- KUANG, A. y MUSGRAVE, M.E.** (1996) Dynamics of vegetative cytoplasm during generative cell formation and pollen maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma*, 194, 81-90
- KUHLMANN, V., FOUROUGHI-WEHR, B., GRANER, A. y WENZEL, G.** (1991) Improved culture system for microspores of barley to become a target for DNA uptake. *Plant Breed.*, 107, 165-168
- KYO M. y HARADA H.** (1985) Studies on conditions for cell division and embryogenesis in isolated pollen culture of *Nicotiana rustica*. *Plant Physiol.*, 79, 89-94
- KYO, M. y HARADA, H.** (1986) Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro*. *Planta*, 168, 427-432
- KYO, M. y HARADA, H.** (1990) Specific phosphoproteins in the initial period of tobacco pollen embryogenesis. *Planta*, 182, 58-63
- KYO, M. y OHKAWA, H.** (1991) Investigation of subcellular localization of several phosphoproteins in embryogenic pollen grains of tobacco. *J. Plant Physiol.*, 137, 525-529
- LATTER, J.** (1926) The pollen development of *Lathyrus odoratus*. *Ann. Bot.*, 40, 227-314

- LAZAR, M.D., BAENZIGER, P.S. y SCHAEFFER, G.W.** (1984) Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*T. aestivum* L.) anther cultures. *Theor. Appl. Genet*, 68, 131-134
- LICHTER, R.** (1981) Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol*, 103, 229-238
- LICHTER, R.** (1982) Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol Bd*, 105, 427-434
- LYNDON, R.F.** (1990) The problems of development: embryogenesis. En: *The Cellular Basis*. (Eds: Black M., Chapman J.). Unwin Hyman, London, 3-16
- LYNE, R.L., BENNET, R.I. y HUNTER, C.P.** (1986) Embryoid and plant production from cultured barley anthers. En: *Plant tissue culture and its agricultural applications* (Ed: L.A. Winthers y P.G. Anderson) Butterworths, London, 405-411
- MAHESHWARI, S.C., TYAGI, A.K., MALHOTRA, K. y SOPORY, S.K.** (1980) Induction of haploids from pollen grains in angiosperms - the current status. *Theor Appl Genet*, 58, 193-206
- MAHESHWARI, S.C., RASCHID, A. y TYAGI, A.K.** (1982) Haploids from pollen grains- Retrospect and prospect. *Am.J.Bot*, 69, 865-879
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. y SAMBROOK, J.** (1982) En: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- MARSOLAIS, A.A., SEGUIN-SWARTZ, G. y KASHA, K.J.** (1984) The influence of anther cold pretreatments and donor plant genotypes on *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 3, 69-79

MARTENSSON, B. y WIDELL, S. (1993) Pollen from cold-treated *Nicotiana tabacum* buds: embryogenic capacity, peroxidase activity and partitioning in aqueous two-phase system. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 35, 141-149

MEINS, F.J.R. (1986) Determination and morfogenetic competence. En: *Plant cell culture technology*. (Ed: Yeoman M. M.). Blackwell, Oxoford, Botanical monographs, 23, 7-26

MIAO, S., KUO, C., KWEI, Y., SUN, A., KU, S., LU, W., WANG, Y., CHEN, M., WU, M. y HANG, L. (1978) Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. En: *Proceedings of simposium on plant tissue culture*. Peking: Science Press, 23-33

MEJZA, S.J., MORGANT, V., DIBONA, D.E. y WONG, J.R. (1993) Plants regeneration from isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Rep*, 12, 149-153

MLODZIANOWSKI, F. y IDZOKOWSKA, K. (1978) Fine sructure of plastdis during androgenesis in *Hordeum vulgare* L. *Acta Soc Bot Pol*, 49, 205-210

MORDHORST, A.P., VOERMAN, K.J., HARTOG, M.V., MEIJER, E.A., VAN WENT, J., KOORNNEEF, M. y DE VRIES, S. (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* 149, 549-563

MORENO DIAZ DE LA ESPINA, S., MEDINA, F.J. y RISUEÑO, M.C. (1980) Correlation between nucleolar activity and nucleolar vacuolation in plant cells. *Eur. J. Cell. Biol*, 22, 724-729

MORRISSON, R.A. y EVANS, D.A. (1988) Haploid plants from tissue culture; new plant varieties in a shortened time frame. *Biotechnology*, 6, 684-690

MURASHIGE, T. y SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-497

MYERS, J.R., GRITTON, E.T. y STRUCKMEYER, B.E. (1992) Genetic male sterility in the pea (*Pisum sativum* L.) : II. Cytology. *Euphytica* 63,3, 245-256

NAKAMURA ,S. y MIKI-HIROSIGE, H. (1985) Fine-structural study on the formation of the generative cell wall and intine-3 layer in a growing pollen grain of *Lilium longiflorum*. *Am. J. Bot.* 72, 365-375

NAKATA, K. y TANAKA, M. (1968) Differentiation of embryoids from developing germ cell in anther culture of tobacco. *Japanese J. Genet.* 43, 67-71

NITSCH , J.P. (1972) Haploid plants from pollen. *Z. Pflanzenzuchtg.* 67, 3-18

NITSCH, C. (1974) La culture de pollen sur mileur synthèque. *C.R. Acad Sci. Paris*, 278, 1031-1034

NITSCH, J.P. y NITSCH, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85-87

NITSCH, C. y NORREEL, B. (1973) Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura* cultivé dans l'anthere ou isolé de l'anthere. *C.R. Acad Sci. Paris*, 276, 303-306

NITSCH, C. (1975) Single cell culture of a haploid cell the microspore. En: *Genetic manipulations with plant material* (Ed: L.Ledoux). Plenum Press, New Yok/London, 297-310

- OLMEDILLA, A., ALCHE, J.D. y RODRÍGUEZ-GARCÍA, M.I.** (1997) Nucleolar evolution and coiled bodies during meiotic prophase in *Olea europaea*: differential localization of nucleic acids. *Eur. J. Cell Biol.* 74, 181-189
- OLSEN, F.L.** (1991) Isolation and cultivation of embryogenic microspores from barley (*Hordeum vulgare* L.) *Hereditas*, 115, 255-266
- OSOLNICK, B., BOHANEC, B. y JELASKA, S.** (1993) Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32, 241-246
- OUYANG, T.** (1986) Induction of pollen plants in *Triticum aestivum* L. En: Haploids of higher plants *in vitro*. (Eds: H.Han and Y. Hongyuang). China Acad. Publ. Beijing, 26-41
- OUYANG, T., HU, H., CHUANG, C. y TSENG, C.** (1973) Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Scientia Sinica*, 16, 79-95
- OWEN, H.A. y MAKAROFF, C.A.** (1995) Ultrastructure of microsporogenesis y microgametogenesis in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. ecotipe Wassilewskija (*Brassicaceae*). *Protoplasma*, 185, 7-21
- PACINI, E.** (1990) Tapetum and microspore function. En: Microspores: evolution and ontogeny. (Eds: S. Blackmore and R. B. Knox). Academic Press, London, 213-237
- PACINI, E. y FRANCHI, G.C.** (1988) Amylogenesis and amyolysis during pollen grain development. En: Sexual Reproduction in Higher Plants, (Eds: M. Cresti, P. Gori and E. Pacini). Springer-Verlag, Berlin, 181-186
- PACINI, E. y JUNIPER, B.** (1979) The ultrastructure of pollen grain development in the olive (*Olea europaea*) I: Proteins in the pore. *New phytologist*, 83, 157-163

PACINI, E. y JUNIPER, B. (1984) The ultrastructure of pollen grain development in *Lycopersicum peruvianum*. *Caryologia*, 37, 157-163

PALMER, C.E., KELLER, W.A. y ARRUSON, P.G. (1996) Experimental haploidy in *Brassica* species. En: *In vitro* haploid production in higher plants. (Eds: Jain S. M., Sopory S. K. And Veilleux R. F.). Kluwer, Dordrecht, 2, 143-171

PAN, C. y KAO, K. (1978) The production of wheat pollen embryo and the influence of some factors on its frequency of induction. En: Proceedings of symposium of plant tissue culture. Peking: Science Press, 133-142

PAXON-SOWDERS, D.M., OWEN, H.A. y MAKARROF, C.A. (1997) A comparative ultrastructural analysis of exine pattern development in wild-type *Arabidopsis* and mutant defective in pattern formation. *Protoplasma*, 198, 53-65

PECHAN, P.M. y KELLER, W.A. (1988) Identification of potentially embryogenic microspores in *Brassica napus*. *Physiol. Plant*, 74, 377-384

PECHAN, P.M., BARTELS, D., BROWN, D.C.W. y SCHELL, J. (1991) Messenger-RNA and protein changes associated with induction of *Brassica* microspore embryogenesis. *Planta*, 184, 161-165

PELLETIER, G. y LLAMI, M. (1972) Les facteurs de l'androgénèse *in vitro* chez *Nicotiana tabacum*. *Z. Pflanzenphysiol*, 68, 97-114

PESCITELLI, S.M., JOHNSON, C.D. y PETOLINO, J.F. (1990) Isolated microspore culture of maize: effects of isolation technique, reduced temperature and sucrose level. *Plant Cell rep*, 8, 628-631

PICARD, E. y DE BUYSER, J. (1975) Nouveaux résultats concernant la culture d'anthères *in vitro* de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Effects d'un choc thermique et de la position de l'anthère dans l'épi. C. R. Acad. Sci. Paris, 281, 127-130

PRAKASH, J. y GILES, K.L. (1992) Induction and growth of androgenic haploids. Int Rev Cytol, 107, 273-292

PRETOVA, A., DE RUIJTER, N.C., VAN LAMMEREN, A.A.M. y SCHEL, J.H.N. (1993) Structural observations during androgenic microspore culture of the 4cl genotype of *Zea mays* L. Euphytica, 65, 61-69

QUIMIO, C.A. y ZAPATA, F.J. (1990) Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. Crop Sci, 30, 188-192

RAQUIN, C., AMSSA, M., HENRY, Y., DE BUYSER, J. y ESSAD, S. (1982) Origine des plantes poliploides obtenues par culture d'anthères. Analyse cytophotométrique *in situ* et *in vitro* des microspores de *Petunia* et blé tendre. Z. Pflanzenzuchtg, 124, 80-86

RASHID, A., SIDDIQUI, A.W. y REINERT, J. (1981) Ultrastructure of embryogenic pollen of *Nicotiana tabacum* var. *Badisher burley*. Protoplasma, 107, 375-385

RASHID, A. (1983) pollen dimorphism in relation to pollen plant formation. Physiol. Plant, 58, 544-548

RAGHAVAN, V. (1976) Role of the vegetative cell in androgenesis in henbane. Science, 191, 388-389

RAGHAVAN, V. (1976) Experimental embryogenesis in Vascular plants. London: Academic press

RAGHAVAN, V. (1977) Patterns of DNA synthesis during pollen embryogenesis in henbane. *J. Cell Biol*, 73, 521-526

RAGHAVAN, V. (1977) Applied aspects of embryo culture. En: Applied and fundamental aspects of plants cell, Tissue and organ culture. (Eds: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj). Berlin: Springer-Verlag, 375-397

RAGHAVAN, V. (1978) Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anthers segments of *Hyoscyamus niger* (henbane). *Am. J. Bot*, 66, 36-39

RAGHAVAN, V. (1986) Pollen embryogenesis. En: Embryogenesis in angiosperms. (Ed: P.W.Barlow, P.B. Green and C.C.Wylie) Cambridge University Press, 152-188

RAGHAVAN, V. (1990) From microspore to embryoid: faces of the angiosperm pollen grain. En: Progress in plant cellular and molecular biology. (Eds: Nijkamp H. I. J., van der Plaas L. H. W. And van Aartij K.). Kluwer, Dordrecht, 407-409

RAGHAVAN, V. y NAGMANI, R. (1989) Cytokinin effects on pollen embryogenesis in cultured anthers of *Hyoscyamus niger*. *Can. J. Bot*, 67, 247-257

RAINA, S.K. y IYER, R.D. (1982) Honey-induced pollen embryogenesis in anther culture of *Datura metel*. *Experientia*, 38, 358-359

RAMMANA, M.S. (1974) The origin and *in vivo* development of embryoids in the anthers of *Solanum* hybrids. *Euphytica*, 23, 623-632

RAMANNA, M.S. y HERMSEN J.G.T. (1974) Embryoid formation in the anthers of some interspecific hybrids. *Euphytica*, 23, 423-427

RASKA, I. OCHS, R.L. y SALAMIN-MICHEL, L. (1990) Immunocytochemistry of the cell nucleus. *Electron Micros Rev*, 3, 301-353

RASKA, I., DUNDR, M. y KOBERNA, K. (1992) Structure-function subcompartments of the mammalian cell nucleus as revealed by electron microscopy affinity cytochemistry. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 771-789

RASKA, I. (1995) Nuclear ultrastructure associated with the RNA synthesis and processing. *J. Cell Biochem.* 59,11-26

REGAN, S.M. y MOFFATT, B.A. (1990) Cytochemical analysis of pollen development in wild-type *Arabidopsis* and a male-sterile mutant. *Plant cell*, 2, 877-889

REINERT, J. y BAJAJ, Y.P.S. (1977) Anther culture: Haploid production and its significance. En: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. (Ed: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj) Berlin: Springer-Verlag, 251-267

REYNOLDS, T.L. (1990) Ultrastructure of pollen embryogenesis. En: Biotechnology in agriculture and forestry. (Ed: Y.P. S. Bajaj). Springer, 2, 66-83

REYNOLDS, T.L. (1993) A cytological analysis of microspores of *Triticum aestivum* (*Poaceae*) during normal ontogeny and induced embryogenic development. *Am. J. Bot.* 80 (5), 569-576

RISUEÑO, M.C. y MEDINA, F.J. (1986) The nucleolar structure in plant cells. *Rev. Biol. Cell*, 7, 1-163 Serv. Edit. Univ. Pais vasco. Bilbao. Spain

ROBETS-OEHLISCHLAGER, S. y DUNWELL, J.M. (1990) Barley anther culture: Pretreatment on mannitol stimulates production of microspore-derived embryos. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 20, 235-240

RODRIGUEZ-GARCIA, M.I. y FERNANDEZ, M.C. (1987) Cytoplasmic nucleoloids during microgametogenesis in *Olea europaea* L. *Biology of the cell*, 60, 155-160

ROSE, R.J., SETTERFIELD, G y FOWKE, L.C. (1972) Activation of nucleoli in tuber slides and the function of nucleolar vacuoles. *Exp. Res*, 71, 1-16

SAMBROOK, J. FRITSCH, E.F., y MANIATIS, T. (1989) En: *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

SANGWAN, R.S. (1981) Etude histologique, biochimique et cytologique de l'induction et du développement du pollen androgénétique chez quelques espèces de *Solanacées* (principalement le *Datura metel* L.). Thèse d'état, Université de Paris VII, Paris.

SANGWAN, R.S. y CAMEFORT, H. (1982) Ribosomal bodies specific to both pollen and zygotic embryogenesis in *Datura*. *Experientia*, 38, 395-397

SANGWAN, R.S. y CAMEFORT, H. (1983) The tonoplast, a specific marker of embryogenic microspores of *datura* cultured *in vitro*. *Histochemistry*, 78, 473-487

SANGWAN, R.S. y CAMEFORT, H. (1984) Cold-treatment related structural modifications in the embryogenic anthers of *Datura*. *Cytologia*, 473-487

SANGWAN, R.S. y NORREEL, B.S. (1975) Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro*. *Nature (London)*, 257, 222

SANGWAN- NORREEL, B.S. (1977) Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* Mill. *J. Expt. Bot*, 28, 843-852

SANGWAN, R.S. y NORREEL, B.S. (1980) Biochemical and structural aspects of induction and development of pollen embryos in *Datura*. *Bull Soc Bot Fr*, 127(3/4), 109-122

SANGWAN, R. S. y NORREEL, B.S. (1987) Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and nonandrogenic plants. *Protoplasma*, 138, 11-22

SANGWAN, R.S. y NORREEL, B.S. (1996) Cytological and biochemical aspects of *in vitro* androgenesis in higher plants. En: *In Vitro* production of higher plants. (Eds: S. M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux. Kluwer Acad. Press, 1, 95-109

SHARP, W.R., RASKIN, R.S. y SOMMER, H.E. (1972) The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. *Planta*, 104, 357-361

SCHOLL, R.L. y AMOS, J.A. (1980) Isolation of doubled haploid plants through anther culture. *Z. Pflanzenphysiol*, 96, 407-414

SEBANEK, J. (1991) Concrete examples of leaf atavism. En: *Experimental morfogenesis and integration of plants.* (Eds: Sebánek J., Sladky Z., Prochazca S., Kutáček M., Luxova M., Erdelské O.). Elsevier, Amsterdam, *Development in crop science*, 18, 361-364

SHARP, W.R., RASKIN, R.S. y SOMMER, H.E. (1972) The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. *Planta (Berl.)*, 104, 357-361

SHIVANNA, K.R. y JOHRI, B.M. (1985) *The angiosperm pollen, structure and function.* New Delhi, Bangalore, Bombay: Wiley Eastern Limited.

SINGH, M., BHALLA, P.L. y MALIK, C.P. (1979) Peroxidase localization during embryogenesis in *Tropaeolum majus*. *Phytomorphology*, 29, 306-309

SLADKY, Z. (1991) Phylogenetic recapitulation and Haeckel's biogenetic law. En: *Experimental morfogenesis and integration of plants.* (Eds: Sebánek J., Sladky Z., Prochazca S., Kutáček M., Luxova M., Erdelské O.). Elsevier, Amsterdam, *Development in crop science*, 18, 359-360

SOPORY, S.K. (1972) Physiology and development of pollen embryoids in *Datura innoxia* Mill. Ph. D. Thesis, University of Delhi, Delhi, India.

SOPORY, S.K. (1977) Development of embryoids in isolated pollen culture of dihaploid *Solanum tuberosum*. Z. Pflanzenphysiol, 84, 453-457

SOPORY, S.K. y MAHESHWARI, S.C. (1976) Development of pollen embryoids in anther culture of *Datura innoxia*. I. General observations and effects of physical factors. J. Exp Bot, 27, 49-57

SOPORY, S.K., JACOBSEN, E. y WENZEL, G. (1978) Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultures anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Sci. Lett, 12, 47, 54

SOPORY, S.K. y MAHESHWARI, S.C. (1976) Development of pollen embryoids in anther culture of *Datura innoxia*. II. Effects of growth hormones. J. Exp Bot, 27, 58-68

SOPORY, S. K. y MUNSHI, M. (1996) 9. Anther culture. En: *In vitro* haploid production in higher plants. (Ed: S.M. Jain, S.K. Sopory and R.E. Veilleux) vol 1, 145-175

STANLEY, R.G. y LINSKENS, H.F. (1974) Pollen. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York.

STEWART, W.N. y ROTHWELL, G.W. (1993) Paleobotany and the evolution of plants. Cambridge university Press, Cambridge.

SUN, C. (1978) Androgenesis of cereal crops. En: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Peking: Science Press, 117-123.

SUNDERLAND, N. (1971) Anther culture: A progress report. Sci. Prog. (Oxford), 59, 527-549

SUNDERLAND, N. (1973) Pollen and anther culture. En: Plant tissue and cell culture (Ed: Ist, H.E. Street) Berkley: University of California Press. 205-239

SUNDERLAND, N. (1974) Anther culture as means of haploid induction. En: Haploids in higher plants, advances and potential (Ed: K.J.Kasha) Univ. Of Guelph. Guelph, 91-122

SUNDERLAND, N. (1978) Strategies in the improvement of yield in anther culture. En: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, 65-86

SUNDERLAND, N. (1982) Induction of growth in the culture of pollen. En: Differentiation *in vitro*. British Society for cell Biology Simposium 4 (Ed: M.M. Yeoman and D.E.S. Truman). Cambridge University press, 1-24

SUNDERLAND, N., COLLINS, G.B. y DUNWELL, J.M. (1974) The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* mill. Planta, 117, 227-241

SUNDERLAND, N. y DUNWELL, J.M. (1977) Anther and pollen culture. En: Plant Tissue and Cell Culture (Ed: IInd y H.E. Street). Berkley: University of California Press, 223-265

SUNDERLAND, N. y EVANS, L.J. (1980) Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. II. The A, B, and C pathways. J. Expt. Bot, 31, 501-514

SUNDERLAND, N. y ROBERTS, M. (1977) New approach to pollen culture. Nature (London), 270, 236-238

SUNDERLAND, N. y WICKS, F.M. (1971) Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. J. ExpBot, 22, 213-226

TAKAHATA Y. y KELLER W. A. (1991) High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. *Plant Sci*, 74, 235-242

TELMER, C.A., SIMMONDS, D.H. y NEWCOMB, W. (1992) Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores culture in *Brassica napus*. *Physiol Plant*, 84,417-424

TELMER, C.A., NEWCOMB, W. y SIMMONDS, D.H. (1993) Cellular changes during heat shock induction and embryo development of cultured microspores of *Brassica napus* cv., Topas. *Protoplasma*, 185, 106-112

THIERY, J.P. (1967) Mise en evidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc. (Paris)*, 6, 987-1018

TROTTIER, M.C., COLLINS, J. y COMEAU, A. (1993) Comparison of media for their aptitude in wheat anther culture. *Plant Cell Tissue Organ cult*, 35, 59-67

TOURAEV, A., VICENTE, O. y HEBERLE-BORS, E. (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Plant Science*, 2, 297-302

TOURAEV, A., INDRIANTO, A., WRATSCHKO, I., VICENTE, O. y HEBERLE-BORS, E. (1996) Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sex. Plant. Reprod*, 9, 209-215

TOURAEV, A., PFOSSER, M., VICENTE, O. y HEBERLE-BORS, E. (1996) Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: Towards a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200, 144-152

TYAGI, A.K., RASHID, A y MAHESHWARI, S.C. (1979) High frequency production of embryo in *Datura innoxia* from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial culture of anthers in liquid medium. *Protoplasma*, 99, 11-17

VAN AELEST, A.C., PIERSON, E.S., VAN WENT, J.L. y CRESTI, M. (1993) Ultrastructural changes of *Arabidopsis thaliana* pollen during final maturation and rehydration. *Zygote*, 1, 173-179

VAN LAMMEREN, A.A.M., KEIJZER, C.J., WILLEMSE, M.T.M. y KIEFT, H. (1985) Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria verrucosa* (Mill) H. Duval. *Planta*, 165, 1-11

VASIL, I. (1980) Androgenetic haploids. *Int. Rev. Cytol. Suppl. IIA*, 195-223

VASIL, I.K. y NITSCH, C. (1975) Experimental production of pollen haploids and their uses. *Z. Pflanzenphysiol*, 76, 191-212

VAZART, B. (1973) Formation d'embyoides á partir de microspores de tabac: Evolution de l' infrastructure des cellules au cours de la première semaine de culture des anthères. *Cell Morphologie*, 243-260

VERGNE, P., DELVALLEE, I. y DUMAS, C. (1987) Rapid assesment of microspore and pollen development stage in wheat and maize using DAPI and membrane permeabilization. *Stain Tech*, 62, 299-304

VERHULST, J. (1996) Atavism in *Homo sapiens*: a bolian heterodoxy revisited. *Sex Plant Reprod*, 9, 209-215

VICENTE, O., BENITO MORENO, R.M. y HEBERLE-BORS, E. (1991) Pollen culture as a tool to study plant development. *Cell. Biol. Rev*, 25, 295-305

VICENTE, O., GARRIDO, D., ZARSKY, V., ELLER, N., RIHOVA, L., BERENYI, M., TUPY, J. y HEBERLE-BORS, E. (1992) Induction of embryogenesis in isolated

pollen cultures of tobacco. En: Angiosperm pollen and ovules. (Eds: E. Ottavino, D. L. Mulcahy, M. Sari Gola and G. Bergamini Mulcahy). Springer-Verlag, Berlin, 279-284

WATERKEYN, L. y BIENFAIT, A. (1971) On a possible function of the callosic special wall in *Ipomoea purpurea* L. Roth Grana, 10, 13-20

WEI, Z.M. (1982) Pollen callus culture in *Triticum aestivum* L. Theor. Appl. Genet, 63, 71-73

WNZEL, G., HOFFMANN, F., POTRYKUS, I. y THOMAS, E. (1975) The separation of viable rye microspores from mixed populations and their development in culture. Mol. Gen. Genet, 138, 293-297

WERNICKE, W. y KOHLENBACH, H.W. (1976) Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol, 79, 189-198

WILLEMSE, M.T.M. y REZNICKOVA, S.A. (1980) Formation of pollen in the anther of *Lilium*. Development of the pollen wall. Acta Bot. Neerl, 29, 127-140

WILLEMSE, M.T.H y KEIJZER, C.J. (1990) Tracing pollen nuclei in the ovary and ovule of *Gasteria verrucosa* Mill. H. Duval after pollination with DAPI-stained pollen. Sex Plant Reprod, 3, 219-224

WILSON, H.M., MIX, G. y FOROUGH-WEHR, B. (1978) Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. J. Expt Bot, 29, 227-238

XU, Z.H., HUANG, B. y SUNDERLAND N. (1981) Culture of barley anthers in conditioned media. J. Expt Bot, 32, 767-778

YANISCH-PERRON, C., VIERA, J. y MESSING, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC9 vectors. *Gene* 33, 103-109

ZAKI, M.A.M. y DICKINSON, H.G. (1990) Structural changes during the first divisions of embryos resulting from anther and free microspore culture in *Brassica napus*. *Protoplasma*, 149-162

ZAKI, M.A.M. y DICKINSON, H.G. (1991) Microspore-derived embryos in *Brassica*: The significance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. *Sex Plant Reprod*, 4, 48-55

ZAPATA, F.J., ALDEMITA, R.R., TORRIZO, A.U., NOVERO, A.U., RAINA, S.K. y ROLA, R.R. (1986) Anther culture of Basmati 370 at IRRI. B. Effect of glucose in anther culture of irradiated Basmati 370. *Int. Rice Res. Newsl*, 11(4), 22-23

ZARSKY, V., RIHOVA, L. y TUPY, J. (1990) Biochemical and cytological changes in young tobacco pollen during *in vitro* starvation in relation to pollen embryogenesis. En: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. (Eds: H. J. J. Nijcamp, L. H. W. Van der Plas and J. van Aartrijk). Kluwer, Dordrecht, 228-233

ZARSKY, V., GARRIDO, D., RIHOVA, L., TUPY, J., VICENTE, O. y HEBERLEBORS, E. (1992) Derepression of the cell cycle by starvation is involved in the induction of tobacco pollen embryogenesis. *Sex. Plant. Reprod*, 5, 189-194

ZEHNBAUER, A. y VOGELSTEIN, B. (1985) Supercoiled loops and the organization of replication and transcription in eukaryotes. *Bioessays*, 2, 52-54

ZHAO, J.P., SIMMONDS, D.H. y NEWCOMB, W. (1996) Induction of embryogenesis with colchicine instead of heat in microspores of *Brassica napus* L. cv. Topas. *Planta*, 198, 433-439

ZIMMERMAN, J.L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5, 1411-1423

ZIAUDDIN, A., MARSOLAIS, A., SIMION, E. y KASHA, K.J. (1992) Improved plant regeneration from wheat anther and barley microspore culture using phenylacetic acid (PAA). *Plant Cell Rep*, 11, 489-498